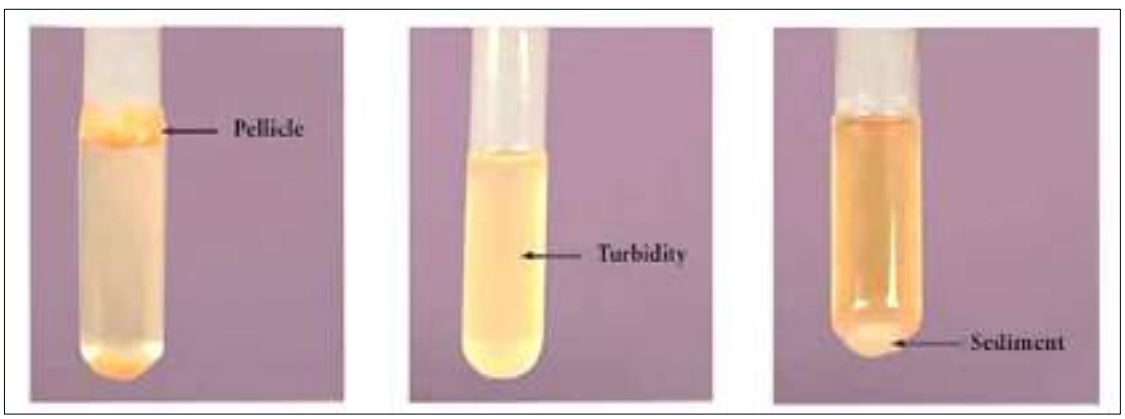
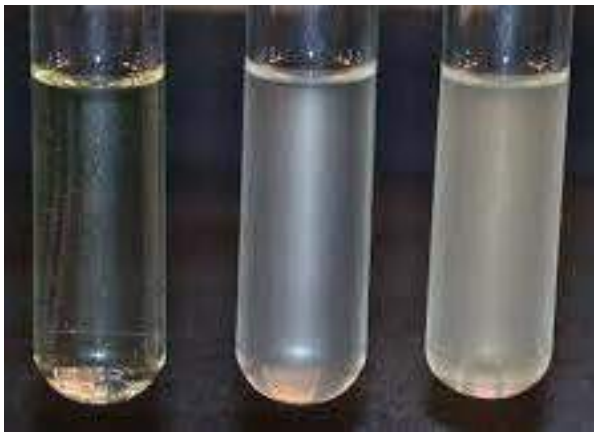
زراعـة الاحيـاء المجهريـة

اولاً : زراعة الاحياء المجهرية في الأوساط السائلة

تستعمل الأوساط السائلة مثل وسط المرق المغذي **Nutrient broth** و ووسط مرق نقيع القلب والدماغ **brain heart infusion broth** لهذا الغرض، ويكون النمو على الوسط السائل على احد الاشكال التالية :

1. **عكوره Turbidity** : تحدث عكوره في الوسط الزرعي بعد عملية الزرع (قبل الزراعة يكون الوسط رائق) كما في بكتريا ***E.coli*** .
2. **نمو سطحي Pellicle growth** : يشير إلى تكوُّن طبقة رقيقة وكثيفة وعادةً غير شفافة تطفو فوق سطح الوسط السائل، كما في افراد جنس **Bacillus** .
3. **تكوين راسب Sediment formation** : يكون النمو بشكل راسب من الخلايا يستقر في قعر الانبوبة ويلاحظ عند رج الانبوبة بهدوء فأنه سوف يتصاعد فيه الراسب بشكل حلزوني للأعلى، كما في افراد جنس المكورات العنقودية **Staphylococcus** .
4. **تكوين المخاط Slime** : كما في تكوين الراب لكن هنا يكون الراسب مخاطي يستقر في قعر الانبوبة، كما في افراد جنس **Klebsiella** .
5. **انتاج الغاز Gas prodaction** : في هذه الحالة نلاحظ تصاعد فقاعات غازية عند رج الانبوبة، كما في بكتريا ***E.coli*** .
6. **انتاج الصبغات الخارجية Exopgmentation** : في هذه الحالة زراعة البكتريا تؤدي الى تغير لون الوسط الزرعي نتيجة تكون صبغات تنتجها البكتريا، كما في الفراد جنس **Pseudomonas**.





