



الجمهورية العربية السورية

وزارة التعليم العالي

جامعة حماة

كلية الزراعة

علم الأحياء الدقيقة

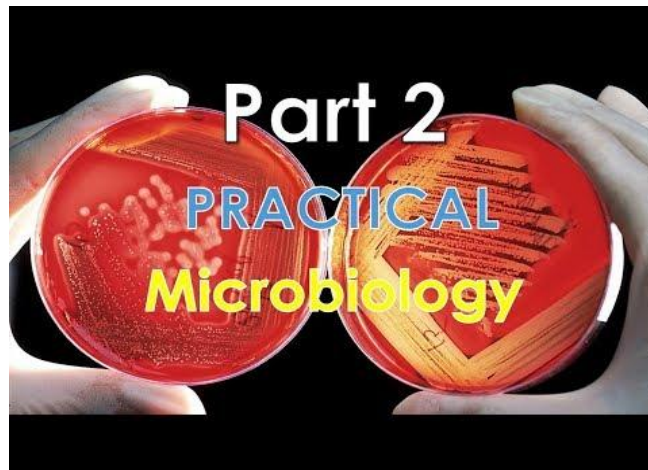
(الجزء العملي)

الجلسة العملية الثالثة

إعداد

الدكتور عبد الواحد الطحي

دكتوراه باختصاص الأحياء الدقيقة



جامعة حماة 2020 - 2021

أنواع أوساط الاستنبات وتحضيرها

Preparing of Culture Media

• تعريف أوساط الاستنبات:

هي الأوساط التي تستطيع الأحياء الدقيقة أن تجد فيها جميع احتياجاتها الغذائية لتنمو وتتكاثر مما يمكننا من عزلها ومعرفة نوعها، وتتألف هذه الأوساط من عناصر مغذية تلبي متطلبات النمو والتكاثر لهذه الأحياء ولا بد أن تحوي مواد أساسية كالكربون والآزوت والفسفور والكبريت إضافة إلى عوامل النمو كالدم والفيتامينات والماء وأن تحقق شروطاً فيزيائية مناسبة كدرجة pH، ونظراً لاختلاف المتطلبات الغذائية من مجموعة إلى أخرى تبعاً لخصائصها الفيزيولوجية والبيئية وقدراتها الاستقلابية فإنه يمكننا أن نميز بين مجموعتين أساسيتين من الأوساط:

- **الأوساط الحية In – Vivo**: تستخدم لتنمية الأحياء غيرية التغذية إجبارية التطفل مثل الفيروسات الراكسية- الكلاميديا (المتدثرات)، ومن هذه الأوساط مثلاً بيض الدجاج - قطع الكبد - الجراثيم.
- **الأوساط المخبرية الصناعية In – Vitro**: تعني الأوساط التي تُركَّبها في المختبر من مواد طبيعية أو صناعية ونضعها في الزجاج تمهيداً لاستخدامها أي الزرع في الزجاج لكن تباين المتطلبات الغذائية والأنماط الاستقلابية والبيئية يقودنا إلى تنوع حتمي أكبر في الأوساط لتلبية حاجات المجموعات التصنيفية على مستوى الفصيلة والجنس وحتى النوع والسلالات المختلفة داخل النوع الواحد. يمكن أن تكون الأوساط:
- **طبيعية Natural Media**: تتركب من مواد طبيعية معقدة التركيب مثل مرق اللحم - الدم الآغاري (الآغار المدمى) - الحليب - البطاطا.
- **صناعية Synthetic Media**: تتركب من مواد صناعية محددة التركيب والأوزان مثل وسط شابيك وسط سيمون.
- **نصف صناعية أو نصف طبيعية Synthetic Media Natural**: يدخل بتركيبها مواد طبيعية ومواد صناعية مثل خلاصة الشعير المضاف لها بعض الأملاح غير العضوية والسكريات.
- يمكن أن تكون الأوساط سائلة أو صلبة أو نصف صلبة وذلك تبعاً لهدف التجربة.

- يجمد الوسط عادة بمادة الآغار المكونة من بروتينات سكرية وهي مادة مستخرجة من بعض الطحالب الحمراء مثل طحلب الجيليديوم *Gelidium* (الشكل 5)، ويكون الآغار صلباً (جامداً) في درجة حرارة 42°م فما دون ومصهوراً (مائعاً) في درجة حرارة 42°م فما فوق.



