زراعة الأحياء المجهرية: Cultivation of Microoranism

بناء الوسط الزرعى:

أن الهدف الأساسي في بناء الأوساط الزرعية هو توفير خليط متوازن من المواد الغذائية التي تحتاجها الأحياء المجهرية وبتراكيز تسمح بنمو جيد على أن لا تزيد تراكيز هذه المواد المغذية في الوسط الزرعي ولأسباب كثيرة منها:

١. لان العديد من المواد المغذية تنقلب الى مواد مانعة للنمو او قد تصبح سامة اذا ما ازداد تركيزها.

٢ .حتى لو حدث النمو في الوسط الزرعي عالي التركيز فان الطبيعة البيئية ستتغير نتيجة الفعاليات الأيضية للاحياء المجهرية النامية فتصبح هذه البيئة غير مناسبة وتتغير الحالة الفسلجية لهذه الأحياء او قد تموت وقد يكون هذا بسبب التغير الشديد في تركيز الأيون الهيدروجيني او بتجمع المواد العضوية السامة او لنفاد الأوكسجين في حالة الاحياء الهوائية الاجبارية .أن عملية تحضير الوسط الزرعي تعتمد على توفر:

١.مجموعة الفلزات المهمة التي تناسب أي كائن دقيق . ٢. مصدر كاربوني ومصدر نيتروجيني وعوامل النمو الأخرى.

ومن الطبيعي أن تختلف المكونات الغذائية باختلاف الكائن الدقيق المراد تنميته فبعضها يكون نحسا او شرها fastidiousويحتاج الى عوامل نمو خاصة في حين لا تحتاج الكائنات ذاتية التغذية الى وجود مركبات عضوية بل تحتاج الى ثاني أوكسيد الكاربون ولهذا تقسم الأوساط الزرعية الى:

أ. الوسط الصناعي : Synthetic medium هو الوسط الزرعي المعروفة مكوناته كما ونوعا من الناحية الكيمياوية.

ب. الوسط المعقد : Complex medium هو الوسط الزرعي الذي لا تعرف مكوناته الكيمياوية كما ونوعا وذلك بإضافة بعض المواد مثل خلاصة اللحم او خلاصة الخميرة لتزويد الوسط الزرعي بالمركبات الكيمياوية العضوية واللاعضوية المختلفة.

–السيطرة على الرقم الهيدروجيني : (PH) يتاثر نمو الاحياء المجهرية في الأوساط الزرعية وبشكل ملحوظ بالتغيرات الكيمياوية التي تطرا على المزرعة نتيجة الفعاليات الأيضية للاحياء النامية فمثلا تتكون الحوامض العضوية نتيجة الفعاليات التخمرية التي تقوم بها البكتريا النامية في وسط الكلوكوز الزرعي . وقد يتوقف نمو هذه البكتريا نتيجة تكون هذه الحوامض واحيانا تتكون القواعد بدل الحوامض اثناء النمو نتيجة قيام الأحياء المجهرية النامية بتهديم او استخدام الأيونات السالبة الموجودة في الوسط الزرعي وان التفاعلات الأيضية التي تجري على البروتينات والحوامض الأمينية قد تغير الرقم الهيدروجيني الى القاعدة نتيجة تكون الأمونيا . تنمو معظم البكتريا عند الرقم الهيدروجيني (PH) المتعادل (PH=٧مع انها تتحمل العيش ما بين ٥ حامضي ٨ قاعدي لذلك ال (PH) –الذي يشهد نشاطا للانزيم يسمى الىPH المثالي او المفضل Optimum PH اما اذا زاد الله PH فيبدا نشاط الإنزيم بالتراجع لان نشاط الانزيم يمثل معدل النمو.

