Lab 5 & 6

إنتاج المزارع النقية Pure culture production

نادراً ما توجد الأحياء الدقيقة Microorganisms كنوع مفرد single species **في الطبيعة** اذ تختلط وتتواجد مع أنواع أخرى وتبدو عند زرعها في المختبر بشكل خليط من المستعمرات البكتيرية تسمى المزارع المختلطة mixed culture وقد تسمّى احيانا بالغشاء الحيوي biofilm عند التصاقها على سطح الاغشية والاسطح الصلبة وذلك لاكتظاظ وتلاصق الخلايا البكتيرية جنب بعضها البعض.

يصعب **دراسة وتشخيص او تعريف البكتيريا** عند وجودها بشكل مستعمرات مختلطة نظرا لتشابه واختلاف الانواع المختلطة في الكثير من الصفات كالشكل والتنظيم والفعاليات البايوكيميائية، على سبيل المثال هناك **مئات الأجناس Genus** البكتيرية شكلها عصوي bacilli ولكنها تختلف فيما بينها في الكثير من الصفات الأخرى والامراض التي تسببها.

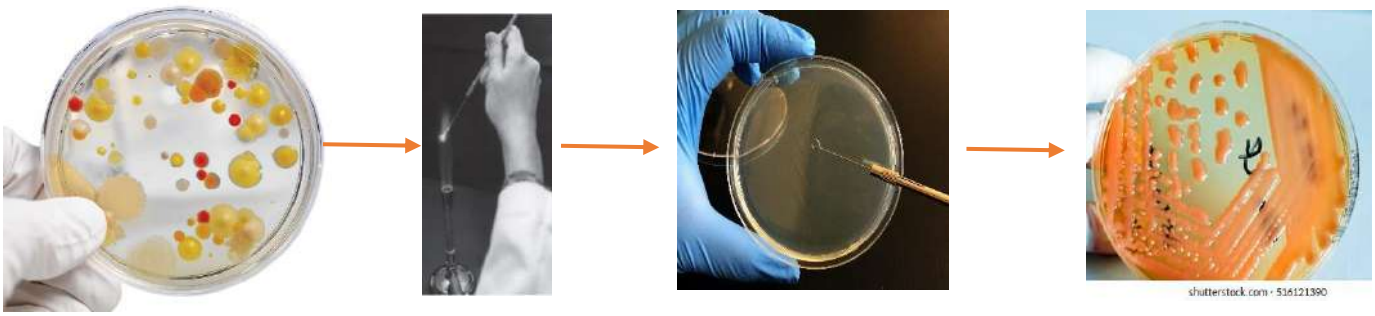
ولتسهيل دراسة **نوع Species** معين يجب أن يستخدم تقنيوا المختبرات laboratory technologists مزرعة نقية pure culture او مستعمرات نقية Pure colonies— أي عشيرة تتكون **من نوع** واحد فقط ويمكن الحصول على المزرعة النقية بعملية تسمى **الزرع الثانوي Sub culturing** التي تعرف بانها نقل البكتيريا من مزرعة لأخرى بهدف تنقيتها ودراسة صفاتها.

ومن الجدير بالذكر ان المستعمرة Colony تعرف بانها تجمع لعدد كبير من الخلايا البكتيرية يمكن رؤيتها بالعين المجردة ناتجة من تضاعف خلية بكتيرية مفردة.

طريقة العمل

للحصول على مزرعة نقية Pure culture نجري عملية الزرع الثانوي Sub culturing لمزرعة مختلطة Mixed culture وكما يلي:

1- قم بتحضير اطباق بتري غير مزروعة حاوية على وسط زرعي وليكن Nutrient agar واطباق أخرى حاوية على مستعمرات مختلطة.
2- باستعمال sterile loop or needle المعقم قم بنقل جزء من المستعمرات من الطبق الحاوي على مستعمرات خليطة الشكل (A ادناه)الى طبق البتري المعقم من خلال زرعها بأحد طرق الزرع التي تم شرحها في المختبر السابق.
3- احضن الطبق الأخير في الحاضنة، بعد 24 ساعة ستحصل على طبق حاوي على مستعمرات نقية.
4- بإمكان تكرار العملية أعلاه للحصول على مستعمرات مختلفة لأنواع أخرى.
5- بإمكان اجراء الخطوات أعلاه أيضا لتنشيط او اكثار البكتيريا عندما يتطلب ذلك في تجارب أخرى ولكن الاختلاف الوحيد هو ان النقل يكون من مزرعة نقية الى طبق خالي من النمو وليس من مزرعة خليطة.



