تنقية البكتريا

طرق التنقية

تختلف حسب الهدف من الدراسة والأمكانيات المتوفرة

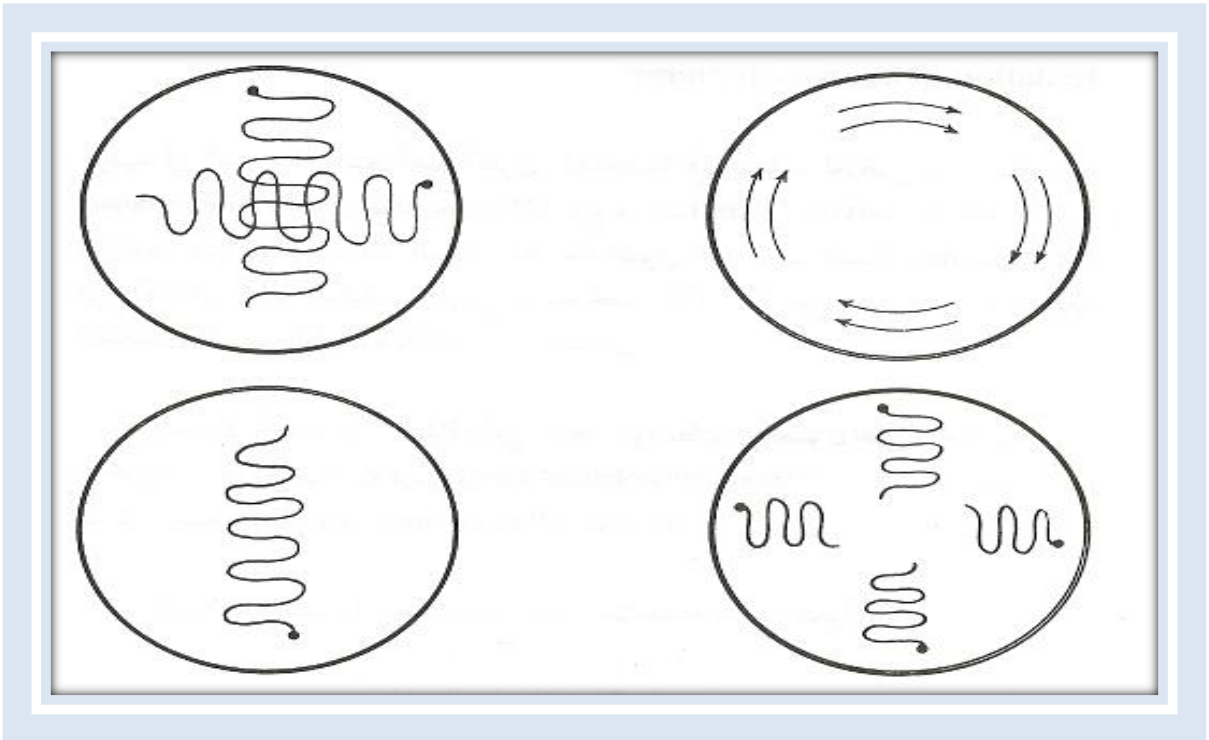
تنقية المزارع البكتيرية

Purification of bacterial cultures

- **توجد طريقتان أساسيتان لتنقية المزارع البكتيرية**
  - **طريقة تخطيط الأطباق (بسيط-متعامد) Streak Plate Method.**
  - **طريقة الأطباق المصبوبة Pour Plate Method.**

أولا : طريقة تخطيط الاطباق: Streak Plate Method

- **الهدف من التخطيط هو الحصول من معلق البكتيريا على مستعمرات منفصلة تماماً.**
- **تخطط العينة على سطح بيئة الأجار المغذي بطريقة التخطيط البسيط أو التخطيط البسيط المتكرر أو التخطيط المتعامد**



أ ـ التخطيط البسيط :

- ❑ **في هذه العملية يحدث تقليل لتركيز الميكروب بمعنى أنه كلما ازدادت عملية التخطيط كلما حصلنا على تركيز أقل للميكروب.**

طريقة العمل:

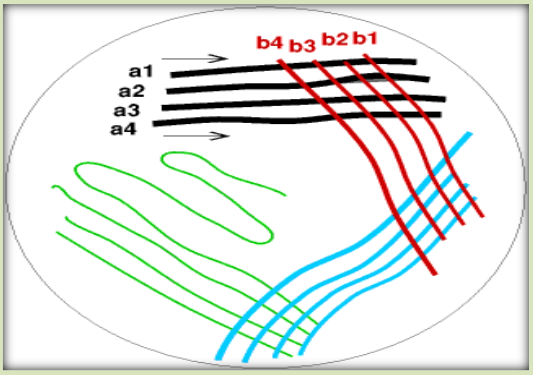
- ✍ **تحت ظروف التعقيم، تعقم إبرة التلقيح باللهب ثم تبرد بلمس حافة الآجار.**
- ✍ **يؤخذ ملء عقدة Loop full من المزرعة المختلطة ويخطط على سطح البيئة الصلبة بطريقة حلزونية.**
- ✍ **تكتب البيانات اللازمة أسفل الطبق.**
- ✍ **تحضن الأطباق مقلوبة عند ٣٧م° لمدة ٢٤ ساعة.**
- ✍ **لاحظ ظهور مستعمرات فردية في الجزء الأخير من التخطيط.**
- ✍ **ملاحظة: يمكن أن نخطط طبق ثاني وثالث بطريقة التخطيط البسيط، إما باستخدام نفس الإبرة أو بإعادة أخذ لقاح جديد.**