قسمت البكتريا على أساس نشاطها بحسب الرقم الهيدروجيني الى:

١ .البكتريا المحبة للحامضية العالية (PH) منخفض. Acidophilic

٢ .البكتريا المحبة للحامضية المعتدلة Neutrophilic وهذا يمثل معظم أنواع البكتريا ما بين (٦.٥–٧.٥) PH

٣ .البكتريا المحبة للقاعدية (PH) عالي Alkalophilie وهذه تفضل ال PH الأكثر من ٨ مثل بكتريا الكوليرا.

ويحدث التغير في الرقم الهيدروجيني نحو القاعدية او الحامضية بصورة تدريجية وبكلام اخر فان الأوساط الزرعية تقاوم هذا التغيير نتيجة الفعل الدار لبعض مكونات الوسط واهمها الحوامض الأمينية والبروتينات حيث تمتلك هذه المواد جذر الأمين القاعديNHz و جذر الكاربوكسيل – cooH الحامضي وبذلك تستطيع هذه المواد ان تتحد مع الحامض او القاعدة

في آن واحد ولهذا يقال عن هذه المواد بانها امفوتيرية amphoteric ويستعان ببعض المواد الدارئة واهمها املاح الفوسفات والكاربونات الدارئة

تتميز دواري الفوسفات Phosphate buffers ب:

١ .تتالف من خليط يحتوي على فوسفات احادي الهيدروجين و KHP٠(ملح ضعيف القاعدة) وفوسفات ثنائي الهيدروجينKHzPO, (ملح ضعيف الحامضية) (PH ٦.٨) .

٢ .هذا المحلول يمنع التغير الجذري في تركيز ايون الهيدروجين عندما تطرح حوامض او قواعد في الوسط الزرعي نتيجة نمو الاحياء المجهرية.

٣. تستخدم كثيرا في تحضير الأوساط الزرعية لانها الأملاح اللاعضوية الوحيدة التي تعمل كدارئ ضمن المدى المهم وهو التعادل النسبي.

٤. لاتعد سامة للأحياء المجهرية

٥..تشكل هذه الاملاح مصدرا مهما للفوسفور تتزود منه الأحياء النامية.

٦–في التراكيز العالية يصبح الفوسفات مائعا لنمو بعض الأحياء الدقيقة وعموما فان البكتريا والفطريات تستطيع أن تتحمل فوسفات البوتاسيوم بتركيز هـ غم / لتر من الوسط الزرعي.

املاح الكاربونات NaCo والبيكاربونات: NaHco,

١. تستعمل في الأوساط الزراعية التي لاتنفع استعمال املاح الفوسفات بها نتيجة تحرر الكثير من الحامض.

٢ .تعتبر الكاربونات خزين قاعدي يعادل الحوامض المتحررة ضمن المزرعة.

٣.بوجود ايون الهيدروجين تتحول الكاربونات الى بيكاربونات ثم تتحول الأخيرة بدورها الى حامض الكاربونيك الذي يتحلل ذاتيا الى ثاني أوكسيد الكربون والماء

$$CO_3^{-2} \underset{+H^+}{\overset{-H^+}{\rightleftharpoons}} HCO_3^- \underset{+H^+}{\overset{-H^+}{\rightleftharpoons}} H2Co_3 \rightleftharpoons Co_2+H_2O$$

٤. يفضل استخدام كاربونات الكالسيوم غير الذائبة Caco, بدل كاربونات الصوديوم الذائبة لانها قلوية حادة.

