جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الانبار
كلية العلوم / قسم علوم الحياة

اسم المادة: فسلجة الاحياء المجهرية

المستوى الدراسي: الدراسات الأولية

المرحلة: الثالث

عنوان المحاضرة: تقدير النمو الميكروبي

مدرس المادة

ا.م.د .عمر محمد حسن

ا.م.د .جمال عبد الرحمن ابراهيم

تقدير النمو الميكروبي

بما أن النمو الميكروبي هو الزيادة في عدد الخلايا المتكونة نتيجة الانقسام، فإنه من الممكن تقدير هذا النمو بطرق عديدة مبنية على الأسس التالية:

1. تقدير العدد الكلي للخلايا الميكروبية مباشرة باستعمال المجهر، أو بطرق غير مباشرة بإجراء عد المستعمرات.
2. تقدير الكتلة الخلوية مباشرة عن طريق تقدير الزيادة في الوزن الجاف أو الرطب، أو عن طريق أحد عناصر المحتويات الخلوية كالكربون أو النتروجين أو بطريق غير مباشر اعتماداً على تقدير درجة تعكير البيئة.
3. تقدير النشاط الخلوي، وهي طريقة غير مباشرة تعتمد على مقارنة النشاط الأنزيمي الناتج بمقدار النمو المراد قياسها.

يمكن إذاً تتبع إحدى الطرق التالية:

أ- تقدير العدد الكلي للخلايا:

يتم هذا التعداد مباشرة بالمجهر في تحضيرات ملونة. ينشر حجم معلوم من المزرعة أو المعلق الميكروبي (0.01 مل) بانتظام على مساحة معلومة من صفيحة زجاجية، حيث يثبت الغشاء الناتج ويلون، ثم تحصى الميكروبات الفردية بفحصه تحت حقل المجهر، ومنه يحسب عدد الخلايا في (1 مل) من المعلق.

تستعمل حالياً صفائح خاصة مثل **Petroff hausser** فيها حجرة للعد تساعد على إجراء العد بشكل دقيق وسريع دون تلوين. ومن عيوب هذه الطريقة كونها تعطي العدد الكلي للخلايا الحية والميتة، وأنها ليست كافية في حالة المعلقات المخففة جداً، بالإضافة لكونها مجهدة للنظر.

شريحة العد بتروف هاوسر

ب- طريقة عد المستعمرات بالأطباق:

تعتمد هذه الطريقة على زراعة الميكروبات في أوساط غذائية صلبة ملائمة داخل أطباق بتري معقمة، حيث يؤخذ (1 مل) من المزرعة المراد فحصها ويلقح بها الوسط الزرعي الصلب، ثم تحضن هذه الأطباق بدرجة حرارة ملائمة، وتعد المستعمرات النامية فيها بعد فترة زمنية معينة تختلف باختلاف النوع الميكروبي المدروس مثلا (24 ساعة) لبكتيريا ***E. coli*** وثلاثة أيام على الأقل لبكتيريا Azotobacter .

يمكن أن نحصل بهذه الطريقة على عدد كبير من المستعمرات التي تتداخل حدودها، ويصبح احتمال الخطأ كبير، لذلك يجري تخفيف متدرج للعينة المدروسة لدرجة تسمح بظهور عدد من المستعمرات في الأطباق يتراوح بين (30-300) مستعمرة، وبمعرفة التخفيف نستطيع معرفة عدد الميكروبات الموجودة في (1 مل). تعطي هذه الطريقة نتائج جيدة عند زراعة بكتريا الحليب والماء والأغذية وغيرها، لأنها طريقة سهلة ودقيقة.

ج- تقدير العدد في الوسط السائل:

تستعمل هذه الطريقة بشكل خاص لعد ميكروبات التربة. حيث تلقح أوساط غذائية سائلة، ملائمة وموزعة في أنابيب اختبار بمعلق التربة المتدرج في التخفيف، وتحضن في الظروف المناسبة فترات زمنية تختلف باختلاف النوع المدروس. تنمو

البكتريا في هذه الأوساط، ويترافق نموها بتشكل راسب حبيبي غروي ولزج في أسفل الأنابيب، أو غشاء رقيق في وسط السائل أو على سطحه. تعد هذه الأنابيب موجبة بالمقارنة مع الأنابيب السالبة التي لا تحوي على الراسب أو الغشاء. يحسب العدد الأكثر احتمالاً بالرجوع إلى جداول خاصة.

د- طريقة العد باستعمال أغشية الترشيح:

يجري ترشيح ميكروبات الماء أو الهواء بأوراق ترشيح خاصة Millipore مختلفة في أقطار مساماتها ثم توضع ورقة الترشيح هذه داخل أطباق خاصة وتحصى مباشرة أو بعد تلوينها. يمكن أن تحتضن أوراق الترشيح في ظروف مناسبة، ثم تحصى المستعمرات النامية بعد فترة معينة.

