محاضرة رقم (2) : فسلجة احياء مجهريه دكتورة : ايمان عبعوب

زرع الاحياء المجهرية وانمائها

للحصول على الاحياء المجهرية لغرض دراستها بالاتجاهات المختلفة يجب ان توفر البيئة اللازمة لنموها وهذه البيئات يطلق عليها الاوساط الزرعية Culture media ويعرف الوسط الزرعي على انه المادة او المواد او البيئة التي تنمو فيها او عليها الاحياء المجهرية وتعطي او توفر هذه الاوساط الزرعية بيئة صناعية artificial environmental تشابه الظروف الطبيعية في بيئتها الطبيعية التي تكون ضرورية لنمو المايكروبات ، تختلف الاوساط الزرعية نظرا لاختلاف الاحياء المجهرية في احتياجاتها الغذائية والتي تعكس اساسا فروقا في القدرات الفسلجية لتلك الاحياء . كما تختلف الاوساط الزرعية باختلاف الغاية من تحضيرها . تحتوي الاوساط الزرعية بانواعها المختلفة على الماء بنسبة تتراوح بين (70-90) %والاحتياجات او المكونات الاساسية للاوساط الزرعية والتي بامكانها ان توفر ظروفا ملائمة للنمو البكتيري هي :

1 – مصدر للطاقة

2 – مصدر للكربون

3 – مصدر للنتروجين والفسفور

4 – الاملاح مثل كاربونات الصوديوم والبوتاسيوم والمغنسيوم بالاضافة الى الكبريتات والكلوريد

5 – قيمة معقولة للدالة الحامضية تتناسب مع صفات وفعالية الميكروب قيد الدراسة

6 – جهد الاكسدة والاختزال بقيمة مناسبة

7 – عوامل النمو مثل Tryptophan لبكتريا *Salmonella typhi* وعاملي النمو V&X لبكتريا *Haemophilus*

وهناك صفات او خصائص للاوساط الزرعية المثالية هي

1 – يجب ان يعطي نمو مقنعا للقحة المفردة

2 – يجب ان يعطي نمو سريعا

3 – يجب ان يكون سهل الاستعمال بالنسبة للاحياء المجهرية لغرض تمكن هذه الاحياء من النمو

4 – يجب ان تكون طبيعية وسهلة الانتاج والتصنيع

5 – يجب ان تكون ملائمة اوقادرة على توضيح كل الخصائص او الصفات المطلوب دراستها

وعند اختيار الوسط الزرعي الملائم لنمو كائن مجهري معين يجب توفير هذه المواد بصورة متوازنة وبتراكيز معينة للحصول على نمو جيد .

فزيادة التراكيز بعض المحتويات عن الحدود المثلى لتواجدها قد يسبب تثبيط النمو وليس زيادته وقد تصل الى مستوى معين تصبح فيه هذه المواد سامة للعديد من الطحالب عند وجودها بتراكيز عالية في الوسط وعددا من المحتويات اذا زادت عن نسب او تراكيز تواجدها المثلى فانها لاتستغل بطريقة مثلى وتعاد الى الوسط الزرعي على شكل مركبات عرضية فعلى سبيل المثال اذا زاد المصدر الكاربوني عن حاجة الكائن المجهري فسيحول الكربون الزائد الى ثاني اوكسيد الكاربون اثناء نموه

الاوساط الزرعية قد تكون بسيطة المكونات او معقدة فمثلا الاوساط الزرعية التي تستعمل لتنمية الاحياء المجهرية ذاتية التغذية تكون بسيطة عادة وذلك لقدرتها على بناء التراكيب المعقدة لخلاياها من مواد بسيطة فقد تحتاج هذه الاحياء لنموها الى بعض الاملاح غير العضوية ومصدرا غير عضوي للنتروجين والماء . اما مصدر الكاربون هنا فيكون عاى الاكثر ثاني اوكسيد الكاربون المذاب من الهواء في الوسط الزرعي . ومن ناحية اخرى فان الاحياء المجهرية النحسة Fastidious تحتاج عادة الى اوساط زرعية معقدة التركيب لنموها وذلك لعدم قدرتها على تصنيع تراكيبها من مواد بسيطة ، هاتان الحالتان من الاحياء المجهرية ((الاحياء ذاتية التغذية والاحياء النحسة)) تقعان على طرفي التقسيمات من الاحياء عند تحضير الاوساط الزرعية لها اما في الحالات الأخرى فانها تحتاج الى اوساط زرعية تقع بين هذين المثالين وتقسم الاوساط الزرعية الى عدة اقسام :

