الاوساط الزرعية

CULTUR MEDIA

إن غالبية الدراسات والبحوث البكتيريولوجيه تتطلب استعمال بيئات زرع مختلفة تحضر بالمعمل، وهذه البيئات وإن لم تكن متماثلة تماماً مع البيئات التي تعيش فيها أو عليها هذه الكائنات في الطبيعة إلا أنها قريبة الشبه منها قرباً قد يوفر الاحتياجات والمتطلبات الغذائية اللازم لتنميتها. لذا **يمكن تعريف البيئة بأنها أوساط زراعية مناسبة لنمو الأحياء المجهرية تتوفر فيها متطلبات النمو الأساسية، أو أي مادة يمكن أن تنمو عليها الكائنات الدقيقة. قد تصنف أحياناً البيئات إلى ..**

وتقسم الاوساط الزرعية حسب تركيبها الكيميائي الى:

١- بيئات محددة التركيب الكيميائي Chemically defined media :

وهي التي تتكون من مواد ذات تركيب كيمياوي محدد "بتركيزات معروفة" وعلى ذلك فهي تتكون من أملاح غير عضوية، أو مخلوط من الأملاح غير العضوية ومركبات غير عضوية، ونظراً لأن التركيب الكيمياوي لكل مكونات البيئة التركيبية يكون معروفاً ومحدداً، فإنه يمكن تكرار تجهيز مثل هذه البيئات بنفس الدقة في كل مرةٍ من مرات التحضير.

٢- بيئات غير محددة التركيب الكيماوي Chemically nodefined method :

هي التي تحتوي على مايلزم نمو الميكروبات من مواد بشكلها الخام، مثل البيئات التي يدخل في تركيبها المواد الطبيعية كمستخلص اللحم، الدم، أو مستخلص الأنسجة النباتية، ولما كان التركيب الكيماوي الدقيق لمثل هذه المواد غير محدد بمعنى أن جميع مكونات البيئة وكمياتها غير معروفة بالضبط وتختلف باختلاف المادة الطبيعية المستعملة كان من الصعب تكرار تحضيرها عملياً.

ويمكن تقسيمها على أساس قوامها إلى:

١- بيئات صلبة "طبيعية" Solid media :

مثل شرائح البطاطس أو الجزر.

٢- بيئات صلبة قابلة للإسالة Solid-reversible to liquid :

مثل البيئات التي يدخل في تركيبها الآجار أو الجيلاتين، وتستخدم لتمييز المستعمرات.

٣- بيئـات نصف صلبة Semisolid media :

وهـي التـي تحتـوي علـى كميـة مـن الآجـار لا تزيـد عـن ربـع الكميـة التـي تضـاف إلـى البيئـات الصـلبة القابلـة للإسالة.

٤- بيئـات سائلة Liquid media :

مثل بيئة اللبن أو بيئة المرق المغذي، وتستخدم لتنمية الميكروبات المعزولة بصورة نقية.

توجد بيئات ذات أغراض خاصة لسهولة تنمية وعزل مجموعات معينة من البكتيريا مثل:

١- الأوساط الغنية Enriched media :

وهـي أوسـاط عاديـة بسـيطة مضـافاً إليهـا مـواد غذائيـة غنيـة مثـل الـدم، المصـل، مستخلصـات النباتـات أو الحيوانات لمواجهة متطلبات النمو الصعب الإرضـاء مثل

Serum agar – Milk agar – Blood agar

٢- الأوسـاط الاختيارية Selective media :

مثل إضافة بعض المواد بتركيز معين كالصبغات، أملاح الصفراء، المضادات الحيوية، الأحماض للسماح بنمو مجموعة من البكتيريا دون غيرهـا كإضـافة صبغة الكريستال البنفسجي بتركيز معين يؤدي إلى نمو مختلف أنواع البكتيريا السالبة لصبغة جرام ويمنع نمو البكتيريا الموجبة

٣- الأوساط المفرقة Deferential media :

هي الأوساط التي تسمح بنمو نوعين من البكتيريا يمكن التمييز بينهما، مثل بيئة آجار الـدم فبإضافة الدم إلى الوسط الزراعي يسمح بتمييز البكتيريا المحللة للدم وغير المحللة، حيث تظهر حلقة فارغة حول المستعمرة المحللة، وبذا تلعب الأوساط المحتوية على الدم دور الوسيط الغني المفرق في الوقت ذاته.

