Lab 4

عزل وتنمية البكتيريا على الأوساط الزرعية
Isolation and Culturing of bacteria on media cultures

بعد ان درسنا في المختبرات السابقة ماهي الأوساط الزرعية وتدربنا على كيفية تحضيرها بمساعدة الأجهزة والأدوات نبدأ الان خطوة زراعة وتنمية البكتيريا **في او على** الأوساط الزرعية المختلفة تمهيدا لتشخيص الاجناس والانواع البكتيرية التي من الممكن عزلها في أي عينة يتطلب الكشف عن البكتريا الموجودة فيها وتدعى جميع الخطوات التي تتعلق بزراعة وتنمية البكتريا **بتقنيات الزرع Culturing techniques او تقنيات العزل Isolation techniques.**

انماط زراعة وتنمية البكتيريا:

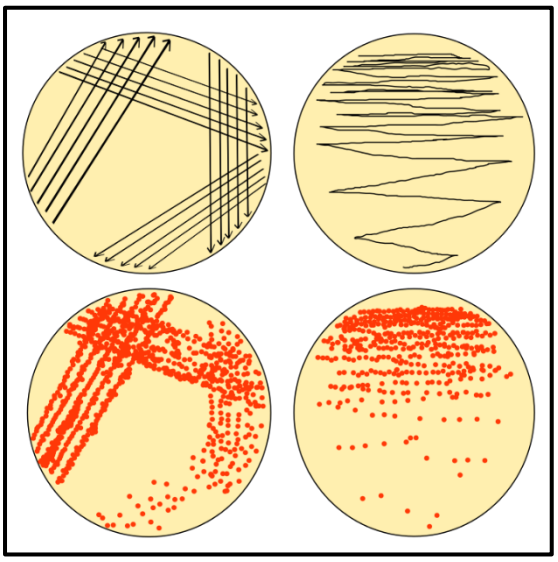
الزرع على الأوساط الصلبة Culturing on solid media

تزرع البكتريا علة الأوساط الصلبة بأربع طرق رئيسية وكما يلي:

- ✓ طريقة تخطيط الطبقstreak-plate method
- ✓ طريقة الصب في الطبقpour –plate method
- ✓ طريقة النشر في الطبقspreading –plate method
- ✓ طريقة الآكار المائل Agar-slop(slant) method
- ✓ التلقيح بالطعن Stabbing method

طريقة تخطيط الطبقstreak-plate method

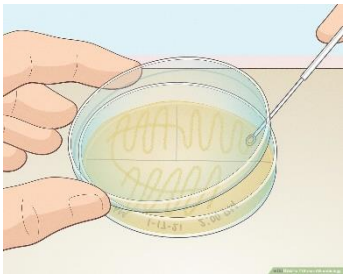
يتبين لنا من العنوان ان الزرع يتم على شكل خطوط ومن اجل جودة عملية الزرع ومعرفة مسار الزرع يتم التخطيط بعدة أنماط من خلال استعمال اللوب LOOP او المسحة القطنية Disposable swab وكما في الاشكال التالية:



طريقة العمل:

1- خذ مسحة من أي منطقة في جسم الانسان او سطح الطاولة او مقابض الأبواب ...الخ.

2- خطط العينة على سط أكار متصلب في طبق البتري بأحد الأنماط المثبتة في الشكل المقابل وذلك باستعمال المسحة القطنية المعقمة مسبقا او بواسطة لووب معقم بمصباح البنزن مع الاخذ بنظر الاعتبار فتح جزء من غطاء طبق البتري اثناء التخطيط خارج ال Hood لتلافي التلوث من الهواء الجوي والتخطيط بلطف gentlyعن استعمال الووب لتلافي تمزق الوسط.



3- بعد حضن العينة في حاضنة الميكروبات بدرجة حرارة 37 م لمدة 18 الى 24 ساعة شاهد نتيجة الزرع (شاهد الفيديو في QR code).

4- النتيجة تظهر نمو مستعمرات متصلة مع بعضها البعض نامية على مسار التخطيط.

