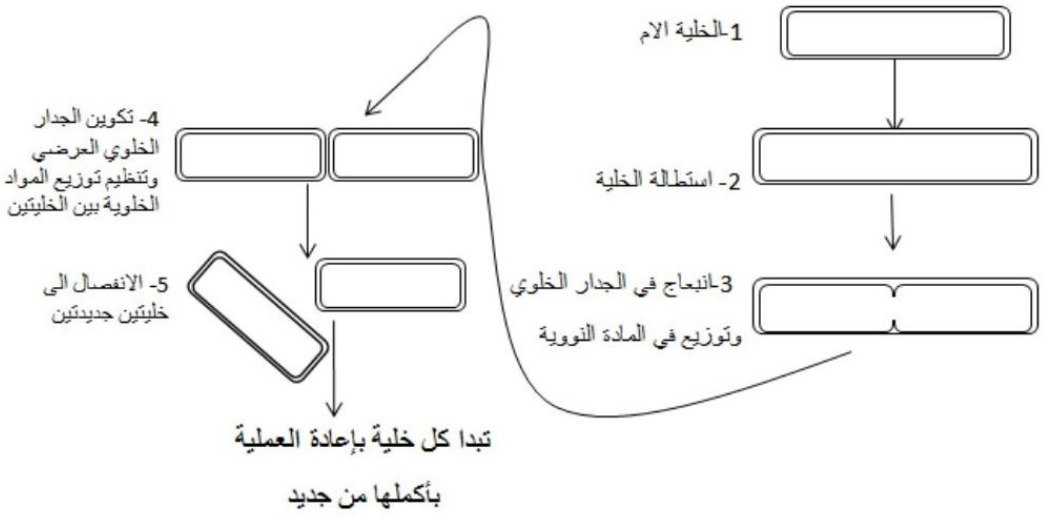
نمو البكتريا وتكاثرها Bacterial growth and population :

يمكن تعريف النمو في الكائنات الحية عموما بانه الزيادة الحاصلة في عموم المكونات الكيميائية للكائن الحي ، وان الزيادة في مجموع الكتلة لا تعني بالضرورة نمو الكائن الحي فهي قد تكون نتيجة تخليق وتجميع مادة تخزينية خلوية مثل النشا الحيواني دون أن يرافق هذه العملية تخليق المواد الحيوية الأساسية المتمثلة بالبروتينات والحوامض النووية ويحدث النمو عادة نتيجة الانقسام الخلوي وهذا يؤدي الى زيادة في حجم الكائن الحي المتعدد الخلايا اما في الأحياء وحيدة الخلية فانه يؤدي الى زيادة في عدد الأفراد .الانقسام الخلوي Cell Division: تتضاعف جميع الخلايا الخضرية Vegetative cell حيوانية كانت أم نباتية أو التي تمثل كائنا حيا بذاتها عن طريق الانقسام الخلوي غير الجنسي (الا ان هذا التقسيم لا يسري على الفيروسات) وينتج الانشطار عن انقسام الخلية الى خليتين او اكثر . وان كلا من هذه الخلايا المتولدة تستمر في الانشطار او الانقسام غير الجنسي الى ما لانهاية بشرط توافر الغذاء والطاقة اللازمين لديمومة النمو والتكاثر فضلا عن توفر الظروف البيئية المناسبة من الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة الى كمية الأوكسجين وتتكاثر معظم البكتريا عن طريق الانشطار الثنائي العرضي transverse binary fission وتشمل عدة مراحل :

١. استطالة الخلية cell elongation وتضاعف المادة النووية جزئيا .
٢. انبعاج في الجدار الخلوي وتوزيع المادة النووية .
٣. تكوين الجدار الخلوي العرضي وتنظيم توزيع المواد الخلوية بين الخليتين .
٤. تبدأ كل خلية بإعادة العملية بأكملها من جديد .



