جامعة حماه – كلية الصيدلة **الجلسة العملية الثانية**

السنة الثالثة **الأوساط الزرعية المستخدمة في استنبات الجراثيم**

تعرّف الأوساط الزرعية بأنها مزيج من المواد المغذية تمكّن الجراثيم من النمو وتضمن لها استمرار حياتها وتكاثرها، وبالتالي عزلها والتعرف على أنواعها وحفظها في ظروف مناسبة من حيث نوعية مركباتها ودرجة حموضتها الملائمة.

لذلك كان لا بد لهذه الأوساط الزرعية من أن تحقق بعض الخصائص الهامة، وهي:

- أن تحوي مواد مغذية أساسية كالكربون والآزوت العضوي والفوسفور والكبريت ومعادن أخرى بالإضافة إلى عوامل النمو اللازمة (Growth Factor) كالدم والهيموغلوبين والفيتامينات وغيرها.
- أن تحقق شروط كيميائية مناسبة كدرجة الـ pH ، فمن الملاحظ بأن معظم الجراثيم تنمو على أوساط قلوية خفيفة تتراوح حموضتها بين 7 - 7.8، أما الفطور فإنها تنمو في أوساط حمضية تتراوح حموضتها بين 5 - 6.5، وكذلك يجب أن تحقق ضغط حلولي نظامي ويتم ذلك بإضافة ملح الطعام، وأن تسمح بحدوث عمليات الأكسدة والإرجاع.
- أن تسمح بدراسة الخواص الاستقلابية والصفات الكيميائية الحيوية للجراثيم المراد دراستها.

فاستنبات الجراثيم يمكن أن يتم وفق نمطين اثنين، هما:

- الاستنبات في الأوساط الحية In vivo: وتستخدم هذه الطريقة لاستنبات الجراثيم التي لا تسطيع الحصول على غذائها بنفسها، كالجراثيم الطفيلية، ومنها الريكتسيات *Rickettsiaceae*، التي يتم استنباتها في الكيس المحي للبيض المحضون لجنين عمره 6 – 7 أيام وتحضن مدة خمسة أيام في الدرجة 37 °C.
- الاستنبات في الأوساط الزرعية الصنعية In vitro.

وإن اختلاف المتطلبات الغذائية للجراثيم يحتم وجود عدة أنواع من الأوساط الزرعية تختلف باختلاف النوع الجرثومي المراد دراسته وهدف الدراسة، لذلك تقسم الأوساط الصنعية إلى مجموعتين رئيستين:

<u>الأولى: مستنبتات التكثير</u>: وهي أوساط سائلة تستخدم في تكثير الجراثيم وزيادة عددها في العينة المدروسة قبل زرعاها على أوساط العزل، ويندرج تحت هذا النوع عدد من الأوساط نذكر منها الأوساط المستخدمة في تكثير الإمعائيات وهي: مرق ماكونكي Mac Conky Broth، ومرق السيلينيت Selenite-F.

Dr.Hiba Ahamed Alourfi

<u>الثانية: مستنبتات العزل</u>: وهي أوساط صلبة غالباً تستخدم لعزل الجراثيم بعد تكثيرها هذا من جهة، ومن جهة أخرى يمكن أن نستفيد من شكل المستعمرة الذي يسمح لنا بتشخيص تقريبي للجنس، حيث أن بعض الأنواع الجرثومية يمكن أن تنمو على عدد من الأوساط معطية أشكالاً مستعمرية مختلفة. فمثلاً تعطي العصوية القولونية *Escherichia coli* عند نموها على وسط S.S Agar مستعمرات ضعيفة النمو، أما على وسط هكتون فتعطي مستعمرات صفراء مخاطية محاطة بهالة حمراء، وتكون المستعمرات على وسط ماكونكي حمراء قرنفلية، أما على وسط E.M.B فتعطي مستعمرات بنفسجية ذات بريق معدني.

وتندرج تحت هاتين المجموعتين عدد من المجموعات الأكثر خصوصية، ونذكر منها:

أ- الأوساط البسيطة Simple Media:

وتستخدم هذه الأوساط لتنمية الجراثيم عادية المتطلبات الغذائية أو من أجل تحضير الأوساط الزرعية الغنية ومثال هذه الأوساط المرق المغذي Nutrient Broth والآغار المغذي Nutrient Agar.

