طرق الحصول على ظروف لا هوائية

1. Deep agar: الطبقات السطحية منه تحتوي على كميات من الأوكسجين أكثر من الطبقات السفلى، وتقل هذه الكميات كلما اخترقنا الأگار إلى الأسفل.
2. الوسط المغذي السائل: يمكن إزالة الأوكسجين منه وذلك بتسخين الوسط إلى درجة الغليان لمدة عشر دقائق لطرد الأوكسجين، إضافة إلى استخدام البارافين المعقم بعد التلقيح لعزل الهواء عن الوسط.
3. إضافة مواد مختزلة لمنع تهوية الوسط بتيارات الحمل مثل:
   - الكلوكوز أو أي سكر آخر.
   - حامض الثايوكلايكوليك الذي يحتوي على مجموعة -SH حرة تتحد مع الأوكسجين.
   - عوامل مختزلة مثل حامض الاسكوربيك، اللحم المطبوخ.
   - مسامير.
4. Anaerobic jar: هو عبارة عن وعاء محكم السد، يمكن خلق ظروف لا هوائية بداخله إما بسحب الأوكسجين منه بواسطة Vacuums واستبداله بخليط من النتروجين وثاني أوكسيد الكاربون. كما يمكن استخدام أكياس الـ (gas pack) الجاهزة بعد إضافة 10 مل من الماء إلى محتويات هذا الكيس ليتحرر غاز الهيدروجين وثاني أوكسيد الكاربون، حيث يتفاعل الأوكسجين المحصور داخل الوعاء مع الهيدروجين المتحرر من الكيس لتكوين الماء وخلق ظروف لا هوائية.

5. Wright's tube: يمكن أيضاً خلق ظروف لا هوائية داخل الوسط الصلب (المائل) باستخدام بلورات pyrogallol، التي تتأكسد في الوسط بوجود هيدروكسيد الصوديوم. فبعد تلقيح البكتريا على سطح الوسط المائل، توضع طبقة من القطن، ثم طبقة من بلورات pyrogallol، ثم يضاف بعدها 1 مل من NaOH (تركيزه 10%) ثم تغلق الأنبوبة بسداد محكم وتحضن في الحاضنة.
6. Brewer's anaerobic petri dish: هذا النوع من الأطباق مصمم بحيث يحتوي الغطاء على جسر يحجز سطح الوسط عند غلق الطبق ويمنع دخول الهواء إلى داخل الطبق. يستخدم وسط صلب خاص بهذه الطريقة هو وسط Brewer's anaerobic agar الذي يحتوي على تركيز عالي من thioglycolate acid.
7. تنمية البكتريا اللاهوائية مع بكتريا هوائية في نفس الطبق (مع ترك مسافة بينهما لمنع التلوث) وسد الطبق سداً محكماً، وفي هذه الحالة سوف تستهلك البكتريا الهوائية الأوكسجين الموجود لتسمح للبكتريا اللاهوائية بالنمو.

ضبط الأس الهيدروجيني pH adjustment للوسط الزرعي المتعادل

بعد تحضير الوسط الزرعي يؤخذ منه حجم قليل ويضبط الاس الهيدروجيني له، ثم بعدها نضبط الأس الهيدروجيني للحجم الكلي قبل تعقيمه. فمثلاً نأخذ 5 مل من الوسط الزرعي ونضعها في بيكر ونضيف عليها قطرة من الدليل (الذي هو عبارة عن مواد كيميائية يتغير لونها بتغير الأس الهيدروجيني للوسط)

بعد قياس الأس الهيدروجيني للوسط باستخدام جهاز pH-meter، إذا كان الوسط قاعدياً يسحح باستخدام HCL (0.1 عياري)، أما إذا كان الوسط حامضياً فيسحح باستخدام NaOH (0.1 عياري)، ثم نحسب كمية الحامض أو القاعدة اللازمة لمعادلة 5 مل من الوسط الزرعي، لاحتساب كمية الحامض أو القاعدة اللازمة لمعادلة حجم الوسط الكلي.