أ- الاوساط الزرعية الطبيعية Natural cultural media :

وهي الاوساط الحاوية على المواد الغذائية الضرورية لنمو الاحياء المجهرية وهي على هيئتها الطبيعية فمثلا المصدر الكاربوني او النتروجين في هذه الاوساط يكون على هيئة مواد او املاح مضافة الى الوسط ولكنه يكون بصورة اقرب الى المكونات الطبيعية للخلية كما هو الحال في الوسط الحاوي على السكر السداسي او المواد البروتينية حيث يستطيع الكائن المجهري ان يستغل او يستخدم هذه المركبات في بناء وحدات تركيبية بصورة اسهل مما لو كانت على شكل مواد او املاح مضافة ، اما من ناحية الاملاح الغير عضوية(الايونات الموجبة او السالبة) فانها تتوفربصورة كافية في هذه الاوساط ، اما اذا كان الكائن الحي المجهري يحتاج الى كميات اضافية من هذه الاملاح فانها تضاف الى الوسط على شكل فوسفات الامونيوم او كبريتات المغنسيوم او الامونيوم . قد تحتوي بعضا من الاوساط الزرعية الطبيعية على بعض من السموم التي تعيق نمو الاحياء المجهرية لذلك يجب معاملة هذه الاوساط لازالة السموم قبل استعمالها ومن هذه السموم عنصر النحاس الذي يؤثر على فغالية الانزيمات الحساسة لذلك يجب معاملة الوسط بنوع معين من الاصباغ الايونية

المهمة مثل Ion-Exchange Resin لازالة سموم من الوسط ومن امثلة الاوساط الطبيعية الدبس ، عصير الذرة ، فول الصويا .

ب- الاوساط الصناعية Synthetic or chemically defined media

وهي الاوساط المعلومة التركيب والتراكيز وتصنع وفقا للغاية المرجوة منها حيث يكون بالامكان حذف او اضافة اي مركب حسب حاجة الكائن المجهري الذي يراد تنميته والحصول على اكبر كمية نمو والمادة التي يحتاجه هذا الكائن ويعتمد عليها بصورة اساسية يمكن تحضيرها بكميات اكبر واضافتها بصورة مستمرة الى الوسط الزرعي ومن الممكن معرفة هذه المادة او المواد التي يعتمد عليها الكائن في نموه بواسطة تاشيرها بالمواد المشعة ومراقبة استهلاكها ومصيرها تحتوي هذه الاوساط على المتطلبات الضرورية والاساسية في تحضير الوسط الزرعي وهي (مصدر للطاقة والكاربون والنتروجين غير غضوي والفسفور غير عضوي والاملاح ... الخ) حيث توفر هذه المتطلبات جميع ما تحتاجه الاحياء المجهرية متباينة التغذية غير الطفيلية اما الاحياء المجهرية الطفيلية فتحتاج الى اوساط مصنعة اكثر تعقيدا تحتوي بالاضافة الى المكونات اعلاه على بعض الاحماض الامينية والقواعدالنووية كالبيورين والبايريميدين وغيرها من الفيتامينات ،فاذا حضر وسط صناعي يحتوي على جميع المكونات الضرورية للنمو ماعدا مصدر كاربوني وزرع على هذا الوسط كائن مجهري لاهوائي المعيشة واذا جرت ظروف النمو في الظلام فان الكائن المجهري الوحيد الذي يمكن ان ينمو في مثل هذا الوسط وفي هذه الظروف يكون بكتريا النترجة Nitrifying bacteria وهي بكتريا ذاتية التغذية مثل *Nitrosomonas* التي تتمكن من استغلال ثاني اوكسيد الكاربون كمصدر للكاربون وتحصل على طاقتها من اكسدة املاح الامونيوم (مصدر للنتروجين) . ولكن اذا اضيف للوسط اعلاه سكر الكلوكوز وكانت ظروف النمو هوائية فان انواعا عديدة من البكتريا والفطريات تستطيع النمو في هذا الوسط لان سكر الكلوكوز يوفر مصدرا للكاربون والطاقة لهذه الاحياء اما اذا كانت التنمية لاهوائية(ظروف لاهوائية) فعندئذ تستطيع البكتريا اللاهوائية ان تنمو وتحصل على طاقتها من تخمر السكر الموجود في الوسط اما اذا اضيف الى الوسط الاخير (المحتوي على كل متطلبات الضرورية لنمو الاحياء المجهرية على سكر الكلوكوز) فيتامينات وعوامل نمو اخرى فان انواعا اخرى من البكتريا التي تحتاج لمثل هذه المواد تستطيع النمو مثل بكتريا *Proteus vulgaris* ولفرض الحصول على النمو المطلوب توفير الظروف الاخرى كالحرارة ، تركيز ايون الهيدروجين الضغط الازموزي بصورة ملائمة .

