الاوساط الزرعية Culture media

هي البيئات الغذائية الكيموحيوية الاصطناعية التي تنمى فيها الاحياء الدقيقة لأنها تحتوي على المتطلبات الغذائية المختلفة للنمو من النتروجين والكاربون والفسفور والكبريت والحديد والمغنسيوم وغيرها من العناصر المعدنية أضافة لبعض العناصر النادرة الفيتامينات وصبغات وكواشف وانزيمات واحماض امينية و Co-factors. تختلف الاوساط الزرعية باختلاف الاحياء الدقيقة والتي تقسم عادة الى مجموعتين رئيستين هما:

1. **احياء ذاتية التغذية Autotrophs :**

هي الاحياء التي تتمكن من النمو معتمدة على مركبات غير عضوية حيث تستخدم ثاني اوكسيد الكاربون (Co_2) مصدرا للكاربون .

2. **احياء غير ذاتية التغذية او متباينة التغذية Heterotrophs :**

هي الاحياء التي تتمكن من استغلال المركبات العضوية مصدرا للكاربون .

الأوساط الزرعية لا توفر للأحياء المجهرية احتياجاتها من العناصر الغذائية فحسب وانما توفر لها أيضا الظروف الفيزيائية من النشاط المائي والضغط الاوزموزي والرقم الهيدروجيني الملائم وكمية الاوكسجين ودرجة الحرارة. والعامل الأخير يتم التحكم به خارجيا من خلال حضن الأوساط الزرعية في الحاضنة. الأوساط الزرعية قد تكون بسيطة أو معقدة التركيب وفي كلا النوعين فهي توفر الطاقة والوحدات الأساسية لبناء أجزاء الخلية.

- **الهدف من استخدام الاوساط الزرعية :**

1. تنمية الاحياء الدقيقة في ظروف مماثلة لنموها .
2. معرفة قدرة الكائن الحي على استهلاك مادة غذائية محددة وهذا يسهل تشخيص الكائن .
3. حث للكائنات الدقيقة على انتاج أو تكوين بعض المواد .
4. تصنيف الكائنات الدقيقة ودراسة صفاتها المزرعية .
5. تساهم بحفظ الاحياء لفترات زمنية معينة وامكانية نقلها من مكان لأخر .

- **تقسيم الاوساط الزرعية :**

لتسهيل دراسة الأوساط الزرعية يتم تقسيمها الى مجاميع مختلفة اعتمادا على أسس متباينة منها:

أولا: الحالة الفيزياوية أو قوامها :

تقسم الاوساط الزرعية حسب قومها الى اقسام تعتمد على نوع المواد الداخلة في الوسط :

أ- **الاوساط السائلة Liquid media :**

وهذه الاوساط تكون خالية من مادة الاكار لذلك تبقى سائلة بعد تحضيرها وتعقيمها وتسمى هذه الأوساط **Broth** مثل: Nutrient broth و MacConkey broth وغيرها.

ب- **الاوساط شبه الصلبة Semi-Solid media :**

تحتوي هذه الاوساط على نسبة من الاكار في حدود **1%** وتتخذ الاوساط شبه الصلبة بعد تحضيرها وتعقيمها قواما أقل صلابة من قوام الهلام وتستخدم في اغراض خاصة كفحص الحركة مثل Semi-Solid motility media .

ج- **الاوساط الصلبة Solid Media :**

وهذه تحتوي على **1.5-2 %** من مادة الاگار التي تجعل القوام هلاميا وتنتهي تسمية الاوساط من هذا النوع بكلمة **Agar** للدلالة على احتواء الوسط على مادة تساعد على تصلبه بعد التحضير ومن الامثلة عليها Nutrient agar و MacConkey agar.

