MICROBIOLOGY
LAC.8

زراعة الاحياء المجهرية

Bacterial Culture Medium and Culture Technique

Manoj Mehta

Msc.clinical microbiology

زراعة الاحياء المجهرية
Cultivation of Microorganism

ان الغرض الرئيسي في تحضير أي وسط زرعي للاحياء المجهرية هو تزويد الاحياء بخليط متوازن للمواد التي تحتاجها الخلايا وبتراكيز تسمح للنمو حيث ان زيادة تركيز أي مادة سيؤدي الى:

١- ان الوسط يصبح مثبط اوسام لان العديد من المواد المغذية تنقلب الى مواد مانعة للنمو.

٢- اذا حدث النمو في الوسط الزرعي عالي التركيز فان الطبيعة البيئية ستتغير نتيجة الفعاليات الايضية للاحياء المجهرية النامية فتصبح هذه البيئة غيرمناسبة وتتغير الحالة الفسلجية لهذه الاحياء او قد تموت. وقد يكون هذا سبب التغير الشديد في تركيز ايون الهيدروجين او بتجمع المواد العضوية السامة او لنفاذ الاوكسجين في حالة الاحياء الهوائية الاجبارية.

تحضير الوسط الزرعي

يعتمد تحضير الوسط الزرعي على:

1	2
اضافة مصدر كاربوني ونتروجين ومصدر طاقة وعوامل نمو خاصة	اضافة الفلزات المهمة التي تناسب أي كائن مجهري

ان الاوساط الزرعية قد تكون بسيطة المكونات او معقدة فمثلا الاوساط الزرعية التي تستعمل لتنمية الاحياء ذاتية التغذية تكون بسيطة عادة وذلك لقدرتها على بناء التراكيب المعقدة لخلاياها من مواد بسيطة بعض الاملاح غير العضوية وماء ومصدر نتروجين و (co2)في حين تكون بعض الاحياء نحسة او شرهة Fastidious تحتاج عادة الى اوساط معقدة التركيب لنموها وذلك لعدم قدرتها على تصنيع تراكيبها

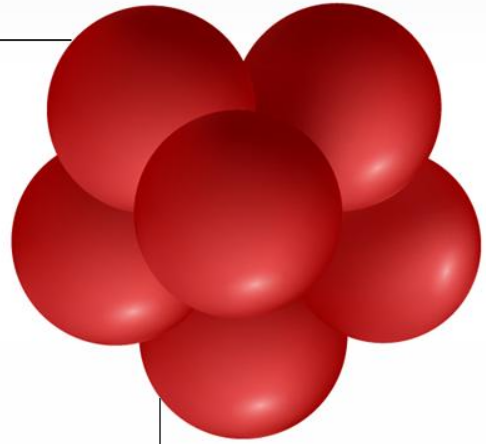
ان حاجة البكتريا الى المصادر الغذائية تختلف حسب الفعاليات الحيوية التي تقوم بها البكتريا لكن جميعها تحتاج الى الماء والذي يشكل نسبة 80%من حجم ووزن البكتريا

تقسيم الاوساط الزرعية

تقسم الاوساط الزرعية الى:

١- **الوسط الصناعي Synthetic medium:** وهو الوسط الزرعي المعروف مكوناته الكيمياوية نوعاً وكماً.

٢- **الوسط المعقد Complex Medium:** وهو الوسط الزرعي الذي لاتعرف مكوناته الكيمياوية نوعاً وكماً وذلك بأضافة بعض المواد مثلاً خلاصة اللحم او خلاصة الخميرة لتزويد الوسط الزرعي بالمركبات الكيمياوية العضوية واللاعضوية المختلفة.



تقسيم الاوساط حسب مكوناتها من الاملاح غير العضويةInorganic Salt

١- الوسط الاول: يحتوي على كلوريد الامونيوم NH4CLفقط ويخلو من المصدر الكاربوني. وهذا الوسط يلائم البكتريا ذاتية التغذية مثل بكتريا النايتروجين Nitrosomanas التي تحصل على الكاربون من co2اما الطاقة من الاكسدة الهوائية للامونيا.

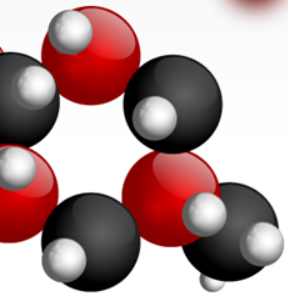
٢- الوسط الثاني: يحتوي هذا على سكر الكلوكوز و NH4CLيصلح هذا الوسط لبكتريا والفطريات لان الكلوكوز يعد مصدر للكاربون والطاقة اما البكتريا اللاهوائية فتحصل على طاقتها من عملية التخمر.

