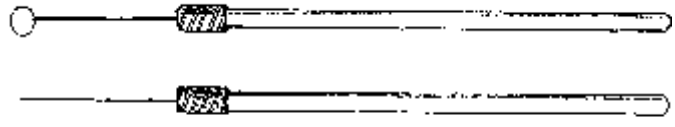
Isolation of pure culture
Methods of isolating bacteria طرق عزل البكتريا

- تخضع البكتريا لمختلف التأثيرات البيئية التي لها علاقة بنموها وبقائها ككل الموجودات الحية .
- وكما نعلم فإن البكتريا لا توجد في الطبيعة على هيئة مزارع نقية بل توجد مختلطة مع بعضها البعض ، لذلك قبل دراسة خواصها المز رعية أو المورفولوجية أو الفسيولوجية ، يجب أولاً عزلها وتنميتها في مزارع نقية.
- للحصول على نمو بكتيري نقي ، هناك عدة طرق تعتمد كلها على فكرة واحدة أساسية وهي تخفيف تركيز الخلايا البكترية بحيث يمكن فصلها عن بعضها البعض ويجري ذلك باستخدام الأدوات التالية :
  ١. الماصة المعقمة : عند نقل كميات كبيرة من المستنبت أو المادة السائلة .
  ٢. الملقط المعقم : عند أخذ قطعة نسيجية تمسح على الآجار .
  ٣. سلك Wire التلقيح : عبارة عن سلك مصنوع من مادة البلاتين Platinum أو الكروم لكن الكروم يتأكسد بسرعة لذا لا يستخدم عند زراعة البكتريا اللاهوائية ، ويعقم بواسطة اللهب حتى الاحمرار (يجب أن يعقم السلك المعدني كاملا)
  وهو نوعان :
  a. سلك التلقيح المستقيم Straight wire .
  b. سلك اللقاح ذو الحلقة Wire loop : منتهي بحلقة ذو قطر 2 – 4 mm .

ونستخدم سلك التلقيح المستقيم Straight wire لتلقيح الأوساط العميقة Deep culture و سلك اللقاح ذو الحلقة Wire loop لتلقيح أطباق بتري وكذالك الأوساط السائلة .

- يجب التأكد من تعقيم إبرة التلقيح حتى الاحمرار و تبريدها قبل أخذ اللقاح البكتيري .
- بعض الأحيان نقضي الكثير من الوقت في التعامل مع الأحياء المجهرية ، ونحتاج إلى نقلها من أنبوبة إلى أخرى أو إلى شرائح أو أطباق بتري ، ولهذا يجب أن نتعلم الطرق الصحيحة لنقل البكتيريا لتجنب تلوثها .



طريقة تعقيم سلك اللقاح

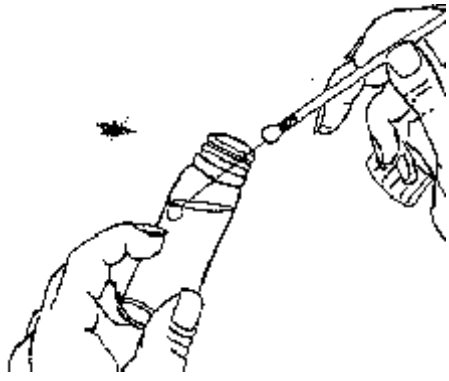
طريقة أخذ اللقاح البكتيري
Method of taking the bacterial inoculum

- **من الأوساط الصلبة في أطباق بتري Agar plate :**

هذه المزارع تحتوي على مستعمرات منفردة للبكتيريا النامية عليها ولهذا يكفي فقط أخذ مستعمرة منفردة كالقاح .
أثناء أخذ اللقاح لا يفتح الطبق بشكل كامل وإنما فتحة كافية لإدخال سلك اللقاح وأخذ المستعمرة .

- **من الأوساط السائلة Broth culture :**

تترسب الأحياء المجهرية في الأوساط السائلة المتروكة لفترة طويلة ، ولهذا فانه قبل اخذ اللقاح يتم رجها لنشر الأحياء المجهرية فيها .
ثم بواسطة سلك اللقاح ذو الحلقة حيث يتم إدخاله إلى داخل الوسط السائل ثم تؤخذ قطرة من الوسط (ممكن أن ترى من خلال الحلقة) .