- **المواد او العوامل المصلبة Solidifying agents :**

تضاف الى الاوساط الزرعية السائلة بعض المواد لتساعدها على التحول الى اوساط صلبة ساعد على تكوين مستعمرات نقية مفردة. وفيما يلي اهم المواد التصليبية التي تضاف الى الاوساط :

1. **الجيلاتين Gelatin**

هو اول مادة استخدمت في تصليب الاوساط الزرعية. وهو عبارة عن مادة بروتينية تحضر بمعاملة عظام الحيوانات، حاليا يندر استعمال الجيلاتين في تصليب الاوساط وذلك كون الجيلاتين يهاجم من قبل الاحياء الدقيقة، ولا يتصلب الا عند درجة حرارة **25 °م** او دون ذلك مما يحول دون استخدامه في الاوساط المستخدمة لتنمية الاحياء الدقيقة المحبة للحرارة **Thermophilic** كما ان تصلب **100 ملليلتر** من الوسط تحتاج من **15-20 غم** من الجيلاتين مما يجعله غير اقتصادي .

2. **الاگـار Agar**

مادة او مركب كاربوهيدراتي معقد يشكل الكالكتوز الوحدات الاساسية فيه يستخلص من بعض الطحالب البحرية الحمراء لاسيما تلك الانواع التي تعود لجنس ***Gelidium*** اذ تشكل هذه المادة احد مكونات الجدران الخلوية في الانواع التابعة لهذا الجنس. يذوب في حدود درجة حرارة غليان الماء ويتصلب عند تبريده الى **45 °م** كما ان مقادير قليلة منه تصلب كميات كبيرة من الوسط اذ يكفي **1.5-2%** منه لتصلب **100 ملليلتر** من الوسط. كما ان مادة الاكار من المواد التي لا تهاجم او تحلل من قبل معظم الاحياء الدقيقة وهذا يضمن انها لا تستهلك في الوسط الزرعي كمادة مغذية من قبل الاحياء التي يتم تنميتها في هذه الاوساط .

3. **السليكا Silica**

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

ثانياً: الغرض من الاستخدام او تطبيقاتها العملية او وظيفتها :

تقسم الاوساط الزرعية حسب الاغراض التي تستخدم من اجلها الى الانواع الآتية :

1. **اوساط اعتيادي او بسيطة : Ordinary Media**

تحـوي علـى مغـذيات بسـيطة وتصـلح لتنميـه معظـم ولـيس جميـع الاحيـاء الدقيقـة مثل **Nutrient agar** .

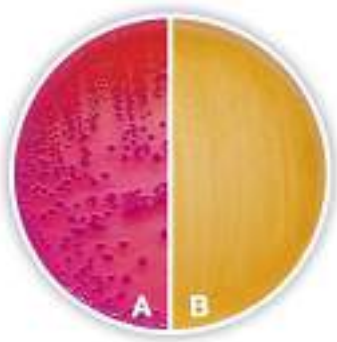
2. **اوساط تفريقيه : Differential Media**

وفيها ينمو اكثر من نوع واحد من الميكروبات غير ان احد هذه الانواع تكون مميزه عن غيرها ويمكن تفريقها بسهولة عن الانواع الاخرى من حيث اللون وشكل المستعمرات وتسمى مثل هذه الاوساط بـ Indicator Media اذ انها تحتوي على دلائل او كواشف الرقم الهيدروجيني حيث يتغير لونها بتغيير قيمة رقم الهيدروجيني بفعل تخمر انواع معينه من السكريات في الوسط.

من هذه الأوساط :

