كلية : التربية الاساسية – حديثة

القسم او الفرع : العلوم العامة فرع الاحياء

المرحلة: الثانية

أستاذ المادة : لما دلي ابراهيم

اسم المادة باللغة العربية : احياء مجهرية

اسم المادة باللغة الإنكليزية : **Microbiology**

اسم المحاضرة الرابعة باللغة العربية: تنمية الاحياء المجهرية على الاوساط الزرعية

اسم المحاضرة الرابعة باللغة الإنكليزية **Bacterial growth on synthetic media:**

تنمية الجراثيم على الأوساط الزرعية Bacterial growth on synthetic media:

بعد ان درسنا في المختبرات السابقة ماهي الاوساط الزرعية وتدربنا على كيفية تحضيرها بمساعدة الاجهزة والادوات نبدأ الان خطوة زراعة وتنمية البكتيريا في او على الاوساط الزرعية المختلفة تمهيدا لتشخيص الاجناس البكتيرية التي من الممكن عزلها في أي عينة يتطلب الكشف عن البكتريا الموجودة فيها وتدعى جميع الخطوات التي تتعلق بزراعة وتنمية البكتريا بتقنيات الزرع Culturing techniques او تقنيات العزل Isolation techniques.

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:

1- **عكارة turbidity:** تتفاوت في كثافتها حسب نوع الجرثومة وكمية الحقنة كما في جراثيم القولونية E.coli.
2- **تكوين تجمع سطحي pellicle formation:** وهذه تمثل طبقة رقيقة من الخلايا (قشرة) تطفو على سطح المرق، كما في جراثيم العصيات Bacillus.
3- **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.
4- **تكوين مخاط Slime formation:** اذا لم ترتفع الخلايا المترسبة في القعر فيعني ان راسب الخلايا النامية مخاطية، كما في جراثيم Kebsiella.
5- **تكوين الغاز gas formation:** يمكن التأكد من وجوده بمشاهدة فقاعات الغاز التي سوف تنتج عند مزج الانبوب كما في الجراثيم القولونية E.coli.

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

-7

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:

1- طريقة تخطيط الطبق	Streak – plate method
2- طريقة الصب في الطبق	Pour – plate method
3- النشر في الطبق	spreading – plate method
4- الأكار المائل	Agar – slop method

1- 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 يبقي 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) ومن الطرق الشائعة في التخطيط:

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.

2- طريقة الصب في الطبق Pour – plate method :

المقصود بالصب هو صب الوسط الزرعي على طبق البتري الحاوي على العينة)كما في الشكل ادناه(وبهذا تختلف عن طريقة التخطيط بعدة نقاط منها ان العينة محملة مسبقا في طبق البتري ويتم صب الوسط عليها حيث نستعمل الماصة الدقيقة Micropipette لنقل العينة الى الطبق بدال من العروة)الووب (والمسحة القطنية كما ان نتيجة الزرع تختلف أيضا إذ ان المستعمرات الناتجة تكون منفصلة عن بعضها البعض وبإمكان تمييزها عن بقية المستعمرات كما بإمكان حساب عددَوَحدات المكونِة للُمستَعمرات المستعمرات التي تدعى بال (CFU Colony forming units التي تتواجد على سطح او وسط او قعر الوسط)ما تُناسب الطريقة هذه في اختبارات فحص عينة الماء او أي سائل ملوث بالبكتيريا وقد تسبق خطوة الصب اجراء عملية سلسلة تخافيف dilution Serial للعينة قبل تحميلها الى الطبق ومن ثم صب الوسط عليها من اجل الحصول على مستعمرات واضحة ومنفصلة تسهل تشخيصها وحساب عددها