٣- الوسط الثالث: يحتوي على فيتامين وهو Nicotinic acid اضافة سكر الكلوكوز و NH4CLوينمو في هذا الوسط الاحياء التي تحتاج الى الفيتامينات مثل بكتريا ***Proteus vulgaris***

٤- الوسط الرابع: وهو وسط معقد يحتوي على (Yeast extract)والسكر يستعمل لتنمية الاحياء الكيمياوية المتباينة التغذية الهوائية واللاهوائية. ان مستخلص الخميرة (Yeast extract)يزود الوسط الزرعي بالمواد النايتروجينية فضلاً عن معظم عوامل النمو العضوية.

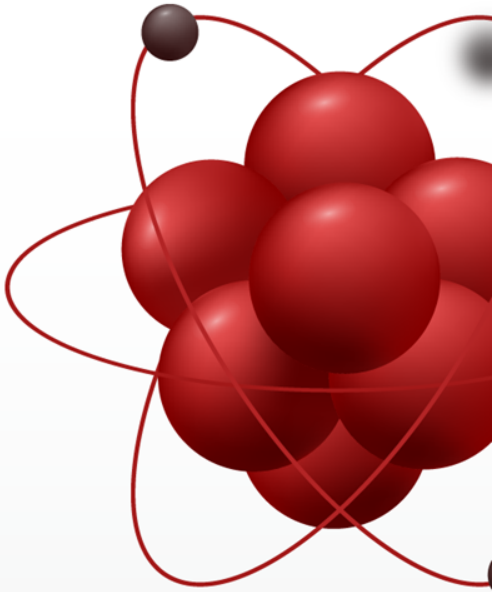
توجد هذه الاملاح في جميع الاوساط الزرعية

K_2HPO_4 $MgSO_4 . 7H_2O$ Mn. Cu, CO. zn), $FeSO_4 . 7H_2O$



ان تحضير الاوساط الزرعية تحتاج الى الكثير من الدقة والجهد في وزن المواد واختيار المواد الكيمياوية المناسبة

تعد الاوساط الزرعية الثلاثة الاولى من الاوساط الصناعية والوسط الرابع وسط معقد لاحتوائه على خلاصة الخميرة بالاضافة الى الاحتياجات الغذائية الاخرى هناك عوامل اخرى يجب توفرها عند نمو كائن مجهري معين وهي درجة حرارة الحضن، الضغط التنافذي، تركيز ايون الهيدروجين



العوامل التي يجب توفرها عند نمو الكائن المجهري

اولا - السيطرة على الرقم الهيدروجيني

ان البيئة الطبيعية لنمو اغلب الاحياء المجهرية هي بين ٤-٩ والعدد القليل الذي ينمو في اس هيدروجيني اقل من ٤ واكثر من ٩ .ويطلق على الاحياء المحبة للرقم الهيدروجيني الواطئ ب Acidophiles والتي تتراوح بين (صفر -٥,٥)وتمتاز بتحلل غشائها السايتوبلازمي عند رفع الاس الهيدروجيني عن ذلك فضلا عن تاثيرها على الانزيمات النقل الموجودة في الغشاء السايتوبلازمي ، وبعض البكتريا مثل *Salmonella typhimurium* و *E.coli* . تقوم بتخليق بروتينات مسؤلة عن تحمل الحموضة . اما الاحياء المحبة للوسط القاعدي الذي يتراوح بين (٨,٥-١١,٥) يطلق عليها ب Alkaliophiles. اما البكتريا التي تنمو في الاس الهيدروجيني المتعادل يطلق عليها ب Neutrophiles والذي يتراوح بين (٥,٥-٨,٥)

ان تنمية الاحياء المجهرية في الوسط الغذائي المناسب فانها تتأثر وبشكل ملحوظ في التغيرات الكيمياوية التي تطرأ على المزرعة نتيجة الفعاليات الايضية للاحياء النامية نفسها فمثلاً تكون الحوامض العضوية نتيجة الفعاليات التخمرية للسكر الموجود في الوسط مما يوقف نمو الكائن المجهري او تتكون قواعد بدلاً من الحوامض نتيجة لعمليات الهدم التي تحصل من قبل الكائن المجهري او استخدام الايونات السالبة الموجودة في الوسط او التفاعلات الايضية التي تحصل في البروتينات والحوامض الامينية والتي تؤدي الى تكوين الامونيا.