شكل يوضح تضاعف الخلية البكتيرية عن طريق الانشطار الثنائي

معدل النمو للمايكروبات أحادية الخلية ذات مدى واسع ومتباين ويكون قصير جدا عند توفر الظروف الملائمة للنمو ويمكن مشاهدة اعلى سرعة للتضاعف تصل الى عشرة دقائق) بكتريا E.coli تتضاعف كل ١٠ دقائق (وقد تصل إلى ٢٤ساعة للاحياء المجهرية او اكثر للابتدائيات بطيئة النمو Slow growing protozoa وبصورة

عامة فترة تضاعف الغالب من البكتريا يتراوح بين ٣٠-٦٠ دقيقة حيث يصل عدد البكتريا المتضاعف من خلية واحدة الى بليون خلال ٢٤ ساعة وهذا يفسر قدرة مشاهدة المزارع البكتيرية في الأوساط السائلة او الصلبة خلال فترة حضانة تتراوح بين ٢٤-٤٨ ساعة ان النمو في الأحياء المجهرية يحصل نتيجة الانقسام الخلوي الا انه في بعض الأحيان يحصل النمو دون الانشطار مثل بعض البكتريا العصوية التي لا تستطيع القيام بعملية الانشطار بسبب تاثير عوامل خارجية كثيرة ، فهي تحت هذه الظروف تعاني من استنساخ المادة النووية ونمو الجدار الخلوي والغشاء السايتوبلازمي والمحتويات الخلوية الا انها لا تنشطر وانما تطول وتنمو الى خيوط طويلة غير مجزئة اما العوامل المانعة للانشطار فهي كثيرة منها الصابون واملاح الصفراء والأشعة فوق البنفسجية وبعض المضادات الحيوية بالإضافة الى النقص في المواد المغذية او حدوث الطفرات . أن البكتريا تستطيع أن تتكاثر بطرق أخرى غير الأنشطار الثنائي العرضي ففي بعض الأنواع مثل رتبة الاكتينومايستات يحصل نمو خيطي يتبعه تجزؤ Fractionation هذه الخيوط الى وحدات صغيرة تنمو الى خلايا بالحجم الاعتيادي وهنالك أنواع أخرى مثل الأحياء التابعة الرتبة ال Hyphomicrobiales تتكاثر عن طريق التبرعم Budding حيث ينفصل البرعم من الخلية الأم بعد أن يصل الى حجم معين وينمو بعدها الى خلية كاملة.

قياس النمو البكتيريMeasurement of bacterial Growth

يتم حساب التجمعات البكتيرية بصورة كمية في الوسط السائل Fluid culture او بحساب المستعمرات البكتيرية في الوسط الصلب ويتم ذلك بحساب عدد الخلايا cell count ، كثافة الخلايا cell density ، او كتلة الخلايا cell mass

ويتم تعداد الخلايا بطريقتين رئيستين وهي:

1. العدد الكليtotal count
٢ -التعداد الحيviable count

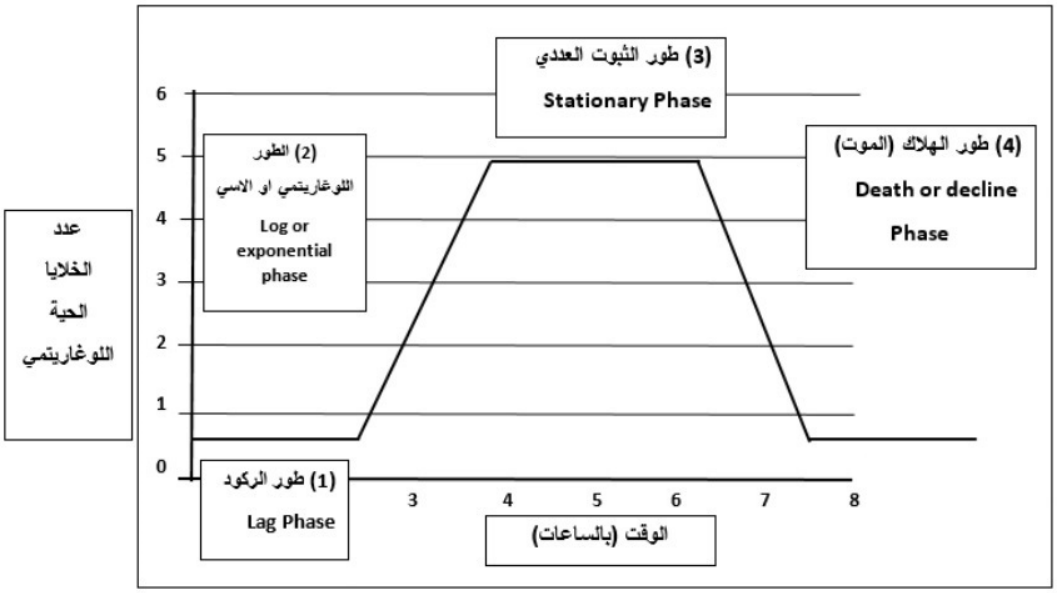
منحني النمو البكتيري Growth curve

مثال لحساب منحنى النمو البكتيري : نفترض أن لدينا مزرعة سائلة لبكتريا القولون Escherichia coli وقد وفرنا لها كل مستلزمات النمو من درجة حرارة ورقم هيدروجيني ومواد مغذية وغيرها ... عندها نتوقع أن خلايا هذه المزرعة ستنمو وتنقسم او تتضاعف بمعدل ثابت.

ويمكن الاستمرار في الحساب لمدة ٤ ساعة أن العدد الخلوي قد يصل الى عدة ملايين من الخلايا في الملتر الواحد (لهذا ترسم العلاقة على ورقة بيائية شبه لوغاريتمية.)

مراحل النمو البكتيري : منحنى النمو يحتوي على عدة أجزاء تبدا بمرحلة ابتدائية لا يظهر فيها أي نمو يتبعها مرحلة نمو سريعة ثم مرحلة توقف في النمو يليها تناقص في العدد الحي وهنالك مراحل انتقالية تتوسط المراحل الأربعة الرئيسية :

-



شكل يوضح منحنى النمو البكتيري Bacterial growth phases

١- طور الركود lag phase او الطور الكامن Latent phase:

هي الفترة التي تحتاجها خلية معسرة مزروعة في وسط غذائي طازج تحت ظروف بيئية مناسبة تبقى مؤقتا كما هي لا تتغير ولا تنقسم لمدة قد تطول أو تقصر اعتمادا على نوع البكتريا وهذا لا يعني أن الخلايا خاملة او ساكنه بل يزداد حجمها بشكل ملحوظ لتجمع الحامض النووي وتخليق الانزيمات والانزيمات المساعدة coenzyme وبكميات مناسبة لعمليات التمثيل الغذائي التي تحدث داخل الخلية

٢. الطور اللوغاريتمي Exponential or Logarithmic phase :

تقوم الخلايا في هذا الطور بالانشطار بصورة منتظمة وبمعدل ثابت وان الخط البياني الذي يربط لوغاريتم العدد البكتيري والوقت هو خط مستقيم والعلاقة بينها هي علاقة طردية .

مميزات الطور :

أ. تكون الخلايا خلال هذا الطور متساوية تقريبا من ناحية المكونات الكيميائية والفعاليات الأيضية والخصائص الأيضية الأخرى .

ب. عدد الخلايا الحية يتساوى مع العدد الكلي وذلك لان نسبة الخلايا الميتة تكون واطنة جدا وان الخلايا جميعها خلايا فتية نشطة .

ت. آن حجم الخلايا في هذا الطور يكون في حده الأدنى.

ث. الغشاء السايتوبلازمي او الجدار برق بشكل ملحوظ وان فعالية الخلية الأيضية تكون في أوج نشاطها.

ج. الخلايا في هذا الطور اكثر حساسية للمؤثرات البيئية الخارجية وللمضادات الحيوية.

ويدعى الوقت اللازم لإنشطار الخلية الواحدة الى خليتين اثنين بعمر او زمن الجيل Generation Time وهو ثابت بالنسبة للنوع البكتيري اذا ما ثبتت الظروف البيئية فاذا بدانا بخلية واحدة فستتضاعف خلال مدة معينة من الوقت الى خليتين ثم الى اربع خلايا لنفس المدة من الوقت وهكذا الى ثمانية ... ستة عشر ... وان المدة

الفاصلة بين كل انشطارين تبقى ثابتة

٣ –طور الثبوت والاستقرار: Stationary phase

يمثل ثبوت العدد البكتيري نتيجة التوقف التام للانشطار الخلوي أو ربما نتيجة التوازن بين معدل الانشطار ومعدل الموت للخلايا وذلك نتيجة قلة المواد المغذية ، تجمع المواد التالفة والسامة وتغير الأس الهيدروجيني.

.٤:– طور الموت: Decline or death phase

في هذا الطور يتغلب معدل موت الخلايا على معدل انشطارها ويكون موت الخلايا لوغاريتميا اي ان الخلايا تموت بمعدل ثابت ويحدث موت الخلايا نتيجة نفاد المواد الغذائية الرئيسية وتجمع المواد التالفة والسامة مثل الحوامض.

