زراعة الأحياء المجهرية Microbial Cultivation

الاوساط الزرعية Culture media

هي خليط متوازن من المواد الغذائية التي تحتاجها الأحياء المجهرية وبتراكيز تسمح بنمو جيد للكائن المجهري. وقد يعتقد البعض انه كلما زاد تركيز المواد المغذية في الوسط الزرعي حصلنا على نمو أفضل، الا ان هذا الاعتقاد غير صحيح وذلك لعدة أسباب أولها أن العديد من المواد المغذية تنقلب الى مواد مثبطة للنمو أو قد تصبح مواد سامة اذا ما ازداد تركيزها كما في بعض المواد العضوية مثل أملاح الحوامض الشحمية كأملاح حامض الخليك أو حتى السكريات وما تنتجه من حوامض عند استهلاكها كمصدر للكاربون أو الطاقة. اما المواد غير العضوية فهي الأخرى قد تصبح مانعة للنمو اذا ما ازداد تركيزها كما في حالة الطحالب الحساسة للتراكيز العالية من أملاح الفوسفات غير العضوية. أما السبب الثاني لعدم حدوث النمو في وسط زرعي عالي التركيز فان الطبيعة البيئية لهذا الوسط ستتغير حتما نتيجة الفعاليات الأيضية للأحياء المجهرية النامية بحيث تصبح هذه البيئة غير مناسبة، وبذلك تتغير الحالة الفسلجية لهذه الأحياء وقد تموت. وقد يكون هذا بسبب التغير الشديد في تركيز أيون الهيدروجين أو بتجمع المواد العضوية السامة أو نفاد الأوكسجين في حالة الأحياء الهوائية الاجبارية.

ولأجل الحصول على النمو الأمثل للأحياء المجهرية يجب توفير ثلاثة متطلبات أساسية لإغناء الوسط الزرعي وهي:

1- مصدر غذائي ملائم للنمو.
2- اختيار المغذيات التي يجب اضافتها الى الوسط الزرعي بدقة.
3- توفير الظروف البيئية الملائمة لنمو البكتريا خلال مدة الحضن.

ان تحضير الوسط الزرعي يعتمد أولا على تركيب مجموعة العناصر المهمة التي تناسب أي كائن مجهري، ومن ثم يضاف مصدر للكاربون ومصدر للطاقة ومصدر للنتروجين وعوامل للنمو الى تركيبة الوسط الزرعي، وتختلف هذه المواد باختلاف الخصائص الغذائية للكائن الحي المراد تنميته.

ان غالبية الأوساط الزرعية التي تستخدم لزراعة البكتريا تكون من النوع المغلق Batch culture والمقصود بالأوساط المغلقة هي الأوساط التي لا يحدث فيها تجديد لمكونات الوسط الغذائية، ولا يمكن ازالة الفضلات والسموم الناتجة من نمو الكائنات المجهرية مما يؤدي الى استهلاك جميع المغذيات وازدياد تراكم الفضلات، مما يوجب اعادة زراعة البكتريا على وسط جديد والا سيؤدي ذلك الى موت البكتريا وهلاكها.

يمكن تقسيم الأوساط الزرعية الى عدة أنواع وذلك اعتمادا على الاسس التالية:

أ- تركيب الأوساط الزرعية: structure of culture media

ان الوسط الزرعي المعروفة مكوناته كما" ونوعا" من الناحية الكيمياوية يدعى بالوسط الصناعي synthetic medium او defined ، وهذا النوع من الأوساط الزرعية يستخدم غالبا لزراعة الكائنات الضوئية ذاتية التغذية وكذلك الابتدائيات التي تقوم بعملية البناء الضوئي، كما ان العديد من الكائنات الكيميائية متباينة التغذية تستطيع النمو على هذه الأوساط.