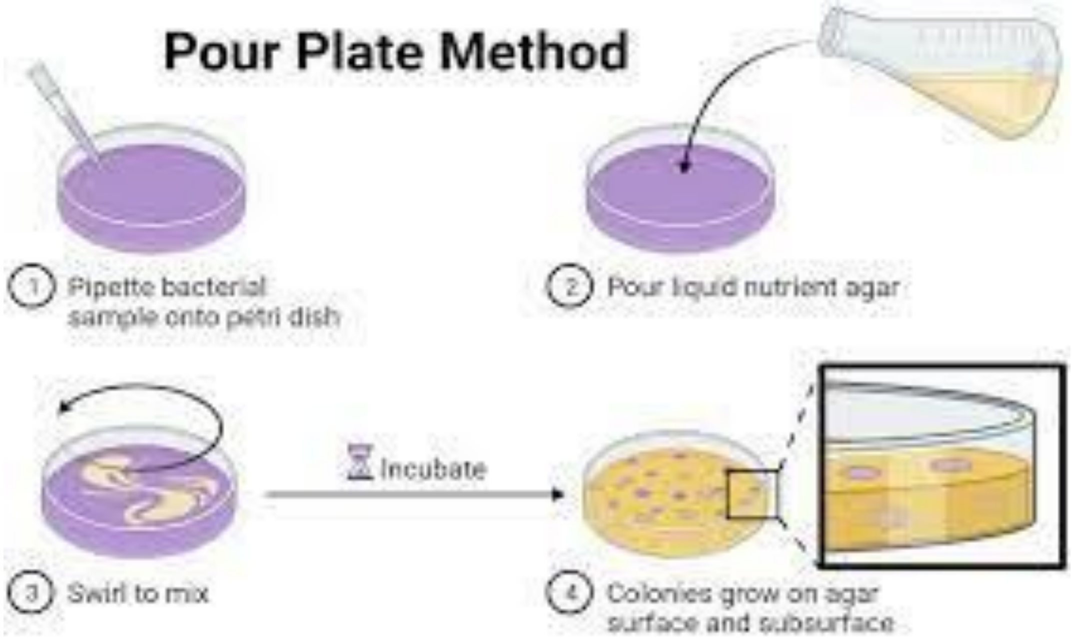
تستعمل هذه الطريقة للأغراض التالية:

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

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

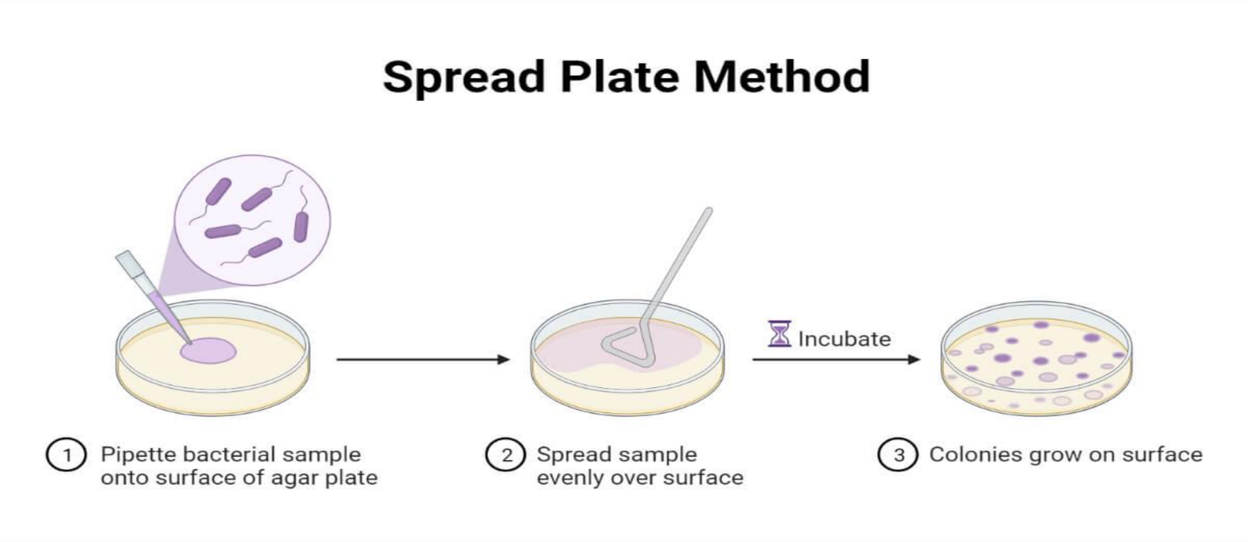
ج- تعداد الجراثيم الحية.

وفي هذه الطريقة يتم حقن الجراثيم اثناء فترة سيولة الاكار في درجة 45°م ومن ثم يصب في الطبق وبذلك تنتشر الجراثيم في كل الوسط وليس فقط على السطح مكونة مستعمرات منفردة في الاطباق.