٤- بيئـات التقدير الحيوي Biological assay media

٥- بيئـات عد البكتيريا Media for eneumeration of bacteria

٦- بيئـات التعرف على البكتيريا Media for characterization of bacteria

❖ مكونات الاوساط الزرعية المستخدمة في عزل الفطريات:

هناك ثلاثة اوساط زرعية

١. اوساط طبيعية مثل الجزر والطماطة Natural Media
٢. اوساط صناعية (اوساط تركيبة) Synthetic Media
٣. اوساط نصف صناعية او نصف تركيبية Hemi Synthetic Media

- **الاوساط الطبيعية** : تستخدم بعض الاوساط الطبيعية لغرض عزل بعض الفطريات وخصوصاً الفطريات التي تحتاج مواد بشكل جاهز من الصعب ان توفر لها في الاوساط المصنعة كوسط الجزر وسط البطاطا ووسط الخيار
- **الاوساط الصناعية :** تكون خالية من أي مادة طبيعية أي فقط مواد كيميائية من امثلتها الوسط Czapeks Solution Agar ويستخدم على Aspergillus و Pencillum اي متخصص عليها وهذه الاوساط دائماً يضاف لها حامض اللاكتك او مضاد حيوي حتى لايحصل انبات للبكتريا واكثر مضاد حيوي مستخدم هو Chloramphenecol (كبسولة) ٢٥٠ملغم /لتر او اقل .
- **أوساط نصف تركيبية** : هناك العديد من هذه الاوساط تصل الى المئات هي تكون اما اوساط عامة General Media او متخصصة Selcted Media ومن تلك الاوساط الوسط Potato Decstrose Agar (PDA) و Potato Sgar Agar (PSA)
- مكونات وسط PDA:

١. 200غم بطاطا ٢. 20غم دكستروز ٣. 20غم آكار

المكونات الأساسية للأوساط الزراعية:

تشترك معظم الأوساط الزراعية في احتوائها على المواد التالية:

- البيتون Peptone

يعتبر مصدراً هاماً للنتروجين العضوي في البيئات المعدة لتنمية البكتيريا غير ذات التغذية

- خلاصة اللحم Beef extract

تحضر من اللحم البقري الخالي من الدهون بعد غليه وترشيح الخلاصة وتركيزها، يحتوي المستخلص على بعض الأحماض غير العضوية وبعض المواد العضوية مثل الأحماض الأمينية، الجلوكوز، اليوريا، حامض اللكتيك، الفيتامينات، عوامل النمو الأخرى.

- خلاصة الخميرة Yeast extract

تحتوي على بعض الأحماض الأمينية، وبعض العوامل المساعدة للنمو، وأملاح معدنية.

- الماء Water

تحتاج الخلايا الحية إلى الماء لنموها ولإتمام عملياتها الأيضية، وعلاوة على استخدامه كمادة مذيبة للمواد الغذائية، ويفضل استخدام الماء المقطر لخلوها من الأملاح المعدنية.

- المواد التصليبية Solidifying agents :

تضاف إلى بيئة الزرع السائلة بعض المواد لتساعدها على تحولها إلى بيئة صلبة تساعد على تكوين مستعمرات فرديه.

وفيما يلي بعض المواد التصليبية التي تضاف إلى بيئات الزرع ..

١. الجيلاتين Gelatin

أول ما استعمل كمادة تصليبية في بيئات الزرع، وهو عبارة عن مادة بروتينية تحضر بمعاملة عظام الحيوانات، ويندر حالياً استعمال الجيلاتين كمادة تصليبية في البيئة نظراً لأن كثير من البكتيريا يمكن تحليله مائياً، ولأنه ينصهر عند درجات التحضين.

٢. الآجار آجار Agar agar

مادة كربوهيدراتيه تستخلص من بعض الطحالب البحرية الحمراء، والتي تنمو بوفرة على سواحل بعض الدول مثل اليابان، وهو يتصلب عند درجة حرارة من ٤٢- ٤٥م، ويمكن إسالته مرة ثانية عند درجة حرارة ٩٨م، ويتميز عن الجيلاتين كونه لا يمكن تحليله بيولوجيا لأن عدد الكائنات المحللة له قليلة جداً.