A. **وسط الماكونكي : MacConkey agar**

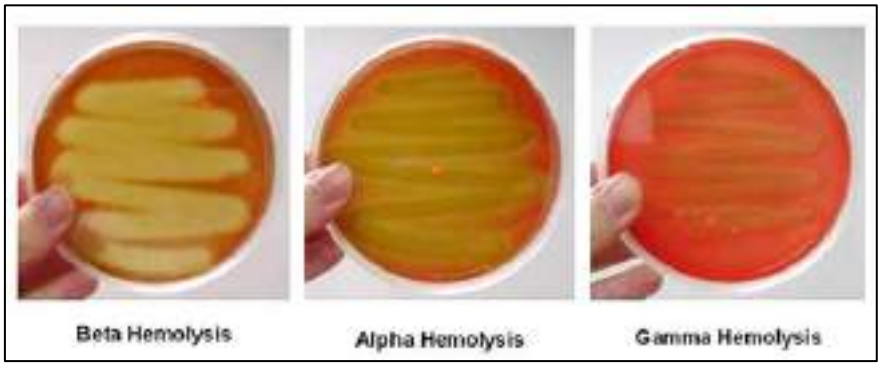
يفرق هذا الوسط بين البكتيريا المخمرة لسكر اللاكتوز وغير المخمرة لسكر اللاكتوز حيث تظهر المستعمرات المخمرة بلون وردي مثل بكتريا: *E.coli, Klebsiella, Enterobacter* بينما البكتيريا غير المخمرة تظهر مستعمراتها بلون اصفر شاحب مثل بكتيريا : *Proteus, Shigella* .



B. **وسط الدم : Blood agar**

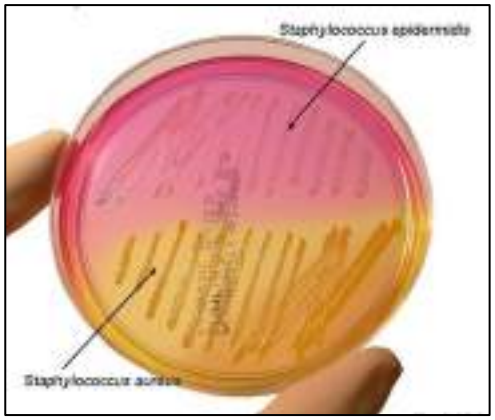
هذا الوسط يعمل على التفريق بين البكتيريا على اساس تحلل الدم **Hemolysis** فالبكتيريا التي تحلل الدم تحلل تاماً او كاملاً تظهر مستعمراتها في الوسط محاطه بهالة شفافة **Clear zone** ويدعى هذا النوع من التحلل بيتا **β-hemolytic** مثل البكتيريا

Strep. Pyogenes اما البكتريا التي تحلل دم تحللاً جزئياً فتظهر مستعمراتها محاطه بهالة خضراء **Green zone** ويسمى هذا التحلل الفا **α-hemolytic** مثل بكتريا ***Strep. Pneumonia*** اما البكتيريا التي لا تحلل الدم فتدعى تحلل گاما **γ-hemolytic** مثل بكتيريا ***Strep. Faecalis*** .



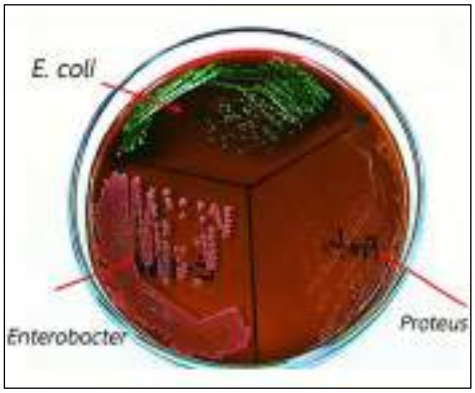
C. وسط المانيتول الملحي : Mannitol Salt agar (MSA)

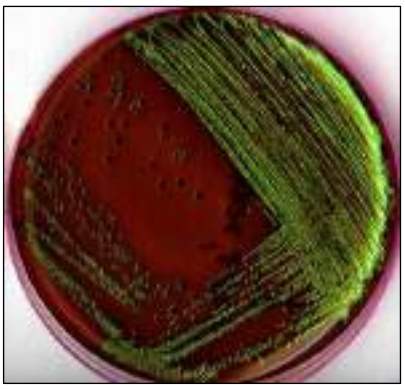
هذا الوسط يفرق بين بكتيريا المكورات العنقودية **Staphylococci** جنس **Staphylococcus** عن طريق اختبار قدرتها على تخمير سكر المانيتول حيث تظهر المستعمرات المخمرة للسكر بلون اصفر مثل ***Staph.aureus*** . بينما تظهر المستعمرات الغير مخمره بلون وردي او احمر مثل بكتريا ***Staph.epidermidis*** .