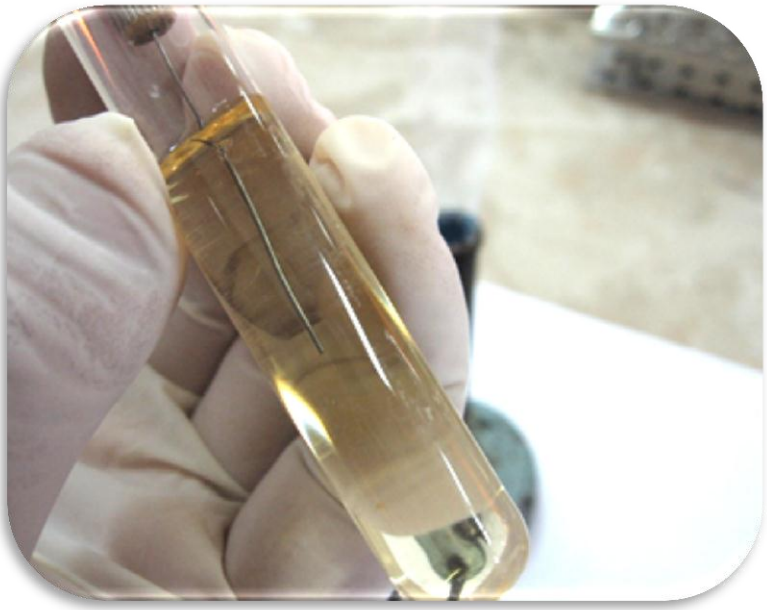
طرائق حفظ المزارع الجرثومية

إن الغاية من حفظ المزارع الجرثومية هو تجنب زراعتها أو نقلها إلى أوساط جديدة خلال فترات قصيرة نسبياً. وإن حفظ الجراثيم بصورة جيدة يعني الحفاظ على أكبر عدد من الجراثيم حية دون أي تغير فسلجي أو وراثي وعموماً فإن كافة الطرق تعتمد على مبدأ إيقاف نمو الجراثيم bacteriostatic باستخدام التبريد أو التجفيف أو كليهما معاً. وهناك نوعان من حفظ الجراثيم:

1. الحفظ لفترة قصيرة short period preservation

يتم الحفظ لفترات بعدة طرائق اعتماداً على خصائص النوع المعني:

- الجراثيم الهوائية aerobes: قد تحفظ لعدة أشهر على أگار مائل في الثلاجة.
- الجراثيم اللاهوائية الاختيارية Facultative anaerobes: والتي يكون الأوكسجين مضراً لها، يتم الحفظ بواسطة مزارع الأگار المطعون stab – agar (حيث يصب الأگار عمودياً وليس مائلاً) وبعد الحصول على النمو يمكن تغطية المزرعة بطبقة من (الفازلين + البارافلم) وذلك لمنع دخول الأوكسجين بالإضافة إلى منع التبخر ومن ثم توضع في الثلاجة.



- الجراثيم اللاهوائية الصارمة strict anaerobes: يجب أن تزرع هذه الجراثيم في وسط مختزل جداً حيث يقوم بسحب الأوكسجين مثل مرق الثايوكلايكوليت مع ملاحظة أن الجراثيم المنتجة للحوامض عند تخميرها للسكريات تؤدي إلى انخفاض الأس الهيدروجيني pH وبالتالي موت الجراثيم، لذا يجب إضافة المحاليل الدارئة buffer solutions إلى الأوساط المستخدمة لتنميتها.

2. الحفظ لفترة طويلة long period preservation

يستخدم هذا النوع لحفظ المزارع الجرثومية لفترات طويلة حيث تستخدم إحدى الطرائق التالية:

- المزج مع حليب اللتموس litmus milk.
- المزج مع الكليسيرين المعقم بنسبة 20% والحفظ بدرجة حرارة −20 م° أو أقل.
- الحفظ في النتروجين السائل liquid nitrogen في قناني مغلقة بدرجة حرارة تتراوح من −100 م° إلى −200 م°.
- طريقة التجميد والتجفيف (التجفيد) lyophilization: مبدأ هذه الطريقة يعتمد على تجميد المزرعة الجرثومية باستخدام الضغط السالب negative pressure. في البداية يتم مزج المزرعة الجرثومية مع الحليب منزوع الدهن والمعقم sterile skimmed milk أو يمكن استخدام مصل الدم بالإضافة إلى مواد أخرى حافظة ومن ثم توضع في أنابيب أو قناني زجاجية وتجمد بسرعة ومن ثم تجفف تحت الضغط السالب وهي مجمدة. ثم تغلق القناني بإحكام حيث يمكن الحفاظ على المزارع الجرثومية حية لسنوات عديدة بهذه الطريقة دون أي تغيير.