الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي
جامعة حماة
كلية الزراعة

علم الأحياء الدقيقة

(الجزء العملي)

الجلسة العملية الرابعة

إعداد
الدكتور عبد الواحد الطحلي
دكتوراه باختصاص الأحياء الدقيقة

جامعة حماة 2020 – 2021

طرائق استنبات وعزل الأحياء الدقيقة

Methods of Culture and isolate Micro organisms

إن استنبات الأحياء الدقيقة في مزارع نقية وعزل الأنواع المختلفة يتطلب تقنية خاصة وحذراً وحرصاً شديدين، وهو يقتضي قبل كل شيء تعقيم أوساط الاستنبات وإجراء عملية الزرع في شروط صارمة تمنع حدوث أي تلوث جانبي، ثم حفظ هذه المزارع في حالة نقية وإمكانية تلقيح أوساط مغذية جديدة بالمزارع النقية على أن تجرى جميع العمليات أمام اللهب وتعقم إبرة الزرع باللهب قبل وبعد التلقيح، بينما تمسك الأنابيب باليد اليسرى وسداداتها باليد اليمنى، ولا يجوز وضع السدادات على الطاولة كما ينبغي إبقاء أنابيب الاختبار أفقية تقريباً وعدم تركها مفتوحة مدة طويلة من الزمن، وكذلك تمرير فوهاتها على اللهب قبل وبعد عملية النقل أو التلقيح لقتل الجراثيم التي يمكن أن تكون على السطح الخارجي لفوهة الأنبوب كما أنها تخلق تياراً هوائياً صاعداً يقلل من احتمالات التلوث الجانبي بجراثيم الهواء. ينبغي دائماً في أثناء عمليات الاستنبات ترك أنبوب اختبار (أو طبق بتري) دون تلقيح حيث يستخدم شاهداً يدلنا على كفاءة عملية التعقيم ودرجة إتقاننا لتقنية الاستنبات.

المحاذير التي يجب ملاحظتها عند الاستنبات:

1- نظافة الأيدي خصوصاً الأظافر التي يجب أن تكون قصيرة مع ارتداء القفازات الخاصة لذلك.

2- يُغطى الشعر والأنف والفم بقناع قماشي.

3- يجب أن يكون مكان العمل مغلقاً تماماً، وتتم تهوية المكان بأجهزة خاصة، ويتم تنظيف مكان العمل بأكمله بالفورمول أو الكحول أو أية مادة معقمة أخرى، ونعقم المكان بمصابيح للأشعة فوق البنفسجية التي نوقفها عند بدء العمل.

بعد الانتهاء من عملية الزرع توضع المستنبتات في الحاضنة بدرجة حرارة مناسبة ولزمن مناسب مع مراعاة ما يلي:

1- عدم فتح باب الحاضنة إلا للضرورة تحاشياً لانخفاض درجة الحرارة أثناء التحضين.

2- وضع الأنابيب على حامل الأنابيب بشكل قائم، وعدم فتحها داخل الحاضنة منعاً لتلوثها.

3- وضع الأطباق مقلوبة لمنع تبخر الماء من البيئة وتكاثفه على السطح الداخلي للطبق، ولتجنب التلوث.

- **طرائق تحضير المزارع الجرثومية:**

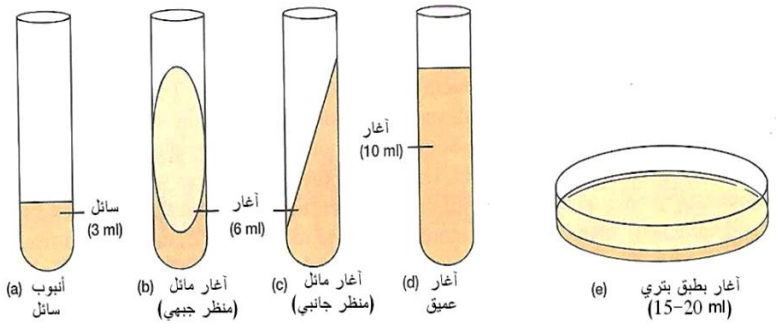
يطلق اسم المزرعة الجرثومية على النمو الحاصل عند استنبات الجراثيم على الأوساط الغذائية المختلفة. يجب التمييز بين المزرعة الجرثومية النقية Pure التي تحتوي على نوع واحد فقط من الجراثيم، والمزرعة الجرثومية المختلطة Mixed التي تحتوي على عدة أنواع جرثومية، وهو ما يميز البيئات الطبيعية التي تختلط فيها الأنواع مما يحتم علينا عزلها اعتماداً على بعض الصفات الشكلية لمستعمرات هذه الأنواع.

