الاوساط الزرعية Culture Media

تدعى المادة أو المواد الغذائية المستخدمة لنمو وتكاثر الاحياء المجهرية مختبريا بالاوساط الزرعية Culture media ويجب ان يحتوي الوسط على جميع الاحتياجات الغذائية الضرورية للنمو وتوفر الطاقة والوحدات الاساسية لبناء اجزاء الخلية وتراكيبها. واهم هذه الوحدات هي الكاربونC (الطاقة)،النيتروجين N ، ماء(70–90%) الغني بالعناصر المعدنية مثل النحاس والخارصين والكوبلت ... كما يحتوي الوسط على املاح Na,K,Ca,Mg وفيتامينات ومساعدات النمو والدواريء (buffers) التي تمنع أي تغير واضح في درجة حموضة الوسط PH الوسط وذلك عن طريق تفاعلها مع الحوامض أو القواعد ليبقىPH الوسط بحدود التعادل. من امثلة الدواريء بعض الاملاح خاصة الفوسفاتية منها:

$KH_2PO4 + NaOH \rightleftharpoons KNaHPO4 + H_2O$

$KNaHPO4 + NaOH \rightleftharpoons KNa_2PO4 + H_2O$ (مع القاعدة)

$K_2HPO4 + HCI \rightleftharpoons KH2PO4 + KCI$ (مع الحامض)

ويمكن للكاربونات والمواد العضوية كالبروتينات (الببتون) ان تعمل كدواريء. حيث ان الفعاليات الحيوية لبعض الاحياء المجهرية قد تؤدي إلى زيادة كمية الحوامض أو القواعد. وظيفة الداريء هي لمنع هذا التغير السريع في الوسط الغذائي.

تقسم الاوساط حسب حالتها الفيزيائية إلى:

1– **البيئات السائلة Liquid Media وتشمل:**

الوسط المغذيnutrient broth, glucose broth, tryptic soy broth, brain heart infusion هذا النوع من البيئات يستخدم للأغراض التالية:

1– لتنمية الاحياء بكميات كبيرة.

2– لدراسة التخمر Fermentation .

3– للختبارات البايوكيميائية Biochemical tests.

4- تستخدم بيئة thioglycolate broth لتنمية البكتريا اللاهوائية أو قليلة الاحتياج للهواء anaerobic and microaerophilic لاحتوائه على مادة الصوديوم ثايوكلايكوليت sodium thioglycolate الذي يتفاعل مع جزيئة الاوكسجين وازالته وبهذا يؤثر على خفض جهد الاكسدة والاختزال في الوسط.

2- البيئات الصلبة Solid media:

تحضر هذه البيئات باضافة مواد مصلبة للوسط مثل الاكار agar والجيلاتين إلى البيئة الغذائية السائلة.

Agar: مادة متعددة السكريات polysaccharide تستخلص من نوع من الطحالب البحرية Geledium spp . من اهم خصائصه:

1- لا يتحلل بيولوجيا، أي ان معظم الاحياء المجهرية غير قادرة على تكسير واستهلاكه كمادة غذائية.
2- لا يتحطم بالدرجات الحرارية العالية كذلك من الممكن تعقيمه بالحرارة العالية للموصد(121م°).
3- يذوب بدرجة حرارة 98 م° ويتجمد بدرجة حرارة 45 م° ولا يتميع بدرجة حرارة الغرفة.
4- يضاف بنسبة (1.5- 2%).

اما الجيلاتين: هو عبارة عن مادة بروتينية تتكون من15 حامض اميني مرتبطة مع بعضها بأواصر ببيتدية من خصائصه:

1- يتحلل بيولوجياً من قبل بعض البكتريا المنتجة لا نزيم Gelatinase.
2- يتميع بدرجة حرارة 26 م° ويتجمد عند الدرجات الحرارية الواطئة.
3- يضاف إلى الوسط بنسبة (10-15%) وقد تزداد إلى (20-25%) عند درجة حرارة الجو.

مثال على الاوساط الصلبة الاكار المغذي Nutrient Agar ، اكار الدم Blood Agar، اكار الدم المطبوخ Chocolate Agar اما فوائدها:

1- لدراسة صفات المستعمرات للبكتريا والاعفان.
2- لعزل الكائن بصورة نقية من المزارع المختلطة.
3- لخزن المزارع.
4- دراسة بعض التفاعلات الكيموحيوية.

تصب البيئات الصلبة في اطباق Petri Dish في انابيب اما على هيئة

أ- اكار عميق Deep Agar لتنمية الاحياء المجهرية اللاهوائية.

ب- الاكار المائل Slant Agar لحفظ المزارع ودراسة بعض الصفات البايوكيميائية.

3- البيئات شبه الصلبة Semi Solid Media

يستخدم هذا النوع من البيئات لدراسة حركة البكتريا وتنمية البكتريا اللاهوائية مثال SIM وتقسم الاوساط الزراعية حسب طبيعة مكوناتها إلى:

1- الاوساط الصناعية Synthetic Media: وهي الاوساط التي فيها مكونات معلومة الكمية.