٣. السليكا Silica

لا تعتبر مادة غذائية فهي عادة تستعمل في تحضير البيئات اللازمة لتنمية الكائنات الذاتية التغذية، وذلك لمنع نمو البكتيريا غير ذاتية التغذية معها.

التعقيم

Sterilization

تعريفه:

إزالة أو إبادة (قتل) لجميع الميكروبات بصورتها الخضرية أو بصورة جراثيم الموجودة من الوسط المراد تعقيمه سواء كان ذلك الوسط بيئة غذائية أو محاليل مختلفة أو أماكن أو مسطحات محدودة في إبعادها أو إحجامها وعادة يتم التعقيم بالتباع طرق تعتمد على أسس فيزيائيه أو كيميائيه أو ميكانيكيه .

الطرق الفيزيائية _ :physical methods

تعتبر الحراره المرتفعة وكذلك بعض الإشعاعات من أهم العوامل الفيزيائية التي تستعمل في أغراض التعقيم . غير إن التعقيم الحراري هو أكثر أنواع التعقيم شيوعا.

***أولا: الحرارة:**

- **الحرارة الجافة Dry heat sterilization**

١_ اللهب المباشر Incineration heat

ويستخدم في ذالك لهب بنزن مثلا لتعقيم إبرة التلقيح ، وكذالك الشرائح الزجاجية وفوهة الأنابيب وفوهة الدورق .

٢_ أفران الهواء الساخن hot air oven

ويستعمل في تعقيم الأواني الزجاجية ، أطباق بتري ، الماصات وذلك بعد وضعه في اسطوانة معدنيه خاصة بكل منها ، وتوضع هذه الاسطوانات داخل المعقم على درجة حرارة ١٨٠ م لمدة ٣٠ دقيقه أو ١٦٠ م لمدة ساعة إذا أريد تعقيمها تعقيما كاملا، وبعد التعقيم يترك المعقم بعض الوقت حتى يبرد ثم يفتح ونستخرج منه الأدوات حتى لا تبرد فجأة مما قد ينشأ احتمال كسرها وتلويثها .

٣_التلهيب الكحولي Alcohol flaming

يستخدم في تعقيم بعض الأدوات كالمشرط ، الملقط ، المقص وذلك بغمرها الجـــسم المراد تعقيمه في كحول أثيلي ثم يعرض للهب المباشر فيشتعل ما يعلق به من كحول .

- **الحرارة الرطبة Moist heat**

ويقصد به استغلال بخار الماء في إجراء التعقيم بدلا من الهواء الساخن.

١_معقم ارنولد Arnold sterizer

وفيه يستعمل البخار على ١٠٠ م فقط .وهو عبارة عن إناء يوضع به ماء وبداخله أرفف لوضع البيئات والمحاليل المراد تعقيمها ، ويلحق بالجهاز ثيرمومتر.

يستعمل هذا المعقم في تعقيم البيئات التي تفسد عند استعمال الحرارة العالية "أكثرمن "١٠٠م" مثل البيئات التي يدخل في تركيبها الجلايتين أو اللبن أو السكريات

التي يخشى من تحللها بالحرارة العالية ،ويتم التعقيم في هذا النوع من الاجهزه على ثلاث فترات في ثلاثة أيام متتالية، ويعرف التعقيم في هذه الحالة بالتعقيم المتقطع.

٢_معقم الأوتوكلاف"التعقيم بالبخار تحت ضغط " Autoclave

وتعتبر هذه العملية أحسن وأسرع وسائل التعقيم لقدرة الحرارة الرطبة على الاختراق ، ومن ثم فهي تقتل الجراثيم ، وللقيام بهذا النوع يستعمل جهاز يسمى "الاوتوكلاف" Outoclave"، وهو عبارة عن اسطوانة معدنية متينة لكي تتحمل الضغط وبداخلها يوضع الماء ثم توضع المواد والاجهزه المراد تعقيمها على أرفف خاصة ، ويوجد للجهاز غطاء خاص . ومن المعروف إن الماء يغلي عند ١٠٠م تحت الضغط الجوي العادي، وترتفع هذه الدرجة إذا ارتفع الضغط داخل الوعاء الذي يوجد به الماء . وفيما يلي بيان بما يمكن تعقيمه في الاوتوكلاف :

معظم البيئات المغذية التي تتحمل درجات الحرارة المرتفعة مثل بيئة الآجار المغذي .