تختلف طرق تحضير المزارع الجرثومية باختلاف الأنواع الجرثومية واختلاف هدف الدراسة، فإذا كانت كمية الجراثيم كبيرة فإننا نزرعها في أوساط صلبة، بينما نزرع الكميات القليلة من الجراثيم على أوساط سائلة بغية زيادة عددها، ويمكن التمييز بين نوعين من المزارع (الشكل 2).

آ- المزارع السائلة Liquid Culture التي تجرى عادةً في أنابيب اختبار.

ب- المزارع الصلبة Solid Culture التي يوجد منها ثلاثة أنواع تختلف باختلاف هدف الدراسة هي:

1- مزارع الأطباق. 2- مزارع الآغار المائل. 3- مزارع الآغار العميق.



الشكل 2- أنماط المزارع الجرثومية

أولاً- الاستنبات في الأنابيب:

1- الاستنبات في وسط سائل Liquid culture:

تُعَدُّ هذه الطريقة من أبسط الطرق التي تستعمل لإكثار الجراثيم والحصول على نواتجها الثانوية ودراسة صفاتها الحيوية، وتتضمن استنبات الجراثيم في أنابيب اختبار تحتوي على وسط مغذ مناسب (ماء + مواد مغذية)، ويبدو نمو الجراثيم في مثل هذه الأوساط بأحد الأشكال الآتية: عكر- تشكل غشاءً رقيقاً على السطح – ظهور ترسبات في قعر الأنبوب – حدوث لزوجة للوسط نتيجة إفراز مواد مخاطية – تكوّن غازاً ذائباً في الوسط نتيجة النمو.

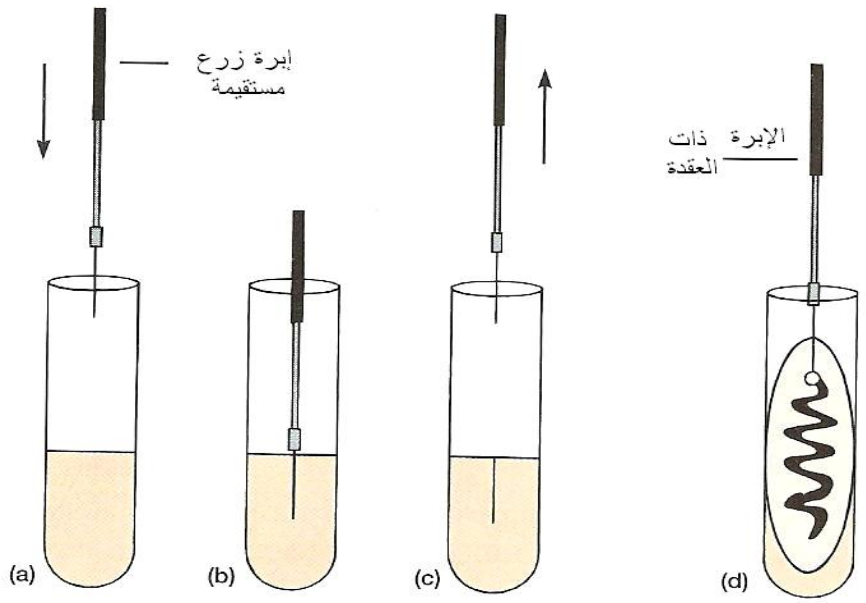
2– الاستنبات فوق سطح مائل من الوسط الصلب:

تدعى هذه الطريقة بالآغار المائل Agar slope أو Slant، وهي تتضمن الاستنبات في أنابيب اختبار حاوية على وسط مغذي مضافاً إليه الآغار ومبرداً في وضعية مائلة. تعد هذه الطريقة مجدية لزيادة السطح القابل للزراعة وسهولة تلقيح الأنابيب وهي ملائمة لاستنبات الجراثيم الهوائية أو اللاهوائية المخيرة، بالإضافة لذلك فهي تمكننا من ملاحظة بعض خصائص المستعمرات الجرثومية كتشكيل الأصبغة. يتم نقل الجراثيم بوضع إبرة التلقيح الحاملة للجراثيم في الجزء السفلي من الأنبوب ثم فرشها على سطح الآغار من الأسفل إلى الأعلى بطريقة التخطيط (الشكل 3).