D. وسط الايوسين ازرق المثلين : Eosin Methylene blue agar (EMB)

هو وسط تفريقي يفرق بين اجناس العائلة المعوية المخمرة لسكر اللاكتوز والتي تظهر بشكل مستعمرات وردية والغير مخمره تظهر بلون اصفر شاحب ما عدا جنس ***E.coli*** الذي يظهر بلون اخضر معدني براق **Green metallic sheen** وذلك لأنها تخمر اللاكتوز تخمر كامل منتجه ايثانول والذي يتفاعل مع صبغه الايوسين مكونه معقد ذو لون اخضر معدني براق .





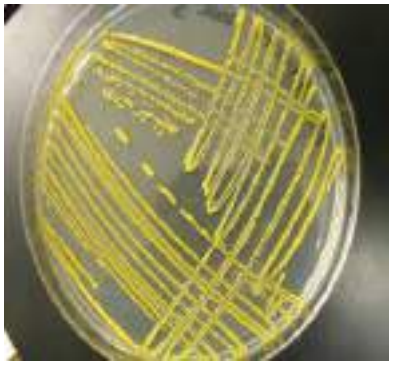
E. وسط السالمونيلا – شيجلا : Salmonella-Shigella agar (SSA)

هو وسط تفريقي بين جنس السالمونيلا **Salmonella** وجنس الشيجلا **Shigella** من حيث قدرتها على تخمر او تخمير سكر اللاكتوز وانتاج غاز كبريتيد الهيدروجين حيث تظهر مستعمرات السالمونيلا بلون وردي مما يدل على انها مخمره للاكتوز وتكون حاويه على لون اسود في منتصف مستعمراتها وذلك بسبب انتاجها غاز كبريتيد الهيدروجين **H_2S** الذي يتفاعل مع سترات الحديد الموجودة في الوسط مكونه راسب اسود في مركز المستعمرة. اما جنس الشيجلا فيظهر بشكل مستعمرات صفراء شاحبه لكونها غير مخمره لسكر اللاكتوز ومستعمراتها تكون خاليه من اللون الاسود اي انها غير منتجه لغاز كبريتيد الهيدروجين.

F. وسط الحليب او الكازائين : Milk or Casein agar

هو وسط تفريقي بين اجناس البكتيريا وخاص المنتجة للصبغات على الوسط الزرعي مثل ***Staphylococcus*** والتي تظهر على شكل مستعمرات ذهبيه **Golden colonies** كما ان جنس ***Pseudomonas*** والذي يحتوي على انواع تنتج صبغات بالوان مختلفة مثل الاخضر والبني، وكذلك جنس ***Pseudomonas flouresense*** الذي التي ينتج صبغه متألقة (براقة)، وجنس ***Serratia*** يظهر على هذا الوسط بشكل مستعمرات حمراء، كما يفرق هذا الوسط بين انواع البكتيريا المحلل لبروتين الكازائين **Casein** مثل بكتريا

Pseudomonas والتي تكون غير محلله اما بكتريا ***Bacillus*** فتكون محلله لهذا البروتين.



3. الأوساط الانتقائية : Selective Media

هي الاوساط التي تحتوي على عناصر غذائية تشجع نمو وسياده نوع معين من البكتيريا وتثبط الانواع الأخرى وهذا النوع من الاوساط يساعد في الحصول على مزرعة بكتيرية نقيه من مجموعة متنوعة من البكتيريا ومن هذه المواد ازايد الصوديوم حيث يضاف الى الوسط الخاص لعزل بكتيريا **Lactic acid** ذلك لان هذه المادة تؤثر في البكتيريا الحاوية على انزيم **Cytochrom Oxidase** وبكتيريا حامض اللاكتيك خالية من هذا الانزيم فلا تؤثر عليها، **من هذه الأوساط :**

A. وسط الماكونكي : MacConkey agar

يحتوي هذا الوسط على صبغه البنفسج البلوري **Crystal violet** والتي تثبط نمو البكتيريا الموجبة لصبغة گرام كما يحتوي على املاح صفراء **Bile salt** المثبطة ايضا لجميع البكتيريا الموجبة وايضا البكتيريا السالبة ما عدا اجناس العائلة المعوية مثل ***E.coli*** والتي تتحمل النمو بوجود املاح الصفراء.