أما الوسط الزرعي الذي لا تعرف مكوناته الكيمياوية كما" ونوعا" فيعرف بالوسط المعقد complex medium وهو من الأوساط الزرعية المهمة لأنها تحتوي على غالبية المغذيات التي تحتاجها أنواع مختلفة من الكائنات المجهرية، كما تستخدم لزراعة البكتريا الحساسة Fastidious bacteria وهي البكتريا التي تحتاج الى مغذيات معقدة لأجل نموها، وتضاف الى الأوساط الزرعية المعقدة بعض المواد مثل خلاصة اللحم meat extract أو خلاصة الخميرة Yeast extract او ماء الببتون Peptone water (وهو عبارة عن بروتينات ناتجة من تحطيم اللحم) أو الكازائين أو الجيلاتين وغيرها من المواد البروتينية، ويعتبر الببتون مصدر للكاربون والنتروجين بالاضافة الى الطاقة، أما خلاصة اللحم فهي عبارة عن المستخلص المائي للحم البقري وتحتوي على الأحماض الأمينية والببتيدات والنيوكليوتيدات واحماض عضوية وفيتامينات ومعادن، أما خلاصة الخميرة فهي المستخلص المائي لخميرة الخبز والتي تزود الوسط الزرعي بـ 19 حامض أميني و 4 قواعد

نيتروجينية بالاضافة الى 10 أنواع من الفيتامينات وخاصة فيتامين B ، وأكثر أنواع الأوساط الزرعية المعقدة استعمالا" هي وسط المرق المغذي Nutrient broth والأكار المغذي Nutrient agar ووسط أكار ماكونكي MacConkey agar ووسط مرق Tryptic Soy agar . وتشترك الأوساط الزرعية الأربعة في التركيب الكيميائي، الا ان الوسط الأول (المرق المغذي) يعزز باضافة كلوريد الأمونيوم NH_4Cl بتركيز غرام واحد لكل لتر من الوسط، الا انه يخلو من المصدر الكاربوني. وهذا الوسط يلائم البكتريا ذاتية التغذية حيث يقوم ثاني اوكسيد الكاربون الموجود في الجو مقام المصدر الكاربوني، أما في الظلام فان الأحياء التي تستطيع النمو في هذا الوسط الزرعي مثل بكتريا النتروجين ذاتية التغذية Nitromonas تحصل على الكاربون من ثاني اوكسيد الكاربون، أما الطاقة فتحصل عليها من الأكسدة الهوائية للأمونيا التي تجهز هذه الأحياء بالنتروجين. أما الوسط الثاني (الأكار المغذي) فيحتوي على سكر الكلوكوز والذي يكون مصدر للكاربون والطاقة، ففي حالة الظروف الهوائية يمكن أن تنمو على هذا الوسط العديد من أنواع البكتريا والفطريات أما في حالة الظروف اللاهوائية فتنمو البكتريا اللاهوائية الاجبارية أو الاختيارية وتحصل على الكاربون والطاقة من خلال تخمر سكر الكلوكوز. أما الوسط الثالث (أكار الماكونكي) فيحتوي على فيتامين واحد وهو حامض Nicotinic acid ولذلك تنمو عليه جميع أنواع البكتريا القادرة على استهلاك الكلوكوز بالاضافة الى احتياجها لهذا الحامض مثل بكتريا *Proteus vulgaris* أحد أنواع البكتريا المعوية العصوية التي تحتاج الى حامض النيكتونيك لكونه عامل نمو عضوي. أما الوسط الرابع (Tryptic Soy broth) فيعد من الأوساط الزرعية المعقدة لاحتوائه على خميرة الخبز، وبذلك تستطيع جميع أنواع الكائنات الكيمياوية المتباينة التغذية (الهوائية واللاهوائية) النمو عليه سواء احتاجت الى عامل نمو بسيط أو احتاجت الى عوامل نمو كثيرة ومعقدة.

ب-**الحالة الفيزيائية للوسط الزرعي:**

تقسم الأوساط الزرعية حسب حالتها الفيزيائية الى ثلاثة أنواع هي:

1- الأوساط الزرعية السائلة liquid or broth culture media

وهي الأوساط الزرعية غير الحاوية على عامل التصلب (مادة الأكار agar) وتشمل أنواع مختلفة من الأوساط مثل Nutrient broth .