عكـوره Turbidity

راسـب Sediment

ثانياً : زراعة الاحياء المجهرية على الأوساط الصلبة :

زراعة الاحياء المجهرية على الأوساط الصلبة تمكننا من الحصول على مستعمرات **نقية Pure ومفردة Single** وبالتالي تساعدنا في التشخيص.

- من الطرق المستعملة في زراعة وعزل البكتريا على الوسط الزرعي الصلب :

1. **طريقة تخطيط الطبق Streak – plate method**
2. **طريقة صب الطبق Pour – plate method**
3. **طريقة النشر في الطبق Spreading – plate method**

1. طريقة تخطيط الطبق Streak – plate method :

تم تطوير هذه الطريقة من قبل اثنين من علماء البكتريا Loffler و Gaffkey في مختبر روبرت كوخ Robert Koch . فيها يتم تخفيف اللقاح inoculum عن طريق تخطيطه streaking على سطح الوسط الصلب، اذ يتم تخفيف اللقاح الى الحد الذي يوجد فيه فقط خليه بكتيرية واحده لكل بضع ملمترات على سطح الوسط الصلب. عندما تنقسم هذه الخلايا البكتيرية الوحيدة الى الاف والاف الخلايا البكتيرية الجديدة تتشكل مستعمره معزولة. يمكن الحصول على المزارع النقية Pure cultures عن طريق انتقاء المستعمرات المعزولة جيدا واعاده تخطيطها على سطح وسط صلب جديد.

- **نصائح للحصول على افضل النتائج :**
  - يجب استعمال كمية صغيرة من اللقاح.
  - التخطيط على الطبق يكون بخفة حتى لا تضغط على سطح الوسط.
  - يتم تعقيم عروة التلقيح (Loop) باللهب بعد كل عملية تخطيط.
  - يجب التأكد كم خلو سطح الوسط الصلب على قطرات رطوبة

" قطرات الرطوبة من الممكن ان تتساقط على سطح الوسط وتنتشر مما يؤدي الى ظهور كتلة متكدسة من النمو والتي تمنع تشكيل مستعمرات فردية، لتجنب ذلك وبشكل روتيني يتم قلب الطبق الزرعي دائما بحيث يكون غطاءه للأسفل وقاعدته للأعلى، بهذا يمكن منع تساقط الرطوبة المتكونة والحصول على مستعمرات نقية من مستعمرات منعزلة جيدا عن طريق نقل جزء من مستعمرة صغيرة الى وسط زرعي اخر منفصل"

- **الغرض من التخطيط Purpose of streaking :**

للحصول على مستعمرات معزولة للبكتيريا على سطح الوسط صلب، هذا مفيد لفصل البكتيريا عن بعضها البعض في المزارع المختلطة **mixed culture** او لتنقية او عزل سلاله معينه من الملوثات، او تستخدم عندما نحتاج الى دراسة مورفولوجيا المستعمرات (شكلها الخارجي)، كذلك عند الشروع بفحوصات تشخيص البكتريا حيث ان الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص البكتريا تكون صالحة عندما يتم اجراءها على العزلات النقية.