3– الاستنبات في الآغار العميق:

تنمو الجراثيم داخل أنابيب اختبار حاوية على وسط مُغَذٍّ صلب، ويتم ذلك بطريقتين:

- **طريقة الوخز Stab Method:** يتم تحضير الآغار بصب الآغار المغذي داخل الأنابيب، وبعد التعقيم يترك ليبرد ويتجمد في وضعية قائمة، ثم تغرس إبرة التلقيح الحاملة للجراثيم مرة واحدة وبشكل مستقيم داخل الوسط المغذي وتسحب أيضاً بشكل مستقيم بحيث لا تؤثر في تماسك الوسط المغذي .
- **طريقة الهز (الرّج) Shake Method:** يتم تحضير المزرعة بتلقيح الوسط الصلب داخل الأنبوب بعد تمييعه، ثم هز الأنبوبة بهدف الحصول على توزيع منتظم للجراثيم قبل تصلب الوسط، وكثيراً ما تستعمل لعزل الجراثيم اللاهوائية.



الشكل 3– رسم يوضح طريقتي الوخز والتخطيط في الأنبوب

ثانياً– الاستنبات في أطباق بتري Agar plates:

يجري الاستنبات في الأطباق الحاوية على وسط مغذي بثلاث طرق رئيسة هي:

1– طريقة التخطيط Streak plates فوق سطح من الوسط المجمد:

إن إضافة مادة مجمدة كالآغار للوسط السائل (البروث) تؤدي إلى تشكل وسط صلب فكل خلية حية (أو مجموعة خلايا) تعطي عند استنباتها مستعمرة منفصلة مستقلة يمكن تمييزها وعزلها عن بقية المستعمرات، ونعتمد في ذلك على بعض الخصائص الشكلية لمستعمرات الأنواع المختلفة في وسط معين. تتضمن هذه الطريقة ثلاث خطوات متتالية هي:

الخطوة الأولى: صب الوسط المغذي في طبق بتري معقم مع أخذ الاحتياطات اللازمة لمنع حدوث أي تلوث جانبي.

الخطوة الثانية: تعقيم إبرة التلقيح على اللهب بطريقة الإحماء.

الخطوة الثالثة: تلقيح الوسط المغذي بعد تجمده بطريقة الخطوط التي يمكن تنفيذها بعدة أشكال وفق مراحل العمل الآتية:

1– اقسم الطبق بخطوط وهمية إلى أربعة أقسام.

2– ضع قليلاً من المزرعة المراد تخطيطها على طرف طبق بتري بإبرة التلقيح المعقمة والمبردة، ثم خطط في الاتجاه الأول (شكل 4).

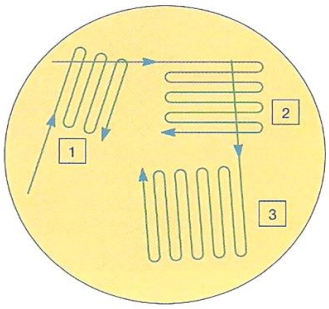
3– عَقّمْ الإبرة وبَرِّدْها، ثم أَدِرْ الطبق وخَطِّطْ في الاتجاه الثاني ابتداءً من آخر خط وصلت إليه في الاتجاه الأول.

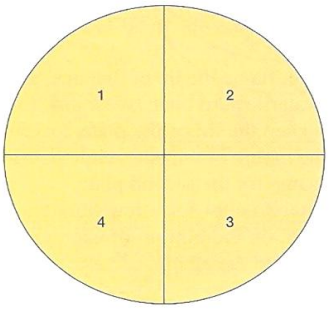
4– عَقّمْ الإبرة مرة أخرى وبردها، ثم أدر الطبق وخطط في الاتجاه الثالث ابتداءً من آخر خط وصلت إليه في الاتجاه الثاني.

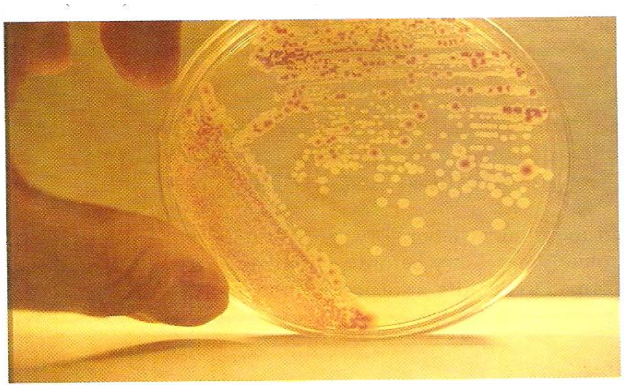
5– عَقّمْ الإبرة مرة أخرى وبردها، ثم أدر الطبق وخطط في الاتجاه الرابع ابتداءً من آخر خط وصلت إليه في الاتجاه الثالث.

6– احضن الطبق، فتنمو عليه مستعمرات نموذجية (الشكل 4).

