---- مجلة علوم الرافدين، المجلد 19، العدد 1، ص94-100، 2008 ----

دراسة حول استخدام مستخلص نبات الجت في تحضير وسط زرعي لتنمية الأحياء المجهرية

محسن أيوب عيسى
قسم علوم الحياة
كلية العلوم
جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2002/8/19، تاريخ القبول 2002/9/15)

الملخص

درس في هذا البحث إمكانية استخدام مستخلص نبات الجت (Alfalfa) *Medicago sativa* في تحضير وسط زرعي لتنمية الأحياء المجهرية حيث أشارت النتائج أن مستخلص النبات الرطب هو أكثر كفاءة من الحالة الجافة، وان الوسط المحضر منه كان ملائماً لنمو أنواع مختلفة من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام وكان أفضل نمو هو في حالة البكتريا *Staphylococcus aureus* وان جميع أنواع البكتريا المستخدمة كان نموها أفضل على الوسط المحلي مقارنة بوسط الاكار المغذي المستخدم لغرض المقارنة ووجد ان الوزن 60غرام/ لتر من الجت الرطب هو الأفضل لتحضير هذا الوسط.

Study About the Use of (Alfalfa) *Medicago sativa* Extract in Preparing of Culture Media for Microorganism Growing

Muhsin A. Essa
Department of Biology
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

In this work the ability of (Alfalfa) *Medicago sativa* extract in preparing of culture for microorganism growing was estimated, results shows that the wet plant extract was most efficient than dried plant and the (Alfalfa) medium was suitable for growing the different type of gram negative and positive bacteria. *Staphylococcus aureus* shows best growing, the growth of all types of bacteria was best at local medium in comparison with foreign medium (Nutrient agar) and it was found that the weight 60g/L of wet plant was suitable in medium preparation.

المقدمة

تعد الأوساط الزرعية المخصصة لتنمية الأحياء المجهرية مهمة في مجال عزل وتشخيص ودراسة هذه الأحياء وان التطورات التي طرأت عليها كان لها دوماً انعكاسات واضحة في تطور علم الأحياء المجهرية بصورة عامة (Difco Mannal, 1977) ومنذ بدايات الاهتمام بهذه الأوساط في النصف الثاني من القرن التاسع عشر كان ولا زال يعمل الباحثون على ابتكار أنواع جديدة وتحوير القديم منها لدعم مستوى كفاءتها سواء كانت أوساط معتمدة على مواد طبيعية أو تركيبية (صناعية) أو نصف تركيبية (Cruickshanlc, 1975; Pirt, 1975). وحديثاً تستخدم بعض هذه الأوساط كأساس لبعض الأنظمة المعدة أوتوماتيكيا بشكل كامل أو جزئي والمستخدمة للتحري بصورة غير مباشرة من المايكروبات المختلفة حيث تستخدم النظائر المشعة وإنتاج الغازات مثل O_2, CO_2 وغيرها والتي يتم تحسسها بطريقة أوتوماتيكية لغرض بيان حصول النمو من عدمه (Elmer et al., 1997).

وللأهمية المذكورة آنفا في مجال الأوساط الزرعية وحاجة قطرنا إليها في المرحلة الحالية بسبب الحصار الاقتصادي والعلمي الجائر المفروض عليه فقد صممت عدد من البحوث لتحضير أوساط زرعية عامة (صبحي ومحسن، 1997) وأخرى لتحضير أوساط زرعية متخصصة من مستخلصات نباتية وحيوانية في تنمية أنواع جرثومية محددة بعضها ذات متطلبات غذائية حساسة (صبحي وجماعته، 2000 ؛ صبحي ومحسن، 1999 ؛ الحسو، 1999) وقد روعي عند تحضير هذه الأوساط وغيرها أن تكون كفوءة ومن مكونات رخيصة وفي متناول اليد، ولعل تحضير الأوساط التي تستخدم لأغراض عامة (أوساط أساسية Basic Media) أهمية خاصة ذلك إنها قد تستخدم في تنمية أنواع مختلفة في البكتريا في آن واحد فضلاً عن إمكانية استخدام مثل هذه الأوساط (من خلال بعض الإضافات) في تحضير أوساط انتخابية وتفريقية متخصصة (Difco Mannal, 1977).

