

## أ/الطرق العامة لعزل وانتخاب الميكروبات من مصادرها الطبيعية

١- عزل مزارع نقية بطريقة الزراعة في أطباق مخطوطة Streak plating

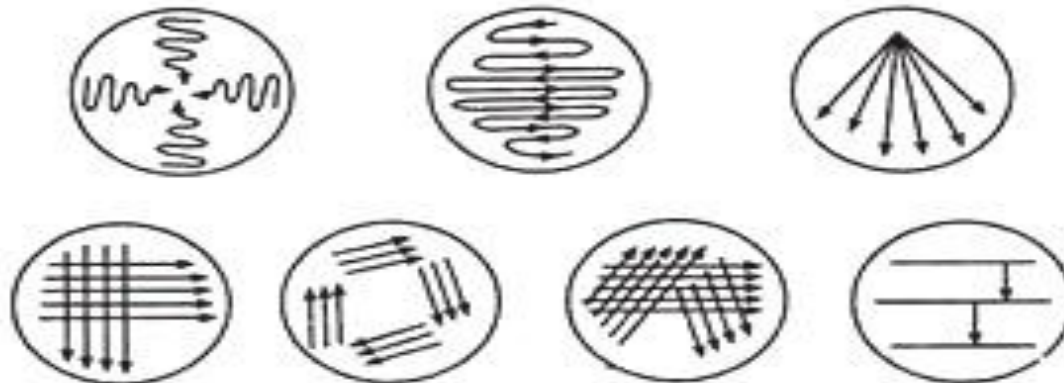
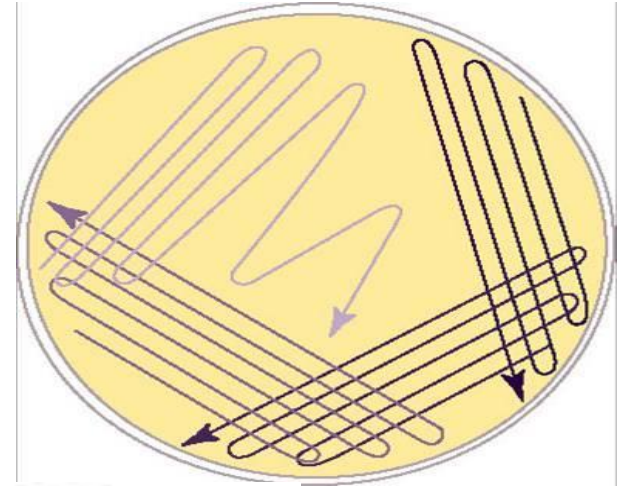
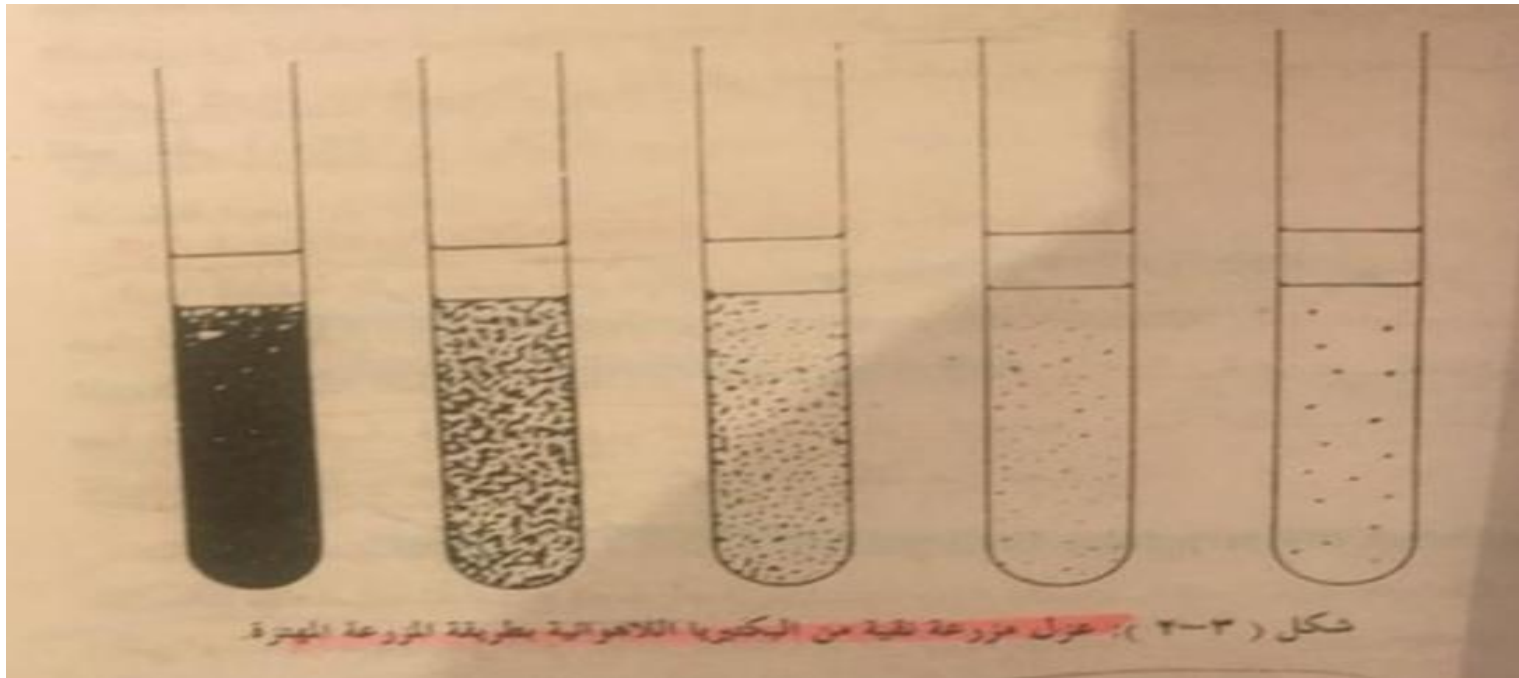