Mixed Culture Pure Culture

س: وضح بخطوات عمل متسلسلة كيفية الحصول على مزارع نقية؟
س: وضح بخطوات عمل متسلسلة كيفية اكثار البكتيريا؟
س: وضح بخطوات عمل متسلسلة كيفية تنشيط البكتيريا؟

طرق نقل وعزل البكتريا تحت ظروف معقمة

تتواجد البكتريا في الطبيعية التي تتوفر لنموها فيها البيئة المناسبة من حيث المغذيات ودرجة الحرارة والرطوبة و PH اما في المختبر فتنمى البكتريا على مواد تدعى الاوساط الزرعية والتي يجب ان توفر لها ظروف ملائمة من حيث الحرارة والتهوية الخ .

ان عمليات النقل للبكتريا هي عبارة عن نقل للبكتريا من بيئة معقمة لاخرى وهذا الامر يتطلب نظام معين يجب اتباعه لضمان اجراء عملية نقل للبكتريا دون حصول تلوث ومن أهمها

١- تجهيز جميع الأدوات والاوساط المطلوبة الضرورية لعملية النقل من موقد بنزين ، Loop، اطباق وانابيب للزرع الخ.

٢- اجراء تعليم للانابيب والاطباق المراد نقل البكتريا لها بكتابة اسم العينة وتاريخ الزرع.

٣- التخلص من الأدوات والمواد الغير ضرورة عن مكان اجراء الزرع (المنضدة) التي يمكن ان تسبب تلوث.

٤- تعديل موقد بنزين وتعقيم سطح مكان التعقيم (المنضدة).

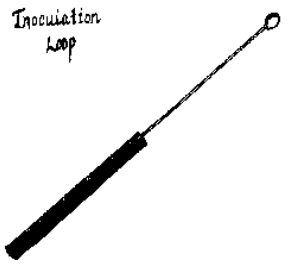
٥- تعقيم ابرة التلقيح ونقل العينة البكتيرية مع التأكد من ان كل عينة بكتيرية تم زرعها بالبيئة المناسبة لها.

٦- عند نقل العينة يجب ان يكون المحيط نظيف ومعقم ويمنع الكلام او العطاس او السعال او أي تيارات هوائية اثناء الزرع والنقل.

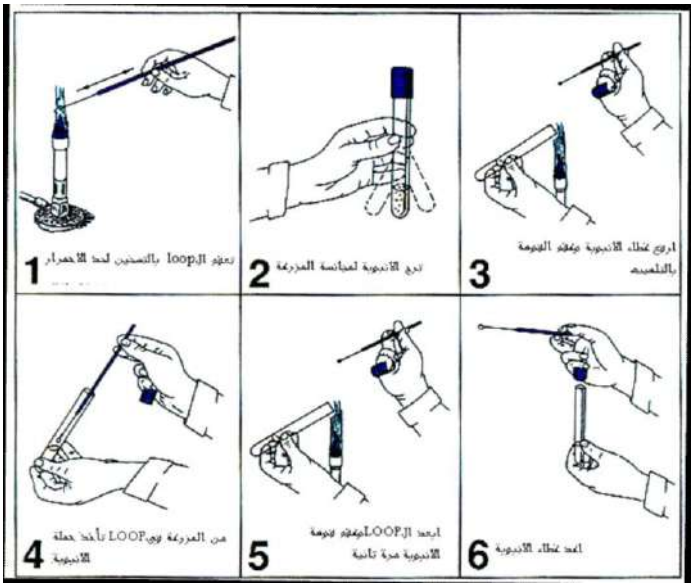
٧- وضع الأوساط بعد الزرع في الحاضنة وتعقيم المنضدة بعدها .