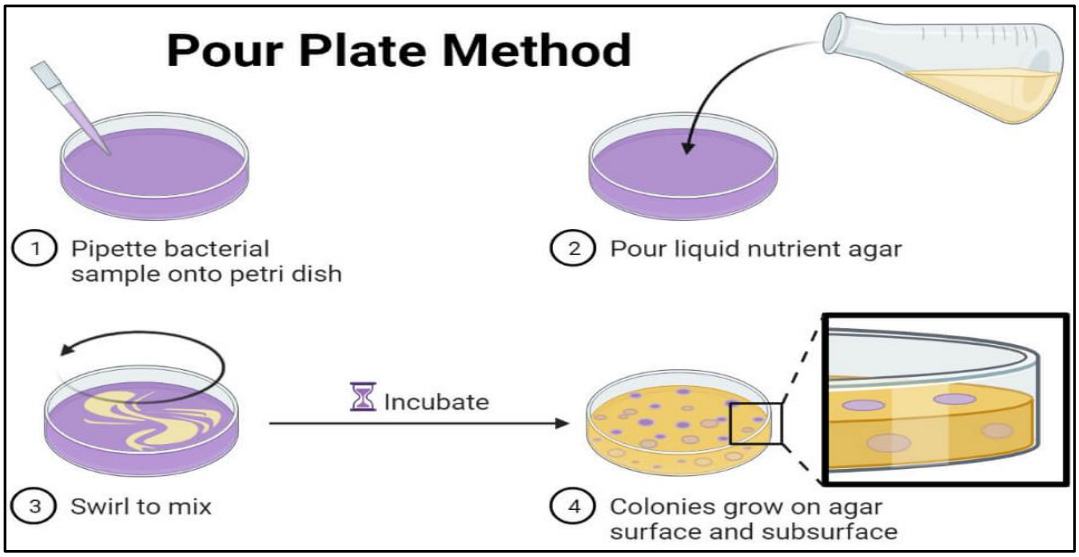
من الجدير بالذكر ان الطريقة أعلاه تطلب وسط زرعي مصبوب ومتصلب مسبقا في طبق البتري.

ht ube.com/watch?v=bm99zrq3ijo

Plate Pouring method طريقة الصب في الطبق

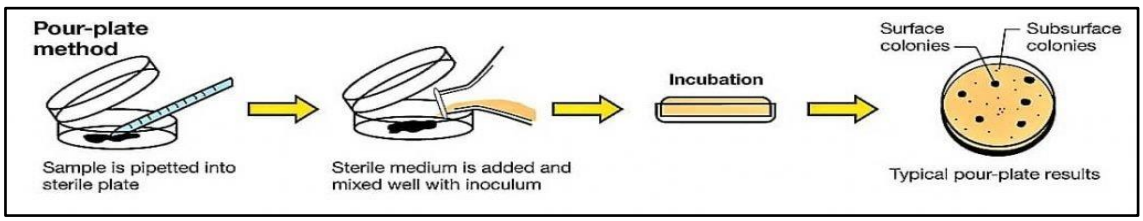
المقصود بالصب هو صب الوسط الزرعي على طبق البتري الحاوي على العينة (كما في الشكل ادناه) وبهذا تختلف عن طريقة التخطيط **بعدة نقاط** منها ان العينة محملة مسبقا في طبق البتري ويتم صب الوسط عليها حيث نستعمل الماصة الدقيقة Micropipette لنقل العينة الى الطبق بدلا من العروة(الووب) والمسحة القطنية كما ان نتيجة الزرع تختلف أيضا إذ ان المستعمرات الناتجة تكون منفصلة عن بعضها البعض وبإمكان تمييزها عن بقية المستعمرات كما بإمكان حساب عدد المستعمرات التي تدعى بالوَحَدات المكونةِ للمُستَعمرات Colony forming units (CFU) التي تتواجد على سطح او وسط او قعر الوسط **(ما السبب؟).**

تُناسب الطريقة هذه في اختبارات فحص عينة الماء او أي سائل ملوث بالبكتيريا وقد تسبق خطوة الصب اجراء عملية سلسلة تخافيف Serial dilution للعينة قبل تحميلها الى الطبق ومن ثم صب الوسط عليها من اجل الحصول على مستعمرات واضحة ومنفصلة تسهل تشخيصها وحساب عددها.