2- الأوساط الزرعية شبه الصلبة Semi-Solid culture media

وهي الأوساط الزرعية الحاوية على مادة الأكار بنسبة 0.5%

3- الأوساط الزرعية الصلبة Solid culture media

وهي الأوساط الزرعية الحاوية على مادة الأكار بنسبة 1-2% والأكثر شيوعا هو التركيز 1.5% بحيث يتصلب الوسط الزرعي بالكامل، والاكار هي مادة غير غذائية تستخلص من الطحالب البحرية الحمراء وتتركب كيميائيا من كبريتات متعددة بشكل أساسي من D- glucouronic acid و D-galactose و 3,6-anhydro- L- galactose ومن أهم مميزات مادة الأكار:

1- تنصهر في درجة حرارة 90 درجة مئوية.

2- تتصلب في درجة حرارة 45 درجة مئوية.

3- تستطيع الاحياء المجهرية النمو على أكار الوسط الزرعي في مدى واسع من درجات الحرارة.

4- عدم قدرة الأحياء المجهرية على تحليل مادة الأكار لذلك يعتبر الاكار عامل مصلب ممتاز للأوساط الزرعية.

ج- وظيفة الوسط الزرعي

تقسم الأوساط الزرعية حسب الوظيفة التي يستخدم لأجلها الوسط الزرعي الى الأنواع التالية:

1- الأوساط الزرعية الداعمة Supportive culture media

وتسمى أيضا بالأوساط العامة General culture media وهي الأوساط الزرعية التي تحافظ على نمو العديد من الأحياء المجهرية مثل وسطي Tryptic soy broth و Tryptic soy agar ومن اهم مكونات هذين الوسطين (tryptophan, peptone, glucose, NaCl, KH_2PO_4).

2- الأوساط الزرعية الاغنائية Enriched culture media

ان العديد من الأحياء المجهرية المتباينة التغذية التي تستطيع النمو على وسط الأكار المغذي أو المرق المغذي الاعتيادي، الا ان هناك الكثير من هذه الأحياء لا تنمو بصورة جيدة أو قد لا تنمو أبدا" في أي من هذين الوسطين. ويتطلب نمو هذا النوع من الأحياء وجود مواد مغذية اضافية، ولهذا تستخدم مواد كثيرة لهذا الغرض مثل الدم أو المصل أو خلاصات الأنسجة النباتية أو الحيوانية وغيرها من المغذيات الأخرى، حيث تضاف هذه المواد الى الأوساط الزرعية الاعتيادية الداعمة Supportive culture media لكي تشجع وتحفز نمو البكتريا الحساسة التي تتطلب مواد غذائية معقدة. ويطلق عادة اسم المادة المضافة على هذا النوع من الاوساط كأن يقال وسط أكار عصير الطماطة أو مرق اللاكتوز أو أكار الدم، وهي جميعا أوساط زرعية مكثفة , ومن أكثر الاوساط الزرعية الاغنائية استخداما" هو وسط أكار الدم والذي تنمو عليه جميع أنواع البكتريا مهما اختلفت متطلباتها الغذائية.

3- الأوساط الزرعية الانتخابية Selective culture media

هي الأوساط الزرعية التي ينمى عليها نوع من البكتريا دون غيرها، ويعتمد عمل هذه الأوساط على ادخال مواد تمنع نمو انواع معينة من الأحياء المجهرية دون غيرها، فمثلا وسط MacConkey agar يمتاز باحتوائه على مادة بلور البنفسج Crystal Violet وأملاح الصفراء Bile Salts (تركيز أملاح الصفراء أعلى من تركيز البنفسج البلوري) وهي من المواد المثبطة لنمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام، وبذلك يكون وسطا" اختياريا" للبكتريا السالبة لصبغة كرام دون غيرها، كما يحتوي وسط أكار الماكونكي على صبغة خاصة تسمى احمر المتعادل Neutral red ، ويمكن الحصول على وسط اختياري للبكتريا السالبة لصبغة كرام عند اضافة البنسلين الى الوسط الزرعي، كما يعد وسط Eosin Methylene Blue (EMB) أحد الأساط الاختيارية للبكتريا السالبة لصبغة كرام لاحتوائه على صبغتي Eosin و Metylene blue اللتان تثبطان نمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام، أما عند اضافة الكحول الفنيلي الأثيلي Phenylethanol الى الوسط الزرعي فهذا يثبط البكتريا السالبة لصبغة كرام ويسمح بنمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام فقط، كما ان الوسط الزرعي كولومبيا CNA وسط اختياري للبكتريا الموجبة لصبغة كرام لاحتوائه على مادتي Colistin و