ومن اهم الأدوات المستعملة:

١-**loop** الاداة التي تستخدم لنقل البكتريا من مكان إلى اخر وهو عبارة عن سلك مصنوع من البلاتين أو الكروم + النيكل حيث تتميز هذ المعادن بانها تسخن بسرعة وتبرد بسرعة.



يمكن ان تتم عمليات النقل بوساطته كما في الاشكال الموضحه ادناه



شكل رقم (١) خطوات نقل البكتريا من وسط سائل

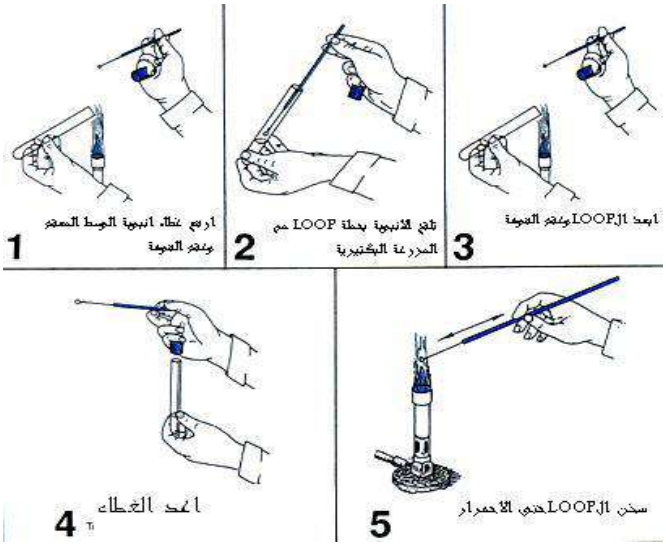
١- تعقيم loop بالتسخين لحين الاحمرار

٢-رج انبوبة الزرع السائل لمجانسته

٣-يتم رفع الغطاء وتعقيم فوهه الانبوبة

٤- نقل حملة ابرة تلقيح من لوسط السائل

٥- ابعاد loop وتعقيم فوهه الانبوبة، ٦- اعاده غطاء الانبوبة



شكل رقم (٢) خطوات تلقيح وسط سائل

اعداد: م.د.ريام فارس صالح

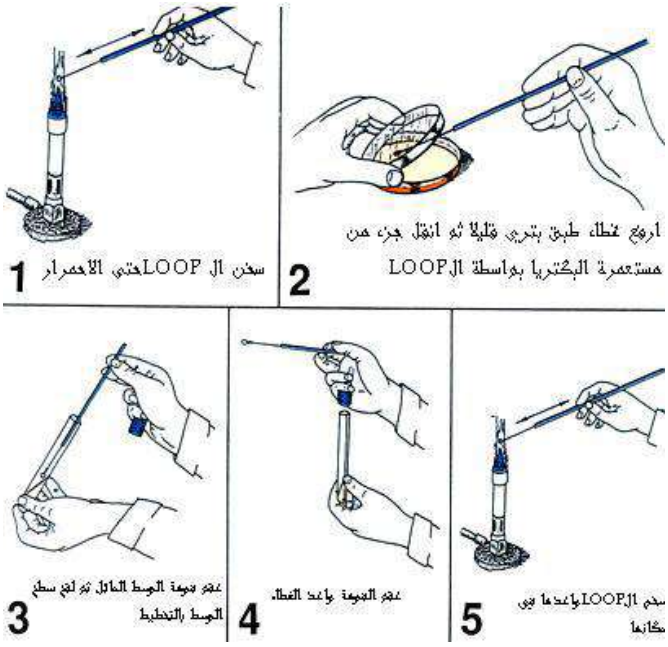
١- يتم رفع غطاء انبوبة الوسط السائل وتعقيم الفوهة