2- الاوساط الطبيعية Non-Synthetic Media: وهي اوساط مكوناتها طبيعية مثل الحليب والبيض والبطاطا ومصل الدم مثال ذلك وسط المرق المغذي Nutrient Broth المتكون من خلاصة اللحم Beet Extract والببتون Peptone ، خلاصة الخميرة Yeast Extract هي الاخرى من اكثر المكونات شيوعا واستخداما. هذا النوع من البيئات يكون معقد التركيب وغني بالفيتامينات والمغذيات.

الببتون Peptone: هو عبارة عن بروتين حيواني (لحوم أو كازائين) أو نباتي (فول الصويا أو بذور القطن) معامل بأنزيمات هاضمة (مثل التربسين). ينتج عن عملية الهضم الانزيمي خليط من البتيدات، الحوامض الامينية، كربوهيدرات، اضافة إلى مواد عضوية ولاعضوية. اضافة الببتون إلى الوسط الزراعي يوفر كل المتطلبات المعدنية الضرورية للكائن الحي مثل الفسفور، الكبريت، الكربون العضوي والنتروجين.

طريقة تحضير الاوساط الزرعية Preparation of Culture Media

يتم بإذابة وزن معلوم من الوسط في الماء المقطر اعتماداً على التعليمات الموجودة على علب الاوساط الزرعية الجاهزة وقد تستخدم الحرارة فقط في تحضيره الاوساط الزرعية الحاوية على الاكار لإذابة جميع مكونات الوسط ويمكن استخدام جهاز المحرك المغناطيسي Magnetic stirrer لتسهيل هذ الخطوة .

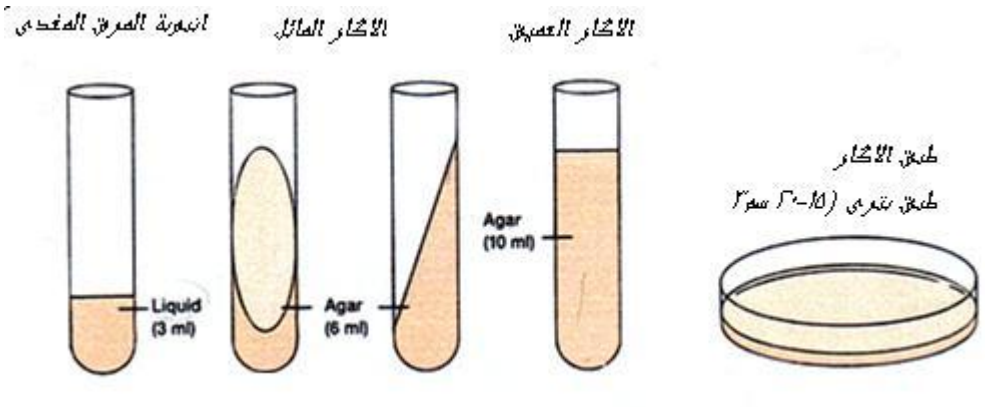
ضبط الاس الهيدروجيني PH adjustment

بعد تحضير الوسط يؤخذ حجم قليل من البيئة ويضبط الاس الهيدروجيني لها و بالتالي نضبط PH الحجم الكلي للوسط قبل تعقيمه. مثلاً: نأخذ 5 مللتر من الوسط الغذائي ونضعها في بيكر ونضيف قطرة من الدليل "وهو عبارة عن مواد كيميائية تتغير الوانها بتغير PH الوسط"

إذا كانت البيئة قاعدية تسحح باستخدام 0.1 عياري HCl واذا البيئة حامضية تسحح باستخدام 0.1عياري NaOH ثم نحسب كمية الحامض أو القاعدة اللازمة لمعادلة 5 مل من البيئة ثم نستخرج كمية الحامض أو القاعدة اللازمة لمعادلة 1000سم^3 من البيئة فمثلا:

حجم البيئة (الوسط الزرعي)	كمية الحامض
5 سم^3	0.2
1000 سم^3	س
اذا س = 40 سم^3	

قياس الـ PH يكون اما باستخدام جهاز PH-Meter أو باستخدام PH – Paper معظم الاوساط الزرعية يكون الاس الهيدروجيني قريب من التعادل. ثم يسخن الوسط الزرعي لحد الغليان، تغلق فوهة الدورق بسداد قطني، ويعقم بجهاز الموحد (121م° لمدة 15دقية) أو إذا احتوى الوسط على مواد تتحطم بالحرارة فمن الممكن ان يعقم بعملية التندلة أو الترشيح. واخيرا يبرد إلى درجة 50 م° فيصب بأحد الاشكال المبينة في الشكل ادناه



اشكال صب الاوساط الزرعية

انواع البيئات الغذائية

1- البيئات الغنية Enriched media : بعض انواع البكتريا تحتاج إلى مواد اضافية في الوسط اضافة إلى المكونات الرئيسية مثل الدم المصل، السائل الخلبي بنسبة 10% أو الكلوكوز بنسبة 2% حيث تضاف هذه المواد إلى البيئات الاعتيادية بعد تعقيمها بجهاز التعقيم. لانها مواد بروتينية أو سكريات تتلف في درجات التعقيم العالية من امثلة هذه الاوساط:

أ- بيئة اكار الدم blood agar: تستخدم لتنمية انواع من البكتريا التي تحتاج إلى بروتينات وفيتامينات موجودة في الدم يحضر من اضافة الدم إلى وسط الاكار المغذي بعد تعقيمه وتبريد إلى درجة حرارة 50 م°.