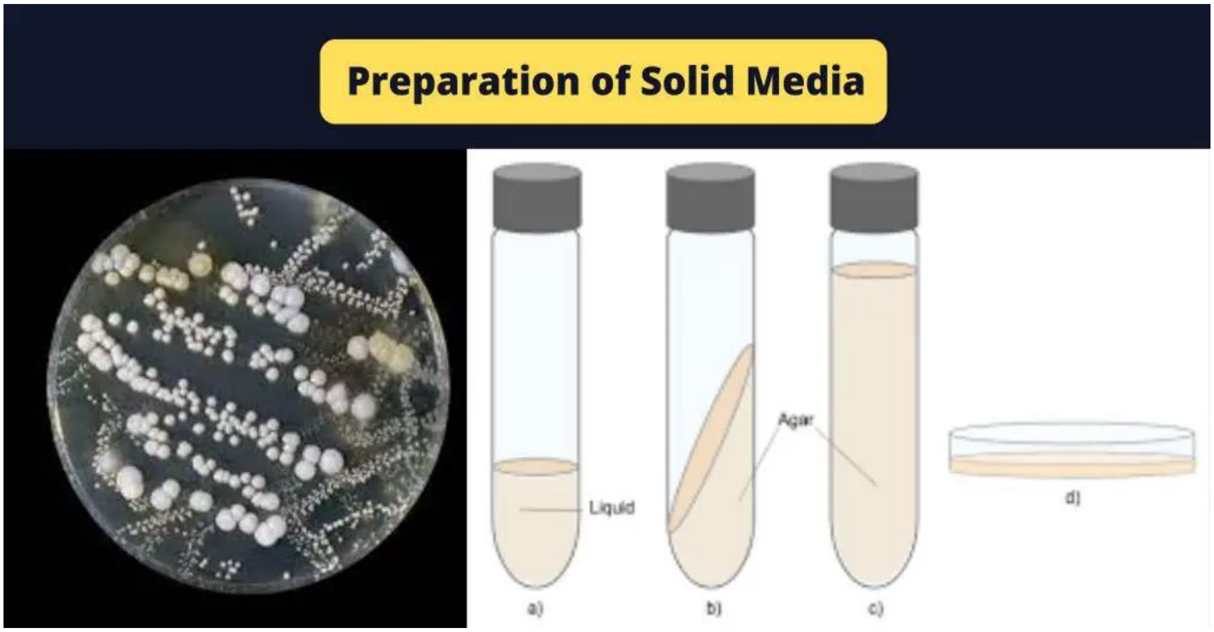
طريقة النشر في الطبق spreading – plate method

في هذه الطريقة يتم نشر العينة على سطح االكار المتصلب بأكمله بحيث تغطي سطح الوسط وت ستعمل من اجل ذلك أداة الناشر الزجاجي التي تدعى ب spreader shape-L او المسحة القطنية وتفيد هذه الطريق في تجربة اختبار او فحص الحساسية test Sensitivity والتي سيتم تناولها في المختبرات القادمة بعد الفحوصات البيوكيميائية. توضع كمية 0,1 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.



3- 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 30° 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 30°.



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:

1- تعقيم منطقة العمل باستخدام الكحول 70% وبحركة دائرية من المركز الى الخارج ومن ثم تلهيب السطح لفترات قصيرة.
2- 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.
3- 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.
4- ضرورة تعقيم فوهات القناني والأنابيب المنقول منها واليها وذلك بتهليبها لفترة قصيرة قبل حقنها بالجراثيم .

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

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.

طرق عزل الاحياء المجهرية من النبات

نحضر عدد من الاجزاء النباتية المصابة ونقطعها قطع صغيرة ثم بعد ذالك نضع القطع لمدة دقيقة الى دقيقتين في محلول القاصر لغرض تعقيمها نلتقط القطع بملقط صغير ومعقم ثم نضعها بماء مقطر لغرض ازالة اثر التعقيم بعد ذالك تنقل الى الوسط وتحضن بالحاضنة

طرق اخذ العينات من الهواء

يعتبر الهواء وسط ناقل للاحياء المجهرية وليس وسط نمو ولغرض دراسة الاحياء الدقيقية في الهواء يعرض الطبق الزرعي الى الهواء لمدة من 10-15 دقيقة بعد ذالك يحضن بالحاضنة

طريقة اخذ العينات من الفم او الانف او الاذن للانسان

نستخد المسحات القطنية للاخذ العينات من هذه المناطق ثم تمرر بشكل خطوط على الوسط الزرعي

ثم يغلق الطبق ويحضن بدرجة 37

محتوى المحاضرة الرابعة