جامعة تكريت
كلية التربية للبنات
علوم الحياة

احياء مجهرية

تحضير الاوساط الزرعية

المرحلة الرابعة

م.م ساره عبدالحميد حسن

Sarah.Abdulhameed235@tu.edu.iq

2024

تحضير الاوساط الزرعية

المكونات الأساسية للأوساط الزرعية:

تشترك معظم الأوساط الزرعية في احتوائها على المواد التالية:

١- البپتون Peptone:

يعتبر مصدراً هاماً للنتروجين العضوي في البيئات المعدة لتنمية البكتيريا غير ذاتية التغذية ويحضر من اللحم الخالي من الدهون بعد تحلله بإنزيم الببسين.

٢- الاكار المغذي Nutrient agar:

يحتوي على خلاصة اللحم، خلاصة الخميرة، ببتون، ملح الطعام، أكار أكار، وهو من الأوساط البسيطة.

٣- خلاصة اللحم Beef extract:

تحضر من اللحم البقري الخالي من الدهون بعد غليه وترشيح الخلاصة وتركيزها حيث يحتوي المستخلص على بعض الأحماض غير العضوية وبعض المواد العضوية مثل الأحماض الأمينية, الجلوكوز, اليوريا, حامض اللكتيك, الفيتامينات, عوامل النمو الأخرى.

٤- خلاصة الخمير Yeast extract:

تحتوي على بعض الأحماض الأمينية وبعض العوامل المساعدة للنمو وأملاح معدنية.

٥- الماء Water:

تحتاج الخلايا الحية إلى الماء لنموها ولإتمام عملياتها الأيضية وذلك علاوة على استخدامه كمادة مذيبة للمواد الغذائية ويفضل استخدام الماء المقطر لخلوه من الأملاح المعدنية.

٦- المواد التصليبية Solidifying agents:

تضاف إلى بيئة الزرع السائلة بعض المواد التي تعمل على تحولها إلى بيئة صلبة تساعد على تكوين مستعمرات فرديه

من انواع المواد التصليبية التي تضاف للاوساط الزرعية:

أ- الجيلاتين Gelatin:

أول ما استعمل كمادة تصليبية في بيئات الزرع وهو عبارة عن مادة بروتينية تحضر بمعاملة عظام الحيوانات ويندر حالياً استعمال الجيلاتين كمادة تصليبية في البيئة نظراً لأن كثير من البكتيريا يمكن تحليلها مائياً ولأنه ينصهر عند درجات التحضين.

ب- الآجار Agar:

مادة كربوهيدراتية تستخلص من بعض الطحالب البحرية الحمراء والتي تنمو بوفرة على سواحل بعض الدول مثل اليابان وهو يتصلب عند درجة حرارة من (٤٢- ٤٥م) ويمكن إسالته مرة ثانية عند درجة حرارة (٩٨م) ويتميز عن الجيلاتين بكونه لا يمكن تحليله بيولوجيا لأن عدد الكائنات المحللة له قليلة جداً.

ج- السليكا Silica:

لا تعتبر مادة غذائية فهي عادة تستعمل في تحضير البيئات اللازمة لتنمية الكائنات الذاتية التغذية وذلك لمنع نمو البكتيريا غير ذاتية التغذية معها.

طريقة تحضير الوسط الزرعي:

١- وزن الوسط الزرعي.
٢- اذابة الوسط باستخدام الحرارة مع التحريك.
٣- التعقيم بالمؤصدة Autoclave.
٤- تبريد الوسط بعد تعقيمه.
٥- تلهيب فوهة flask قبل الصب.
٦- صب الوسط في طبق بتري.
٧- تلهيب الوسط بعد الصب.
٨- تلهيب غطاء بتري بعد الصب.
٩- ترك الاكار يتصلب.
١٠- وضع الاطباق في أكياس لحين الاستعمال.
١١- الحفظ في الثلاجة بشكل مقلوب.

