المحاضرة التاسعة

زراعة الاحياء المجهرية Cultivation of Microorganism :

بناء الوسط الزرعي :

ان الهدف الأساسي في بناء الأوساط الزرعية هو توفير خليط متوازن من المواد الغذائية التي تحتاجها الاحياء المجهرية وبتراكيز تسمح بنمو جيد على ان 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 الايضية للاحياء المجهرية النامية فتصبح هذه البيئة غير مناسبة وتتغير الحالة الفسلجية لهذه الاحياء او قد تموت وقد يكون هذا بسبب التغير الشديد في تركيز الايون الهيدروجيني او بتجمع المواد العضوية السامة او لنفاد الاوكسجين في حالة الاحياء الهوائية الاجبارية .

ان 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 ان تختلف المكونات الغذائية باختلاف الكائن الدقيق المراد تنميته فبعضها يكون نحسا او شرها fastidious ويحتاج 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 .

<u>أ) السيطرة على الرقم الهيدروجيني (PH)</u> : يتاثر نمو الاحياء المجهرية في الأوساط الزرعية وبشكل ملحوظ بالتغيرات الكيمياوية التي تطرا على المزرعة نتيجة الفعاليات الايضية 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 الاحياء المجهرية النامية بتهديم او استخدام الايونات السالبة الموجودة في الوسط الزرعي وان التفاعلات الايضية التي تجري على البروتينات والحوامض الامينية قد

تغير الرقم الهيدروجيني الى القاعدة نتيجة تكون الامونيا . تنمو معظم البكتريا عند الرقم الهيدروجيني (PH)المتعادل (PH=7) مع انها تتحمل العيش ما بين ٥ حامضي ٨ قاعدي لذلك ال (PH) الذي يشهد نشاطا للانزيم يسمى ال PH المثالي او المفضل Optimum PH اما اذا زاد ال PH فيبدا نشاط الانزيم 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 PH (7.5 – 6.5)

٣-البكتريا المحبة للقاعدية (PH) عالي Alkalophilic 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 الدارئ لبعض مكونات الوسط واهمها الحوامض الامينية والبروتينات حيث تمتلك هذه المواد جذر الأمين القاعدي -NH٢ وجذر الكاربوكسيل COOH- الحامضي وبذلك تستطيع هذه المواد ان تتحد مع الحامض او القاعدة في ان واحد ولهذا يقال عن هذه المواد بانها امفوتيرية amphoteric ويستعان ببعض المواد الدارئة واهمها املاح الفوسفات والكاربونات الدارئة .

تتميز دوارئ الفوسفات Phosphate buffers :

١- تتالف من خليط يحتوي على فوسفات احادي الهيدروجين $K_2H\ PO4$ (ملح ضعيف القاعدة) وفوسفات ثنائي الهيدروجين $KH_2\ PO٤$(ملح ضعيف الحامضية) (PH 6.8 .)

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 الاملاح 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 الاحياء النامية .

٦- في التراكيز العالية يصبح الفوسفات مانعا لنمو بعض الاحياء الدقيقة وعموما فان البكتريا والفطريات تستطيع

ان تتحمل فوسفات البوتاسيوم بتركيز ٥ غم / لتر من الوسط الزرعي .

املاح الكاربونات $Na_٢Co_3$ والبيكاربونات $NaHCo_٣$:

1- 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 الكاربون والماء

$$CO_3^{-2} \xleftrightarrow{+H^+} HCO_3^{-} \xleftrightarrow{+H^+} H_2Co \xleftrightarrow{-H^+} CO_2 + H_2O$$

٤- يفضل استخدام كاربونات الكالسيوم غير الذائبة $CaCo_3$ 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

ب) السيطرة على كمية الاوكسجين :

يعد الاوكسجين 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 او دوارق صغيرة ، ومن ثم تحضن تحت الظروف الجوية الاعتيادية وقد نستخدم الرج في أجهزة هزازة معينة معدة لهذا الغرض او ان يضخ الهواء في المزارع المراد تهويتها باستخدام مضخات خاصة هذا اذا كان حجم المزرعة كبيرا جدا كما في الصناعة التي تعتمد على التخمرات .

اما زراعة البكتريا غير الهوائية الاجبارية فتحتاج الى استبعاد الاوكسجين على قدر ما نستطيع وقد يستخدم لهذا الغرض

١- قناني محكمة السد تملأ تماما بالوسط السائل المفرغ من الاوكسجين .

٢- غليان الوسط السائل لطرد O_2 .

٣- تحضن الاطباق 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 مثل Sodium thioglycolate

والحامض الاميني ال Cysteine و كبريتيد الصوديوم Na_2S ..... وغيرها .

ج) تهيئة ثاني أوكسيد الكاربون : تركيز غاز Co_2 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 CO_2 قد تصل الى ٥% الا ان هذه الزيادة تسبب تغير ال PH في الوسط الزرعي لذا يتم استعمال المحلول الدارئ وذلك لزراعة الاحياء المجهرية الضوئية ذاتية التغذية والكيمياوية ذاتية التغذية.

د) توفر الضوء :

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

ه) تجنب رواسب المعادن : حدوث راسب عن تعقيم الأوساط الزراعية وخصوصا عندما يحتوي الوسط الزرعي على ايونات الفوسفات بتركيز عال نسبيا تشكل مشكلة مهمة عند ملاحظة النمو الكمي للاحياء 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 لمركبات هذه المعادن ثم اضافتها الى بقية المكونات في الوسط الزرعي المعقم بعد ان 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 Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) بتركيز ٠,٠١ % تقريبا .

أنواع الأوساط الزراعية :

١- الأوساط الزرعية الاغنائية Enriched media: : يتطلب نمو أنواع كثيرة من الاحياء 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 الاحياء التي تطلب مواد غذائية معقدة .

٢- الأوساط الزرعية الانتخابية selective media :يعتمد عمل هذه الأوساط على ادخال مواد تمنع نمو أنواع معينة من الاحياء 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 كاربوني وحيد لا يستطيع استغلاله الا من قبل مجموعة معينة من الاحياء مثل إضافة النشا كمصدر كاربوني ، من الأوساط الانتخابية وسط MacConkey agar .

٣- الأوساط الزرعية التفاضلية Differential media

وهي أوساط تستعمل للتميز بين نوعين من الاحياء 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 الامينية فالاوساط التحليلية مخصصة لتنمية نوع معين من الاحياء المجهرية المتباينة التغذية التي تحتاج عامل نمو معين وتنتخب هذه الاحياء 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 الاحياء المجهرية من خلال النمو الحاصل عليها او من خلال التغيرات الكيمياوية التي تطرا على هذه الأوساط نتيجة نمو احياء مجهرية معينة عليها او فيها .

٦- الأوساط الزرعية الحفظية Maintenance media :

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

يمكن تمييز الأوساط الزرعية على أساس حالتها الفيزياوية أوساط صلبة Solid او شبه صلبه Semisolid او سائلة Liquid .

ان المرق المغذي Nutrient broth يكون سائلا اما اذا أضيفت اليه كمية قليلة من الاكار agar (0.05) % نحصل على وسط شبه صلب اما اذا تم زيادة نسبة الاكار الى (٢%) الى الوسط السائل نحصل على وسط صلب Nutrient agar .