- **من الأوساط المائلة و العميقة Slant and Deep agar :**

يتم أخذ اللقاح بواسطة التقاط مستعمرات بكتيرية من قمة الشكل المائل أو العميق في الأنبوبة بطريقة تشبه حركة القشط بواسطة سلك اللقاح ذو الحلقة Wire loop.

- **من العينات المرضية From clinical specimens :**

يتم ذلك باستخدام ماسحة معقمة Swab مغطاة بالقطن أو بمادة الداكرون Dacron أو بمادة Calcium alginate إلا أن الأخيرة تعتبر سامة للكلاميديا Chlamydia .

طريقة تلقيح الأوساط الزراعية
Methods of inoculation of culture media

- **تلقيح الأوساط الصلبة Inoculation of agar plate :**

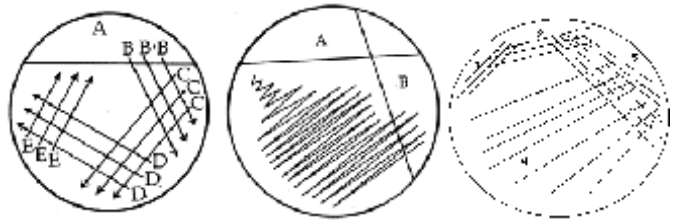
حتى عام ١٨٨٣ ، كانت تنمى البكتيريا في المختبر في الأوساط السائلة أو على أسطح الثمار والخضار فقط .
إحدى أهم الإكتشافات في علم الأحياء الدقيقة كانت من قبل العالم روبرت كوخ Robert Koch وهي تطوير وسط مغذّي صلب Solid culture media للحصول على مزارع نقية Pure cultures .
البكتيريا يمكن أن تنتشر عبر الأسطح الصلبة وتنفصل عن بعضها البعض . عندما هذه البكتيريا الفردية تتكاثر، فأنها سوف تشكل مستعمرات Colonies .
أذن فالمستعمرة هي عبارة عن كتلة مرئية من الخلايا الميكروبية التي نشأت عن خلية واحدة نظريا.
عندما كلّ وحدة تشكيل مستعمرة Colony – Forming Units (CFU) تمثّل سلالة بكتيريا وحيدة ؛ فأن هذه السلالة تدعى بالمزارع النقية .
بداية كان يستخدم الجيلاتين gelatin كمادة تصلبيه ، لكنة يذوب لسوء الحظ في درجات الحرارة فوق°30C ، ففي الصيف قد يكون مستحيل العمل مع gelatin .
بسبب هذا التقييد ، يستخدم الآجار المستخرج من بعض الطحالب البحرية بدلا عن الجيلاتين لكثرة استقراره .

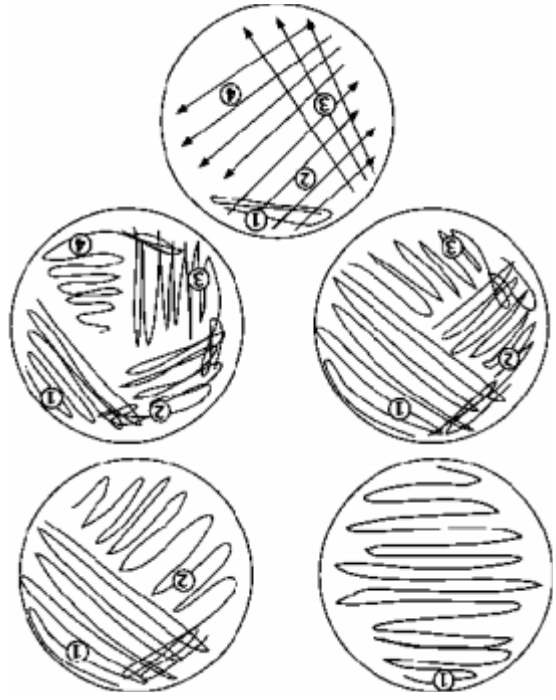
- وهناك عدة طرق متبعة لعزل البكتريا وفصلها عن بعضها البعض على الأوساط الصلبة وهي :
  ١. تقنية التخطيط Streak plate technique .
  ٢. تقنية النشر Spread plate technique .
  ٣. تقنية الصب Pour plate technique .