يهدف التخطيط إلى تخفيف اللقاح إلى أقصى درجة ممكنة، وبهذا يظهر النمو الجرثومي في نهاية الخطوط على شكل مستعمرات نقية مفردة Single colonies مناسبة للعزل والدراسة، ويمكن تخطيط الأطباق الحاوية على بيئة عزل مناسبة للحصول على مستعمرات منعزلة.







الشكل 4- رسم يوضح تخفيف اللقاح بطريقة التخطيط

طريقة التخطيط فوق وسط صلب بطبق بتري.pm 4

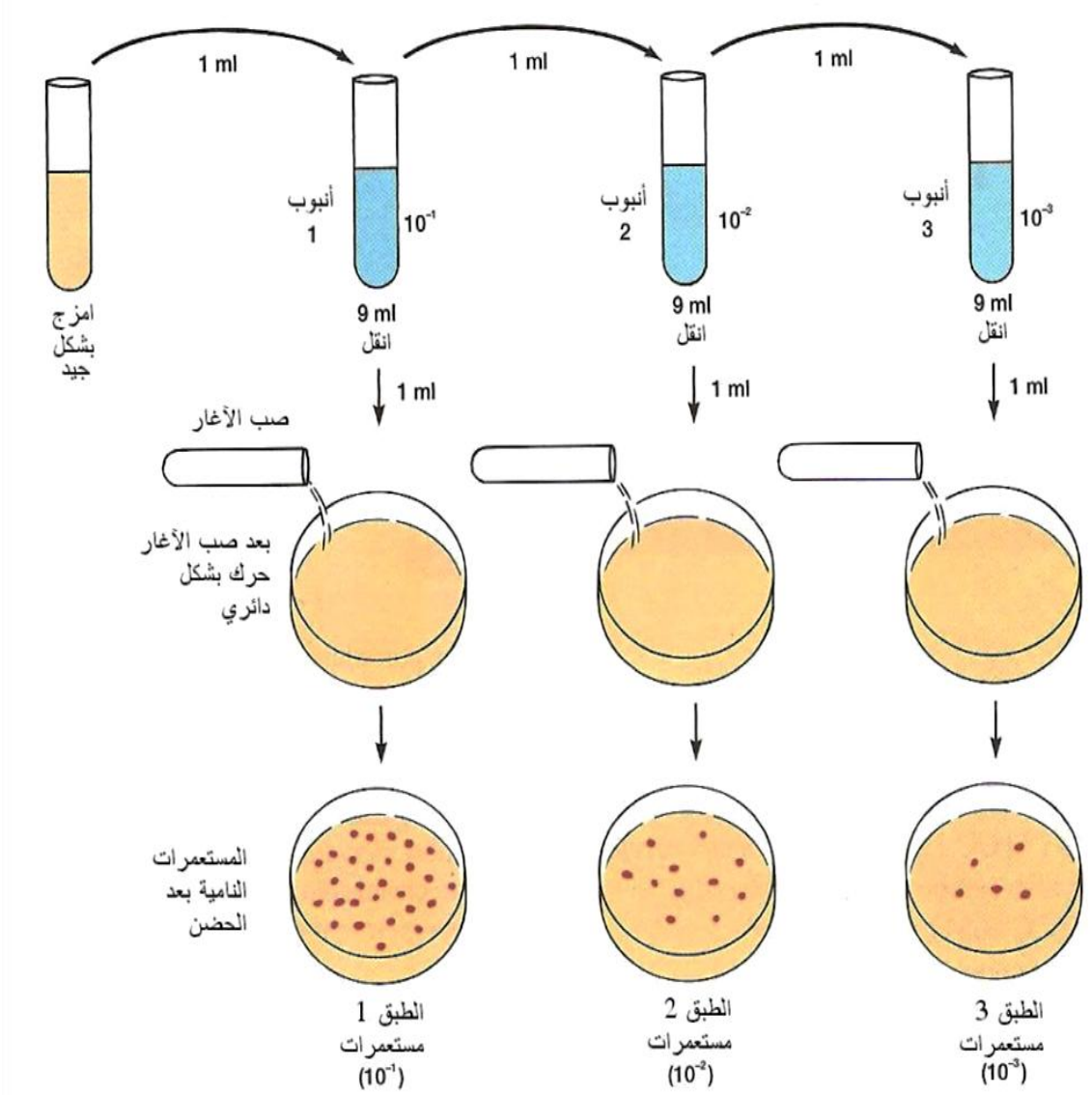
فيديو يوضح طريقة التخطيط Streak plates فوق سطح من الوسط الصلب بطبق بتري

2- طريقة النشر على سطح طبق بتري:

تستخدم للتحري عن محتوى عينة سائلة من الجراثيم وعدّ الجراثيم الموجودة داخل هذه العينة، وتتم بأخذ كمية من العينة السائلة وفرشها على سطح طبق الآغار بالناشر (السباتيول) المعقم، وبعد عملية الفرش يترك طبق بتري كي يجف ويمتص السائل الموجود على سطحه، ثم يحضن بالوضع المقلوب.