ج- الاوساط الزرعية شبه الصناعية Semi Synthetic media

وهي اوساط صناعية تكون بعض محتوياتها طبيعية مثل وسط Potato – Dextrose (PDA) Agar

وتقسم الاوساط الزرعية اعتمادا على حالتها الفيزياوية الى :

أ- اوساط سائلة Liquid media

تستخدم للحصول على كثافات ميكروبية عالية ولدراسة بعض الفعاليات الميكروبية حيث يوفر الوسط الزرعي السائل فرصا كافية لنمو وتكاثر الميكروبات لانه نتيجة لحالته الفيزياوية يزيد من اتاحة التقاء البكتريا بالمادة الغذائية على العكس من الوسط الصلب والذي يكبل المادة الغذائية مما يضيف عناءا كبيرا على الكائن المجهري ويجعله يخسر طاقته اكثر في سبيل الحصول على مادته الغذائية ولا يكون الوسط السائل ملائما لاغراض الغربلة في مزارع نقية كما انه لايوفر امكانية دراسة صفات المستعمرات الميكروبية

ب - اوساط صلبة Solid media

وتستخدم لدراسة عزل الاحياء المجهرية بهيئات نقية كما انها تستخدم لدراسة صفات المستعمرات وتستخدم عدة مواد لتصليب الاوساط الغذائية من اهمها الاكار Agar : وهو عبارة عن سكريات متعددة معقدة Complex polysaccharide تستخلص من الاعشاب البحرية Sea weeds (الطحالب من النوع Gelidium) لا توفر هذه المادة اي غذا للبكتريا حيث لا يمكنها تاييضها وتستخدم كمادة مصلبة فقط .

الجيلاتين Gelatin : بروتين يحضر بالتحلل المائي للكولاجين hydrolysis of collagen والاستخدام الاساسي للجيلاتين هو لاختبار قدرة الميكروبات على استعماله او تسييله Liquefy وهي صفة مهمة في تشخيص وتصنيف البكتريا

ج- اوساط شبه صلبة Semisolid media : وتكون حالته الفيزياوية وسط بين الحالتين السابقتين (الصلبة والسائلة) تستخدم في الكشف عن بعض الفعاليات الحيوية للبكتريا ومن الامثلة على هذا النوع من الاوساط وسط الاكسدة والتخمر – Oxidation Fermentation media (OF media)

وتقسم الاوساط الزرعية من ناحية وظائفها وتطبيقاتها العملية الى المجاميع التالية :

1 – الاوساط الزرعية الانتقائية Selective media

وهي اوساط تحتوي على مواد مثبطة تمنع نمو احياء مجهرية وبنفس الوقت تشجع نمو انواع اخرى وباستعمال هذا النوع من الاوساط الزرعية نتمكن من الحصول على انواع معينه من الاحياء المجهرية الموجودة في مجتمع مختلط من الاحياء ومن الامثلة على هذا النوع من الاوساط هو وسط MacConkey agar الذي يحتوي على املاح الصفراء Bile salt التي تثبط نمو البكتريا غير المعوية وتسمح بنمو البكتريا المعوية ويمكن اعتباروسط الماكونكي وسطا تفريقيا لانه يحتوي على الصبغة الحمراء المتعادلة Neutral red والتي بوجودها يمكن التفريق بين الانواع المخمرة للاكتوز (تعطي لون احمر وردي Pink) والانواع غير المخمرة للاكتوز تكون صفراء ،شاحبة)

2 – الاوساط المغذية او المدعمة Enrichment media :

والتي تحتوي مواد خاصة تضاف الى الوسط لغرض الحصول على زيادة في نمو المايكروب المطلوب دراسته بحيث تظهر اعداد اكبر بكثير من الانواع غير المطلوبة ومن الامثلة على هذه الاوساط وسط Tetra thionate broth (مرق التتراثايونيت) الذي يثبط نمو بكتريا القولون ويسمح بنمو البكتريا المرضية المسببة للتيفوئيد والباراتيفويد خلال فترة (12-18) ساعة .