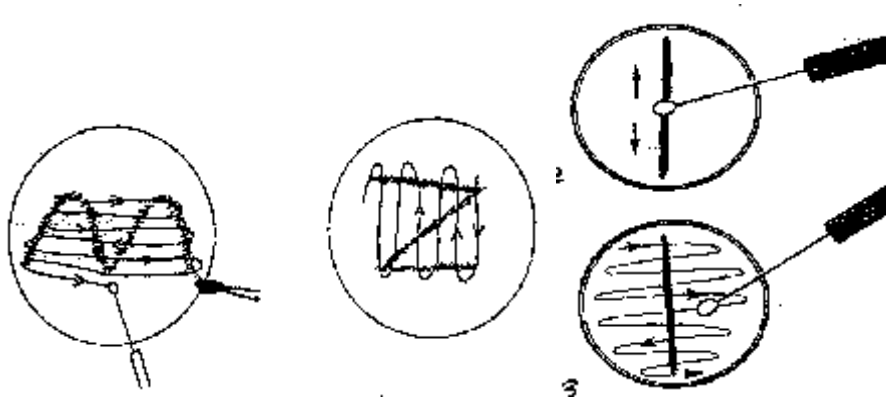
- **أولاً : تقنية التخطيط Streak plate technique :**

- إنّ طريقة التخطيط تقنية سريعة وبسيطة تؤدي إلى تخفيف تركيز الخلايا البكتيرية. إنّ الهدف من ذلك هو الحصول على مستعمرات منفردة معزولة على جزء كبير من سطح الآجار ، ولهذا فأن النوع المرغوب يمكن عزله في أوساط أخرى .
- التخطيط الصحيح للأطباق أداة لا غنى عنها في علم الأحياء الدقيقة.
- في أكثر الحالات سلك التلقيح ذو الحلقة يستعمل لتخطيط الأطباق. سلك اللقاح لا يجب أن يكون مؤكسد أو يخدش سطح الآجار .
- يمكن تقسيمها حسب طريقة التخطيط إلى :
  ١. التخطيط المتوازي (المتقاطع) وفيه نخطط خمس مناطق متباعدة على الطبق .
  ٢. التخطيط المنكسر : وفيه نخطط حوالي ثلاث مناطق متباعدة على الطبق .
  ٣. التخطيط الكثيف أو البسيط : وفيه يتم تخطيط منطقة واحدة على الطبق .

- وهذه الطريقة طريقة التخطيط تجرى بأخذ لقاح بكتيري من العينة ويخطط بالقرب من حافة الطبق ثم يحرق سلك اللقاح على اللهب وتعمل خطوط أخرى متوازية تقطع الخطوط الأولى وبشكل عمودي عليها ثم يحرق سلك اللقاح (ويبرد بمنطقة لا تحتوي على لقاح في الطبق) وتعمل خطوط أخرى متوازية تقطع نهاية الخطوط الثانية وهكذا .
- هذه الطريقة تؤدي إلى تخفيف خلايا البكتريا من خط إلى آخر حتى نحصل على مستعمرات بكترية منفصلة يسهل دراستها .


A
B B B
C C C
E E E
D D D
A
B





- **تقنية النشر Spread plate technique :**

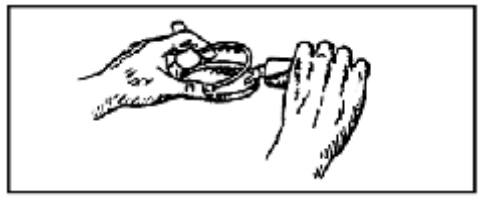
في هذه التقنية نستخدم ناشر زجاجي على شكل حرف L بدلا من استخدام سلك اللقاح ، حيث يتم نشر كمية معينة من السائل على أوساط صلبة .

- **تقنية الصب Pour plate technique :**

هي عبارة عن تقنية عملية تستخدم للحصول على مزارع نقية وكذلك في عد الكائنات الحيّة المجهرية في العينات مثل الماء، الحليب، الأغذية ، والمواد أخرى .