٢- تعقيم loop وتلقيح الانبوبة بوساطته

٣- ابعاد loop وتعقيم فوهه الانبوبة

٤- اعاده الغطاء

٥- تعقيم loop بالتسخين لحين الاحمرار



شكل رقم(٣) طريقة تلقيح مائل الاكار بالبكتريا من طبق اكار صلب

١- تسخين loop حتى الاحمرار

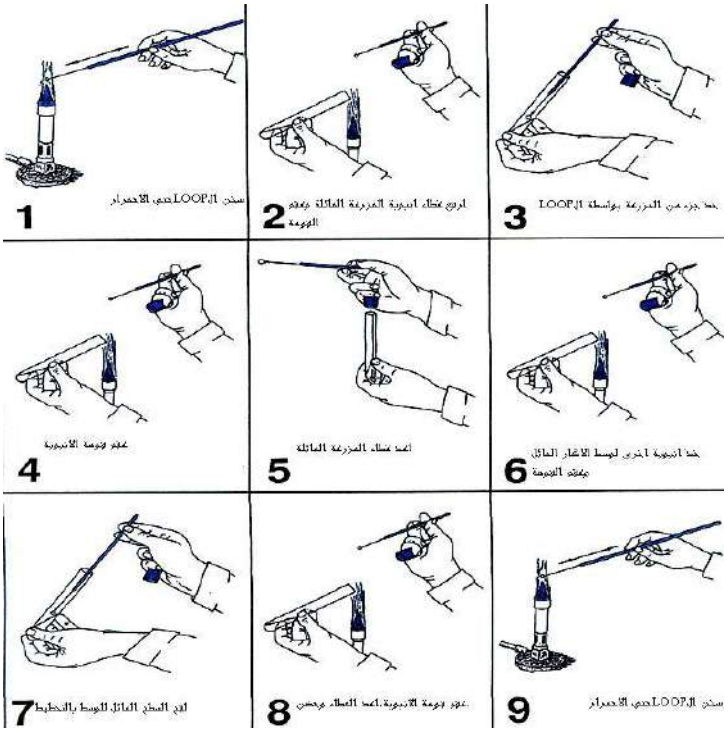
٢-رفع غطاء طبق الوسط الصلب قليلا ونقل جزء من المستعمرة البكتيرية بوساطة loop

٣- تعقيم فوهة الوسط السائل ثم يلقح سطح الوسط بالتخطيط

٤- تعقيم فوهه الانبوبة واعاده الغطاء

٥- تسخينloop واعادته الى مكانه.

اعداد: م.د.ريام فارس صالح



شكل رقم (٤) طريقة تلقيح مائل الاكار بالبكتريا من مزرعة مائلة

١- تسخين loop حتى الاحمرار

٢-رفع غطاء انبوبة المزرعة المائل الصلب وتعقيم الفوهة

٣- نقل جزء من المستعمرة البكتيرية بوساطة loop

٤- تعقيم فوهة الانبوبة

٥- إعادة غطاء المزرعة المائلة

٦- اخذ انبوبة وسط مائل أخرى وتعقيم فوهتها

٧- يلقح سطح الوسط المائل بالتخطيط

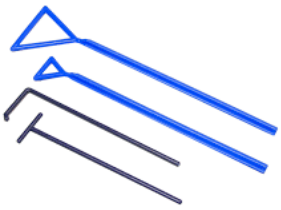
٨- تعقيم فوهة الانبوبة وإعادة الغطاء ويحضن الانبوب

٩- تسخين loop حتى الاحمرار.

٢- **الماسحة القطنية Cotton swabs** يمكن ان تستعمل لنقل البكتريا من وسط سائل لاخر صلب كاداه لنشر البكتريا على سطح وسط صلب او لاجراء فحص حساسية المضادات الحياتية اوتستعمل لاخذ مسحات من تجويف الفم اوالجلد او اللوزتين لزرع وتشخيص البكتريا الممرضة

٣- **Toothpicks** يمكن ان يستعمل لنقل المستعمرات البكتيرية المنماه على وسط صلب لاخر

٤- **L-shape او Cell spreader** هي أداة يدوية تستخدم في علم الأحياء والمجالات ذات الصلة لنشر الخلايا البكتيرية بسلاسة على سطح وسط زرعي صلب، يمكن أن يصنع L-shape من الزجاج أو البلاستيك أو المعدن ، وتأتي بأشكال مختلفة.



٥- الماصات Pipettes هي أداة مختبرية تستعمل لنقل أو قياس حجم سائل ما، تستعمل الأداة غالباً في مجالات الكيمياء وعلم الأحياء إضافة إلى الصناعات الدوائية والطب، تتوفر هذه الأداة بعدة قياسات كما يمكن أن تصنع من عدة مواد بلاسيكية او زجاجية.