الشكل 5- طحلب الجيليديوم *Gelidium*

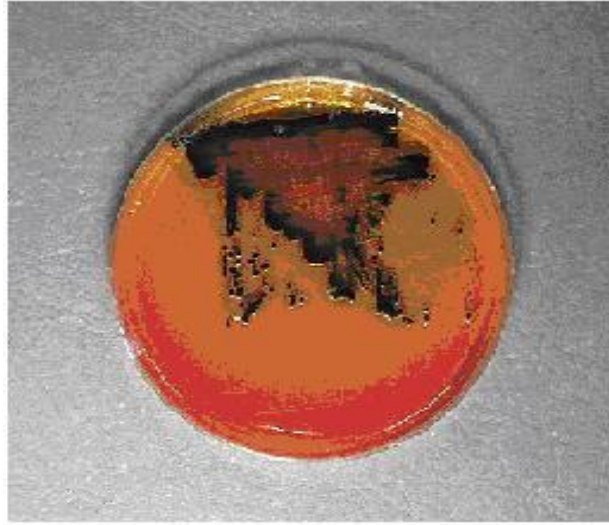
يمكن أن يجمد الوسط بمادة الجيلاتين، وهي مادة بروتينية تستخلص من العظام وتتصلب بدرجة حرارة 25°م فما دون، وتكون مصهورة بدرجة حرارة 25°م فما فوق، ويمكن أن يستعمل وسط الجيلاتين وسطاً تفريقياً يفرق بين نوعين أو مجموعتين من الجراثيم، المجموعة الأولى محللة للجيلاتين والمجموعة الثانية غير محللة له حيث إن المجموعة الأولى تستطيع التغذية على الجيلاتين وتحليله وتحويله من الحالة الصلبة إلى الحالة السائلة حتى في درجات الحرارة المنخفضة دون 25°م، ويندر حالياً استعمال الجيلاتين كمادة تجميد في البيئة نظراً لأن كثير من الجراثيم يمكن تحليلها مائياً ولأنه ينصهر عند درجات التحضين.

• أنواع أوساط الاستنبات:

تتنوع الأوساط الغذائية بسبب اختلاف المتطلبات الغذائية حيث تنمو بعض الجراثيم معطية أشكالاً مختلفة فمثلاً تعطي العصوية القولونية *E. 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. يمكن تصنيف الأوساط الغذائية وفق الهدف من استعمالها إلى:

1- الأوساط الغنية: مثل وسط الدم الآغاري ووسط مرق اللحم Nutrient Broth، وتنمو على هذه الأوساط معظم الأنواع الجرثومية وتستخدم أيضاً لتنمية الجراثيم غيرية التغذية. ويُعدّ وسط آغار البطاطا والدكستروز P.D.A، ووسط مستخلص الشعير والآغار M.E.A من الأوساط الغذائية الفطرية، وهي من الأوساط الصلبة العضوية العامة الطبيعية غير المحددة.

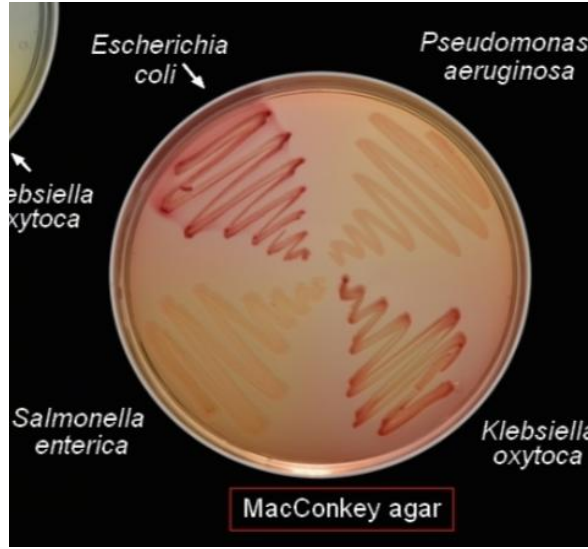
2- الأوساط المختارة: هي أوساط مغذية أضيف إليها بعض المواد الخاصة لتؤثر على نمو بعض الجراثيم مثل إضافة البلورات البنفسجية بتركيز معينة لتزيد من نمو الجراثيم سالبة الغرام وتحد من نمو الجراثيم موجبة الغرام، ومن هذه الأوساط وسط شابمان Chapman Media الذي يحوي على 75غ/ل كلور الصوديوم و10غ/ل مانتيول إضافة إلى حمرة الميتيل حيث تنمو على هذا الوسط المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* فقط، بينما يثبط نمو الجراثيم الأخرى بسبب التركيز الملحي العالي. وسط السالمونيلا والشيغيلا *Salmonella-Shigilla* (S.S Agar) وهو وسط مكون من الآغار المضاف إليه اللاكتوز والأملاح الصفراوية والسيترات والأخضر اللماع وهيبوسولفيت الصوديوم والأحمر المعتدل، وهذا الوسط ملائم لعزل السلمونيلا والشيغيلا وبعض الجراثيم المعوية ولا يسمح بنمو الجراثيم موجبة غرام، ويُعدّ بيئة تفرقية لجراثيم *Salmonella* و *Shigella* حيث تأخذ مستعمرات *Salmonella* لون البيئة مع وجود لون أسود في المركز نتيجة تحلل مواد موجودة في البيئة ينتج عنها غاز H_2S (الشكل 6)، وتأخذ مستعمرات *Shigella* لون الوسط (شفاف).