طريقة العمل :

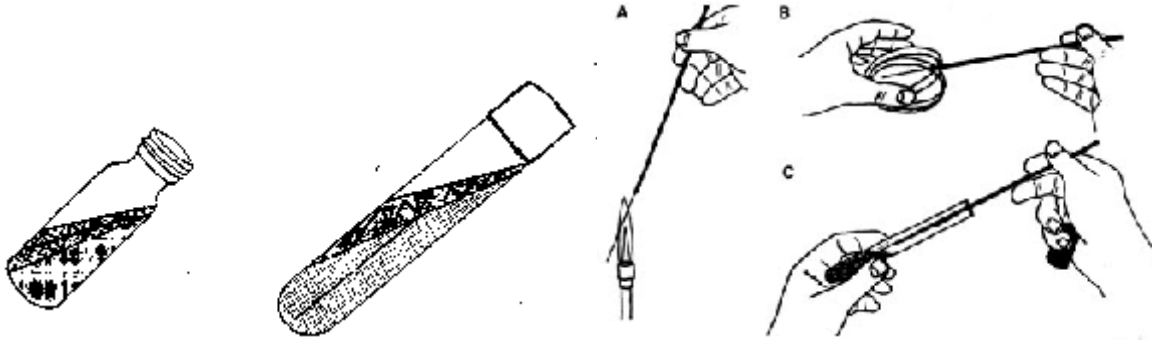
- قم بعمل معلق بكتيري في وسط سائل ، ثم صب مقدار 1 مل من المعلق البكتيري إلى طبق بتري معقم . تأكد من تعقيم فوهة الأنبوبة قبل عملية الصب .
- قم بصب كمية 20 – 10 مل من وسط الآجار المغذي Nutrient agar ، والمحفوظ عند 50 – 45 درجة مئوية ، إلى طبق بتري .
- أخلط مكونات طبق بتري وذلك بتحريكه للأمام والخلف ومع اتجاه و عكس عقارب الساعة .
- يترك الطبق حتى يتصلب الآجار ، ثم يحضن بشكل مقلوب عند درجة حرارة 37 لمدة 48 ساعة .
- الكائنات الحية ستنمو كمستعمرات فردية في الوسط الصلب .



- **تلقيح الأوساط المائلة Inoculation of slant agar :**

وهذه تتم باستخدام سلك اللقاح المستقيم لعمل وخز في وسط الوسط الزراعي في الأنبوبة ثم بعد ذلك يخطط على سطح الوسط المائل بطريقة Zig-Zag .

- بعد إزالة الغطاء تعقم فوهة الأنبوبة باللهب ، ثم تحمل الأنبوبة بشكل مائل وليس بشكل عمودي بجوار اللهب .
- بواسطة سلك اللقاح المستقيم يعمل وخز سريع في وسط الأنبوبة ويخطط على سطح الوسط المائل بطريقة Zig-Zag .
- تعقم فوهة الأنبوبة قبل إرجاع الغطاء ثم تغطى بعد ذلك .
- تعقم إبرة التلقيح بعد الاستخدام لقتل أي كائنات حية باقية .



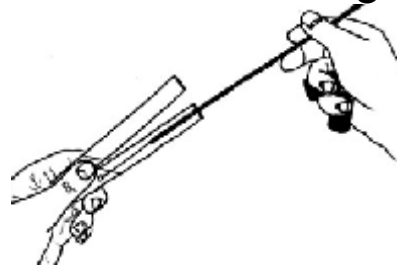
- **تلقيح الأوساط العميقة Inoculation of deep media :**

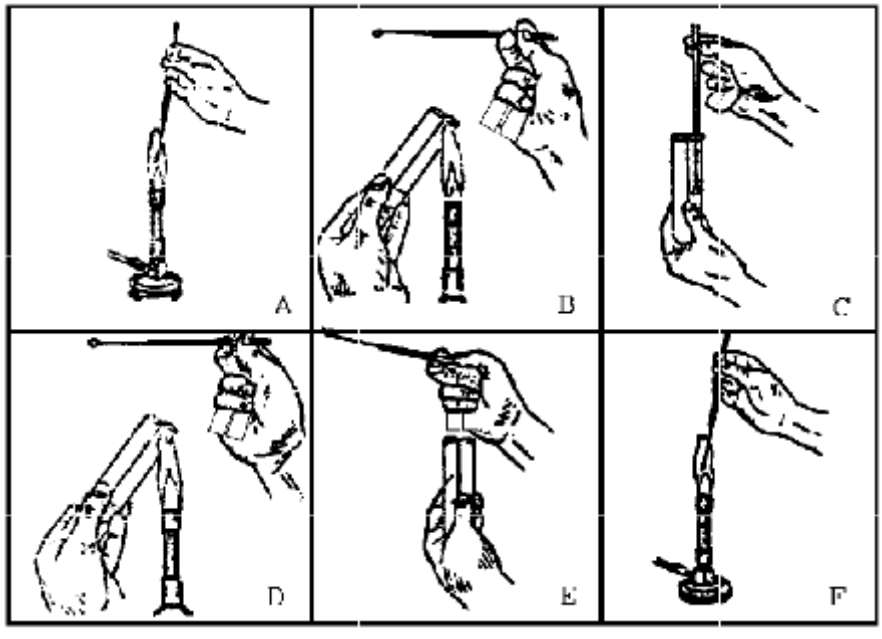
كما في عملية تلقيح الأوساط المائلة . باستخدام سلك اللقاح المستقيم ، يعمل وخز سريع في وسط الأنبوبة من دون التخطيط على السطح .