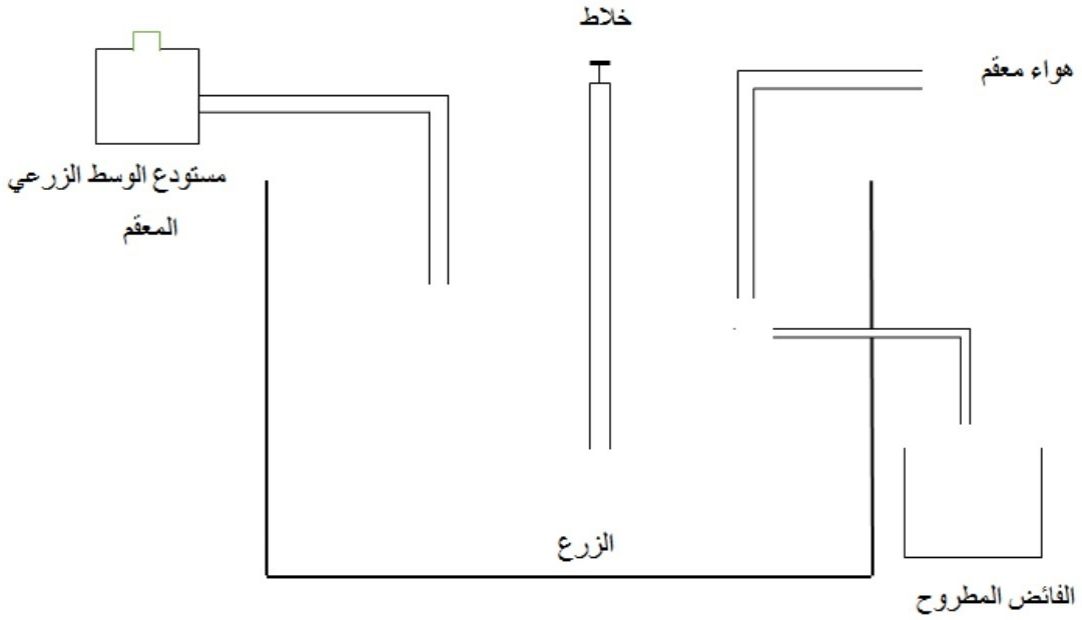
٥:–. المراحل الانتقالية بين اطوار النمو : الملاحظ عند انتقال المزرعة تدريجيا من طور الى اخر وهذا يعني أن الخلايا ليست جميعا في حالة عضوية واحدة متماثلة عند اقتراب المزرعة من الطور التالي.

النمو التزامنى : Synecrenous growth وهي المزرعة التي تنقسم فيها جميع الخلايا في آن واحد وتستعمل هذه المزارع في نواح بحثية كثيرة . ويحدث التزامن بالنمو عند نقل خلية بكتيرية واحدة من مزرعة لوغاريتمية الى وسط غذائي طازج جديد ومن نفس مكونات الوسط الغذائي المستخدم وبنفس درجة حرارة الحضن المستخدمة ففي هذه الحالة تنشطر الخلية هذه الى خليتين متشابهتين تقريبا وبسبب هذا التشابه التقريبي بين الخليتين فان انشطارهما التالي يكون متزامنا الا ان هذا التزامن لا يكون مطلقا وهكذا يستمر التزامن التقريبي في النمو لبضعة أجيال حيث تدخل الخلايا في طور الانقسام العشوائي بسبب تراكم الفروقات الفسلجية الطفيفة جدا بين الخلايا.

الزرع المستمر : Continuous Culture هي الطريقة الزرعية التي يتم بها السيطرة على توفير المواد الغذائية بصورة مستمرة وإزالة المواد الضارة المفرزة من قبل الاحياء المجهرية اثناء النمو بذلك يتم المحافظة على الزرع في الطور اللوغاريتمي دون الدخول بطور الثبات . وللتغلب على مصاعب تراكم المواد السامة ونفاد مستلزمات النمو تستخدم وسيلتان هما المقر الكيماويChemo state ومقر العكرة.Turbid state

المقر الكيمياوي : يتالف من مستودع الزرع منظم لإزالة جزء محدود من الخلايا النامية والمواد الضارة وينظم مرور الهواء بواسطة ناظم معين

–مقر العكرة :وهو منظم بصري كهربائي كالمطياف الضوئي يمرر أي انحراف للعكرة عن المعدل المطلوب الى جهاز سيطرة لتنظيم مرور كمية الوسط الزرعي لمستودع الزرع تستخدم المزارع المستمرة للدراسات الفسلجية والوراثية والصناعية.