ب- الأوساط الغنية Enriched Media:

وتتألف هذه الأوساط من مرق اللحم والآغار المغذي، حيث تسمح بنمو أمثل للجراثيم وخاصة تلك التي تكون صعبة المتطلبات الغذائية، ولتحضير هذه الأوساط يضاف إلى الوسط قليل من الدم منزوع الليفين بنسبة 5% وذلك لنمو الجراثيم المحبة للدم، كذلك يمكن إضافة صفار البيض والفيتامينات. وتستخدم هذه الأوساط لاستنبات الجراثيم غيرية التغذية (كالجراثيم المرضية Pathogenic Bacteria) والتي تحتاج إلى مركبات عضوية من أجل نموها وتطورها حيث تستطيع أن تحطم المركبات العضوية وتستخدمها في بنائها واستقلابها.

ت- الأوساط التفريقية Differential Media:

تستخدم هذه الأوساط لتمييز الأنواع المختلفة من الجراثيم على أساس خواصها الكيميائية الحيوية وقدرتها على تفكيك مركب ما مضاف إلى هذه الأوساط، أو قدرتها على تشكيل مركب ما دون بقية الأنواع الأخرى، فعند تحضير هذه الأوساط يضاف إليها بعض المواد الخاصة للتفريق بين الأنواع الجرثومية، فعلى سبيل المثال على الوسط الغني المضاف إليه الدم منزوع الليفين بنسبة 5% يمكن لبعض الجراثيم أن تشكل أثناء نموها منطقة شفافة حول المستعمرات الجرثومية، وتنتج هذه المنطقة عن انحلال الكريات الحمراء للدم تحت تأثير الأنزيمات المحللة للكريات الحمراء والتي تفرزها بعض الجراثيم هذا الانحلال قد يكون:

- كلياً أو يسمى β- Hemolytic كالناتج بتأثير جراثيم المكورات العقدية القيحية *Streptococcus pyogens*، وجراثيم المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*.

Dr.Hiba Ahmed Alduihi

- أو يكون جزئياً ويدعى α- Hemolytic كالذي تسببه جراثيم المكورات العقجية المخضرة *Streptococcus virdins*
- أو ألا تظهر هذه المناطق الشفافة للأنواع التي لا تحلل الكريات الحمراء أو ما يدعى γ- Hemolytic فالجراثيم هي المكورات العقدية البرازية *Streptococcus foecalis*.

وبذلك نستطيع التفريق بين ثلاثة أنواع من الجراثيم.

ث- الأوساط الاصطفائية Selective Media:

هذه الأوساط تسمح فقط بتكاثر أنواع جرثومية معينة وذلك لأن هذه الأوساط تحوي على بعض المواد الكيميائية أو بعض الملونات أو الصادات الحيوية، حيث أن هذه الأوساط تثبط الجراثيم الأخرى وتسمح بنمو أنواع جرثومية معينة. ونذكر من أمثلتها:

وسط شابمان Chapman Media: والذي يحوي على 75 غ/ل من كلور الصوديوم و 10 غ/ل من المانيتول بالإضافة إلى حمرة الميثيل. وتنمو على هذا الوسط فقط المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus*، بينما يثبط نمو معظم الجراثيم الأخرى بسبب التركيز الملحي العالي.

وسط السالمونيلا والشيجيلا Salmonella-Shigilla Agar (SS Agar): وهو وسط مكون من الآغار المضاف إليه اللاكتوز والأملاح الصفراوية والسيترات والأخضر اللماع وهيبوسولفيت الصوديوم والأحمر المعتدل. هذا الوسط ملائم جداً لعزل السلمونيلا والشيجيلا وبعض الجراثيم المعوية ولا يسمح بنمو الجراثيم موجبة الغرام.

ج- الأوساط الخاصة بتعداد الجراثيم Media for enumeration of bacteria:

وهي أوساط خاصة من أجل تقدير أعداد الجراثيم في عينة ما كالماء مثلاً، ومن هذه الأوساط وسط Plate Count Agar.

ح- الأوساط الخاصة بدراسة تخمرات السكاكر Sugar Fermentaion Media:

إن دراسة تخمر السكاكر من قبل الجراثيم يعتبر اختباراً هاماً للتعرف على الجراثيم وتشخيصها، لذلك يضاف السكر المراد دراسته ومشعر لدرجة الحموضة (مثل أحمر الفينول، أزرق البرموتيمول) ويضبط الوسط على pH ذات تفاعل قلوي خفيف. فإذا استهلكت الجراثيم السكر وفككته فإن ذلك يؤدي إلى تحرر بعض الحموض التي تؤدي إلى تغير التفاعل الحمضي في الوسط وبالتالي تغير لون الوسط، فهذا التغير يشير إلى أن الجرثوم قام بتخمير السكر المضاف إلى الوسط، ومن هذه المجموعة نذكر وسطاً يسمى (Triple Sugar Iron Agar (TSIA.