طريقة العمل:

1- قم بتحضر وتعقيم الوسط الزرعي.
2- قم بتحمل العينة بمقدار 100 مايكرو لتر الى طبق البتري الفارغ باستعمال الماصة الدقيقة Micropipette.
3- اترك الوسط الزرعي ليبرد الى درجة حرارة 45 درجة (أي قبل التصلب).
4- عقم فوهة الدورق المخروطي بلهب مصباح بنزن وبعدها صب الوسط الزرعي في الطبق مباشرة.
5- حرك الوسط ثلاث مرات على شكل رقم 8 لمجانسة ومزج الوسط مع العينة بشكل تام.
6- اترك الوسط ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10-15 دقيقة.
7- بعد التأكد من تصلب الوسط ضع الطبق في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م بشكل مقلوب.
8- بعد مرور 24-48 ساعة شاهد النتيجة التي تكون بشكل مستعمرات مختلفة الاشكال منفصلة عن بعضها البعض.



https://www.youtube.com/watch?v=TQqPQSzRtcA

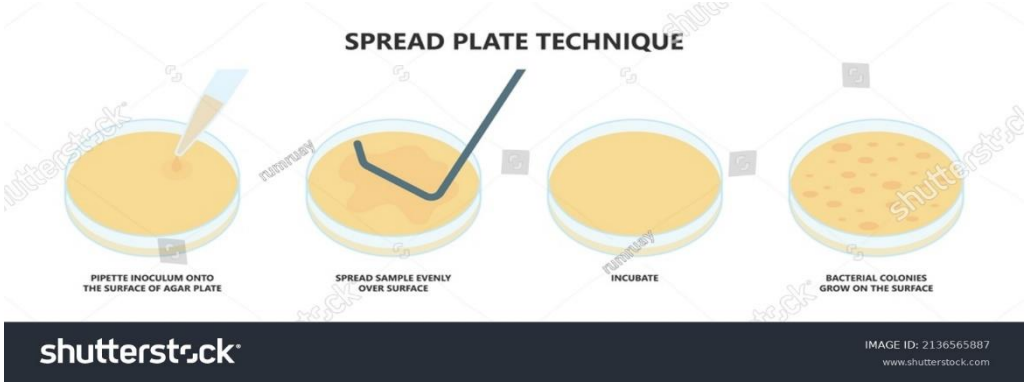
شاهد طريقة الصب في الفيديو أعلاه

طريقة النشر في الطبقspreading –plate method

في هذه الطريقة يتم نشر العينة على سطح الاكار المتصلب بأكمله بحيث تغطي سطح الوسط وتستعمل من اجل ذلك أداة الناشر الزجاجي التي تدعى ب L-shape spreader او المسحة القطنية وتفيد هذه الطريق في تجربة اختبار او فحص الحساسية Sensitivity test والتي سيتم تناولها في المختبرات القادمة بعد الفحوصات البيوكيميائية.

طريقة العمل:

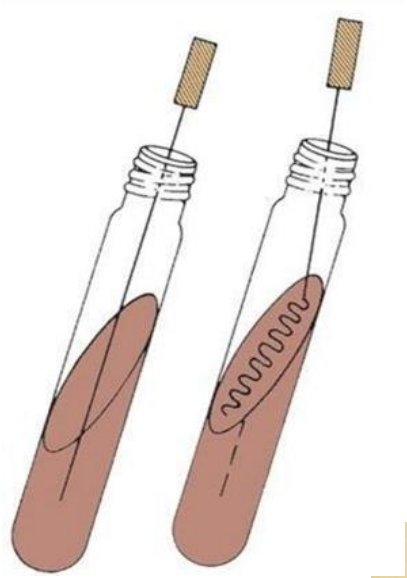
1- قم بوضع 100 مايكرو ليتر من العينة أو العالق البكتيري على سط الاكار المتصلب.
2- قم بنشر العينة باستعمال أداة L-shape spreaderعلى كامل سطح الاكار بحركة دائرية مستمرة وذلك بعد تعقيمها بالتلهب.
3- في حال استعمال المسحة القطنية قم بعمل تخطيط مستمر على كامل الطبق.
4- حضن العينة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية وبعد 24 ساعة شاهد النتائج.