FIG. 16.13. Various methods of streaking.



## ٢- المزرعة المهتزة shaken culture



### ٢-٣-٢. عزل مزارع نقية بطريقة المزرعة المهتزة:

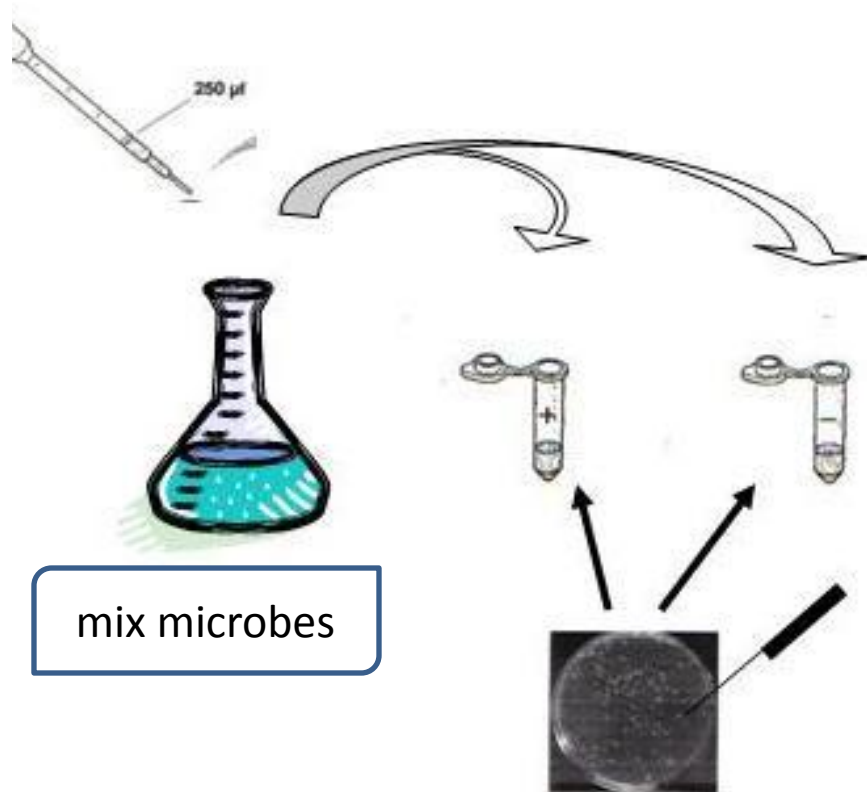
في حالة الميكروبات الأكثر حساسية للأكسجين فإنه من الأفضل استخدام طريقة المزرعة المهتزة بدلاً من الأطباق المصبوبة. وفي هذه الطريقة تحضر أنبوبة بها بيئة أجار منصهرة ومبردة وتلقح وترج ثم ينقل ١٠/١ من محتوياتها إلى أنبوبة أخرى محتوية على نفس البيئة ثم ترج وتستخدم في تلقيح بيئة أخرى بنفس الطريقة السابقة. وبعد تحضير ٦-١٠ تخفيفات متوالية تبرد الأنابيب بسرعة وتغلق جيداً بصب طبقة من البرافين المعقم (١ جزء من البرافين الصلب + ٣ جزء من البرافين السائل) على السطح. عندما تكون البيئة المستخدمة محتوية على عامل مختزل مثل