Dr. Hiba Ahamed Alquini

طرق تحضير المزارع الجرثومية

يطلق اسم المزرعة الجرثومية على المجموع الناتج عن نمو الجراثيم على الأوساط الزرعية المختلفة. لذلك فإنه بالإمكان التميز بين نوعين من المزارع الجرثومية، وها، **المزرعة النقية** Pure Culture وتحتوي على نوع جرثومي واحد فقط، و**المزرعة المختلطة** Mixed Culture وتحتوي على عدة أنواع جرثومية. وقلما نجد في الطبيعة مزرعة جرثومية نقية، إذ تختلط الأنواع الجرثومية في البيئات الطبيعية بعضها مع بعض، وقد تحتوي المزرعة المختلطة على نوعين أو أكثر من الجراثيم، وهذا يحتم علينا عزلها اعتماداً على بعض الصفات الشكلية لمستعمراتها هذه الأنواع وباستخدام أوساط انتقائية مختلفة.

تختلف طرق تحضير المزارع الجرثومية باختلاف الأنواع الجرثومية وهدف الدراسة، فإذا كانت كمية الجراثيم كبيرة فإننا نزرعها على وسط صلب بعد إجراء عملية التخفيف أحياناً، بينما تزرع الكميات القليلة من الجراثيم على أوساط سائلة بغية زيادة عددها.

وعليه يمكن التميز بين عدة ثلاثة أنماط للمزارع الجرثومية:

A- المزارع الصلبةSolid Culture.

B- المزارع السائلة Liquid Culture.

C- المزارع نصف الصلبة Semisolid Culture.

A – المزارع الصلبة Solid Culture: وهي التي تحتوي على عامل مساعد على تصلب الوسط الغذائي مثل الآغار Agar أو الجيلاتين Gelatin أو السيليكا جل Silica Gel، ولكن أفضل تلك المواد هي التي لا تستهلك من قبل الجراثيم ولا تثبط نمو الجراثيم ولا تميع في درجة حرارة الغرفة.

وتختلف المزارع الصلبة باختلاف هدف الدراسة، إذ توجد منها ثلاثة أنواع وهي:

1 – مزارع الأطباق Agar Plate: وفيها تنمو الجراثيم على أوساط مغذية صلبة في أطباق بتري بطريقتين شائعتين جداً في هذا المجال:

- **طريقة التخطيط Streak Plate Method:**

إن الهدف الرئيس من عملية التخطيط هو تخفيف اللقاح إلى أقصى درجة ممكنة، وبهذا يظهر النمو الجرثومي في نهاية الخطوط على شكل مستعمرات نقية مفردة.

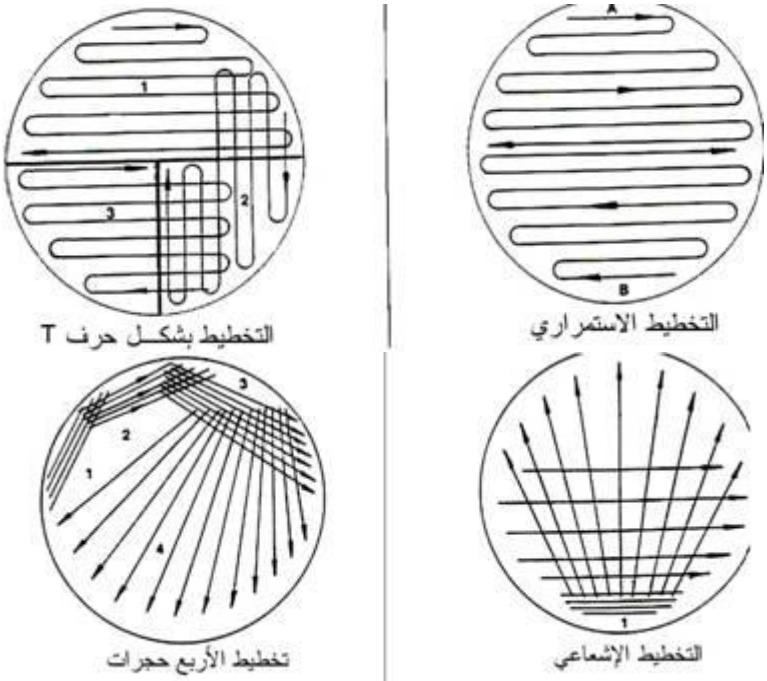
وتتضمن ثلاث خطوات متتالية:

1 – صب الآغار السائل في أطباق بتري معقمة وتركها حتى تتصلب.

2 – تعقيم أبرة التلقيح على اللهب.

3 – تلقيح سطح الآغار بتخطيط مناسب، من الأنماط الأربعة الأكثر شيوعاً الموضحة في الشكل.