3- طريقة الآغار المصبوب:

تعدُّ هذه الطريقة مفيدة للحصول على مستعمرات مستقلة، ثَمَّ عزل الأنواع الجرثومية المختلفة. تختلف عن طريقة النشر السابقة في عملية الاستنبات حيث تتم قبل تجمد الوسط المغذي بدرجة (45°م-50°م) كما تسمح بإجراء تخفيف للجراثيم الموجودة بكثافة في الوسط، وهذا التخفيف يتضمن استخدام تراكيز متدرجة من معلق الجراثيم، ويفضل استخدام التخفيف المناسب الذي يسمح بالحصول على مستعمرات منفصلة من جهة، وتظهر فيه جميع الأشكال النامية في الوسط من جهة أخرى (الشكل 5).



الشكل 5- رسم يوضح مراحل طريقة التخفيف

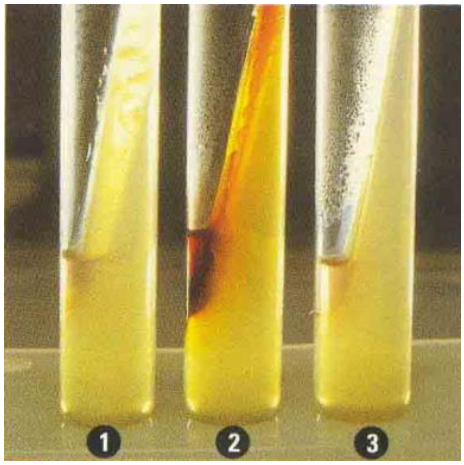
صفات المزارع الجرثومية ونوع النمو

Characteristic of Microbial Culture and growth type

عند نمو خلية جرثومية على سطح وسط غذائي صلب تتكون تجمعات من الخلايا ذات شكل مميز تسمى المستعمرة الجرثومية، ويمكن رؤيتها في هذه الحالة بالعين المجردة، ومستعمرات النوع الواحد تكون متشابهة في الصفات من حيث القطر واللون والارتفاع ....الخ.

أولاً: مظاهر النمو على أنبوب الآغار المغذي المائل:

يمكن توصيف شكل النمو على الآغار المائل بعد عملية التلقيح وفق خط مستقيم متجهاً من أسفل الأنبوبة إلى أعلاها، ثم الحضن المناسب ليتم النمو الجيد حيث تختلف أشكال النمو من نوع جرثومي إلى نوع آخر (الشكل 6) وهي كالتالي:



1- نمو خيطي منتظم على طول خط التلقيح.

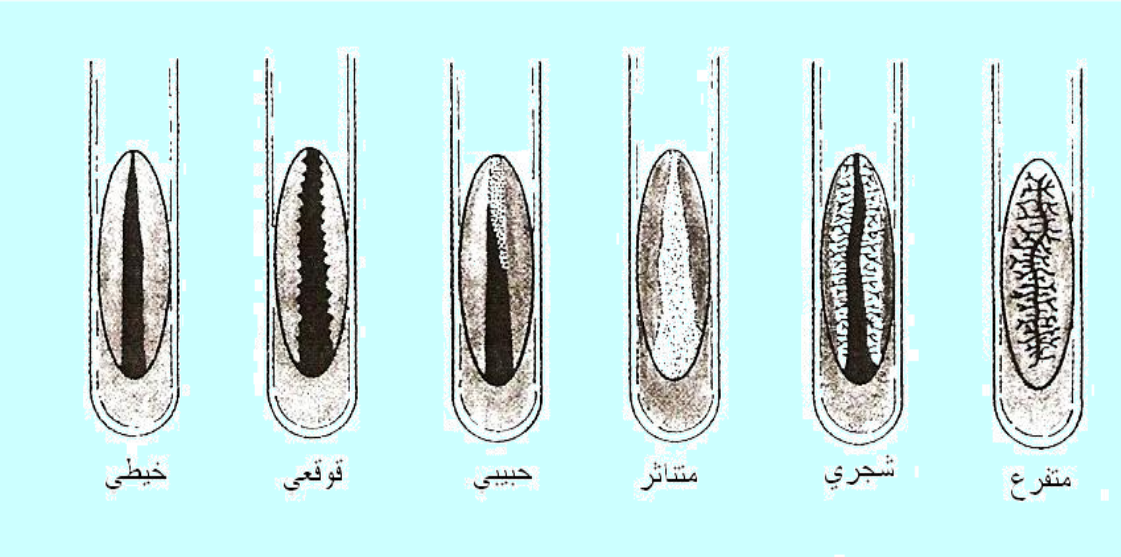
2- نمو مسنن (قوقعي) تكون فيه أطراف خط النمو مسننة.