https://www.youtube.com/watch?v=Rye6DfMv66Q

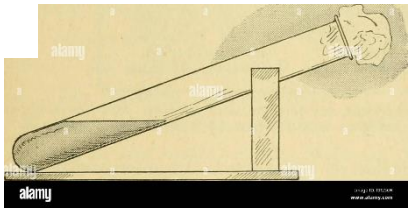
طريقة الآكار المائل Agar-slop(slant) method

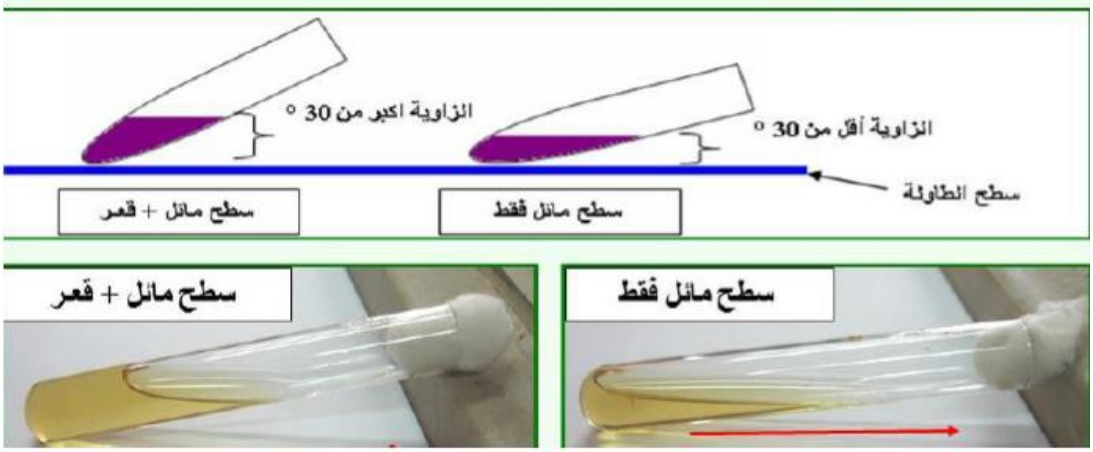
تفضل هذه الطريقة لحفظ البكتيريا Preserving of bacteria كما تستعمل لمشاهدة تكوين الخضاب أو انتاج الغازات في وسط Triple sugar iron agar TSA.



طريقة العمل:

1- قم بتحضير انبوبة اختبار زجاجية او قنينة مكارتني McCartney bottle.
2- بعد تحضير الوسط الزرعي املأ الانبوبة لمنتصفها بهذا الوسط.
3- بعد انتهاء تعقيم الأوساط ضع الانابيب بصورة مائلة مرتفع الفوهة عن سطح الطاولة بما يقارب 30 درجة أو أقل إذا أريد الحصول على سطح مائل slant فقط، أما إذا أريد الحصول على سطح مائل بالإضافة إلى القعر butt فيتم وضع الأنبوب الحاوي على الآكار المغذي بزاوية أكبر من 30 درجة وكما في الاشكال التالية.
4- يتم زرع البكتيريا بطريقتين هما الطعن Stabbing بواسطة ابرة التلقيح Inoculating needle او التخطيط المتعرج Zigzag streaking.





الزرع على الأوساط السائلة Liquid media culturing

بالعادة تحضر الأوساط السائلة وتحفظ داخل انابيب ويستعمل الزرع على الأوساط السائلة لعدة أغراض وهي:

1- تنشيط البكتريا من جديد Activation of bacteria وخصوصا بعد حفظها لمدة طويلة.
2- الزرع من اجل الاختبارات البيوكيميائية مثل اختبار الاندول وتخمر السكريات حيث ان التغيرات اللونية في الوسط السائل تدل على نتائج خاصة بنوع الاختبار.
3- تحضير العالق البكتيري من اجل الاختبارات البيوكيميائية والتي تعتمد على اللقاح البكتيري Bacteria inoculum.