- **التخطيط على الطبق يأخذ عدة اشكال منها :**

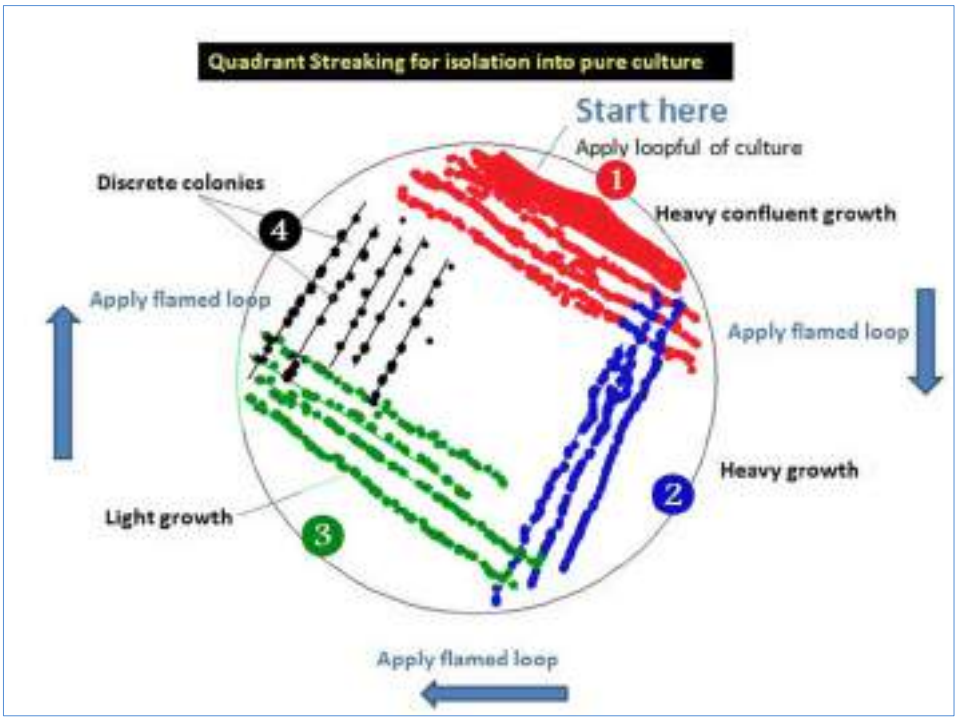
أ. **التخطيط الرباعي Quadrant Streaking :**

وهذا التخطيط يتم بالخطوات التالية :

1. تعقيم Sterilize عروة التلقيح inoculating loop عن طريق وضع الحلقة في لهب مصباح بنزين Bunsen burner حتى تسخن وتصبح بلون احمر ثم نتركها فتره قليله لتبرد.
2. بواسطة عروة التلقيح يتم اخذ جزء من العينة المراد زراعتها او جزء من المزرعة البكتيرية غير النقية المراد تنقيتها ويتم نشرها على الربع الاول من الطبق باستخدام خطوط متوازية هذه تسمى **(المنطقة 1)** .
3. نعقم عروة التلقيح مره اخرى والسماح لها ان تبرد قليلاً بعدها نمد من حافة **(المنطقة 1)** خطوط متوازية الى الربع الثاني من الطبق **(المنطقة 2)**.
4. نعقم عروة التلقيح مره اخرى والسماح لها ان تبرد بعدها نمد من حافة **(المنطقة 2)** خطوط متوازية الى الربع الثالث من الطبق **(المنطقة 3)**.

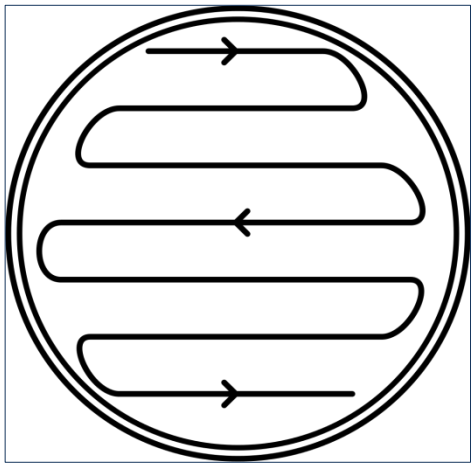
5. نعقم عروة التلقيح مره اخرى ونسمح لها بان تبرد بعدها نمد من حافة **(المنطقة 3)** خطوط متوازية الى الربع الرابع من الطبق **(المنطقة 4)**.

" بالتخطيط الرباعي نحصل على اربع مناطق على الطبق الزرعي، الربع الأول **(المنطقة 1)** تكون منطقة نمو مختلط كثيف Heavy confluent growth، الربع الثاني **(المنطقة 2)** منطقة نمو اقل كثافة Heavy growth من الربع الأول، الربع الثالث **(المنطقة 3)** النمو فيها يكون قليل Light growth ، والربع الرابع **(المنطقة 4)** النموات فيها تكون منفصلة Discrete colonies "



ب. التخطيط المستمر Continuous streaking :

تستعمل هذه الطريقة لإعادة زراعة العزلات النقية، هذه الطريقة لا تستعمل في العزل أي للحصول على مستعمرات نقية.