3- نمو حبيبي (سبحي) تكون المستعمرات النامية شبه مندمجة على طول خط التلقيح.

4- نمو متناثر يكون النمو رقيقاً على شكل ستار منتشر.

5- نمو شجري (متفرع) يكون النمو على شكل شجرة.

6- نمو جذري متفرع يكون على شكل الجذر.



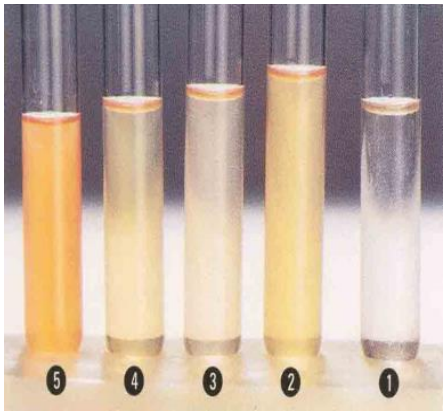
الشكل 6- مظاهر النمو على سطح أنبوب آغار مائل

ثانياً: مظاهر النمو الجرثومي في بيئة المرق المغذي :

يصنف النمو في المرق كما يلي:

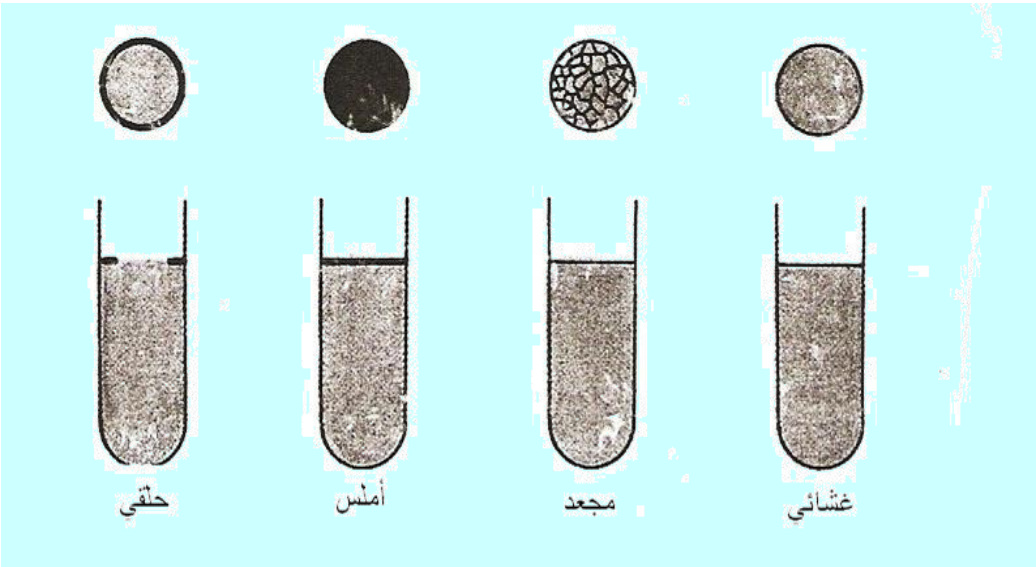
أ- **السطح:** أشكال النمو السطحي أربعة (الشكل 7) هي:1- حلقي: يكون النمو على شكل حلقة حول حواف الأنبوبة. 2- أملس رقيق: يكون النمو على شكل طبقة رقيقة ملساء تغطي سطح البيئة. 3- غشائي: يشبه النمو الغشاء الرقيق لكنه أرق من سابقه. 4- مجعد: يكون على شكل كتل طافية.

ب- **تحت السطح:** النمو يكون على إحدى الصور الآتية:1- عكر: يظهر النمو بشكل سحابي كما في الجراثيم القولونية *E.coli*. 2- حبيبي: يظهر النمو على شكل حبيبات صغيرة. 3- صوفاني: يظهر النمو على شكل كتل صغيرة طافية ومنتشرة. 4- قشري (رقائق): يظهر النمو على شكل كتل كبيرة في المعلق كما في الجراثيم العصوية *Bacillus*.