3 – اوساط زرعية خاصة Special media وهي اوساط صممت او وضعت لعزل انواع معينة من الاحياء المجهرية وكذلك تمكننا من التعرف على انواع اخرى غيرها مثل وسط Lowenstein –Jensen المستعمل لتنقية بكتريا Mycobacterium المسببة لمرض السل في الانسان حيث يحتوي هذا الوسط على صبغة Malachite green المثبطة لنمو الاحياء مجهرية غير *Mycobacterium* واحتوائه ايضا على مادة Glycerol المشجعة لنمو مسبب مرض السل البشري .

4 – اوساط تفريقية Differential media : مثل وسط اكار الدم Blood agar والذي يفرق بين البكتريا المحللة وغير محللة للدم

5 – اوساط اختبارية Assay media : وتستخدم في اختبارات خاصة مثل وسط Muller Hinton agar – الذي يستخدم في اختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية

6 – اوساط تشخيصية Characterization media : وهي اوساط تحتوي على مواد معينة يمكن بواسطتها تحديد النوع البكتيري القادر على احداث بعض التغيرات الكيميائية مثل وسط Triple – Sugar – Iron (TSI)

7 – اوساط لا هوائية Anaerobic media : اوساط تحتوي على مواد مختزلة تتحد مع الاوكسجين لتوفر ظروف لاهوائية ومن امثلتها وسط Robertson's Cook Meat media ,Thioglycolate broth

5 – اوساط الحفظ Maintenance media : وهي اوساط تستعمل في حالة اطالة بقاء البكتريا حية محتفظة بحيويتها وصفاتها الفسلجية ولا يفضل استعمال الاوساط الزرعية المشجعة على النمو السريع في حالة حفظ البكتريا فمثلا وجود الكلوكوز يسرع النمو ولكنه ينتج حوامض ضارة بالكائن المجهري المراد حفظه لذا يستحسن حذف الكلوكوز من الوسط بمعنى اخر فان ما هو مناسب للانماء الجيد ليس ملائما للحفظ .

وللحصول على مزارع بكتيريا نقية هناك عدة تقنيات توصلنا الى هذه الغاية هي :

1 – تقنية الزرع على الاطباق Plating method وتشمل التقنيات التالية :

أ- العزل بالتخطيط Streaked plate
ب- العزل بالنشر Spread plate
ج - العزل بالصب Poured plate

انماء البكتيريا الهوائية اذ يجب توفير الاوكسجين لانه عامل مهم ومحدد للنمو .

انماء البكتريا اللاهوائية :

وعند اتحاد البكتريا الهوائية واللاهوائية الحساسة جدا للاوكسجين يجب اتخاذ مايلزم لابعاد الاوكسجين للبيئة الانماء ومن الطرق المتبعة في ذلك :

1 – اوساط لا هوائية اختزال اوكسجينها (توجد عدة مواد مختزلة للاوكسجين توضع فيها كالسستين Cysteine)

2 – حاضنات اللاهوائية Anaerobic incubator اذ تفرغ من الهواء وتملئ بغاز النتروجين او خليط من غاز ثاني اوكسيد الكاربون والهيدروجين .

ويعتبر الاوكسجين مادة سامة للاحياء المجهرية اللاهوائية للاسباب التالية

1 – يؤكسد الاوكسجين بعض المجاميع المختزلة في الانزيمات ومنها المجاميع الكبريتية (SH) مؤديا الى تثبيط فعل تلك الانزيمات مثل انزيم Nitroginase المسؤول عن تثبيت النتروجين الجوي والذي يتلف بشكل كبير لا سبيل لاصلاحه بوجود الاوكسجين

2 – تقوم العديد من الانزيمات الخلوية بتحفيز التفاعلات الداخل فيها الاوكسجين منتجة