عزل البكتريا من مصادر مختلفة Isolation of Bacteria from different Sources

توجد عدة مصادر لعزل البكتريا التي يكون بعضها متواجد بشكل طبيعي كفلورا طبيعية وبعضها يكون ممرض للإنسان والحيوان ومن تلك المصادر (الانسان، الماء ،التربة، الهواء) وغيرها

١- الانسان

يحتوي جسم الإنسان على أعداد لا حصر لها من الكائنات الدقيقة، يحتوي الفم على سبيل الذكر على ما يزيد عن ٧٠٠ نوع من الكائنات الدقيقة، والقناة الهضمية تحتوي على ما بين ٥٠٠ و ١٠٠٠ نوع من الكائنات الدقيقة، ويحتوي سطح الجلد على عدد كبير من الكائنات الدقيقة اذ يعد بيئة مناسبة لأنواع كثيرة جداً من هذه الكائنات، يمكن ان تقسم الكائنات المجهرية من حيث تأثيرها على الإنسان إلى:

١- **الفلورا الطبيعية Normal Flora** كائنات صديقة للإنسان تستوطن الأسطح الخارجية والداخلية للإنسان السليم ولا تسبب أي مرض له.

٢- **كائنات ممرضة Pathogenic Microorganisms:** تسبب الامراض للإنسان في حاله سنحت له أي فرصة لإحداث المرض للانسان.

٣- **كائنات انتهازية Opportunistic Microorganisms:** أشد هذه الأنواع خطراً فهي تعيش داخل الجسم إلا أنه تتحين الفرصة لتضر الجسم.

تعيش الجماعات الميكروبية في توازن و حدوث خلل في توازن جماعات الفلورا الميكروبية نتيجة تعاطي مضادات حيوية لفترات طويلة أو عقاقير وعوامل أخرى تثبط مناعة الجسم يؤدي إلى سوء تصرف هذه الجماعات وتصبح ضارة وتسمى حينئذ ميكروبات انتهازية.

فوائد الفلورا الميكروبية:

١- منع الميكروبات الممرضة من الاستيطان.

٢- تزويد الجسم ببعض الفيتامينات وتحويل بعض المركبات الضارة إلى مشتقات غير ضارة.

أ –الفلو را الطبيعية للفم Norrmal flora of mouth

الفلورا البكتيرية للفم Oral Bacterial Flora تلعب دوراً كبيراً في أكثر أمراض الفم شيوعاً التهاب اللثة وتسوس الأسنان عندما تتوفر لها ظروف ملائمة منها وذلك بإفرازها للسموم والإنزيمات والأحماض نتيجة لاستهلاك بقايا الطعام التي تبقى في الفم دون عناية صحية.

المواد: القطن، كحول ٧٠%، اطباق بتري تحتوي وسط مغذي، ماسحة قطنية cotton swab

طريقة العمل

يتم تعقيم اصبع اليد بالكحول وبعد ان يجف يوضع الابهام على سطح سقف الفم ثم تنقل البصمة للابهام الى سطح وسط المغذي وتحضن الاطباق بدرجة ٣٧مْ لمدة ٢٤ ساعة في الحاضنة فيلاحظ النمو واشكاله على الوسط بعد التحضين.

كذلك يمكن اخذ مسحة من تجويف الفم او اللعاب بماسحة قطنية cotton swab معقم ونقله الى سطح وسط مغذي وتحضينه بالحاضنة بدرجة ٣٧مْ لمدة ٢٤ ساعة في الحاضنة فيلاحظ النمو واشكاله على الوسط بعد التحضين.