ب- وسط اكار الدم المطبوخ chocolate agar: يضاف الدم إلى وسط الاكار المغذي وهو بدرجة 90- 95 م° يستخدم لتنمية بعض البكتريا المعقدة مثل *Haemophilus influenzae*

ج- بيئة Thayer-martin: تستخدم لتنمية مكورات السيلان *Neisseria gonorrhoeae*.

2- البيئات الانتقائية selective media : هي الاوساط التي تسمح بانواع معينة فقط للنمو وذلك بسبب.

أ- غياب الموارد المغذية الضرورية والحرجة التي تجعل الوسط غير مناسب لنمو بعض الاحياء المجهرية وليس جميعها.

ب- وجود مواد مثبطة لنمو انواع من الاحياء المجهرية مثلNaCL، Crystal Violet ,antibiotics مثال:

1- وسط ماكونكي MacConkey Agar هذا الوسط يحتوي على املاح الصفراء bile salts التي تسمح للبكتريا المعوية السالبة لصبغة كرام بالنمو بينما تثبط البكتريا اللامعوية الموجبة لصبغة كرام. ان وجود املاح الصفراء و crystal violetهو الذي يجعل هذا الوسط انتقائي لانه يثبط +G ويسمح لـ – G بالنمو.

2- وسط Mannitol Salt Agar هذا الوسط يحتوي 7.5% ملح الطعام NaCl الذي يمنع كل انواع البكتريا ما عدا جنس العنقوديات Staphylococccus .

3- الاوساط التفريقية Differential media : تحتوي هذه الاوساط على مواد تجعل بعض البكتريا تظهر بشكل يختلف عن الانواع الاخرى وتسمح بالتفريق بين نوع واخر مثال ذلك وسط ماكونكي هذا الوسط يحتوي على سكر اللاكتوز و دليل الاحمر المتعادل neutral red بعد نمو البكتريا المعوية على هذا الوسط قسم منها يخمر سكر اللاكتوز مثل *Escherichia* coli لتنتج حامض يغير لون الدليل بحيث تبدو المستعمرات بلون وردي غامق مثل بكتريا *proteus mirabilis* تظهر مستعمراتها شاحبة اللون.

قسم من البيئات تكون انتقائية وتفريقية في نفس الوقت مثل وسط ماكونكي ووسط EMB.

اما وسط MSA فهو ايضا انتقائي وتفريقي في نفس الوقت حيث يحتوي على دليل الفينول الاحمر. الوسط مهم للتفريق بين بكتريا *Staphylococcus aureus* المخمرة للمانيتول عن بقية انواع العنقوديات غير المخمرة له حيث تحول الاولى الوسط من الاحمر إلى الاصفر (الحامضي) اما الثانية فتنمو دون تغير لون الوسط .

وسط اكار الدم يعتبر من الاوساط الغنية والتفريقية في نفس الوقت حيث انه اضافة إلى كونه وسط غني فانه يميز بين انواع البكتريا الممرضة اعتمادا على قدرتها على تحليل الدم بافرازها انزيم يسمى Hemolysin فمثلا بكتريا *Streptococcus pneumoniae* تحل الدم جزئي (Alpha hemolysis) حيث تظهر منطقة مخضرة حول المستعمرة. بينما بكتريا *Streptococcus pyogenes* تحلل الدم تحلل كامل اذ تظهر منطقة شفافة حول المستعمرة تسمىBeta hemolysis.انواع اخرى من البكتريا لا تحلل الدم نهائيا مثل *Staphylococcus epidermidis* يدعى هذا النوع من التحلل gamma hemolysis .

بعض الاوساط قد تكون غنية وانتقائية حسب الحاجة. بإضافة البنسلين مثلا إلى الوسط يجعل الوسط انتقائيا للبكتريا السالبة لصبغة كرام.

4- الاوساط الخاصة special media: اوساط لأغراض خاصة تستخدم لعزل و تنمية مجموعة معينة واحيانا التفريق بين نوعين من البكتريا مثال ذلك وسط Lowenstein-jensen media الخاص بتنمية بكتريا السل والذي يحتوي على صبغة الملكايت الاخضر التي تثبط نمو كل انواع البكتريا ما عدا بكتريا السل. هذا الوسط يستخدم لتنمية بكتريا السل وبنفس الوقت تفرق بين السل البشري والسل البقري .