وفي ظروف أخرى لا تنفع دوارئ الفوسفات والكاربونات فيفضل ضبط الرقم الهيدروجيني دوريا او باستمرار وذلك بإضافة حوامض او قواعد تحت ظروف معقمة

–السيطرة على كمية الأوكسجين:

يعد الأوكسجين عامل تغذية مهما للأحياء المجهرية الهوائية الاجبارية ويمكن تنمية هذا النوع من الاحياء عن طريق تخطيطها فوق سطح طبق الاكار اما اذا كانت المزرعة سائلة فيمكن استخدام انابيب الاختبار الاعتيادية أو دوارق صغيرة ، ومن ثم تحضن تحت الظروف الجوية الاعتيادية وقد نستخدم الرج في أجهزة هزازة معينة معدة لهذا الغرض أو أن يضخ الهواء في المزارع المراد تهويتها باستخدام مضخات خاصة كان حجم المزرعة كبيرا جدا كما في الصناعة التي تعتمد على التخمرات اما زراعة البكتريا غير الهوائية الاجبارية فتحتاج الى استبعاد الأوكسجين على قدر ما تستطيع وقد يستخدم لهذا الغرض :ـ

١. قناتي محكمة السد تملا تماما بالوسط السائل المفرغ من الأوكسجين.

٢ .غليان الوسط السائل لطرد O٢.

٣. تحضن الأطباق المزروعة في جرار معدة لهذا الغرض وباستخدام المجففات desiccators vacuum بعد ان تفرغ من الهواء وتملا بالنتروجين او الهيدروجين او بخليط من هذين الغازين مع ثاني أوكسيد الكاربون.

٤. إضافة مواد مختزلة قوية للوسط الزرعي – للتخلص من التأثير السام للأوكسجين مثلSodium thioglycolate و الحامض الأميني الCysteine و كبريتيد الصوديوم ..... Na٢٥ وغيرها.

–تهيئة ثاني أوكسيد الكاربون تركيز غاز co٢ في الجو قليل جدا فهو لا يتعدى ٠.٣% في الأمكنة المفتوحة واكثر بقليل في الأماكن المغلقة لذا يتم ضخ هواء يحتوي على كميات كبيرة من Co٢ قد تصل الى ٥٪ الا ان هذه الزيادة تسبب تغير ال PH في الوسط الزرعي لذا يتم استعمال المحلول الدارئ وذلك لزراعة الأحياء المجهرية الضوئية ذاتية التغذية والكيمياوية ذاتية التغذية.

ـ توفر الضوء:

يعد الضوء من المتطلبات الضرورية لتنمية الأحياء المجهرية الضوئية مثل الطحالب والبكتريا الضوئية الى ان تهيئة الإضاءة الضرورية المناسبة مع السيطرة على درجات الحرارة تعد من العمليات الصعبة وتنحصر الاطوال الموجية التي تناسب التخليق الضوئي التي تقوم بها الأحياء المجهرية الضوئية للتغذية باقل من ٧٠٠ نانو متر للطحالب الحقيقية النواة وتنحصر ما بين ٧٠٠ و ١٠٠٠ نانو متر للبكتريا الخضراء والبنفسجية.

تجنب رواسب المعادن : حدوث راسب عند تعقيم الأوساط الزراعية وخصوصا عندما يحتوي الوسط الزرعي على ايونات الفوسفات بتركيز عال نسبيا تشكل مشكلة مهمة عند ملاحظة النمو الكمي للأحياء المجهرية ويحدث هذا الراسب نتيجة تكوين مواد معقدة غير ذائبة من تفاعل الفوسفات وايونات بعض المواد الثقيلة مثل الحديد . وتحل هذه المشكلة عن طريق تعقيم المحلول المركز المركبات هذه المعادن ثم اضافتها الى بقية المكونات في الوسط الزرعي المعقم بعد أن يبرد او بإدخال كمية قليلة من العامل الكلابي Chelating agent حيث يكون مادة معقدة ذائبة مع هذه المعادن وبذلك يمنع تفاعلها مع الفوسفات ومن هذه العوامل المستخدمة في هذا المجال هو حامض ال EDTA(Ethylene diamine tetra acetic acid)

أنواع الأوساط الزراعية:

١. الأوساط الزرعية الأغنائية : Enriched media: يتطلب نمو أنواع كثيرة من الأحياء المجهرية وجود مواد مغذية إضافية مثل إضافة الدم او المصل او خلاصات الانسجة النباتية او الحيوانية حيث تضاف هذه المواد الى الأوساط الزرعية الاعتيادية مثل الاكار المغذي او المرق المغذي لكي تصبح صالحة لتنمية الأحياء التي تطلب مواد غذائية معقدة.