- **تلقيح الأوساط السائلة Inoculation of fluid media :**

وهذه تتم بواسطة سلك اللقاح ذو الحلقة Wire loop حيث أن قطره واحدة من السائل كافية لنقل الملايين من البكتريا من وسط إلى آخر أو من العينة إلى الوسط .

- يفتح الدورق أو الأنبوبة الحاوية على الوسط السائل وتعقم فوهة الدورق أو الأنبوبة بإمرارها على اللهب .
- يحمل الدورق أو الأنبوبة بجانب اللهب و بشكل مائل ، ثم يدخل **سلك اللقاح** الحاوي على اللقاح البكتيري إلى داخل الوسط السائل ثم يتم تحريكه بعناية لتحرير اللقاح البكتيري .
- في حالة استخدام الماصة يتم تحرير الحجم المطلوب من السائل إلى داخل الدورق أو الأنبوبة الحاوية على الوسط الزرعي ، ثم ترج بعد ذلك .
- تعقم فوهة الأنبوبة ثم تغطى وتحضن .





- **تعليم الأوساط الملقحة Labeling of inoculated media :**

تعلم بكتابة التأريخ واسم المريض ونوع العينة على قاعة الطبق لا تعلم على غطاء الطبق .

- **تحضين الأطباق الزراعية Incubation of culture media :**

الأوساط الملقحة يجب أن تحضن **بأسرع وقت ممكن** ، إي تأخير في عملية التحضين قد يؤثر على حيوية بعض الأنواع البكتيرية و بشكل خاص البكتيريا اللاهوائية Anaerobic bacteria ، Meningococci **و** Gonococci **و** *H.influenzae* . كما أن التأخير قد يزيد من احتمالية تلوث الأطباق بسبب الحشرات أو الغبار . كما أن الأوساط الملقحة و الغير الملقحة يجب أن تحمى من أشعة الشمس المباشرة .

يجب تحضين البكتيريا في درجة حرارة مناسبة ، كما أن بعضها يحتاج إلى الرطوبة ، و أيضا احتياجات غازية **خاصة مثل توفر** CO_2 **أو** O_2 أو غياب الأوكسجين .

- **درجة حرارة التحضين Temperature of incubation :**

معظم البكتيريا المرضية تنمو في درجة حرارة $35 – 37\ C^{\circ}$ والمفضلة هي $37\ C^{\circ}$.

- **الرطوبة Humidity :**

الجو الجاف ممكن أن يؤثر على حيوية بعض البكتيريا المرضية مثل Gonococci **والتي تقتل بسرعة في الجو الجاف** .

وضع ورقة ترشيح مبللة (رطبة) في قاع Candle jar كافية لجعل الوسط المحيط **رطبا** .

- **الاحتياجات الغازية Gaseous requirement :**

تم شرحها سابقا في درس الأوساط الزراعية .

- **زراعة البكتيريا اللاهوائية Culture of anaerobic bacteria :**

الجو اللاهوائي يكون أساسيا لزراعة البكتيريا اللاهوائية مثل Clostridium **و** Bacteroides **وكذلك** الأنواع اللاهوائية للبكتيريا السبحية Anaerobic Streptococci .

كما أن التحضين اللاهوائي يساعد في عملية التفريق وانتقاء البكتيريا اللاهوائية من بين بقية الأنواع البكتيرية (اللاهوائية) .

هناك العديد من التقنيات تستخدم للحصول على ظرف هوائية منها :

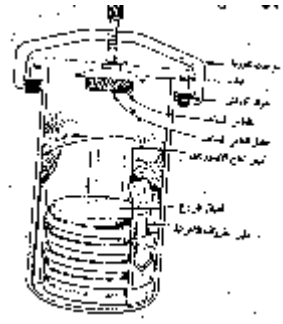
1. Oxygen – removing system .
2. Copper coated steel .
3. Use of reducing agents in culture media .