Chemo state

القياس الكمي للنمو البكتيرى:

اولا: الطرق المباشرة:

ان دقة هذه الطريقة تقل كثيرا اذا ما كان العدد البكتيري عاليا جدا او منخفضا جدا ففي الحالة الأولى تتراكم الخلايا بعضها

فوق البعض الاخر وبذلك نجد هنالك خلايا لا تحسب . اما في الحالة الثانية فان الخلايا قد تتجمع في بقعة معينه هذا فضلا عن

ان الخطا ان وجد فهو يتضخم وهذا غير مقبول احصائيا.

١ .حساب عدد الخلايا باستخدام المجهر.

أ) طريقة بريدBreed method

يتم حساب عدد الخلايا او البكتريا بعد ان ناخذ حجما معينا من النموذج وتوزعه على مساحة معروفة من شريحة مجهرية ومن ثم تصبغ هذه المساحة وتفحص بالمجهر وعند معرفتنا لمساحة الحقل المجهري تحسب عدد الخلايا فيه لكي نعرف العدد البكتيري في الملتر الواحد من النموذج كتقدير عدد الخلايا البكتيرية في الحليب.

ب) Petroff – Hausser counting chamber or hemocytometer

وتستعمل هذه الشريحة لحساب عدد كريات الدم الحمراء وهي عبارة عن شريحة خاصة مجزئة الى مربعات تبلغ مساحة المربع الواحد منها ١/٤٠٠ ملم وتغطى الشريحة بغطاء رقيق يستند اليها تاركا مسافة ١/٥٠ ملم بينه وبينها وبذلك يكون لدينا حجم قدره ١/٢٠٠٠٠ ملم' فوق كل مربع من مربعات الشريحة ويتم حساب عدد الخلايا في الملتر الواحد.

٢ .العد بواسطة اغشية الترشيح:

وتستعمل اغشية خاصة بثقوب صغيرة جدا ومنتظمة بحيث تمنع مرور البكتريا اذا ما رشح السائل من خلالها

تمرر كمية معروفة الحجم من السائل المراد حساب عدد الخلايا فيه من خلال غشاء الترشيح . فتحجب البكتريا من عبور الغشاء وتبقى محبوسة علية ويمكن عدها وهي على الغشاء باستخدام المجهر حيث تصبغ البكتريا وثم يضاف زيت التغطيس(immersion oil) على الغشاء لجعله شفافا لكي تستطيع فحصه بالمجهر . تستعمل هذه الطريقة لتحديد عدد البكتريا في الهواء أو الماء او أي حجم نموذج كبير وذات محتوى بكتيري واطيء جدا.

.3-:العد بواسطة العدادات الالكترونية:

تستطيع هذه الأجهزة عد او حساب الاف الخلايا الحية والميتة خلال مدة قصيرة جدا من الوقت قد لا يتجاوز بضع ثوان وتعتمد هذه الأجهزة على مبدا العين الالكترونية حيث أن هنالك اشعة الالكترونية تعبر من قطبين في هذه العين أو الفتحة فاذا مرت الخلايا من خلال هذه الأقطاب اعترضت مرور الأشعة هذه وبذلك تقطع الدائرة الكهربائية ويترجم هذا القطع الكهربائي بواسطة أجهزة معينة الى ارقام تمثل عدد الخلايا البكتيرية التي مرت خلال العدادات.