ب –الفلورا الطبيعية للجلد

الاحياء المجهرية التي تتواجد بشكل طبيعي على الجسم أو فتحاته تدعى الفلورا الطبيعية Normal flora تعتبر هذ الكائنات تعايشية commensals لانها لا تضر المضيف بل احيانا تلعب دورا هاما لصالحه .حيث تمنع الكائنات المضرة من مهاجمة الجلد بسبب تنافسها مع الاحياء الممرضة على المواد الغذائية، التعرف على هذ الاحياء الموجودة طبيعيا على الجلد غاية في الاهمية لانها كثيرا ما تصادفنا كملوثات في الهواء(على خلايا الجلد التي تتناثر باستمرار وتبقى في الجو) من اهم انواع هذه البكتريا:

١– ***Staphylococcus epidermidis*** بكتريا خلاياها كروية، وعنقودية التجمع(تحت المجهر) تتواجد طبيعيا على جلد الانسان وبعض الحيو انات.

٢– ***Staphylococcus aureus*** على الاقل ٢٠% من الاشخاص يحملون هذ الجرثومة خاصة في فتحات الانف (بشكل طبيعي) وهي لا تضر المضيف ولكنها تكون ممرضة عند دخولها إلى داخل الجسم إذ تسبب التسمم الغذائي او الجروح.

٣- ***Micrococcus luteus*** بكتريا كروية الشكل تتواجد على الجلد لبعض الاشخاص وهي غير ممرضة وتعد من البكتريا الملوثة للهواء

٤- ***Propionbacterium acnes*** عصيات لا هوائية(يعتقد انها تسبب حب الشباب بسبب عزلها من هذ المناطق).

المواد: القطن ، كحول ٧٠ %، cotton swab ، محلول الملح الفسلجي المعقم Normal saline (NaCl في الماء ٠,٩%) ، اطباق nutrient agar.

طريقة العمل:

١-تمسح منطقة الجلد من أي جزء (الايدي او فروة الراس) بقطعة قطن مشبعة بالكحول بتركيز ٧٠% لمدة دقيقة ولتطهير المنطقة من الاحياء المجهرية غير المتوطنة (Transient) organisms والتي لا تشكل جزء من الفلورا الطبيعية.

٢-تترك لتجف.

٣-ترطيبswab بالسلاين ويمسح الجلد في منطقة محددة لمدة ١٥ ثانية

٤-يفتح الطبق تحت ظروف معقمة ويلقح سطح الاكار بواسطة ماسحة قطنية swab ويتم التخلص من المسحة بوضعها في بيكر يحتوي على ديتول.

٥-يحضن الطبق في الحاضنة لمدة ٢٤ ساعة عند درجة حرارة ° ٣٧ م.

٦-تفحص الاطباق وتدرس انواع المستعمرات واشكالها و الوانها، قوامها.

ملاحظه: يمكن عزل البكتريا من تجويف الانف باخذ مسحة بوساطة ماسحة قطنية وزرعها على سطح وسط صلب معقم وتحضينه بالحاضنة بدرجة ٣٧مْ لمدة ٢٤ ساعة في الحاضنة.

كذلك يمكن عزل البكتريا من الشعر بنقل جزء من الشعرة او اظافر بوساطة مقص معقم الى سطح وسط معقم وتحضن في الحاضنة بدرجة ٣٧مْ لمدة ٢٤ ساعة.

٢- عزل البكتريا من الهواء والماء

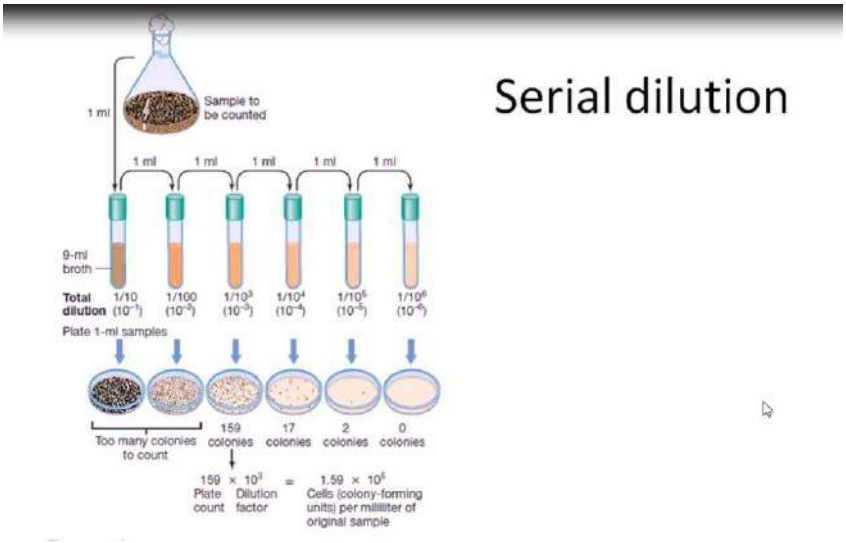
عند عزل البكتريا من الهواء يترك الطبق الذي يحوي وسط معقم مفتوح في المختبر لمدة (١٠-٣٠) دقيقة ساعة ثم يغطى ويحضن في الحاضنة وتسجل النتائج اما في حالة اخذ عينة ماء سواء حنفية او مياه معدنية تنقل حملة ابرة تلقيح من الماء الى سطح وسط معقم بطريقة التخطيط ويحضن الطبق بالحاضنة.