جـ- **الراسب:** تتفاوت كمية الراسب في الأنبوبة من لا شيء إلى كمية كبيرة. لتوصيف نوعية الراسب نهز الأنبوبة بحيث يصبح الراسب على شكل معلق كما في جراثيم المكورات العنقودية *Staphylococcus*، ويمكن أن يكون الراسب إما حبيبياً أو رقيقاً (قشرياً) أو خيطياً حريرياً أو لزجاً كما في جراثيم *Klebsiella* (لاختبار اللزوجة يمكن أن نلامس قاع الأنبوب بإبرة التلقيح).

د- **كمية النمو:** يجب هز الأنبوبة ثم نقدر كمّية النمو بالنظر على أنه ضئيل أو متوسط أو غزير.



الشكل 7- أشكال النمو السطحي في بيئة المرق المغذي

ثالثاً: مزرعة الوخز في الجيلاتين:

بعد تلقيح أنابيب الجيلاتين المغذي العميق بطريقة الوخز والحضن بالحرارة المناسبة يتم فحص الأنابيب من النواحي الآتية:

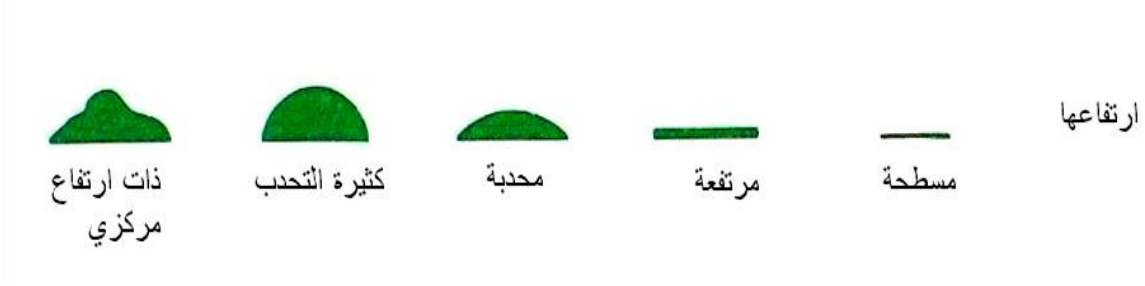
1- **النمو:** وجوده من عدم وجوده.

2- **نوع النمو:** أغلب الجراثيم لا تنمو على الجيلاتين المغذي، ولكن لو نمت بدون إسالة الجيلاتين يكون النمو خيطي مستقيم يحدث في منطقة الوخز فقط، أو نمو حبيبي، أو متعرج، أو هدبي، أو نمو شجري.

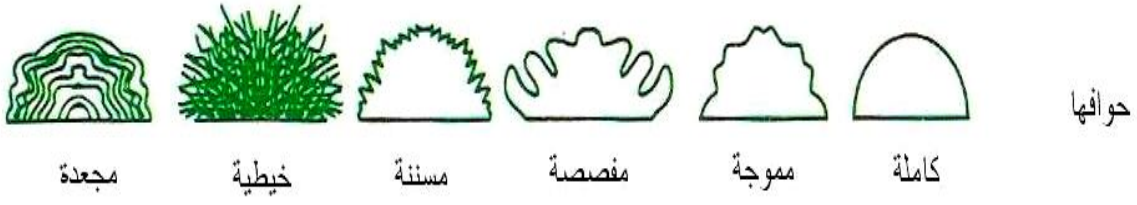
رابعاً: طبق الآغار المغذي:

تدرس المستعمرات النامية على سطح الآغار المغذي باستخدام عدسة يدوية أو بمساعدة مكبرة حيث يتم تسجيل ما يلي: لون المستعمرة، وعتمة المستعمرة، وشكلها، وارتفاعها عن سطح البيئة، وحافة المستعمرة، وبحسب ما هو موضح في الشكل (8).