2. طريقة صب الطبق Pour – plate method :

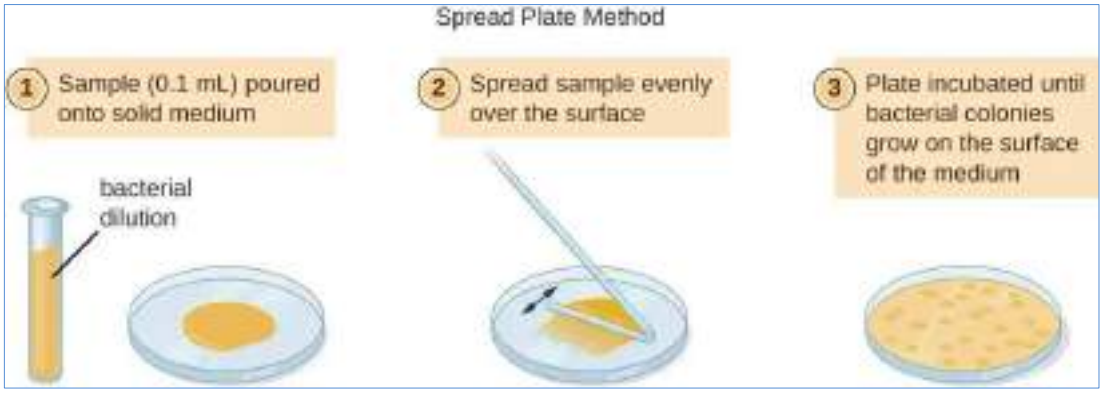
في هذه الطريقة يتم تبريد الوسط المحضر داخل الدورق المخروطي وقبل تصلبه يتم مزج عالق البكتريا المخفف (بعد عمل تخافيف متسلسلة للعينة الاصلية) المراد زراعته مع الوسط الزرعي جيداً، هذه يساعد على نشر البكتريا في جميع أجزاء الوسط الزرعي.

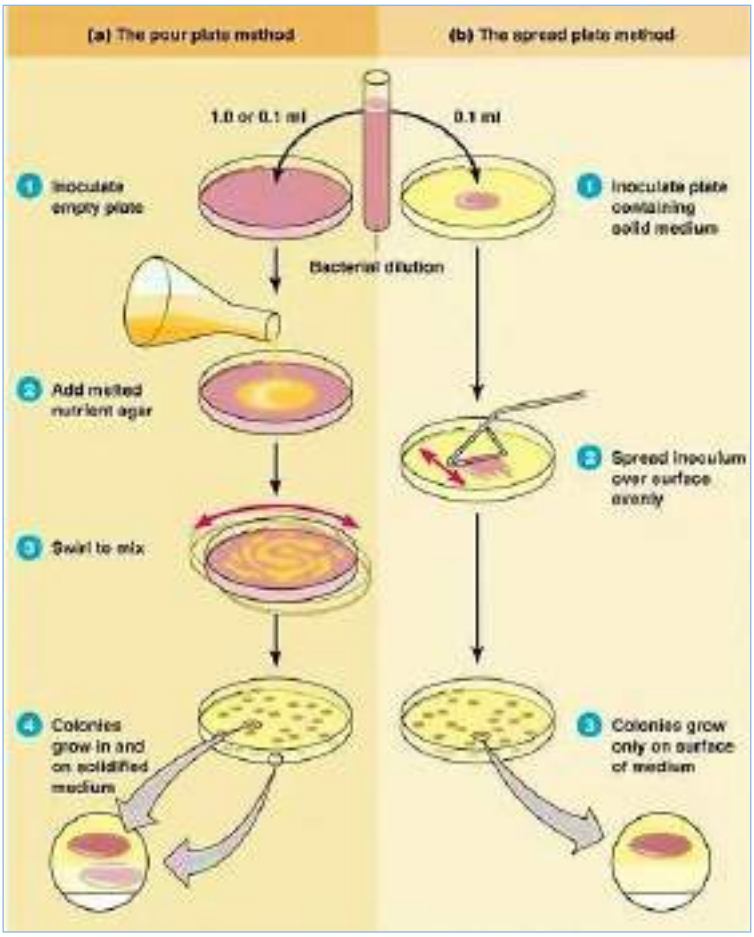
قد تتم هذه الطريقة بالية أخرى وذلك عن طريق إضافة العالق البكتيري الى طبق زرعي معقم ويصب عليه وسط الاكار الذائب والمبرد بين **42 – 45** ^{o}م، ويخلط تماما عن طريق تدوير الطبق ثم يترك ليتصلب، بعد الحضن يمكن فحص الاطباق والتحري عن وجود مستعمرات فردية.