تنمية الجراثيم على الأوساط الزرعية Bacterial growth on synthetic media:

أ- تنمية الجراثيم في المزارع السائلة:

ان أسهل طريقة للتعامل مع الجراثيم تتم في تنميتها في أنابيب اختبار تحوي على أوساط زرعية سائلة كوسط المرق المغذي ووسط نقيع المخ والقلب ، يظهر النمو في المرق المغذي على النحو التالي:

١- عكارة turbidity: تتفاوت في كثافتها حسب نوع الجرثومة وكمية الحقنة كما في جراثيم القولونية E.coli.

٢- تكوين تجمع سطحي pellicle formation: وهذه تمثل طبقة رقيقة من الخلايا (قشرة) تطفو على سطح المرق، كما في جراثيم العصيات Bacillus.

٣- تكوين راسب sediment formation: يظهر النمو على شكل راسب من الخلايا يستقر في قعر الانبوب ولكنه يرتفع بشكل لولبي او حلزوني عند رج الانبوبة بهدوء، كما في جراثيم المكورات العنقودية Staphylococcus.

٤- تكوين مخاط Slime formation: اذا لم ترتفع الخلايا المترسبة في القعر فيعني ان راسب الخلايا النامية مخاطية، كما في جراثيم Kebsiella.

٥- تكوين الغاز gas formation: يمكن التأكد من وجوده بمشاهدة فقاعات الغاز التي سوف تنتج عند مزج الانبوب كما في الجراثيم القولونية E.coli.

٦- الخضاب الخارجي depigmentation: حيث يلاحظ تغير لون الوسط الزرعي كما في جراثيم الزوائف Pseudomonas.

ب- تنمية الجراثيم في المزارع الصلبة:

ان من فوائد استخدام المزارع الصلبة هو عزل الجراثيم عن بعضها لتكوين مستعمرات نقية منفردة single pure colonies وبالتالي يسهل التعامل معها وتشخيصها بسهولة والمستعمرة الواحدة تمثل النمو الناتج من انقسام خلية جرثومية واحدة.

الطرق المستعملة في تنمية الجراثيم على الاوساط الصلبة:

١- طريقة تخطيط الطبق Streak – plate method

١- طريقة الصب في الطبق Pour – plate method

٢- النشر في الطبق spreading – plate method

٤- الأكار المائل Agar – slop method

١- طريقة تخطيط الطبق Streak – plate method:

يتم بهذه الطريقة وضع النقلة الجرثومية على سطح الاكار قرب حافة الطبق ومن ثم تخطط بإتباع احدى الطرق الموضحة في الاشكال التخطيطية لاحقاً حيث يتم النقل والتخطيط باستخدام الناقلة المعقمة sterile loop وان الخلايا المتكدسة مع بعضها في بداية التخطيط قد تؤدي الى تكوين مستعمرات متصلة مع بعضها ولكن مع استمرار التخطيط لا يبقى الا عدد قليل من الخلايا الجرثومية على الناقلة حيث يؤدي ذلك الى تكوين مستعمرات منفردة في نهاية التخطيط (وتظهر نتيجة التخطيط بعد حضانة الطبق ونمو الجراثيم)

ملاحظة: توضع الاطباق في الحاضنة بصورة مقلوبة أي الغطاء الى الأسفل، وذلك لان وضع الطبق بصورة اعتيادية (أي الغطاء الى الأعلى) وبوجود التراكيز العالية من الماء في الوسط الزرعي الصلب سوف يؤدي الى تبخر الماء وتكدسه على السطح العلوي للطبق، ولذلك فأن أي تحريك للطبق سيؤدي الى انسياب قطرات الماء على سطح الاكار ودمج المستعمرات الجرثومية مع بعضها.

٢- طريقة الصب في الطبق Pour – plate method :

تستعمل هذه الطريقة للأغراض التالية:

أ- دراسة نمط التحلل الدموي لمستعمرات الجراثيم المحللة للدم مثل Streptococci.

ب- فصل المستعمرات الواحدة عن الأخرى بصورة أفضل مع نقاوة المستعمرة.

ج- تعداد الجراثيم الحية.