٠٢ الأوساط الزرعية الانتخابية: selective media يعتمد عمل هذه الأوساط على ادخال مواد تمنع نمو أنواع معينة من الأحياء المجهرية دون غيرها فمثلا عند إضافة مادة البلور البنفسجي crystal violet بتركيز معين للوسط الزرعي ستنمو البكتريا السالبة لصبغة كرام دون غيرها اما عند إضافة كحول Phenyl ethanol للوسط الزرعي فتساعد على نمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام دون السالبة او ادخال مصدر كاروني وحيد لا يستطيع استغلاله الا من قبل مجموعة معينة من الأحياء مثل إضافة النشا كمصدر كاربوني ، من الأوساط الانتخابية وسط. MacConkey agar

٣. الأوساط الزرعية التفاضليةDifferential media

وهي أوساط تستعمل للتميز بين نوعين من الأحياء المجهرية فمثلا استعمال اكار الدم للتميز بين البكتيريا المحللة للدم وغير المحللة للدم تظهر المستعمرات المحللة للدم محاطة بهالة شفافة وغير المحللة لاتظهر حولها هالة شفافة

٤. الأوساط الزرعية التحليلية: Assay media

وهي أوساط زرعية صناعية تستخدم للتقويم الكمي لبعض المواد مثل الفيتامينات والحوامض الأمينية فالاوساط التحليلية مخصصة لتنمية نوع معين من الأحياء المجهرية المتباينة التغذية التي تحتاج عامل نمو معين وتنتخب هذه الأحياء انتخابات بحيث يكون عامل نموها هو نفسه 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 الإضافة.

٥. الأوساط الزرعية التشخيصية: characterization media

وهي أوساط تستخدم لتشخيص الأحياء المجهرية من خلال النمو الحاصل عليها او من خلال التغيرات الكيمياوية التي تطرأ على هذه الأوساط نتيجة نمو احياء مجهرية معينة عليها أو فيها.

٦. الأوساط الزرعية الحفظية:Maintenance media

وتستخدم للإبقاء على حيوية الأحياء المجهرية عند خزنها لمدة معينة وهي مزروعة على هذه الأوساط دون تغيير الخصائص العضوية لهذه الأحياء. لايفضل إضافة الكلوكوز ضمن مكونات هذه الأوساط لان الكلوكوز يجعل هذه الأحياء تنمو بسرعة مه يؤدي الى تكوين الحوامض بفعل الفعاليات الأيضية وبالتالي يؤدي الى تسريع موت هذه الأحياء.

يمكن تمييز الأوساط الزرعية على أساس حالتها الفيزياوية أوساط صلبة solid او شبه صلبه semi solid او مانية Liquid .

ان المرق المغذي Nutrient broth يكون سائلا اما اذا أضيفت اليه كمية قليلة من الأكار %(٠.٠٥) agar نحصل على وسط شبه صلب اما اذا تم زيادة نسبة الأكار الى (٢٪) الى الوسط السائل نحصل على وسط صلب. Nutrient agar

المصادر :-

كتاب علم الأحياء المجهرية البيطرية, الدكتور فاروق خالد حسن والدكتور خليفة أحمد خليفة والدكتور حامد حسن طنطاوي والدكتور جاسم محمد العبد الله ١٩٨٢ جامعة بغداد

كتاب مبادئ الأحياء المجهرية ,الدكتور غازي موسى الخطيب والدكتور وهاب امين حسن ١٩٩٠ جامعة بغداد

كتاب علم الأحياء المجهرية البيطرية الدكتور جاسب جاسم حداد ١٩٩١ جامعة الموصل