Nalidixic acid واللتان تثبطان نمو البكتريا السالبة لصبغة كرام، كما يعد الوسط Mannitol salt agar من الأوساط الزرعية الانتخابية لبكتريا المكورات العنقودية Staphylococcus حيث يبلغ تركيز ملح الطعام في وسط المانيتول 7.5% وهذا التركيز العالي لملح الطعام يكون مثبطا" لبقية الانواع البكتيرية، كذلك يمكن اضافة مصدر كاربوني وحيد لا يستطيع استغلاله نوعا واحدا أو مجموعة أحياء دون غيرها، فالوسط الزرعي الذي يحتوي على النشأ كمصدر وحيد للكاربون لا تنمو عليه الا الأنواع التي تستطيع استغلال النشأ كمصدر للكاربون، وهكذا يمكننا ادخال اي مصدر كاربوني وحيد في الوسط الزرعي لضمان نمو نوع معين أو مجموعة من الأحياء المجهرية بعد أن نتأكد من ان هذه المادة تمثل المصدر الكاربوني الوحيد لهذه الأحياء.

4- الأوساط الزرعية التفاضلية أو التفريقية Differential Culture Media

هي الأوساط الزرعية التي تستخدم للتمييز بين المجاميع المختلفة من البكتريا والتي تعتمد في تشخيص البكتريا بناء" على خصائصها البايلوجية، حيث تضاف بعض المواد الى الأوساط الزرعية لتعمل دليلا" يميز بين نوعين من الأحياء المجهرية التي زرعت على الوسط التفريقي. يعد وسط أكار الدم أبرز أنواع الأوساط التفريقية (اذ يكون غنيا بالبروتينات، الكاربوهيدرات، الدهون، الحديد، والعديد من عوامل النمو العضوية والفيتامينات) ويستخدم للكشف عن قدرة العزلات البكتيرية على انتاج عامل الضراوة الهيمولايسين hemolysin وهو انزيم محلل لكريات الدم الحمراء، حيث يوجد ثلاثة أنواع من هذا الأنزيم هي:

1- **بيتا- هيمولايسين:** وهو النوع المحلل للدم بشكل تام بحيث تظهر مناطق شفافة حول المسعمرات ويحدث في النوع *Streptococcus pyogenes* .

2- **الفا- هيمولايسين:** والتي تحلل الدم تحللا جزئيا ويظهر حزام أخضر حول المستعمرات نتيجة تحلل الهيموغلوبين الى ميثوهيموغلوبين كما يحدث في النوع *Streptococcus mutans* .

3- **كاما- هيمولايسين:** والتي تكون غير محللة لكريات الدم الحمراء كما في بكتريا *Streptococcus salivarius* .