$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^-$$

وينتج هذا الجذر مواد سمية مثل بروكسيد الهيدروجين وجذر الهايدروكسيل OH^- بالتفاعلات التالية :

$$2O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Chelated

$$H_2O_2 + O_2^- \longrightarrow O_2 + OH^- + OH$$

(Iron)

وجذور الهيدروكسيل جذورفعالة تقوم بتدمير اي جزء في الخلايا ،البكتريا الهوائية نتيجة لامتلاكها لانزيم Super oxide dismutase والذي بواسطته يمكن التخلص من الجذر Super oxide وكذلك تتخلص من بيروكسيد الهيدروجين بواسطة انزيمي Peroxidase و Catalase اذ تشطر بيروكسيد الهايدروجين الى اوكسجين وماء كالتالي :

Catalase

$$2\ H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$$

اما البكتريا اللهوائية فاما تفتقر الى هذه الانزيمات الثلاث اعلاه اوتحتوي على قليل منها مقارنة بالبكتريا الهوائية .

زرع البكتريا في الاوساط الزرعية الملائمة :

هو الطريقة المتبعة روتينيا في مختبرات الاحياء المجهرية ولكن هذه الطريقة لاتعكس تصرف او سلوك الاحياء المجهرية في بيئتها الطبيعية وذلك لما يلي :

1 – من الصعب توفير المواد الغذائية الموجودة في البيئة الطبيعية للاحياء المجهرية بتراكيز كافية للنمو الافضل في الاوساط الزرعية

2 – لاتكون الاحياء المجهرية في بيئتها الطبيعية معزولة بمزارع نقية كما هو الحال في الاوساط الزرعية

والطريقة الاعتيادية لعزل وزرع الاحياء المجهرية هي مانسميه بالمزارع الخاملة او المستقرة لان الظروف التي تنمو بها تلك الاحياء تعتبر العامل الرئيسي الذي يحدد طبيعة النمو وان اهم هذه الظروف هو الوسط الزرعي الذي يعتبر ظرفا مستقرا وغير متغير . فالزرع الذي لا تتغير ظروفه يعتبر مستقرا ويطلق Batch culture وفي هذا النوع من الزرع يصل النمو الى اقصاه مره واحده ثم يبدأ بالهبوط ولايبقى النمو مستمرا وبالطاقة القصوى والمزارع الخاملة او المستقرة لاتؤمن الحصول على كميات وافية من الاحياء المجهرية وخاصة في الصناعات وذلك لان كمية المواد الغذائية المتوفرة للنمو تكون وافية عند بداية الزرع ثم تبدا بالنضوب والخلايا النامية تقوم بافراز مواد تؤدي بالنتيجة الى تغير ظروف النمو حيث سيتغير تعامل الخلايا مع الوسط في حالته الجديدة وتحاول تكيف مع هذه الحالة لذا يحتوي الزرع على مجموعة من الاحياء المجهرية غير المتجانسة فسلجيا فبعد فترة من التطبع الفسلجي للنمو في هذا الوسط تبدأ حجوم الخلايا بالازدياد يتبعه انقسام هذه الخلايا ودخولها في طور النمو الآسي او اللوغارتيمي حيث يحدث الانقسام في هذا الطور بسرعات متساوية اي ان ازدياد الاعداد يكون بسرعة منتظمة فكل خلية تصل الى عمر او حجم معين لتبدا عنده بالانقسام الى خليتين والانقسام يحدث بواسطة الانشطار الثنائي البسيط Binary fusion ففي طور النمو الاسي تستهللك المواد الغذائية من الوسط الزرعي وتتطرح نواتج الفعاليات الحيوية الى الوسط والفترة الزمنية لهذا الطور تختلف من زرع لاخر معتمدة على كمية المواد الغذائية المتوفرة ووطبيعة النمو الحاصل وبما ان المواد الغذائية في هذا النوع من الزرع محددة نوعا ما فالانقسامات في الخلايا تتوقف