من هذا المنطلق تطورت فكرة البحث في إمكانية استخدام نبات الجت كأساس في تحضير وسط زرعي لتنمية الأحياء المجهرية حيث يعد هذا النبات ذات محتوى غذائي جيد ويزرع في قطرنا بصورة واسعة لاستخدامه كعلف حيواني اخضر وهو متوفر تقريباً على مدار السنة (الأنصاري، 1982) وتقدر المساحة المزروعة منه في العراق بحوالي 80 ألف دونم وان معدل إنتاج الدونم الواحد في عموم القطر يقدر بحوالي (15 – 12) طن للدونم سنوياً (صفر، 1985)، حيث درست كفاءة استخدامه في حالته الجافة والرطبة كما قورن النمو فيه مع احد الأوساط الأساسية المستخدمة في تنمية الأحياء المجهرية.

المواد المستعملة وطريقة العمل

1- المواد

أ ـ النبات :

الاسم العامي للجت Common Alfalfa

الاسم العلمي *Medicago sativa*

ينتمي الجت إلى العائلة البقولية والجنس Medicago وهو نبات معمر ينمو إلى ارتفاع 50 – 100سم يتفرع الساق من أسفل إلى عدة فروع تتراوح بين 5 – 20 فرعاً توجد عليها الأوراق بغزارة ويمكن للنبات ان يبقى في الأرض عدد السنين يتراوح بين 5 – 7 سنة في المعتاد (1985، صفر).

وتم الحصول على النبات المستخدم في تجارب هذا البحث من مزارع محافظة نينوى حيث استعمل الجزء الذي يحتوي على الساق والأوراق المرتبطة به في تحضير الوسط الزرعي.

ب- أنواع البكتريا المستخدمة:

استخدم في هذا البحث تسعة أنواع من البكتريا المرضية بعضها يعود لمجموعة البكتريا السالبة لصبغة كرام *Salmonella typhi, Esherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris, Klebsiella pneumonia* وأخرى تابعة لمجموعة البكتريا الموجبة لصبغة كرام *Staphylococcus aureus, Streptococcus viridans Bacillus cereus, Micrococcuc sp*. وجميع هذه البكتريا معزولة ومشخصة في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل.

جـ- الأوساط الزرعية:

- وسط المرق المغذي Nutrient broth (OXOID) لتنمية المزارع السائلة للبكتريا المستخدمة.
- وسط الاكار المغذي Nutrient agar (OXOID) لأجل مقارنة النمو فيه مع الوسط المحلي.
- الوسط المحلي: الذي حضر كما يلي واستناداً إلى (صبحي ومحسن، 1997).

* في الحالة الطرية للنبات اخذ الجزء العلوي الخضري الحاوي على اكبر كمية من الأوراق ووزن 60غم (وجد عملياً خلال البحث ان هذا الوزن هو الأفضل بين أربعة أوزان هي 80، 60، 40، 20/غم) منه ثم فرمت وقطعت بصورة جيدة ووضعت في بيكر زجاجي سعة 1 لتر وأضيف لها حوالي 500سم^3 ماء مقطر (أو ماء حنفية مبيت) غلي على النار لمدة (5) دقائق رشح بعد ذلك باستخدام قطع من الشاش ثم كمل الحجم إلى 1 لتر وأضيف له 18غم من مادة الاكار لغرض التصليب ثم ضبط الرقم الهيدروجيني للوسط على 7.2 وعقم بالموصدة بدرجة حرارة 121م لمدة 15 دقيقة.

* اما الحالة الجافة للنبات فان الوزن الطري (60غم) وضع في الفرن بدرجة 50م لمدة 24 ساعة لغرض التجفيف ثم سحقت على مسحوق ناعم وضع في بيكر. سعة 1 لتر وأعيدت عليه جميع الخطوات المذكورة آنفا بالنسبة للحالة الطرية للنبات.

2- العمل :

أ- طريقة التخطيط على الأطباق Streaking:

استخدمت المزارع السائلة بعمر 24 ساعة لأنواع البكتريا المستعملة في تلقيح نوعي الوسط الصلب المحضر من الحالة الطرية والجافة للنبات وبطريقة التخطيط على الاكار لأجل مقارنة النمو فيها وحضنت الأطباق بدرجة 37م لمدة 24 ساعة وثبت بعدها كثافة النمو الملاحظة.

ب- استخدمت طريقة تقدير العدد الحي للخلايا Viable plate count لمقارنة النمو على كل من الوسط المحلي الصلب ووسط الاكار المغذي المستورد حيث أخذت المزارع البكتيرية السائلة التي بعمر 24 ساعة وثبت عدد البكتريا الأولى قبل الإضافة باستخدام طريقة الشريحة ذات الحجر Chamber slid بعدها استخدمت ماصة دقيقة لنقل واحد ملليتر من كل مزرعة وعملت تخافيف عشرية لغاية التجفيف (10 – 8) ثم وزع مكررين من التخافيف الثلاثة الأخيرة لكل وسط مستعمل وحضنت الأطباق بدرجة 37م لمدة 24 ساعة وحسب العدد الحي للخلايا باعتماد المستعمرات النامية على هذه الأوساط.