هـ- تقدير درجة تعكير البيئة Turbidimetrice method

تنمو الميكروبات في الأوساط السائلة، ويترافق هذا النمو بزيادة تعكر الوسط بسبب ازدياد عدد الخلايا فيه. فإذا مررنا حزمة ضوئية خلال الوسط، فإن الخلايا البكتيرية تمتص وتبعثر بعض هذه الأشعة الضوئية. والحقيقة أن كمية الضوء الممتصة والمبعثرة تتناسب مع كتلة الخلايا في الوسط، حيث أن ازدياد عدد الخلايا يؤدي إلى زيادة تبعثر الضوء وامتصاصه. ولقياس مدى هذا التبعثر يستعمل إما مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer أو مقياس العكر Turbidimeter .

تستعمل هذه الطريقة بكثرة في دراسة نمو البكتريا لسرعتها ودقتها. ولكن لا يمكن استعمالها في الأوساط الملونة كثيراً أو التي تحتوي على مواد عالقة أخرى غير الخلايا البكتيرية، أو عندما يكون نمو المزرعة ضعيفاً. تجدر الإشارة إلى أن هذه الطريقة تأخذ في الحساب الخلايا الميتة والحية على السواء.

و- تقدير الزيادة في محتويات الخلية من النتروجين:

ذكرنا سابقاً أن الخلية الميكروبية تتركب بشكل أساسي من البروتين، ولما كان النتروجين يشكل القسم الرئيسي من هذا البروتين (إذ يشكل 5.5% من وزن الكتلة الجاف)، فإن كميته في المستعمرة تتناسب مع عدد الخلايا البكتيرية وحجمها.
غالباً ما يجري قياسان لكمية النتروجين في المستعمرة أحدهما قبل بدء النمو والآخر في نهايته ثم تحسب الزيادة في النمو تعد هذه الطريقة غير حساسة، لأنها تصلح في حال وجود أعداد كبيرة من الميكروبات فقط.

ز- تقدير الزيادة في الوزن الجاف للخلية:

تستعمل هذه الطريقة في حال المزارع الميكروبية ذات النمو الكثيف، وهنا يجب غسل الخلايا جيداً من الشوائب والمواد العالقة بها، وتعد من الطرق غير الحساسة أيضاً.

ح- تقدير النشاط الخلوي:

يكون ذلك بتقدير التغيرات الكيميائية التي تحدث لإحدى مكونات الوسط، كأن تقدر كمية الحمض الناتجة عن تخمير سكر الغلوكوز بواسطة نوع ميكروبي معين لأن هذه الكمية تتناسب عادة مع الأعداد الميكروبية في المزرعة. كما قد يتم تقدير النشاط الخلوي بقياس النشاط الأنزيمي لأنزيم ما كقياس قدرة النتروجينيز Nitrogenase على تحويل الأستيلين C_2H_2 إلى اثيلين C_2H_4 في عملية القياس غير المباشرة لتثبيت النتروجين الجوي من قبل ميكروبات التربة المثبتة للنتروجين حيث تتناسب كمية الاثيلين المنطلقة مع عدد الميكروبات المثبتة للنتروجين في المزرعة المدروسة.

ط- النمو المتواقت Synchronous growth:

إن انقسام الخلايا في مزرعة ميكروبية ما قد لا يحدث بالوقت نفسه بالنسبة لجميع الخلايا. ولما كانت ضروريات البحث تقتضي أحيانا الحصول على خلايا متشابهة تماما، بحيث أن كل خلية من هذه المزرعة تمثل تماماً جميع الخلايا الموجودة فيها، فإن إحداث مثل هذا التواقت هام جداً صناعياً.

لقد أثبتت التجارب إمكانية إحداثه إما بتغيير الظروف الفيزيائية حيث تحفظ الخلايا فترة من الزمن على درجات حرارة منخفضة فيحدث فيها استقلاب بطيء، ولكنها لا تبدأ بالانقسام إلا عند رفع درجة الحرارة، وإما باستعمال كمية من خلايا الطور أللوغاريتمي الحديثة التي تفصل بالترشيح أو بالتثقيل التفاضلي Deferential centrifugation من مزرعة ما لتستخدم في تلقيح الوسط المناسب.

ي- الاستنبات المستمر Continuous culture:

إن إطالة الطور اللوغاريتمي في المزارع البكتيرية هي أحد المواضيع الهامة بالنسبة لكل من البحث العلمي والتقدم الصناعي، وهذا ما يمكن تحقيقه مختبرياً، إذ يعمد إلى جعل وسط الاستنبات ثابتاً، إما بإضافة تيار ثابت من الوسط المستعمل باستمرار بحيث يبقى تركيز الشوارد والعناصر الغذائية بالنسبة نفسها وذلك باستعمال جهاز يسمى Chemostat، أو بإضافة وسط الاستنبات الطازج عند وصول درجة عكر المزرعة حداً معينا في جهاز يسمى Turbidostat. يطلق على هذا النمو اسم النمو المتوازن أو النمو الثابت.

المراجع

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

Kim, B.H. and Gadd G.M. Bacterial Physiology and Metabolism. Cambridge University Press, New York, USA. 2008.

Moat, A.G. J.; Foster, W. and Spector M.P. Microbial Physiology, 4th Edition, John Wiley & Sons, Inc., Publications, New York, USA. 2002.

Watson, D. Microbiology and Microbial Physiology. White Word Publications, New York, USA. 2018.