الشكل (6): وسط السالمونيلا والشيغيلا *Salmonella-Shigilla* (S.S Agar)

3- الأوساط التفرقية: تساعد على التفريق بين نوعين من الجراثيم، إذ يضاف إليها بعض المواد لاختبار إمكانية تحللها من قبل مجموعة من الجراثيم أو عدم تحللها مثل إضافة الكازئين لمعرفة إذا كانت الجراثيم محللة له أم غير محللة، وكذلك إضافة الجيلاتين والدم و..... الخ، ومن هذه الأوساط وسط آغار ماكونكي Mac Conkey Agar الذي يعمل على التفريق بين الجراثيم المخمرة لسكر اللاكتوز عن الجراثيم غير المخمرة لسكر اللاكتوز فالجراثيم المخمرة للاكتوز تأخذ اللون

الأحمر مثل *E.coli* و *Klebsiella* و *Enterobacter*، والجراثيم غير المخمرة للاكتوز ليس لها لون (شفافة) مثل *Proteus* و *Salmonella* و *Shigella* (الشكل 7). يحتوي هذا الوسط على Crystal violet أو Bile Salts بحيث يسمح بنمو الجراثيم السالبة لصبغة غرام فقط. يُعدّ وسط الدم الآغاري Medium Blood Agar من الأوساط التفريقية الذي يعمل على التفريق بين الجراثيم المحللة للدم مثل المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* عن تلك غير المحللة للدم، ويُعدّ وسط الدم المطبوخ Chocolate Agar من الأوساط التفريقية أيضاً حيث يمكن نمو *Heamophilus spp* و *Neisseriae* في هذا الوسط.



الشكل (7): وسط آغار ماكونكي Mac Conkey Agar

- 4- أوساط التقدير الحيوي: تكون عادة محددة التركيب، وتستعمل لقياس كمية مادة ما منتجة من قبل الجراثيم مثل قياس كمية الفيتامين أو الصاد الحيوي المنتج من قبل جرثوم معين.
- 5- أوساط خاصة بتعداد الجراثيم: تستخدم لتقدير أعداد نوع معين من الجراثيم.
- 6- أوساط تحدد صفات الجراثيم: هي أوساط خاصة تستعمل لعزل الجراثيم التي لها قدرة وظيفية ما مثل الأوساط التي تحدد مجموعة جراثيم *Azotobacter* أو مجموعة جراثيم حلقة الكربون.
- 7- أوساط منظمة: تستعمل للحفاظ على الجراثيم واستمرارية نموها لزمن طويل، حيث تضاف بعض المواد التي تحفظ المستعمرات من الفناء، وتبقيها حية أكبر مدة ممكنة.
- 8- أوساط اصطفائية: هي تصطفي نوعاً واحداً معتمداً على خاصية معينة يملكها دون سواه، مثال وسط E.M.B الذي يميز النوع *E.coli* عن غيره من الجراثيم التي تنمو عليه.