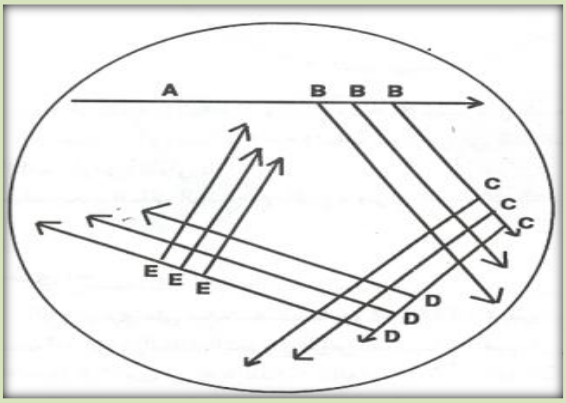
ب) التخطيط المتعامد:

طريقة العمل:

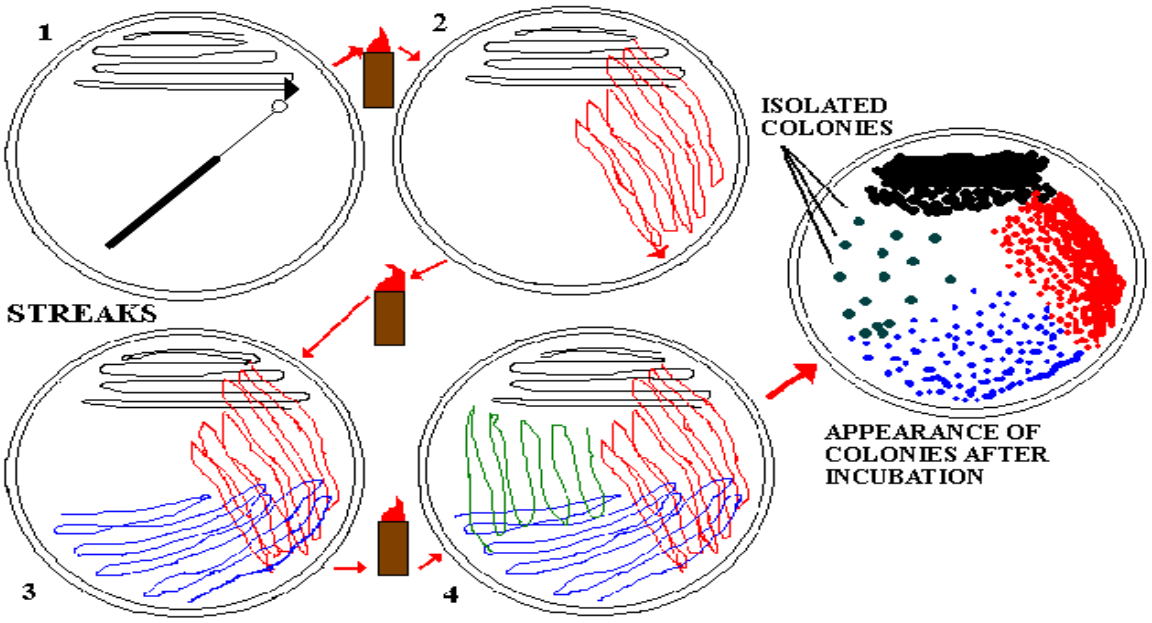
١. **تحت ظروف التعقيم، تعقم إبرة التلقيح كما سبق.**
٢. **بملء العقدة من المزرعة المختلطة يخطط خطوط متعامدة على سطح البيئة الصلبة كما بالرسم.**
٣. **نقوم بعمل ثلاث خطوط أفقية باستخدام إبرة التلقيح المحتوية على اللقاح وذلك على بيئة الآجار الصلب.**
٤. **يتم حرق إبرة التلقيح وتبريدها في طرف الآجار ثم يتم لمس آخر نقطة تم تلقيحها في الخطوط الأفقية السابقة ويتم عمل خطوط متعامدة عليها وهكذا. .**
٥. **يجب مراعاة عدم خلط الخطوط الأولى مع الثالثة، والثانية مع الرابعة وهكذا أثناء التلقيح.**
٦. **يمكن عمل مكررات للتخطيط المتعامد.**
٧. **تكتب البيانات أسفل الطبق ثم تحضن الأطباق مقلوبة عند درجة حرارة من ٣٥ـ ٣٧ م° لمدة ٢٤ساعة.**

لاحظ النمو الكثيف في منطقة الخطوط الأولى يقل تدريجيا حتى تظهر مستعمرات فردية في آخر التخطيط.


b4 b3 b2 b1
a1
a2
a3
a4


A
B B B
C C C
E E E
D D D

الشكل التالي يوضح ا لتخطيط المتعامد مشيرا إلي اتجاه التخطيط وإعادة التعقيم بالأرقام