عند هبوط كمية هذه المواد الغذائية الى مستوى معين ونتيجة لما جرى من زيادة اعداد الخلايا وازدياد طرح نواتجها الايضية فان طبيعة الوسط الزرعي تتغير وتبدا الاحياء بالتعود على النمو في هذا المحيط الجديد فلذلك يدخل النمو الاحيائي الى طور ثالث يسمى بطور الاستقرار Stationary phase وفي هذا الطور يتساوى عدد الاحياء المتزايدة مع الاحياء الميتة لذلك ياخذ العدد الحي من الكائنات حدا ثابتا يستمر لفترة من الزمن ثم يدخل النمو في الطور الرابع يسمى بطور الانحدار Decline phase وفيه تتزايد اعداد الاحياء الميته وتصبح الغالبة على الاعداد الحية . ويحدث خلال اطوار النمو المختلفة عدم تجانس في الطبيعة الفسلجية للاحياء المتواجدة في الزرع المستقر Batch خاصة في قابليتها على تكوين البروتين ويمكن ملاحظة ذلك بعملية تقدير الحامض النووي الرايبوزي والذي يعكس بدوره قدرة الكائن الحي على تكوين البروتين ان المزارع المستقرة لايمكن ان توفر للكائن الحي المجهري وبصورة مستمرة جميع احتياجته من المواد الغذائية لذلك يصبح هذا الشكل من الزرع غير عملي في الصناعات التي تتطلب استمرار نمو الكائن الحي المجهري للحصول بواسطة فعاليته الحيوية على المنتجات المطلوبة لذا اصبح من الضروري اضافة مواد غذائية بين فترة واخرى وازالة كمية معينة من الوسط الحاصل فيه النمو اذا تمت عملية تعويض مواد غذائية وازالة الوسط الزرعي القديم بطريقة جيدة وصحيحة فان استمرارعملية النمو الجرثومي سيتم بدون اي مشاكل وهذا مايسمى يالزرع المستمر Continuous cultivation او النمو المستمر Continuous growth والاسس التي يعتمد عليها هذا النوع من الزرع هي تزويد الكائن المجهري وبسرعة مثلى للمواد الغذائية وبكميات ملائمة بحيث توفر تكاثرا منتظما لهذا الكائن حيث يستمر النمو بالطور اللوغارتيمي ويستمر الانقسام بصورة منتظمة والحصول على النمو الامثل يجب توفير الظروف المقلى للنمو ليس للزرع ككل ولكن للخلية الواحدة مثل الوسط لتزويده بالكميه الكافية للاوكسجين واحداث انتشار متجانس وصحيح للوسط الزرعي في جهاز او نظام الزرع المستخدم وتوفير الظروف المثلى للنمو يتطلب معرفة وافية لطبيعة الزرع والتنسيق بين النمو واضافة المواد الغذائية والحفاظ على حجم ثابت للزرع وبكثافة ثابته للنمو اصبح الاساس الذي يعتمد عليه بعض من الاجهزة المستعملة للزرع المستمر والمسماة الموازن الضوئي او منظم العتمة Turbido stat وسمي هذا الجهاز بالاسم اعلاه لانه مزود بوسيلة ضوئية Photoelectric device تتابع وباستمرار كثافة المزرعة عن طريق قيم امتصاصها للضوء تعكس كثافة النمو الحاصلة والتي على اساسها زيادة او تقليل معدل الاضافة للمادة الغذائية والوسط الزرعي الجديد المضاف يستعمل حال اضافته ولاتطرح اية كميات غير مستغلة منه عند ازالة كمية من الزرع . والنوع الاخر من الاجهزة المستعملة مختبريا للزرع المستمر تسمى الموازن او المنظم الكيميائي Chemo stst وفيه يمكن السيطرة على كثافة الزرع مباشرة ولكن تركيب الزرعي يكون بالشكل الذي يعمل فيه الوسط الزرعي بجميع مكوناته وبتراكيز اعلى مما يحتاجه الكائن الحي ماعدا مادة واحدة يعتمد عليها الكائن الحي وتضاف هذه المادة بتركيز محدد وكاف فقط لاحداث نمو محدود الكمية ويتم تنظيم إضافات الوسط الزرعي الجديد اثناء انقسام الخلايا لكي تحصل على زرع تكون معظم خلاياه في مرحلة معينة من النمو المنظم المستمر .