تحضير أوساط الاستنبات

تتلخص خطوات تحضير البيئة الغذائية وأوساط الاستنبات فيما يلي:

- 1- وزن المكونات المطلوبة ووضعها في وعاء مناسب.
- 2- إذابة المكونات بإضافة كمية من الماء المقطر المطلوبة للوسط، وقد يحتاج الأمر للتسخين في بعض الحالات كما في حالة وجود آغار في البيئة.
- 3- ضبط الرقم الهيدروجيني pH باستخدام جهاز pH meter وذلك بإضافة محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH أو محلول حمض كلور الماء HCl حسب ظروف الوسط.
- 4- تعبئة الوسط في عبوات مناسبة (أنابيب أو دوارق أو زجاجات... إلخ)، وتغطية العبوات بسدادات خاصة أو بالقطن والسيلوفان.
- 5- التعقيم بالطريقة المناسبة لتركيب الوسط، ثم الحفظ في مكان مناسب لحين الاستعمال.

• الأوساط الغذائية شائعة الاستعمال في استنبات الأحياء الدقيقة:

1- وسط المرق المغذي Nutrient broth:

وسط سائل كثير الاستخدام يصلح لتنمية أنواع من الجراثيم الهوائية وهو وسط الأساس في تحضير كثير من الأوساط الأخرى، ويتركب من المواد التالية:

5 - غ مستخلص اللحم.

10 - غ ببتون (هضمون) Peptone.

5 - غ ملح الطعام NaCl.

1 - ل ماء مقطر.

طريقة التحضير:

تمزج المكونات وتوزع في أنابيب بمعدل 5 مل لكل أنبوب وتعقم بالصاد الموصد مدة 20 دقيقة

عند الدرجة 121°م. في حال عدم توفر مستخلص اللحم يمكن تحضيره بالشكل الآتي:

نأخذ 1 كغ من اللحم البقري المفروم جيداً، ونضيف إليه 2 لتر من الماء العادي. يغلى على النار مدة 20 دقيقة، ثم يترك ليبرد من 2 - 3 ساعات. تزال الطبقة الدهنية من على السطح ثم يرشح، وتجمع الرشاحة في وعاء نظيف، ثم يضاف لكل 1000 مل من خلاصة اللحم 10 غ من الببتون و 5 غ من ملح الطعام. نضبط درجة pH على 7.6 ثم نعقم لمدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م.

بعدها نعيد ضبط درجة pH على 7 - 7.2 ثم نوزع المرق في الأنابيب بمعدل 5 مل لكل أنبوب وتعقم ثانية على الدرجة 115°م لمدة 25 دقيقة.

ملاحظة: يجب أن تكون درجة التعقيم الثانية أقل ارتفاعاً من درجة التعقيم في المرة الأولى لكي نتجنب ترسب الفوسفات القلوية الترايية التي تعكر المحلول. يُحضر البيبتون (الهضمون) في العديد من المعامل بهضم اللحم البقري بإنزيم الببسين (أو إنزيم التريسين فيسمى التريتون) أو من مواد أخرى، وقد يكون البروتين المستخدم من مصدر حيواني أو نباتي مثل لحم البقر أو نبات الصويا.

2- مرق البيبتون الفيزيولوجي أو الماء الهضموني:

المكونات:

- 10 غ بيبتون.
- 5 غ NaCl.
- 1000 مل ماء مقطر.

طريقة التحضير:

تمزج المكونات وتضبط درجة pH على 7 - 7.2، ويوزع في أنابيب ويعقم بالصاد الموصد عند الدرجة 121°م لمدة 20 دقيقة. هذا الوسط يستعمل غالباً لدراسة تخمر السكريات وإنتاج الإندول. في حالة استعماله لدراسة تخمر السكريات نضيف إليه مشعر لدرجة الحموضة (pH) مثل أزرق البروم تيمول أو أحمر الفينول، والسكر المراد دراسته بنسبة تتراوح بين 0.5 - 5 %، ويمكن وضع أنبوب Durham بداخل أنبوب المرق لمراقبة انطلاق الغاز، ثم يعقم.

3- مرق ماكونكي أحادي التركيز Mac Conkey:

المكونات:

- 5 غ توركولات الصوديوم أو تورغليكولات الصوديوم أو أي ملح صفاوي مناسب.
- 10 غ لاكتوز.
- 20 غ بيبتون.
- 5 غ كلور الصوديوم.
- 1000 مل ماء مقطر.