النتائج والمناقشة

من خلال ملاحظة الجدول (1) الذي يبين كثافة نمو أنواع البكتريا المستخدمة على وسط مستخلص الجت الصلب نجد أن معظم هذه الأنواع البكتيرية قد نمت في كلا الحالتين ولكن نموها كان أفضل في الحالة الرطبة للجت، وحيث أن الوزن الأولي للجت المستخدم في تحضير المستخلص في كلتا الحالتين كان ثابتاً (60غم) فهذا يعني ان عملية التجفيف ربما أدت إلى فقدان هذا النبات بعض إمكانياته الغذائية المهمة لتغذية هذه المايكروبات وان الحرارة (خصوصاً الجافة) عادة ما تؤدي الى مثل هذا التأثير على العناصر الأساسية لنمو الكائن المجهري خاصة فيما يتعلق بالمحتوى البروتيني والفيتامينات (السعد، 1982)، ومن بين التسعة أنواع من البكتريا المستخدمة لم تظهر كل من بكتريا *Micrococcuc sp., E. coli* فرقاً واضحاً في هذا المجال ربما لعدم تأثر احتياجاتها الغذائية الأساسية بعملية التجفيف.

الجدول 1 : مقارنة كثافة نمو الأنواع البكتيرية المستخدمة على الوسط المحضر من مـستخلص الجـت الرطب والجاف.

نوع البكتريا	كثافة النمو على الوسط المحضر من مستخلص الجت	
	الرطب	الجاف
Staphylococcus aureus	+++	++
Bacillus cereus	++	+
Streptococcus viridans	++	+
Micrococcus sp.	+	+
Eschrichia coli	++	++
Salmonella typhi	++	+
Proteus vulgaris	+++	+
Klebsiella pneumonia	+++	++
Pseudomonas aeruginosa	++	+

ويوضح الجدول (2) نمو الأنواع السالبة والموجبة لصبغة كرام النامية على وسط مستخلص الجت مقارنة بوسط الاكار المغذي المستورد حيث يلاحظ أن جميع هذه الأنواع البكتيرية قد نمت بشكل أفضل في الوسط المحلي مقارنة بالوسط الأجنبي الأمر الذي يعكس احتواء مستخلص الجت المحضر على إمكانيات ملائمة بشكل واضح لنمو هذه الأنواع من البكتريا المرضية سواء السالبة منها أو الموجبة لصبغة كرام والمعروفة في تباين احتياجاتها الغذائية (Cruickshank and Elmer, 1998; 1975). كما أن نتائج البحث تشير إلى أن طريقة الاستخلاص وتحضير هذا الوسط كانت ملائمة بحيث لم يظهر أي تأثير مضاد لنمو الأنواع البكتيرية الموجبة لصبغة كرام بشكل خاص والذي ربما يكون موجوداً ضمن مركبات هذا النبات (Batista and Duotre, 1999) وتجدر الإشارة إلى أن المستخلص المحضر من الجت لتحضير الوسط غير مدعم بأي مادة إضافية الى تركيبه لتشجيع نمو البكتريا، حيث تشير المراجع الى ان للجت محتوى جيد من المواد البروتينية والكاربوهيدراتية والفيتامينات فضلاً عن العناصر الأساسية والأثرية المهمة للتغذية والنمو. (صفر، 1985؛ الأنصاري، 1982؛ رضوان والفخري، 1976).

بالرجوع للجدول (2) يلاحظ من بين أنواع البكتريا الموجبة لصبغة كرام ان بكتريا *Staph. aureus* كانت الأفضل في نموها على الوسط المحلي بل يتعدى ذلك إلى كونها الأفضل مقارنة بالأنواع السالبة لصبغة كرام أيضا، وهذا يعني أن هذه البكتريا المرضية المهمة قد استطاعت الاستفادة بشكل كبير من إمكانيات هذا الوسط مقارنة بالأنواع الأخرى، تلتها في كفاءة النمو الأنواع السالبة لصبغة كرام التي كانت متقاربة في نموها باستثناء بكتريا *Sal. typhi* التي كانت أفضل في نموها تلتها *Pr. vulgaris* ثم *K. pneumonia* ثم *E. coli* و*Ps. aeruginasa* وقد كانت بقية الأنواع البكتيرية

الموجبة *B. cereus, Str. viridans* على التوالي اقل نمواً وان اضعف نمو لوحظ من بين جميع الأنواع البكتيرية المستخدمة كان في حالة البكتريا *Micrococcus sp.* إن هذا التباين في قابلية النمو على الوسط المحلي المحضر يعكس اختلاف هذه الأنواع من البكتريا في إمكانياتها الفسلجية والتغذوية التي تحدد في النهاية مدى إمكانية كل نوع منها على الاستفادة من مكونات الوسط وبالتالي قدرتها على النمو (السعد، 1982 ؛ Cruickshank,1975)، حيث يلاحظ هذا التباين كذلك في حالة وسط الاكار المغذي المستورد.