- سنجد ألوان مختلفة من المستعمرات المختلفة،وقد تكون كل المستعمرات ذات لون واحد،لكن أشكالها مختلفة من ناحية الصفات المزرعية،وقد تكون كل المستعمرات ذات لون واحد وشكل واحد.
- أذا تم الجزم والتأكد من أن المستعمرة المستقلة التي تم الحصول عليها هي نقية تماما فإنه يتم حفظ المستعمرة البكتيرية على بيئة الآجار المائل (أنابيب الآجارالمائل) وتحفظ في الثلاجة لحين استخدامها لإجراء أية تجارب تطلبها الدراسة، (وذلك إذا لم يطلب الحفظ بطرق أخرى).

ثانياً : طريقة الأطباق المصبوبة

طريقة العمل:

- تحت ظروف التعقيم، كل مجموعة لديها ٦ أطباق بتري فارغة معقمة تدون عليها المعلومات.
- كل مجموعة لديها مزرعة بكتيرية مختلطة وأنبوبة اختبار بها ٩ مل ماء مقطر معقم.
- ينقل لكل طبق مقدار ٤ قطرات من الماء المعقم باستخدام ماصة معقمة (بمقدار ½ مل أو أكثر).
- باستخدام إبرة التلقيح المعقمة باللهب والمبردة ينقل للطبق الأول ملء ٤ عقد من المعلق البكتيري ويتم خلط قطرات المعلق مع الماء بإبرة
- ينقل من الطبق الأول إلى الطبق الثاني ملء ٤ عقد وتخلط مع الماء وهكذا.....

- **لكل طبق يصب كمية مناسبة من بيئة الآجار المغذي السائلة والمبردة عند ٤٥ م° (مع مراعاة خلط البيئة مع القطرات جيداً لضمان التوزيع المتجانس).**
- **تترك الأطباق في جو المعمل حتى تتصلب البيئة.**
- **تحضن الأطباق مقلوبة عند درجة حرارة مناسبة من ٣٠-٣٧ م° لمدة ٢٤ساعة.**
- **بعد ذلك يتم تحديد الأطباق التي ظهر فيها مستعمرات فردية واضحة.**

طرق حفظ المزارع الميكروبية (Maintenance of bacterial strains):

بعد عزل وتنقية البكتيريا، يتم حفظها بطرق مختلفة وذلك من أجل تعريفها أو استخدامها في الدراسات المختلفة لأغراض طبية،أو صناعية وغيرهما.

ويوجد العديد من طرق الحفظ التي تستخدم لحفظ البكتيريا لفترات قصيرة أو طويلة المدى.

أولا: طرق الحفظ لفترات قصيرة :

١) طريقة الحفظ باستخدام أنابيب الآجار المائل (Agar Slant):

هو عبارة عن أنبوبة اختبار ذات غطاء وتحتوى على بيئة اجار، وضعت على سطح مائل أثناء تبريدها لتجميد الاجار. إن محتويات الأنبوبة المعاملة بهذه الطريقة تتصلب مكونة سطحا مائلا من السهل تلقيحه بإبرة التلقيح المستقيمة أو ذات العقدة.

وتستخدم أنابيب الآجار المائل لحفظ البكتيريا بعد تلقيحها بالميكروب النقي وتحضينها عند درجة الحرارة المناسبة لمدة ٢٤ ساعة، ثم تحفظ الأنابيب عند درجة حرارة ٤مْ .

وتعتبر طريقة الآجار المائل(Agar Slant) التي تستخدم في زراعة الكائنات الدقيقة على المزارع الصلبة من الطرق الشائعة في حفظ المزارع الميكروبية.(Maintaining stock cultures)

- **<u>مميزات الحفظ في أنابيب الآجار المائل:</u>**
- **١- فرص التلوث في الأنابيب أقل.**
- **٢- مساحة تهوية أكبر من الأطباق.**
- **٣- سهولة التداول والنقل.**
- **٤- تشغل مساحة أقل في الثلاجة.**

٥- جفاف البيئة في الأنابيب أقل من جفافها في أطباق بتري

٢) الحفظ باستخدام الجلسرولGlycerol :

يتم حفظ المزارع البكتيرية في محلول معقم من الجلسرين يتراوح تركيزه من ١٠-٤٠%، عند درجة حرارة (– ٢٠ºم). وفى هذه الطريقة يتم تجميع النمو البكتيرى النقى بالإبرة المعقمة ثم يوضع في أنبوبة بها جلسرين معقم وبعض الحبيبات الزجاجية الصغيرة حتى تمنع تكون بلورات ثلجية أثناء الحفظ.

ثانيا: طرق الحفظ لفترات طويلة :

١) الحفظ باستخدام التجفيد Lypholization :

تتم عملية التجفيد باستخدام جهاز (Lypholizer) حيث يوضع الميكروب في أنابيب ذات فوهة كبيرة في الجهاز، ثم يتم سحب الماء تدريجيا تحت التبريد الشديد. في النهاية نحصل على الميكروب في صورة بودر.