طريقة التحضير:

تذاب المواد السابقة عدا اللاكتوز في الماء الساخن ويسخن المزيج على البخار لمدة ساعتين ثم يبرد ويترك في البراد لليوم التالي، ثم يضاف إليه اللاكتوز ويرشح ويضبط pH الوسط على 7.4 ثم يضاف 5 مل من محلول مائي للأحمر المعتدل بنسبة 1 % أو 1 مل من محلول كحولي 1 % من أرجواني بروم الكريزول. يوزع المحلول في أنابيب ويعقم بالدرجة 115°م لمدة 15 دقيقة.

4- وسط الآغار المغذي **Nutrient agar**:

وسط صلب عبارة عن وسط المرق المغذي مضاف له الآغار بمعدل 15 - 20 غ/ل.

المكونات :

- 1 ليتر مرق مغذي.
- 15 غ آغار.

طريقة التحضير:

تمزج المكونات، ويوضع المزيج في حمام مائي مغلياً لمدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار وتتحل تماماً، ثم يهيا الوسط حسب المطلوب فيما أن يوزع في أنابيب ويعقم لمدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م، أو أن يعقم ويترك ليبرد حتى الدرجة 50°م ثم يوزع في أطباق بتري معقمة.

5- وسط آغار ايوزين زرقة الميتلين **(EMB) Eosine Methylene Blue Agar**:

المكونات:

- 10 غ بيتون.
- 2 غ فوسفات ثنائية البوتاسيوم K_2HPO_4 .
- 15 غ آغار.
- 1000 مل ماء مقطر.

طريقة التحضير:

تمزج المكونات ويوضع المزيج في حمام مائي مغلياً لمدة دقيقة واحدة أو أكثر، ثم يوزع في دوارق بمقدار 100 مل لكل دورق ويعقم بالصاد الموصل لمدة 30 دقيقة عند الدرجة 121°م، وعند الاستعمال تذاب الدوارق ويضاف لكل دورق (أي لكل 100 مل) ما يلي:

- 5 غ لاكتوز.
- 5 غ سكروز.

- 0.4 غ ايوزين أو 2 مل من محلول الايوزين 2 %.

- 0.1 غ أزرق الميتلين أو 1 - 2 مل من محلوله 0.2 %.

تمزج المحتويات جيداً، وتسخن حتى درجة الغليان لمدة 5 دقائق، ثم تبرد حتى الدرجة 50°م، وتوزع في أطباق بتري معقمة.

6- وسط آغار ماكونكي Mac Conkey Agar:

المكونات:

- 5 غ توركولات الصوديوم أو أي ملح صفراوي مناسب.

- 20 غ بيتون.

- 5 غ ملح الطعام NaCl.

- 20 غ آغار.

- 1000 مل ماء مقطر.

طريقة التحضير:

تمزج المكونات ويوضع المزيج في حمام مائي مغلي لمدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار وتتحل تماماً، ويضبط pH إلى 7.6 - 7.8 ويترك ليبرد حتى الدرجة 50°م ثم يضاف بياض البيض بنسبة بياض بيضة لكل ثلاثة لترات من الوسط. يعقم لمدة 15 دقيقة عند الدرجة 115°م، يرشح وهو ساخن ثم يضبط pH عند 7.3، ويضاف 10 غ لكتوز و 5 - 10 مل من محلول 1 % من الأحمر المعتدل، ويمزج جيداً، ويوزع في دوارق، ويعقم ثانية لمدة 15 دقيقة عند الدرجة 115°م، ويترك ليبرد حتى الدرجة 50°م ثم يوزع في أطباق بتري معقمة.

7- وسط الدم الآغاري Blood Agar Medium:

المكونات:

- 5 غ مستخلص لحم البقر.

- 15 غ تريبتون.

- 5 غ ملح كلور الصوديوم.

- 15 غ آغار.

- 1000 مل ماء مقطر.

طريقة التحضير:

تمزج المكونات ويوضع المزيج في حمام مائي مغلياً لمدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار وتتحل تماماً، ثم يوزع في دوارق بمقدار 100 مل لكل دورق، ويعقم بالصاد الموصل لمدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م، وعند الاستعمال تذاب الدوارق، وتبرد حتى الدرجة 45°م ويضاف لكل دورق (أي لكل 100 مل) 5 مل من دم الخروف أو دم الحصان (بشكل عقيم)، وتمزج جيداً وتصب في أطباق بتري معقمة.