ان تكون مثل هذه المواد تؤدي الى تغير الرقم الهيدروجيني للوسط الا ان التغير لا يكون بشكل حاد او مفاجئ بسبب احتواء الوسط على ما يسمى بالدارئ مثل الحوامض الامينية والبروتينات لاحتوائها على جذور الامين -NH2 والكاربوكسيل - COOH في ان واحد مما تعمل على الاتحاد مع الحوامض والقواعد المتكونة. لذلك يطلق على هذه المواد بأنها امفوتيرية amphoteric .

الا انه في بعض الاحيان يكون التغير في الرقم الهيدروجيني للوسط الزرعي كبير بحيث تعجز قدرة الدارئ على كبحه لذلك يستعان ببعض المواد الدارئة مثل:

أ-املاح الفوسفات.

١- تتكون دوارئ الفوسفات phosphate buffers من خليط يحتوي على (K2HPO4ملح ضعيف القاعدية) و (KH2PO4ملح ضعيف الحامضية).

$$H^+ + HPO_4^{-2} \rightarrow H_2PO_4^{--}$$

$$OH^- + H_2PO_4^- \rightarrow HPO_4^{-2} + H_2O$$

٢- يستخدم في تحضير الاوساط الزرعية لانه يمنع التغيير الجذري في تركيز ايون الهيدروجين الناتج من نمو الاحياء المجهرية.
٣- تعد من الاملاح اللاعضوية الوحيدة التي تعمل كداريء ضمن المدى المهم وهو التعادل النسبي
٤- لاتعد سامة للاحياء المجهرية.
٥- تعد مصدراً مهماً للفسفور تتزود منه الاحياء.
٦- التراكيز العالية من الفوسفات تكون مانعة لنمو بعض الاحياء. وعموماً فان البكتريا والفطريات تستطيع ان تتحمل فوسفات البوتاسيوم بتركيز ٥ غم/ لتر من الوسط الزرعي

ب- املاح الكاربونات والبيكاربونات

١-تستخدم عند تحرر الحوامض بكمية كبيرة في الوسط الزرعي فلا تنفع استخدام داريء الفوسفات.

$$Na_2Co_3 + HcL \longrightarrow NaCl + H_2O + Co_2$$

$$NaHCO_3 + NaOH \longrightarrow Na_2Co_3 + H_2O$$

٢- وجود ايون الهيدروجين يحول الكاربونات الى بيكاربونات ثم تتحول الاخيرة الى حامض الكاربونيك الذي يتحلل الى CO2وماء.

-١

$$Co_3^{-2} \underset{+H^+}{\rightleftharpoons} HCO_3 \underset{+H^+}{\rightleftharpoons} H_2CO_3 \rightleftharpoons CO_2 + H_2O$$

-3يعمل على منع تجمع ايونات الهيدروجين.

٤- لايفضل استخدام كاربونات الصوديوم الذائبة بل يفضل كاربونات الكالسيوم غيرالذائبة لان الاولى قلوية حادة. والقلوية العالية تكون غير ذائبة في الوسط في ظروف اخرى لاتنفع دواريء الفوسفات والكاربونات لذا يفضل ضبط الرقم الهيدروجيني دورياً وبأستمرار بأضافة قاعدة او حامض تحت ظروف معقمة.

ثانيا - السيطرة على كمية الاوكسجين

يعد الاوكسجين عامل تغذية مهماً بالنسبة للاحياء المجهرية الهوائية لانه يدخل في العديد من العمليات البنائية والهدمية.

- **زراعة الاحياء المجهرية الهوائية**

تزرع عن طريق تخطيطها فوق سطح الاكار في اطباق بتري اما اذا كانت المزرعة سائلة فيمكن استخدام انابيب الاختبار الاعتيادية. او دورق صغير ثم تحضن تحت الظروف الجوية اما اذا كانت الكميات كبيرة فانها توضع في اوان كبيرة حتى تزيد من المساحة السطحية للمزرعة وتعريضها للاوكسجين، وقد تستخدم اجهزة هزازة لهذا الغرض او قد يضخ الهواء الى داخل المزرعة باستخدام مضخات خاصة كما في الصناعة التي تعتمد على التخمير.

- **زراعة الاحياء المجهرية اللاهوائية**

يتم استبعاد الاوكسجين بواسطة

١- تستخدم قناني محكمة الغلق وتملاء تماماً بالوسط السائل المفرغ من الهواء.