#الشاش والقماش والقطن.

المزارع الميكروبية المراد التخلص منها كمزارع البكتيريا المرضية . ويجري التعقيم في الاوتوكلاف لمدة ١٥ _٢٠ دقيقه على درجة حرارة ١٢٠ م تقريبا

ثانيا :الإشعاعات radiations

يستفاد عمليا من التأثير الضار لبعض الإشعاعات على البكتيريا في التعقيم بعض الأماكن كغرف العمليات الجراحية وعنابر تعبئة الأدوية و العقاقير المعقمة وغرف التلقيح الملحقة عادة بالمعامل البكتيريولوجية الكبيرة وفي بعض الصناعات الغذائية و صناعة الألبان و في تعقيم السطوح الكبيرة الملوثة ومحطات الحجر الزراعي لتطهير المنتجات الزراعية

١. الأشعة فوق البنفسجية ultravoilt radiation

تستعمل عادة هذه الأشعة أكثر من غيرها من أغراض التعقيم وفي الأغراض السابق ذكرها ويلاحظ أن الأشعة فوق البنفسجية لها قدرة ضعيفة على التغلغل داخل الأشياء من ذلك نرى أن فعلها التعقيمي سطحيا و قد يعزى تأثيرها على الخلية

٢. الإشعاعات الأخرى

يمكن استعمال الأشعة السينية x-ray ذات الموجات القصيرة وكذلك أشعة جاما في أغراض التعقيم وهذه الإشعاعات لها قدرة على إختراق الأجسام الصلبة و التغلغل فيها ولكنها تتطلب أجهزة خاصة ذات تكاليف عالية .

ثالثا:الطرق الكيميائية chemical methods

من المواد الكيميائية التي تستخدم في صورة محاليل للتعقيم السطحي

- الكلوروفورم: تعتبر من المطهرات الطيارة وتستخدم في تعقيم بعض المواد مثل سيرم الدم ويتم التخلص منه بتسخينة على حمام مائي على ٧٥م كي يتطاير
- الفينول أو حمض الكربوليك :

قد تستعمل بعض المواد مثل الفينول بتركيز ٥% للتعقيم السطحي للأرضيات الغرف والعيادات و بعض الأدوات والأجهزة

- كلوريد الزئبقيك (محلول السليماني):

يستخدم لتعقيم الأيدي و المناضيد ودرنات البطاطس مثلا لعزل الميكروبات الممرضة له و الموجودة بداخلة أي تستخدم لتعقيم الأسطح الخارجية للنباتات

- كحول الإيثيل :

يستخدم بتركيز من ٥٠-٧٠% في تطهير الأيدي أو المناطق المختلفة في الجسم و يرجع تأثيرها المميت إلى تجميعها وتخثيرها للبروتين الخلوي .

رابعا:الطرق الميكانيكية mechanical methods

- تعتمد هذه الطرق على إزالة خلايا الكائنات الحية الدقيقة من الوسط الكامنة فيه بطريقة ميكانيكية كأن تحجز الثقوب الدقيقة للمرشحات المستعملة خلايا الكائنات الحية ذات الأقطار التي تزيد عن أقطار ثقوبها و التعقيم بالمرشحات لايتوقف على قطر الثقوب فقط بل يتوقف أيضا على الشحنة الكهربائية للمرشح وكذلك الشحنة الكهربائية للكائنات الدقيقة المحتوي عليها السائل وهناك العديد من المرشحات تختلف فيما بينها في نوع المادة التي يصنع مثل مرشح عجينة باريس وهو مصنوع من الجبس ومرشح شمبرلاند المصتوع من نوع معين من الخزف الصيني

و تستعمل المرشحات في تعقيم بعض المواد التي لايمكن تعقيمها عن طريق الحرارة الرطبة بنوعيها حيث أن الحرارة المرتفعة تغير من الخواص الكيميائية و الفيزيائية لهذه المواد مثل التحضيرات الإنزيمية ومحاليل المضادات الحيوية .