ملاحظة: يمكن أن نحضر بالطريقة نفسها وسط الدم المطبوخ Chocolate Agar على أن يضاف الدم للوسط عند درجة حرارة 80°م مما يؤدي لانفجار الكريات الحمراء، وتحرر عوامل النمو منها، وتنشيط بعض الأضداد الموجودة على سطح الكريات الحمر التي من شأنها تثبيط نمو بعض الجراثيم.

8- وسط (Salmonella – Shigella) S.S:

المكونات:

مستخلص لحم البقر.	5 غ
سيترات الحديد.	1 غ
ثيو سلفات الصوديوم.	8.5 غ
سيترات الصوديوم.	8.5 غ
بيبتون.	5 غ
لاكتوز.	10 غ
أملاح صفراوية.	8.5 غ
الحمرة المعتدلة.	25 ملغ
الأخضر اللامع.	0.33 ملغ
آغار.	13.5 غ
ماء مقطر.	1000 مل

طريقة التحضير:

تمزج المكونات ويوضع المزيج في حمام مائي مغلياً لمدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار وتتحل تماماً، ويترك ليبرد حتى الدرجة 50°م ثم يوزع في أطباق بتري معقمة دون أن يعقم الوسط (أي الوسط ليس بحاجة إلى تعقيم).

9- وسط هيكتون آغار Hektoen agar:

المكونات:

ببتون.	غ 12 -
أملاح الصفراء.	غ 9 -
مستخلص الخميرة.	غ 3 -
لاكتوز.	غ 12 -
سالسيلين.	غ 12 -
سكروز.	غ 12 -
كلور الصوديوم.	غ 5 -
كبريتات الصوديوم.	غ 5 -
سترات أمونيوم الحديد Ferrus ammonium citrate.	غ 1.5 -
فوكسين قاعدي Acid fuchsin.	غ 0.1 -
آغار.	غ 14 -
أزرق بروميتمول Bromothymol blue.	غ 0.065 -

طريقة التحضير:

تمزج المكونات ويوضع المزيج في حمام مائي مغلياً لمدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار وتتحل تماماً، ثم تبرد حتى الدرجة 50°م، وتصب مباشرة في أطباق بتري معقمة دون تعقيم.

10- وسط آغار البطاطا Potato agar:

وسط صلب يصلح لتنمية الفطريات يتركب من المواد التالية:

200 غ بطاطا مقشورة، و 15 غ آغار، و 1 لتر ماء مقطر.

11- وسط آغار البطاطا والغلوكوز (PDA) Potato Dextrose Agar:

200 غ بطاطا مقشورة، و 15 غ آغار، و 15 غ غلوكوز، و 1 لتر ماء مقطر.

12- وسط خلاصة الشعير والآغار (MEA) Malt Extract Agar:

وسط صلب يصلح لتنمية الفطريات يتركب من 30 غ خلاصة المولت، و 15 غ آغار،

و 1 لتر ماء مقطر، ويمكن تحضيره على الشكل التالي:

- 1- مستخلص الشعير Malt Extract 40 غ.
 - 2- مستخلص الخميرة Extract of Yeast Powder 2 غ.
 - 3- ماء مقطر 1000 مل.
 - 4- آغار Agar-Agar 10 غ.
- وزن المواد واخلطها حتى الانحلال التامّ بالماء المقطرّ وتعديل درجة الحموضة PH على 6 ± 0.2 باستخدام NaOH أو HCl وذلك على جهاز PH meter بالمقارنة مع ورق عباد الشمس ثمّ وضع المحلول في دوارق (200 مل من المحلول في كلّ دورق) وذلك بعد وضع 2 غ من الآغار في كلّ دورق، وتعقم الأوساط بالمعقم Autoclave لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة 121°C والضغط 15 ليبرة/إنش²، ثم حفظ الأوساط الغذائية في البرّاد حتى الاستعمال.

❖ صبغة أزرق الميتلين Methylene blue:

- 3 غ أزرق الميتلين.
 - 30 مل كحول 95 %.
 - 100 مل ماء مقطر.
- يذاب أزرق الميتلين بالكحول، ثم يضاف إليه الماء، ويرشح.
- #### ❖ مشعر الفينول فتالين:
- يحل 1 غ من الفينول فتالين في 50 مل من الكحول الايتيلي 95 % ثم يضاف 50 مل ماء مقطر.

انتهت المحاضرة