٢- يتم غليان الوسط لغرض طرد $O2$

٣ -في حالة تنمية الاحياء المجهرية في وسط صلب اذ تحضن الاطباق في اجواء غير هوائية باستخدام الجرار المعد لحضن المزارع الصلبة المزروعة في الاطباق وتستخدم مجففات مفرغة Vacuum desiccatorsوبعد ان تفرغ من الهواء تملأ بالناتروجين او الهيدروجين او بخليط من هذين الغازين مع CO_2.

4 -زراعة البكتريا اللاهوائية المجبرة بأضافة مواد مختزلة قوية للوسط الزرعي مثل Sodium thioglycolate و حامض Cysteineو Na_2Sوغيرها .

ثانيا - السيطرة على CO2

يتم السيطرة على كمية CO2من خلال ضخ هواء يحتوي على ٥% من (CO_2خاصة ان الهواء الجوي يحتوي على ٠.٣% من (CO_2الا انه سوف يولد تغيير في الوسط الزرعي لذا يتم استعمال دوارئ لغرض زراعة الاحياء المجهرية الضوئية ذاتية التغذية والكيمياوية ذاتية التغذية.

ثالثا –السيطرة على الضغط

اغلب البكتريا تعيش على سطح الارض او على سطح المياة الان ان هناك بعض البكتريا التي تعيش في اعماق البحار والتي يتراوح الضغط فيع حوالي ٦٠٠-١١٠٠ atm (ضغط جو) والتي يطلق عليها Barotolerat زيادة الضغط عن ذلك يؤثر سلبا في حين يلاحظ بعض البكتريا المتواجدة في امعاء اللافقريات البحرية تتحمل ضغط عالي يطلق عليها barophilic

خامسا - توفر الضوء

يعد الضوء من المتطلبات الضرورية لتنمية الاحياء المجهرية الضوئية photosynthesis لذا جميع الاحياء التي تمتلك chlorophyll او bacteriochlorophyll او cytochromes او flavin تستطيع امتصاص الضوء كمصدر طاقة لذا يتم السيطرة على توفر الضوء ودرجة الحرارة عن طريق استخدام حاضنات مزودة بوسيلة تثبت درجة الحرارة المطلوبة وبما ان الحاضنات لا تحتوي على اضاءة داخلية لذا يجب وضع الحاضنات قرب الشبابيك الجيدة الإضاءة لأوقات متقطعة متجنبين التعرض المباشر لضوء الشمس تجنباً من شدة الضوء الذي يرفع من درجة الحرارة الذي سيمنع نمو الأحياء المجهرية.

ان الاطوال الموجية التي تناسب عملية التخليق الضوئي التي تقوم بها الأحياء المجهرية الضوئية التغذية اقل من ٧٠٠ نانومتر للطحالب ولحقيقية النواة وتنحصر ما بين ٧٠٠-١٠٠٠ نانو متر للبكتريا الخضراء والبنفسجية.

سادسا -تجنب رواسب المعادن

عند تحضير الاوساط الصناعية يتكون راسب اثناء عملية التعقيم وخصوصاً اذا احتواء الوسط على ايونات الفوسفات بتراكيز عالية اذ يتكون راسب نتيجة تكوين مواد معقدة غير ذائبة من تفاعل الفوسفات وايونات بعض المواد الثقيلة مثل الحديد ويتم معالجة هذه المشكلة عن طريق تعقيم المحلول المركز لمركبات هذه المعادن بشكل مفرد ثم تضاف الى بقية المكونات في الوسط الزرعي المعقم بعد ان يبرد او ادخال كمية قليلة من عامل الكلابي Chelating agent حيث يكون مادة معقدة ذائبة مع هذه المعادن وبذلك يمنع تفاعلها مع الفوسفات ومن هذه العوامل هو EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid) بتركيز ٠.٠١% تقريباً.

سابعا -درجة الحرارة

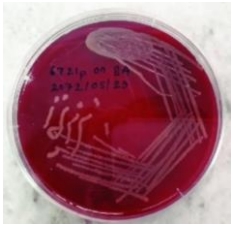
تنمو البكتريا في درجات حرارة مختلفة اعتمادا على نوع البكتريا فالبكتريا التي تنمو في درجة بين ٠-١٥ درجة مئوية يطلق عليها Psychrophiles اما البكتريا التي تنمو في درجة حرارة تتراوح بين ٢٠-٣٠ درجة مئوية يطلق عليها Facultative phychrophiles في حين هناك بكتريا تنمو في درجات تتراوح بين ٢٠-٤٥ درجة مئوية يطلق عليها Mesophiles اما البكتريا التي تنمو في درجات الحرارة العالية يطلق عليها Thermophiles اذ تتحمل النمو في درجات حرارة اعلى من ٥٥ درجة مئوية .وهناك انواع تنمو في درجات حرارة تتراوح بين ٨٠-١١٣ درجة مئوية يطلق عليها hyperthermophiles ويلاحظ هناك درجات حرارة مثلى ضمن هذا المدى يكون النمو في افضل الحالات تسمى درجة الحرارة المثلى Optimum temperature.