طريقة صب الطبق تعتبر مفيدة في للحصول على مستعمرات نقية مما يساعد في تعداد البكتريا، أي انها مفيدة في تقدير اعداد البكتريا الحية في المعلق الزرعي.

3. طريقة النشر في الطبق Spread – plate method :

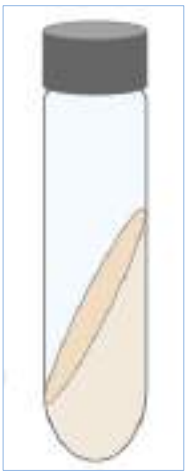
هذه الطريقة تتم بوضع **0.1 مل** من عالق البكتريا المخفف على سطح الوسط الزرعي قرب المركز ثم تنشر باستعمال الناشر الزجاجي المعقم على شكل حرف **L** . تستعمل هذه الطريقة عادة للحصول على مستعمرات نقية وفي عد البكتريا.

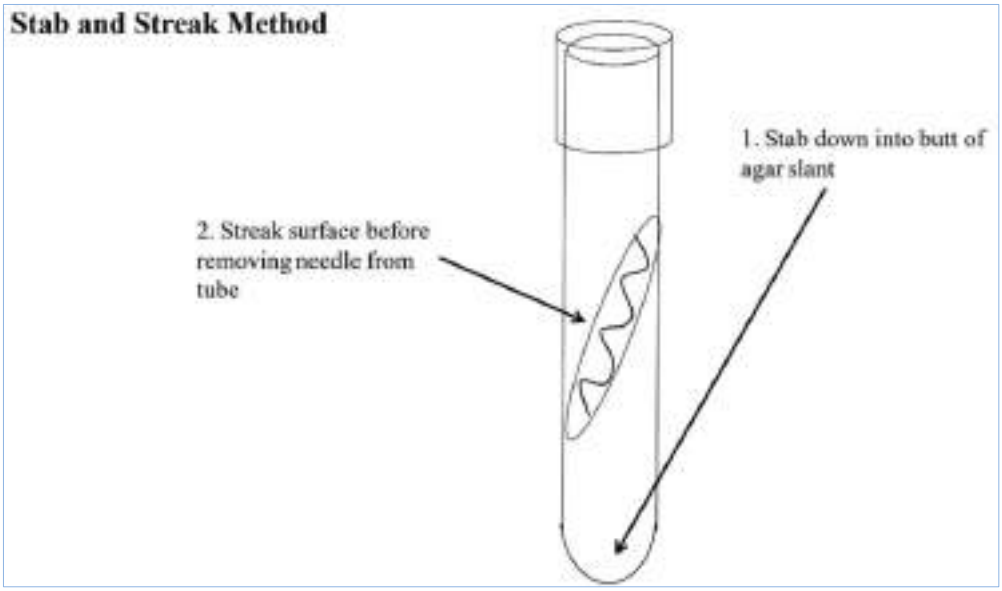




الانابيب مائلة الاكار agar slant tubes :

يتم تحضير انابيب الاكار المائلة بوضع انبوبة الاختبار الحاوية على الوسط الزرعي الصلب بصورة مائلة على سطح الطاولة للحصول على سطح مائل وقعر Slant & Butt ، تستعمل طريقة الاكار المائل عادة لغرض حفظ البكتريا وأيضا لدراسة قابلية البكتريا على انتاج الغازات. تتم زراعة البكتريا على السطح المائل Slant بطريقة التخطيط المستمر، اما القعر Butt فيزرع بطريقة الطعن Stabbing بواسطة السلك المستقيم.





النمو في الوسط شبه الصلب Growth on semi–solid medium :

تتميز بعض أنواع البكتريا بقابليتها على اسالة الجيلاتين Liquefaction of gelatin وذلك بعد الحضن في وسط الجيلاتين لمدة أسبوع او اكثر، وهذه تعد صفة تشخيصية. فضلا عن ذلك تستعمل الأوساط شبه الصلبة الحاوية على **1%** منها الاكار لمعرفة حركة البكتريا فيما اذا كانت متحركة ام غير متحركة.