طريقة العمل:

1- قم بتحضير الوسط الزرعي السائل مثل (Peptone water , Nutrient broth, Tryptic soy broth).
2- قم بتوزيع الوسط السائل على انابيب اختبار زجاجية ذات غطاء او انبوبة Plane tube من النوع الضبابي.
3- قم بتعقيم الانابيب الحاوية على الأوساط السائلة بواسطة المؤصدة.
4- بعد التعقيم بإمكان استعمال الانابيب لاختبارات مختلفة

تحضير العالق البكتيري Bacterial suspension او اللقاح البكتيري Bacterial inoculum

1- بعد تحضير الانابيب الحاوية على الوسط الزرعي وفق النقاط أعلاه قم بتلقيحها بالبكتريا اما عن طريق اللوب او ابرة التلقيح او الماصة الدقيقة مع المزج بشكل رقيق.
2- احضن الانابيب في الحاضنة لمدة 18-24 ساعة.
3- النتيجة تكون عكوره في الوسط نتيجة لنمو البكتيريا فيها وبهذا يكون الوسط جاهز كلقاح بكتيري وكما في الفيديو ادناه.

https://www.youtube.com/watch?v=uQajWNIAvXE

الزرع على الأوساط شبه الصلبة Semisolid media culturing

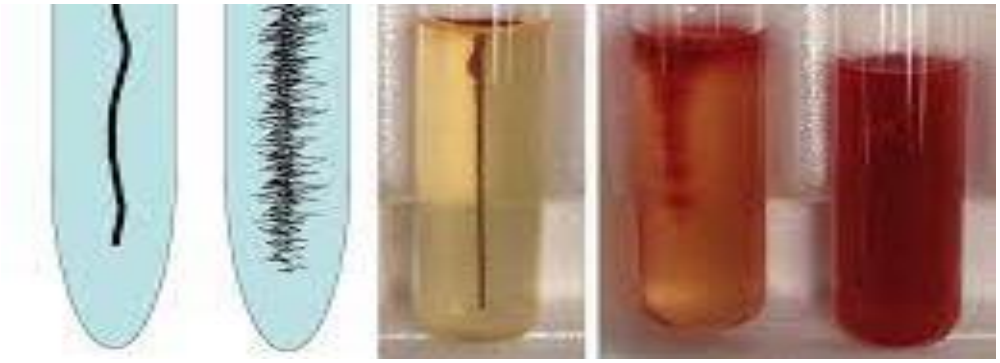
يستفاد من الزرع على الوسط شبه الصلب لغرضين هما :

- ✓ فحص قابلية البكتريا على الحركة Bacteria movement في اختبار يسمى Motility test.
- ✓ فحص قابلية البكتريا على تمييع(تحلل) الجيلاتين gelatin liquefaction في اختبار يسمى Gelatinase test.

طريقة العمل:

1- قم بتحضير وسط شبه صلب مثل وسط SIM medium مختصر Sulfide Indole Motility medium حيث يستعمل للكشف ما اذا كانت البكتريا قابلة على الحركة.
2- بعد تعقيم الوسط داخل الانابيب اتركها بصورة عمودية لتتصلب.
3- قم بتلقيح الوسط عن طريق الطعن Stabbing.

4- قم بحضن الأنابيب الملقحة في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م ولمدة 24 ساعة.
5- بعد انتهاء الحضن نلاحظ النتيجة أي وجود الحركة من عدمها.
6- نستدل عن حركة البكتريا من خلال حدوث هجرة او حركة نمو البكتريا على جانبي منطقة الطعن إذا كانت متحركة Motile bacteria.
7- في حال كانت البكتريا غير متحركة Nonmotile عندها تكون المستعمرات متكونة فقط في منطقة الطعن وكما في الاشكال التالية.



Nonmotile Motile Nonmotile Motile

اما بالنسبة لتميع الجيلاتين يلاحظ تحول الوسط من الشكل الجيلاتيني الى الشكل السائل عند تلقيحها ببكتريا منتجة لانزيم ال Gelatinase .