٠.٠٥ - ٠.٢ % وزن/حجم  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  فإنه من الممكن الاستغناء عن غطاء البرافين وتغلق الأنابيب بسدادة من المطاط. وفي هذه الحالة يزال الأكسجين الموجود في الأنبوبة بأكسدة المادة المختزلة في طبقات الأجار العليا (٠.٥ - ٢ سم).

وبعد التحضين لفترة معينة تتكون المستعمرات في المزرعة المهتزة على امتداد عمق عمود الأجار كما في شكل (٢-٣) ولذلك فإنه ليس من السهل نقل مستعمرات فردية. ولنقل مستعمرات فردية يزال غطاء البرافين باستخدام إبرة معقمة. يستخرج عمود الأجار برفق من الأنبوبة بإمرار غاز خالي من الأكسجين خلال ماصة شعرية يتم إدخالها بين جدار الأنبوبة والأجار، ثم يوضع عمود الأجار في طبق بترى معقم. يقطع عمود الأجار إلى أقراص باستخدام سكين معقم وبذلك يمكن الحصول على أقراص من الأجار محتوية على مستعمرات منفردة. ويجب أن لا تعتبر هذه المستعمرات مزارع نقية حتى إذا تم الحصول عليها في صورة فردية، ولا بد من عمل تخفيفات على الأقل مرة أخرى من كل مستعمرة فردية تم الحصول عليها بالطريقة السابقة حيث يتم تخطيطها على طبق آخر أو يتم عمل سلسلة من المزارع.



### ٣- عزل خلية فردية single-cell isolation





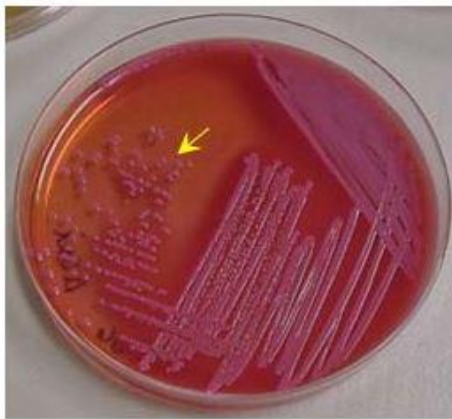
### ٢-٢-٢. عزل خلية فردية:

عزل خلية فردية من خليط من الميكروبات باستخدام الميكروسكوب تعتبر البديل الوحيد عندما تكون طريقة العزل بالأطباق أو بالمزرعة المهتزة غير مناسبة. وتتوقف الطريقة التي تستخدم في التقاط خلية فردية على حجم الخلايا. ففي حالة الميكروبات ذات الخلايا كبيرة الحجم مثل البروتوزوا والطحالب وحيدة الخلية يتم ذلك يدوياً باستخدام ماصة شعرية دقيقة حيث تلتقط خلية فردية عند تكبير منخفض نسبياً بالميكروسكوب الضوئي. بعد ذلك تنقل هذه الخلية إلى حجم من البيئة المعقمة لصلها وإزالة التلوث بالميكروبات الأصغر حجماً.