الجدول 2 : مقارنة الأعداد الحية للبكتيريا المستخدمة والنامية على كل مـن الوسـط المحلـي ووسـط الاكار المغذي.

نوع البكتريا	معدل العدد الحي للبكتيريا/ سم^3	
	الوسط المحلي	الوسط الأجنبي
أ. الأنواع الموجبة لصبغة كرام		
Staphylococcus aureus	136×10^9	24×10^9
Bacillus cereus	3.2×10^9	0.5×10^9
Streptococcus viridans	6.5×10^9	4.3×10^9
Micrococcus sp.	0.84×10^9	0.76×10^9
ب. الأنواع السالبة لصبغة كرام		
Eschrichia coli	12.8×10^9	6.56×10^9
Salmonella typhi	33×10^9	7.5×10^9
Proteus vulgaris	16×10^9	6.9×10^9
Klebsiella pneumonia	15.6×10^9	7.2×10^9
Pseudomonas aeruginosa	11×10^9	6.98×10^9

وإذا ما أخذنا بنظر الاعتبار أن نبات الجت الذي يزرع تقريباً في كل أنحاء القطر ومتوفر على مدار السنة فضلاً عن رخص ثمنه ومحتواه الغذائي الجيد وقابلية مستخلصة على تنمية أنواع مختلفة من البكتريا (الكفاءة) مقارنة بوسط أساسي مهم هو الاكار المغذي فهذه كلها تعد مواصفات مثالية لوسط زرعي يستخدم لهذا الغرض فضلاً عن إمكانية تحويره بإضافة مواد معينة تجعله تفريقياً وانتخابياً لعزل وتشخيص أنواع بكتيرية محددة ومن المؤكد في ضوء نتائج هذا المستخلص الخام ان يعقب ذلك دراسات قد تكون أكثر تفصيلاً لجعل الوسط المحضر منه في أعلى مستوى لكفاءته.

المصادر العربية

الأنصاري، مجيد محسن. إنتاج المحاصيل الحقلية. دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.

الحسو، محمود زكي، 1999. عزل وتشخيص جرثومة *Kl. pneumonia* ودراسة بعض صفاتها الامراضية والزرعية. أطروحة ماجستير، جامعة الموصل، العراق.

السعد، مها رؤوف، 1982. مبادئ فسلجة الأحياء المجهرية. دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.

رضوان، محمد السيد وعبد الله قاسم الفخري. محاصيل العلف والمراعي. الجزء الثاني، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.

صبحي حسي خلف، محسن أيوب وأسامة سعيد، 2000. استعمال أوراق البرتقال لتحضير وسط ماكونكي محلياً. مجلة علوم الرافدين، المجلد 32، العدد 4، ص61 – 55.

صبحي حسين خلف ومحسن أيوب عيس، 1997. استعمال أوراق البرتقال كوسط أساسي في تحضير الأوساط الزراعية لأنواع مختلفة من البكتريا. مجلة علوم الرافدين، المجلد8، العدد 2،ص11 – 6

صبحي حسين خلف ومحسن أيوب عيسى، 1999. دراسة حول وسط جديد لنمو البكتريا اللبنية Lactobacilli، مجلة علوم الرافدين، المجلد 31، العدد 1، ص 76 – 73.

صفر، ناصر حسين. محاصيل العلف والمراعي. دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة بغداد.

REFERENCES

Batista, O. and Duorte, J., 1999. Structure of Antimicrobial Activity of Diterpenes from Some Plants. J. Nature Product, Vol. 57, pp. 858 – 861.

Cruickshank, J.P., 1975. Medical Microbiology. 12th Ed. Vol. 2, Published by Churchill Livingstone. Edenbrugh London and New York.

Difco Manual of Dehyrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures, 1999. 9th. Ed., Published by Difco Laboratories Inc., Detroit and Michigan.

Elmer, W.K., Sephen, D.A., William, M.J., Pual, C.S. and Washington, C.W., 1997. Diagnostic Microbiology 5th Ed. Published by Lippinctt – Raven.

Pirt, S.J., 1975. Principle of Microbe and Cell Cultivation. Blackwell Scientific Publication, Oxford, London.