ان هذا الاختلاف بين هذه المجاميع في درجات الحرارة **يعود الى اختلاف الطبيعة البروتينية (الانزيمات) في الخلية اذا لكل خلية انزيمات تعمل في درجات حرارة معينة اعتماد الى نوع البكتريا**

انواع الاوساط الزرعية

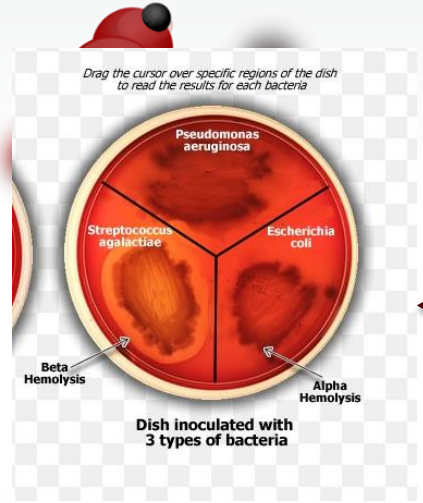
١-الاوساط الزرعية الاغنائية Enriched Mediaاو المعقدة Complex

هي الاوساط الزرعية التي تحتوي على مواد مغذية اضافية مثل الدم او المصل او خلاصات الانسجة النباتية او الحيوانية لكي تصبح صالحة لتنمية الاحياء التي تتطلب مواد غذائية معقدة.



٢- الاوساط الزرعية الانتخابية : Selective Media

هي الاوساط التي تسمح لنمو انواع معينة من الاحياء نتيجة لاضافة مثبطات خاصة التي تحد من نمو بعض الاحياء المجهرية مثل المضادات الحيوية او اضافة Crystal violetبتركيز معين يسمح بنمو الاحياء G- ولا يسمح نمو الانواع الاخرى او اضافة Phenylethanol الذي يساعد على نمو بكتريا G+ دون السالبة او ادخال مصدر كاربوني وحيد لا يستطيع استغلاله الا من قبل مجموعة معينة من الاحياء مثل اضافة النشا. ومثال على الاوساط الانتخابية وسط MacConkey agar.



٣- الاوساط التفاضلية Differential Media:

هي نوع من الاوساط الانتخابية وعند نمو بعض الاحياء تظهر صفات خاصة تميزها عن غيرها فمثلاً استعمال الدم للتميز بين البكتريا المحللة للدم عن غير المحللة للدم فتظهر المستعمرات المحللة محاطة بهالة شفافة وغير المحللة لاتظهر حولها هالة شفافة (يوجد ثلاث انواع من اتزيمات تحلل الدم (الفا ∞- haemolysis و-بيتا ß haemolysis و كاما γ- haemolysis) .

٤-الاوساط الزرعية التحليلية Assay media:

هي اوساط صناعية تستخدم للتقويم الكمي لبعض المواد المراد مثل الفيتامينات والحوامض الامينية، وهذه الاوساط مخصصة لتنمية نوع من الاحياء المتباينة التغذية التي تحتاج الى عامل نمو معين، وتنتخب هذه الاحياء انتخاباً بحيث يكون عامل نموها هو نفس المادة المراد تقويمها ولهذا تحذف هذه المادة عادة من مكونات الوسط التحليلي. وبعد الزرع تضاف مقادير معلومة من المادة المراد تقويمها ثم تقارن كمية المادة المستخدمة مع النمو الحاصل نتيجة هذه الاضافة.

٥-الاوساط الزرعية التشخيصية Characterization media:

هي اوساط تستخدم لتشخيص الاحياء المجهرية من خلال النمو الحاصل عليها او من خلال التغيرات الكيمياوية التي تطرأ على هذه الاوساط نتيجة نمو احياء مجهرية معينة عليها او فيها.

٦-الاوساط الزرعية الحفظية Maintenance media:

تستخدم للابقاء على حيوية الاحياء المجهرية عند خزنها لمدة معينة وهي مزروعة على هذه الاوساط دون ان تتغير الخصائص العضوية لهذه الاحياء.

اي سؤال ؟؟؟؟