ولكن طريقة الماصة الشعرية هذه لا يمكن استخدامها إذا كانت خلايا الميكروب المراد عزله صغيرة إلى حد يصعب رؤيتها عند تكبير ١٠٠ مرة أو أقل، حيث أنه في مثل هذه الحالات يلزم زيادة التكبير. إلا أنه عند التكبير العالي يصعب التحكم الدقيق في الماصة الشعرية وإجراء هذه العملية بدقة. ولذلك فإنه يجب استخدام أداة ميكانيكية تسمى Micromanipulator متصلة بأدوات زجاجية دقيقة. والغرض الأساسي من استخدام الـ Micromanipulator هو دقة التحكم، حيث أن حركة دقيقة وصغيرة لأدوات التشغيل يمكن أن تؤثر في مساحة صغيرة تحت الميكروسكوب عند تكبير عالي (٥٠٠-١٠٠٠ مرة).



## ٤- استخدام البيئات الانتخائية Selective media



*Escherichia coli*



*Salmonella*



*Shigella*

### ٢-٣-٤. استخدام البيئات الانتخائية Selective media :

البيئة الغذائية التي تناسب نمو ميكروب معين دون غيره تعرف بالبيئة الانتخائية، حيث أنه عند تلقيح مثل هذه البيئات بخليط من الميكروبات المختلفة، يتمو الميكروب الذي تناسبه البيئة فقط بينما يثبط نمو باقي الميكروبات. ولهذا فإنه إذا استخدمت بيئة انتخائية خاصة، فإن الميكروب المرغوب يمكن عزله من بيئته الطبيعية مثل التربة التي تحتوى على عديد من الأنواع المختلفة من الميكروبات.

هناك العديد من المواد المثبطة للنمو والتي تدخل في تركيب البيئات الانتخائية. مثال على ذلك استخدام أملاح الصفراء في بيئات زرع بكتيريا *Escherichia coli* والتي لها تأثير مثبط على نمو البكتيريا شديدة القرابة منها مثل *Enterobacter aerogenes*. وتتنوع البكتيريا تنوعاً كبيراً في حساسيتها للبنسلين فقد وجد أن استخدام البنسلين بتركيز منخفض يمنع نمو البكتيريا الحساسة له في خليط من الميكروبات، أما في التركيزات العالية فيكون البنسلين سام بصفة عامة للكائنات غير حقيقية النواة وغير سام للكائنات حقيقية النواة. ولذلك فإنه يستخدم لتنقية البروتوزوا و الفطريات و الطحالب حقيقية النواة الملوثة بالبكتيريا. وعلى العكس فإن المضاد الحيوى Nystatin يكون عادة سام للكائنات حقيقية النواة وغير سام للكائنات غير حقيقية النواة. ولذلك يضاف الـ Nystatin إلى البيئة لتنقية البكتيريا الملوثة بالفطريات و الأميبا.



## ب/ تنقية المزارع Purification of microbial cultures.





# ج/ حفظ المزارع Maintenance and transport of cultures



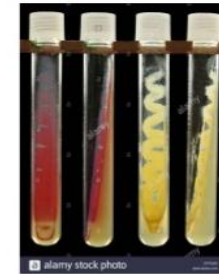
Lyophilisation or Freeze- drying

الحفظ باستخدام التجفيد



Agar Slant Culture

الحفظ باستخدام الآجار المائل



Paraffin Method/ Preservation by Overlaying Cultures with Mineral Oil

الحفظ باستخدام الزيت المعدني



**الحفظ باستخدام النيتروجين السائل Liquid nitroge**



**الحفظ باستخدام التربة المعقمة Sterilized soi**