وفي هذه الطريقة يتم حقن الجراثيم اثناء فترة سيولة الاكار في درجة ٤٥°م ومن ثم يصب في الطبق وبذلك تنتشر الجراثيم في كل الوسط وليس فقط على السطح مكونة مستعمرات منفردة في الاطباق.

٣- طريقة النشر في الطبق spreading – plate method:

توضع كمية ٠،١ مل من معلق الجراثيم المخفف على سطح الاكار قرب المركز ثم تنشر بواسطة ناشرة زجاجية معقمة بشكل حرف L او بواسطة ماسحة قطنية cotton swap.

٤- طريقة الأكار المائل Agar – slop method:

تفضل هذه الطريقة لحفظ الجراثيم كما تستعمل لمشاهدة تكوين الخضاب او انتاج الغازات ويتم تحضير الاكار المائل بوضع أنبوب الاختبار الحاوي على وسط الاكار المغذي بصورة مائلة مرتفع الفوهة عن سطح الطاولة bench بما يقارب ٣٠° او أقل اذا اريد الحصول على سطح مائل slant فقط اما اذا أريد الحصول على سطح مائل بالإضافة الى قعر slant – butt لزراعة الجراثيم بواسطة الطعن stabbing فيتم وضع الانبوب الحاوي على الاكار المغذي بزاوية اكبر من ٣٠°.

طريقة حقن الجراثيم على الأوساط الزرعية:

ان تنمية الجراثيم على الأوساط الزرعية الصلبة او السائلة تتم باتخاذ الاحتياطات والتدابير اللازمة للحفاظ على النقاوة وعدم التلوث وكما يلي:

١- تعقيم منطقة العمل باستخدام الكحول ٧٠% وبحركة دائرية من المركز الى الخارج ومن ثم تلهيب السطح لفترات قصيرة.

٢- يجب تلهيب الابرة الناقلة او الحلقة الناقلة حتى الاحمرار وبهذا سوف يتم تحطيم كافة الجراثيم الملوثة ويجب الانتباه الى تسخين الجزء السفلي من المقبض ايضاً لكي لا تدخل جراثيم ملوثة الى قناني الاختبار.

٣- اثناء النقل يجب مسك الناقلة باليد اليمنى وكما يمسك القلم مع مسك الانبوبة باليد اليسرى ترفع السدادة القطنية او الغطاء بين أصابع اليد اليمنى او الاصبع الصغير وراحة الكف مع مراعاة عدم وضع الغطاء او السدادة على الطاولة، كذلك يجب مسك الانبوبة بصورة مائلة مع الأفق مع مراعاة عدم انسكاب الوسط الزرعي السائل، يجب ان يتم الحقن قرب اللهب لان تيارات الحمل من اللهب سوف تمنع دخول الجراثيم الملوثة الى داخل الانبوب.

٤- ضرورة تعقيم فوهات القناني والأنابيب المنقول منها واليها وذلك بتهليبها لفترة قصيرة قبل حقنها بالجراثيم .

النمو على الوسط شبه الصلب (مادة الجيلاتين المطعون) Growth in semi- slid medium:

ان بعض الجراثيم تتصف بقابليتها على تمييع الجلاتين liquefaction of gelatin وتظهر هذه الصفة بعد حضانة قد تطول الى أسبوع او اكثر لذلك يجب وضع مواد مغذية وذلك لتعزيز نمو الجراثيم بالإضافة الى الجلاتين ويستفاد من التنمية على وسط الجلاتين أيضا لمعرفة حركة الجراثيم حيث يمكن معرفة فيما اذا كانت الجراثيم متحركة ام لا من خلال طعن الوسط باستخدام ابرة خاصة لذلك ويتم قراءة نتيجة نمو الجراثيم في وسط الجلاتين من خلال امالة الوسط بعد تبريده (بعد انتهاء فترة الحضانة) حيث ان الجزء المتميع يتحول الى سائل حتى بعد التبريد في حين يكون الجزء الغير متميع صلباً في درجة حرارة التبريد.

المؤصده (Autoclave)

الحاضنات (Incubators)

جهاز طرد مركزي Centrifuge