Dr.Hiba Ahamed Alobi



- **طريقة الأطباق المصبوبة Pour Plate Method:** وهدفها توزيع العينة بشكل متجانس في كامل الوسط المغذي. إذ تتم عملية الاستنبات هنا بتلقيح الآغار المغذي بالعينة المطلوبة قبل تجمده عند الدرجة 45 °م ومن ثم يسكب في أطباق معقمة وتترك حتى تتصلب، وبعد التحضين يلاحظ تشكل مستعمرات مدفونة في الوسط المغذي وأخرى سطحية منفصلة يمكن عزلها ودراستها.

2 – مزارع الآغار المائل Slant Culture: وتحضر هذه المزارع بصب الآغار السائل في أنابيب اختبار ومن ثم توضع على بشكل مائل على سطح مستوٍ وتترك لتتصلب، وبذلك تحقق هذه المزارع زيادة في مساحة السطح التي تنمو عليه الجراثيم، وتحافظ على الرطوبة، وتمنع تجفاف الوسط.
تتم الزراعة على هذه المزارع بوضع اللاقحة الحاملة للجراثيم بتماس مع الجزء السفلي للأنبوب ثم تفرش على سطح الآغار نحو الأعلى. وتستخدم هذه المزارع عند حفظ العينات الجرثومية لفترات طويلة.

3 – مزارع الآغار العميق Deep Culture: وتحضر هذه المزارع بنفس طريقة تحضير المزارع المائلة ولكن توضع عمودية على سطح مستوٍ. ويتم تلقيحها بطريقتين:

- **طريقة الوخز Stab Method:** وذلك بغرس أبرة التلقيح الحاملة للجراثيم في الوسط المغذي ولمرة واحدة فقط وتستخدم لمعرفة الاحتياجات الهوائية للجراثيم.

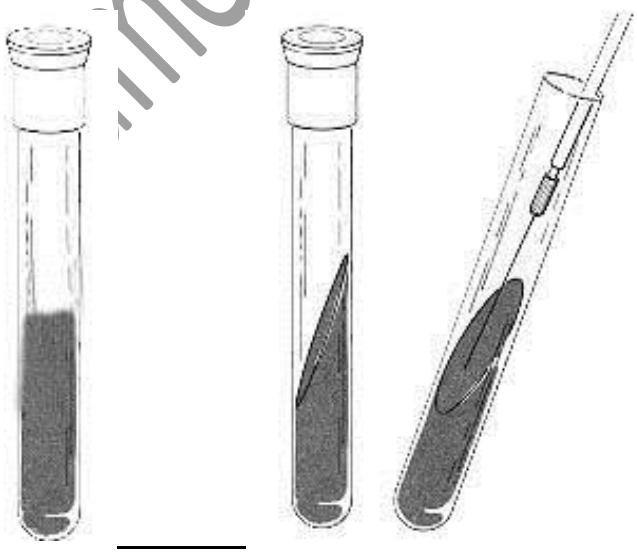
Dr Hina Ahmed A.

- **طريقة الهز Shake Method:** حيث يتم تحضير المزرعة بتلقيح الوسط الزرعي قبل تصلبه، ثم يهز أنبوب الاختبار بهدف الحصول على توزع منتظم للجراثيم. وبذلك نحصل على مزارع تسمى المزارع متساوية التوزع وغالباً ما تستعمل لعزل الجراثيم اللاهوائية.

B – المزارع السائلة Solid Culture: تستخدم هذه المزارع من أجل إكثار الأعداد القليلة من الجراثيم، حيث يتم نقل الجراثيم إلى الوسط الغذائي السائل المصبوب بأنابيب اختبار أو أرلنيمايرات باستخدام أبرة التلقيح ذات العقدة حيث أن قطرة من السائل تحوي ملايين الجراثيم التي تنقل من وسط إلى آخر.

C – المزارع نصف الصلبة Semisolid Culture: وهي تشبه المزارع الصلبة ولكنها تكون ذات قوام هلامي أو جيلي وذلك لانخفاض نسبة الآغار فيها، تستخدم هذه المزارع لتحديد ودراسة حركة الجراثيم.

بعد الانتهاء من الزراعة تحضن المزارع بدرجة حرارة مناسبة لنمو النوع المدروس بوضعها في جهاز خاص يدعى بالحاضنة Incubator، ويجب الانتباه إلى قلب الأطباق أثناء الحضن لمنع تبخر الماء من البيئة المغذية ومنع تكاثفه على لسطح الداخلي لمنع التلوث.



مزارع الآغار المائل مزارع الآغار العميق

Dr.Hiba Ahmed Aldujhi