B. وسط المانيتول الملحي : Mannitol Salt agar

يعتبر هذا الوسط انتقائي لأنواع جنس المكورات العنقودية **Staphylococci** بسبب احتوائه على تركيز عالي من املاح الكلوريد الصوديوم **NaCl** بتركيز **7.5 - 5 %** والذي يثبط نمو جميع الاجناس البكتيرية باستثناء المكورات العنقودية والتي تتحمل النمو في التراكيز العالية من هذه الاملاح .

C. وسط الايوسين ازرق المثليين : Eosin Methylene blue agar (EMB)

يحتوي هذا الوسط على املاح الصفراء والتي تكون مثبطه للبكتيريا الموجبة لصبغة كرام ومعظم البكتيريا السالبة ما عدا اجناس البكتيريا المعوية وتحتوي على صبغه ازرق المثليين التي تكون مثبطه لنمو جميع انواع البكتيريا الموجبة لصبغه كرام .

D. وسط السالمونيلا – شيجلا صلب : Salmonella – Shigella agar (SSA)

يحتوي على املاح الصفراء وسترات الصوديوم وصبغه الاخضر اللماع **Brilliant green** المثبطة لنمو البكتيريا لموجبة والعديد من البكتيريا السالبة لصبغة كرام المخمرة لسكر اللاكتوز الموجودة في الغائط ويسمح بنمو السالمونيلا والشيجلا .

4. **الأوساط الاغنائية او المدعمة : Enriched Media**

هذه الاوساط تُدَعَم ببعض المكونات والمواد التي تشجع نمو الاحياء الدقيقة الشرهه او صعبة التغذية **Fastidious** اي التي تحتاج الى العديد من عوامل النمو مثل المواد العضوية والفيتامينات والخمائر والاملاح اي ان هذه الاوساط تعمل على زياده العدد القليل من البكتيريا في العينة الى الملايين مثل وسط **Peptone water** الذي يستخدم لزياده عدد البكتيريا المعزولة من الغائط، ووسط **Selenite broth** الذي يستخدم لزياده عدد السالمونيلا وبعض انواع الشيجلا. من الامثلة الاخرى على الاوساط الاغنائية :

A. **وسط اجار الدم : Blood agar**

B. **وسط اگار الشوكولاتة : Heated Blood agar (Chocolate agar)**

C. **وسط نقيع الدماغ والقلب : Brain-heart infusion broth**

5. **الأوساط الناقلة : Transport Media**

هذه الاوساط تكون عاده بسيطة بالتركيب وفي الغالب تكون سائله حيث تستعمل لنقل العينات من ناطق بعيده وذلك للحفاظ عليها من الجفاف لحين وصول العين الى المختبر ومن الأمثلة عليها وسط **Stuart transport media** .

6. **اوساط الادامة او الحفظ : Maintenance Media**

تستخدم هذه الاوساط لإدامة وتنشيط حيوية البكتيريا المخزونة والحفاظ على صفاتها الفسيولوجية لفترات طويله مثل وسط المرق المغذي **Nutrient broth** ووسط الاگار المغذي **Nutrient agar** .

7. الاوساط الخاصة : Special Media

وهي اوساط خاصة لتنمية انواع معينة من البكتيريا المرضية مثل وسط **Brucella agar** المستخدم لتنميه اجناس بكتيريا ***Brucella Spp.*** ، ووسط **Loeffler's Media** الذي يستخدم لتنميه عصيات الخناق ***Corynebacterium diphtheria*** ، وكذلك الوسط **Lowenstein Jensen agar (L.J.A)** المستعمل لتنميه بكتيريا التدرن اي عصيات السل ***Mycobacterium tuberculosis*** .