- **Oxygen – removing system :**

وهي عبارة من أنظمة منتجة تجاريا تعمل على أنتاج ظروف لاهوائية باستخدام مواد كيميائية تعمل على امتصاص الأوكسجين مثل :

1. Anaerocult system .
2. AnaeroGen system .

أيضا هناك أكياس Sachets منتجة تجاريا تحتوي أيضا على مواد تعمل على إزالة الأوكسجين .



- **Copper coated steel :**

وهي من أبسط الطرق لإزالة الأوكسجين ، وتستخدم عندما لا تتوفر الأجهزة الخاصة بإزالة الأوكسجين .
وتتم هذه الطريقة بواسطة تحضين الأطباق في حقيبة بلاستيكية محكمة الإغلاق ، حاوية على معدن من الحديد تم تنشيطه مسبقا بواسطة وضعة في محلول كبريتات النحاس Copper sulphates ، النحاس سوف يعمل على امتصاص الأوكسجين .

- **Use of reducing agents in culture media :**

عبارة عن أوساط حاوية على مواد مختزلة مثل :

- Thioglycollate broth : الذي يحتوي على مادة Sodium thioglycollate والدليل Methylene blue أو Resazurin للتأكد من حالة الوسط (الدليل Resazurin يفضل على الدليل Methylene blue ، ويكون عديم اللون في الوسط المختزل إي في غياب الأوكسجين ويتحول إلى اللون الوردي Pink في الوسط المؤكسد إي في وجود الأوكسجين .
- Cooked meat medium : والذي يستخدم لزراعة Clostridium .

أيضا هناك طريقة سهلة لمنح ظروف لاهوائية في وسط Litmus milk أو Peptone water وذلك بلستخدام صفائح صغيرة من الحديد (25 × 3 mm) ، يعقم الحديد بالتسخين ويوضع في الوسط وهو ساخن ، وعندما يبرد الوسط يلقح بالبكتيريا .

- **الزراعة في ثاني أكسيد الكربون Culturing in carbon dioxide :**

الجو الغني بثاني أكسيد الكربون CO_2 يستخدم لزراعة *N.gonorrhoeae* ، *N.meningitidis* ، *Brucella spp* و *S.pneumoniae* .
هناك طريقتين لإنتاج CO_2 :

1. Candle jar .
2. From chemicals .

- **Candle jar :**

الطريقة الأسهل والأرخص لإنتاج غاز CO_2 هي وضع الأطباق الملقحة بالبكتيريا في وعاء Jar محكم الإغلاق وبداخلة شمعة مشتعلة ، مع استمرار اشتعال الشمعة فإن كمية الأوكسجين تقل مع الاستمرار في توليد غاز CO_2 .
تقدر نسبة غاز CO_2 المنتجة حتى انطفاء الشمعة 3-5% .
لزراعة Neisseria توضع ورقة ترشيح مبللة في قاع الوعاء لإنتاج رطوبة في الجو المحيط .

- **From chemicals :**

يتم إنتاج غاز CO_2 باستخدام مواد كيميائية في وعاء بواسطة تفاعل بيكربونات الصوديوم Sodium bicarbonate مع حامض الطرطريك Tartaric acid أو حامض الستريك Citric acid .

الطريقة :

للحصول على 10% من غاز CO_2 في أناء ذات سعة 3 لتر ، يخلط 0.7 جرام من بيكربونات الصوديوم Sodium bicarbonate مع 1.7 جرام حامض الطرطريك Tartaric acid (أو 2.4 جرام من حامض الستريك Citric acid) . قبل إغلاق الإناء ترطب هذه المواد بقليل من الماء .

- **الحفاظ على المزارع البكتيرية Preserving Bacterial Cultures :**

البكتيريا يمكن أن تبقي لفترات طويلة من الوقت وذلك باستخدام التجميد أو التجفيف lyophilization (تجفيف بالتجميد) أو استخدام غاز النتروجين السائل .

- **الزرع الثانوي Subculture from solid media to solid media :**

يتم ذلك بواسطة استخدام سلك لقاح Wire loop معقم ، نلامس المستعمرة المرغوب في زراعتها ، ثم ننتقل إلي وسط صلب أخر مناسب . ثم يخطط في الوسط الصلب بواسطة إحدى تقنيات التخطيط السابق ذكرها .