ثانيا : الطرق غير المباشرة:

١- الطرق الكيمياوية : هنالك مواد معينة توجد بكميات ثابتة تقريبا في الخلايا الحية ومن الممكن عند التقييس الكمي لهذه المواد ان تحدد تقريبا كمية او كتلة الخلايا التي تحتويها وتعتمد هذه الطريقة في مجال الصناعات حيث يكون نمو الاحياء المجهرية كثيفا ويعد النايتروجين احد هذه المواد المعتمدة . ويوجد النايتروجين بحدود ثابتة في البروتينات عموما ولقياس النمو بهذه الطريقة تجمع الخلايا وتغسل جيدا ونتخلص مما علق بها من وسط غذائي ويتم القياس الكمي للنايتروجين بطريقة كلدال Kjeldhal method وكذلك قياس كمية البروتين في الخلية باستخدام كشاف فولنFolins reagents حيث يعطي لونا بتفاعله مع الحوامض الأمينية التايروسين tyrosinوالتربتوفان tryptophan وهي حوامض توجد دائما في البروتينات كميات ثابتة تقريبا . ويمكن قياس مؤشرات أخرى للنمو مثل تحديد المجاميع الأمينية الحرة free amino- group او الحوامض النوويةRNA ، DNAاو كمية الفسفور في هذه الحوامض.

٢ (تحديد وزن الخلايا الجاف : أن الوسيلة المباشرة الوحيدة لقياس كتلة الخلايا هي عملية الوزن الجاف للخلايا البكتيرية في مزرعة ذات حجم معروف وتستعمل هذه الطريقة في المجالات الصناعية والبحثية.

١ (قياس العتمة : Turbidity Measurment وهي طريقة شائعة جدا في مجال تحديد كتلة الخلايا للاحياء الوحيدة الخلية وهي طريقة ضوئية حيث تحدد فيها كمية الضوء المنتشر في معلق من الخلايا وتعتمد هذه التقنية على حقيقة أنه عندما تعلق الأجسام الصغيرة جدا في سائل ما فان قدرة هذه الأجسام على امتصاص الضوء ونشره في السائل تتناسب مع تركيزها وضمن حدود معينة فعندما تمرر حزمة ضوئية خلال أحد هذه السوائل فان الاختزال الحاصل في كمية الضوء الخارجة من السائل يؤخذ مؤشرا لكثافة الخلايا وتدعي كمية الضوء المختزلة هذه بالكثافة الضوئية وهي تقاس باستخدام أجهزة قياس المطياف الضوئي. Spectrophotometer

٢ (طريقة التخفيف المتسلسل: Serial Dilution وتستخدم هذه الطريقة لتقدير اعداد البكتريا الحية في السوائل مثل الحليب، الماء او المزارع السائلة حيث يخفف مللتر واحد من النموذج السائل عشرة اضعاف في كل تخفيف ولغاية أربعة تخفيفات او خمسة حسب ما يناسب كثافة الخلايا في النموذج وتجرى التخفيفات باستعمال المرق المغذي مخففا وفي انابيب اختبار مناسبة

حيث تحضن هذه الأنابيب بعد أن ترج رجا جيدا ويسجل ان كان هناك نمو او لا يوجد.

طريقة عد المستعمرات: Colony count وتستخدم هذه الطريقة لتحديد عدد البكتريا في الحليب والماء ومواد أخرى ، وفي هذه التقنية يصب حجم معروف من المزرعة السائلة او النموذج السائل في طبق بتري ، ثم يضاف بعدها وسط الأكار المغذي السائل تحت درجة حرارية لاتزيد على ٤٥ درجة مئوية ثم يحرك الطبق بلطف لمزج النموذج وتوزيعه جيدا ضمن وسط الأكار وبعد فترة حضانة مناسبة تحسب المستعمرات النامية حيث أن حساب عدد المستعمرات يعني عدد الخلايا الحية في النموذج ان عدد المستعمرات التي تستطيع العين البشرية عدها تعطينا اقل خطا احصائي ، تنحصر ما بين ٥٠ مستعمرة الى ٢٠٠ مستعمرة ولهذا علينا تخفيف النموذج ليعطينا عدد من المستعمرات يقع ضمن هذه الحدود.

المصادر :-

كتاب علم الاحياء المجهرية البيطرية, الدكتور فاروق خالد حسن والدكتور خليفة احمد خليفة والدكتور حامد حسن طنطاوي والدكتور جاسم محمد العبد الله ١٩٨٢ ,جامعة بغداد

كتاب مبادئ الاحياء المجهرية ,الدكتور غازي موسى الخطيب والدكتور وهاب امين حسن ١٩٩٠ ,جامعة بغداد

كتاب علم الاحياء المجهرية البيطرية,الدكتور جاسب جاسم حداد ١٩٩١ ,جامعة الموصل