أ – شكل (مظهر) المستعمرة على سطح طبق الآغار



ب – ارتفاع المستعمرة عن سطح طبق الآغار



ج – حواف المستعمرة النامية على سطح طبق الآغار

الشكل 8- شكل وأوصاف المستعمرات النامية على سطح الآغار

انتشار الأحياء الدقيقة

يتمّ إجراء اختبار بسيط في البداية لكي نبرهن على وجود الأحياء الدقيقة وانتشارها في كل ما يحيط بنا، وبعد نمو هذه الأنواع المختلفة من الجراثيم نحاول توصيف المستعمرات النامية للتعرف على أكبر عدد من النماذج المختلفة لأشكال المستعمرات الجرثومية أولاً، ثم إجراء تلوين للتعرف على أشكال الخلايا الجرثومية وطبيعة جدارها الخلوي. لإجراء هذا الاختبار يجب علينا تعقيم الأدوات المستخدمة في التجربة وتجنب تلوث الأوساط الغذائية وإتباع الطرق السليمة في التعقيم، ثم نقوم بتعريض أحد الأوساط الغذائية المعقمة إلى الهواء أو رذاذ العطاس أو السعال أو نقوم بمسح سطح الوسط المغذي بإصبع اليد أو بمسحة قطنية معقمة مسح بها سطح الجدار أو المنضدة، أو نقوم بنقل بعض المواد إلى الوسط المغذي كالتربة أو ماء الصنبور أو مخلفات الطعام الموجودة على الأسنان أو تحت الأظفار.....الخ، ثم نضع الأوساط الملقحة بالحاضنة لمدة زمنية محددة بدرجة حرارة مناسبة بعد تعليمها بنوع المعاملة وترقيمها حيث يصبح بإمكاننا فحصها بسهولة، واترك أحد الأطباق بدون معاملة كشاهد.

ملاحظة: يمكن أن تنمو على هذه الأوساط أحياء دقيقة مختلفة قد تكون جراثيم أو فطريات، يجب التمييز بينها.

الأدوات والمواد اللازمة:

1- وسط غني مثل الآغار المغذي معقم موجود في أطباق بتري معقمة، أو في أنابيب بشكل مائل.

2- مسحات قطنية معقمة.

3- ماصات معقمة.

طريقة العمل:

1- يُصهر الآغار المغذي ويبرد حتى درجة حرارة 55°م ثمّ يصب حوالي 20 مل في أطباق بتري معقمة مع تحريكها حركة رحوية، وتترك الأطباق حتى تبرد ويتصلب الآغار.

2- اكتب على الأطباق المعلومات الآتية: الاسم – الفئة – نوع المعاملة وهي كالآتي:

طبق معقم شاهد للمقارنة Sterile Control، هواء، أصابع اليد، تخفيف من التربة، ماء الصنبور، رذاذ العطاس، مسحة قلف الأسنان ..... الخ.

3- اترك الطبق المعقم دون إضافة أي شيء فهو شاهد يستخدم للمقارنة مع بقية الأطباق.

4- ارفع غطاء الطبق الذي كتب عليه هواء، وعرضه لهواء الغرفة لمدة خمس دقائق، ثم أغلقه.

5- ارفع غطاء الطبق الذي كتب عليه أصابع اليد، ومرر على سطحه أحد الأصابع، ثم أغلقه.

6- خذ جزءاً من معلق تربة بماصة معقمة (0.1 مل)، وارفع غطاء الطبق الذي كتب عليه التربة وافرشها على سطح الطبق، ثم أعد إغلاقه ثانية.

7- يُسحب جزءاً من الماء بماصة معقمة (0.1 مل)، وارفع غطاء الطبق الذي كتب عليه ماء الصنبور، وافرشها على سطح الطبق، ثم أعد إغلاقه ثانية.

8- ارفع غطاء الطبق الذي كتب عليه رذاذ العطاس أو السعال، واسعل بداخله، ثم أعد إغلاقه ثانية.

9- خذ جزءاً من قلف الأسنان بالقرب من اللثة بوساطة ماسحة قطنية معقمة، وارفع غطاء الطبق الذي كتب عليه قلف الأسنان وامسحها على سطح الوسط المغذي بطريقة التخطيط، ثم أغلقه.

10- بلّل مسحة قطنية معقمة بالماء المعقم، وامسحها على سطح الجدار بمساحة قدرها 2 سم^2، ثم ارفع غطاء الطبق الذي كتب عليه سطح الجدار وامسحها على سطح الوسط المغذي، ثم أغلقه.

11- ضع جميع الأطباق بعد قلبها في الحاضنة على درجة حرارة 28°م لمدة أسبوع (يفضل وضع كل طبق في كيس من البلاستيك منعاً للجفاف والتلوث).

12- افحص المستعمرات النامية في الجلسة العملية التالية، وقارن بين المستعمرات الفطرية والمستعمرات الجرثومية، واكتب ملاحظاتك السابقة جميعها مع رسم الأشكال الجرثومية والفطرية للمستعمرات والخلايا. لاحظ أنّ **مستعمرات الجراثيم**: متجانسة، سطحها أملس كريمي لامع، حوافها محددة، أكثر عتامة للضوء. **ومستعمرات الفطريات**: ذات خطوط شعاعية منطلقة من المركز، سطحها زغبي، غير محددة الحواف، أكثر شفافية للضوء (الشكل 9).

الشكل (9): شكل مستعمرات الجراثيم ومستعمرات الفطريات

انتهت المحاضرة