ان وسط Mannitol salt agar يعد أيضا من الأوساط الزرعية التفريقية الذي يفرق بين انواع بكتريا المكورات العنقودية Staphylococcus حيث يحتوي على سكر المانيتول كمصدر للكاربون والطاقة، وبما ان النوع *Staph. aureus* هي النوع الوحيد القادر على استهلاك سكر المانيتول مما يسبب انتاج حامض في الوسط، وهذا التغير في الأس الهيدروجيني يغير لون الكاشف الموجود في الوسط وهو الفينول الاحمر (phenol red) الى اللون الأصفر، بينما بقية أنواع المكورات العنقودية تكون غير قادرة على استهلاك سكر المانيتول وبذلك تنمو على وسط Mannitol Salt Agar دون تغير في لونه، كما ان وسط MacConkey agar يعتبر ايضا وسطا" تفريقيا" للأنواع السالبة لصبغة كرام، حيث يمتاز وسط الماكونكي باحتوائه على سكر اللاكتوز كمصدر للكاربون والطاقة، وبذلك فالبكتريا القادرة على تخمر سكر اللاكتوز تنتج حامض (فضلات حامضية)، وبما ان الوسط حاوي على صبغة الأحمر المتعادل فبذلك تظهر المستعمرات المخمرة لسكر اللاكتوز بلون وردي الى الأحمر كما في بكتريا *E. coli* و *Klebsiella pneumoniae* ، كما ان الوسط EMB يعد أيضا من الأوساط التفريقية لاحتوائه على سكري اللاكتوز والسكروز، فالأنواع البكتيرية السالبة لصبغة كرام لها القدرة استهلاك سكر اللاكتوز او السكروز كمصدر للكاربون والطاقة وتنتج كميات كبيرة من الحامض لهذا تظهر المستعمرات بشكل بريق أخضر لماع (معدني) كما في بكتريا *E. coli* .

5-الأوساط الزرعية التحليلية أو الكمية Assay culture media

هي اوساط زرعية تنمو عليها غالبية أنواع البكتريا المتباينة التغذية، والغرض من استخدامها هو لتحديد أقل تركيز من مادة غذائية معينة (خاصة عوامل النمو) مثل الحوامض الأمينية والفيتامينات التي تعطي أفضل معدل للنمو، وتستخدم أيضا في تحديد التركيز المثبط الأدنى Minimum Inhibitory Concentration MIC للمضاد الحيوي باستخدام وسط أكار مولر-هنتون Muller-Hinton Agar .

6- الأوساط الزرعية التشخيصية Characterization culture media

هو نوع خاص من الأوساط الزرعية التي تستعمل لتشخيص البكتريا من خلال اختبار قدرتها على انتاج انزيمات معينة او استهلاكها لمصادر الكاربون او النتروجين وغيرها، حيث ان التغيرات الكيمياوية التي تظهر عند نمو البكتريا عليها تعد دلالة على نتيجة الاختبار، مثل وسط Urea agar الذي يستخدم للكشف عن قدرة البكتريا على انتاج انزيم اليوريز (وسط اليوريا يكون لونه اصفر واذا كانت البكتريا منتجة لأنزيم اليوريز يتغير لون الوسط من الأصفر الى الوردي أو الأحمر الفاتح)، كما ان وسط Simmon citrate utilization agar أحد أنواع الأوساط التشخيصية والذي يستخدم للكشف عن قدرة البكتريا على استخدام السترات كمصدر وحيد للكاربون ويتغير لون الوسط من الأخضر الى الأزرق في حالة قدرة البكتريا على استهلاك السترات.

7- الأوساط الزرعية الحفظية Maintenance culture media

هي أوساط زرعية تستخدم لحفظ الأحياء المجهرية (خاصة البكتريا) عند خزنها لمدة معينة دون أن تتغير الخصائص العضوية والفسلجية للبكتريا، ويفضل أن يكون معدل نمو البكتريا بطيء جدا" ، كما يجب أن تكون الأوساط الحفظية خالية من سكر الكلوكوز لأن استهلاك السكريات ينتج حامض وبذلك يؤدي الى تغير الأس الهيدروجيني للوسط وبالتالي موت البكتريا.

والاوساط الحفظية تكون على نوعين:

أ- الحفظ قصير الأمد Short Time Preservation

تحفظ العزلات البكتيرية في هذه الطريقة على وسط الأكار المغذي المائل slant nutrient agar أو الأطباق الزرعية الصلبة للأكار المغذي، ويجب تجديد الوسط كل شهر او شهرين.

ب-الحفظ طويل الأمد Long Time Preservation

يتم هذا النوع من الحفظ باستخدام الأوساط الزرعية السائلة مثل Nutrient broth او Brain Heart Infusion Broth ويستخدم الكليسيرول المعقم بتركيز 20% للمحافظة على الخلايا من التحلل وايقاف النمو البكتيري.