٣- عزل البكتريا من التربة

تحتوي التربة على أعداد كبيرة من الاحياء المجهري من ضمنها البكتريا التي قد تكون هوائية او لاهوائية التي تختلف في اشكالها والوانها وانواعها، توجد عدة طرق لعزل البكتريا من التربة حسب نوع البكتريا اذا كانت هوائية او لاهوائية ومكونة او غير مكونة للأبواغ بعد تحضير تخافيف لإجراء العزل للبكتريا:

تحضر التخافيف

يوزن (١ غم) من نموذج من النماذج المختلفة(تربة زراعية وتربة رملية) ويضاف إلى أنابيب اختبار التي تحتوي ٩ مل من الوسط المعقم فنحصل على التخفيف الأول ١٠/١ نجري سلسلة تخافيف أخرى بنقل ١مل من التخفيف الأول الى أنبوب اخر يحتوي وسط مغذي سائل للحصول على التخفيف الثاني ١٠٠/١ وينقل من هذا التخفيف ١مل لأنبوب اخر فنحصل على تخفيف ١٠٠٠/١ وكما موضح في الشكل ادناه .



بعد هذه الخطوة توجد طرق للحصول على مزارع نقية للبكتريا منها في حالة البكتريا الهوائية الغير مكونة للأبواغ تستعمل احد الطرق التالية

أ- طريقة التخطيط Streaking Method

٢- طريقة النشر Spreading Method

تصلح هذه الطريقة للحصول على مزرعة نقية من عينة يشك بانها تحتوي عدة أنواع من الاحياء المجهرية حيث في هذه الطريقة ينقل ٠.١ مل من العالق الى سطح وسط اكار مغذي معقم ثم ينشر العالق بناشر زجاجي معقم في اتجاهات متعددة لضمان نشر الخلايا البكتيرية بشكل منفصل ثم تحضن الاطباق لمدة ٧٢ ساعة او اكثر بدرجة (٢٨-٣٠) مئوية.

اما في حالة البكتريا المكونة للأبواغ التي قد تكون هوائية مثل بكتريا جنس Bacillus او لاهوائية مثل جنس Clostridium فيمكن ان تعزل البكتريا الهوائية وكما يلي:

١- بعد ان تحضر التخافيف توضع انابيب التخافيف في حمام حمائي بدرجة ٨٠ مئوية لمدة٢٠ دقيقة

٢- ينقل من تلك التخافيف المحضرة مسبقا مقدار يتراوح من ٠.١ الى ١مل الى الطبق فارغ في حالة بكتريا هوائية غير مكونة للأبواغ ويصب الوسط الصلب المعقم (درجة حرارته ٤٥مئوية) وتخلط العينة والوسط بتحريك محتويات الطبق افقيا باتجاه وعكس اتجاه عقرب الساعة وتترك يتصلب ويحضن بالحاضنة بدرجة (٣٠) مئوية لمدة اسبوع

٣- يلاحظ شكل المستعمرات والوانها وتسجل النتائج

في حالة البكتريا اللاهوائية تستعمل نفس الخطوات للبكتريا اللاهوائية المكونة للأبواغ فيما عدا النماذج المأخوذة من التربة على عمق ٥٠ سم عن سطح التربة وتستعمل أوساط خاصة للتنمية Thioglycolat-medium ووسط clostridium –medium .