نظام الموازن الكيمائي مستقر لانه ذاتي التصحيح فاي زيادة او نقصان في معدل اضافة الوسط الجديد وما يتريب عليه من نقص في المزرعة من خلال سحب الفائض يقابله ما يكافؤه من زيادة او نقصان في معدل النمو فلو افترضنا ان الموازن الكيمائي في حالة ثبوت Steady stat وزدنا من معدل اضافة الوسط الطازج فماذا يحصل ؟

سيزداد معدل فقدان الخلايا في المزرعة مؤقتا متجاوزا معدل تكوين الخلايا مما يؤدي الى نقصان في كثافة النمو في المزرعة وبذلك يتم استهلاك المادة المحددة للنمو بمعدلات اقل مما كانت عليه من قبل مؤديا الى زيادة تركيزها في المزرعة والذي يؤدي بعد ذلك الى زيادة في معدل النمو نتيجة لزيادة استهلاك المادة المحددة (والتي يزداد تركيزها) حيث يوازن معدل فقدان الخلايا من خلال حجم المزرعة المطروح اما اذا خفضنا معدل اضافة الوسط فستحدث سلسلة من الاحداث المعاكسة لما ذكرنا اعلاه . ولهذا غان معدل النمو في نظام الموازن الكيميائي ينظم ليوازن فقدان الخلايا فيبقي تركيزها ثابتا . في المنظم الكيميائي تكون سرعة اضافة الوسط الجديد الى الزرع هي العامل الاهم المسيطر على نمو الكائن الحي فيها ويمكن الوصول الى تلك العلاقة بصيغة رياضية فلو كان :

حجم المزرعة =V ، (Flow rate)معدل الاضافة =F مقاس بوحدة الحجم / الزمن ،MRT (Mean Residence Time)= معدل مدة البقاء ويساوي معدل الوقت الذي يقضيه الكائن في وعاء الزرع

$$MRT = V/F \quad _____ 1$$

ويكون معدل التخفيف : (D) Dilution rate مساويا لمعكوس MRT ويساوي :

$$D = F/V \quad _____ 2$$

D = معدل التخفيف = نسبة سرعة اضافة الوسط الزرعي الجديد الى حجم الزرع وتساوي عددالحجوم من الوسط الجديد والتي تمر من خلال وعاء الزرع .

وفي حالة التوازن Steady stst يكون :

معدل انتاج الخلايا اثناء النمو = معدل فقدان الخلايا خلال الحجم الفائض

$$Dx/dt = kx \quad _____ 3$$

حيث k = معدل النمو

X = تركيز الخلايا

ويعبر عن فقدان الخلايا خلال الحجم الفائض بالمعادلة التالية :

$$Dx/dt = F/V * X \quad _____ 4$$

حيث D = معدل التخفيف

X = تركيز الخلايا

وبما انه في حالة Steady stat والتي يكون فيها معدل انتاج الخلايا اثناء النمو = معدل فقدان الخلايا خلال الحجم الفائض فيكون :

$$KX=DX _____ 5$$

وبحذف X من الطرفين تصبح المعادلة كالتالي :

$$K = D \text{ معدل النمو} \quad \text{معدل التخفيف } D _____ 6$$

اي ان معدل النمو يكافأ معدل التخفيف في الموازن الكيميائي . ويعبر عن اي تغير في تركيز الخلايابالمعادلة التالية :

$$Dx/dt=KX-DX _____ 7$$

اي ان التغير في تركيز الخلايا يساوي معدل نمو البكتريا مطروح منه معدل تخفيف الخلايا .

ففي المنظم الكيميائي يتحدد معدل النمو على تركيز المادة الغذائية المحددة للنمو فالمعادلة التالية تحدد العلاقة بين (K) معدل النمو عند اي تركيز من تركيز المادة المحددة للنمو وبين معدل النمو الاقصى K_{max}

$$K=K_{max}(S/K_s+S) _____ 8 \quad \text{First order kinetics}$$

K = معدل النمو النوعي عند تركيز S

S = تركيز المادة الخاضعة للتفاعل (او المحددة للنمو)

K_{max} = معدل النمو النوعي عندما يكون تركيزالمادة المحددة للنمو بدرجة الاشباع

K = ثابت قيمته العددية تساوي تركيز المادة المحددة للنمو والخاضعة للتفاعل

فعند تعويض معادلة رقم (8) بمعادلة رقم (5) يكون الاتي :

$$XK_{max}(S/K_s+S)=DX _____ 9$$

$$K_{max}(S/K_s+S) = D$$

$$K_{max}S=(K_s=S)D$$

$$K_{max}S - DS=K_sD$$

$$S(K_{max} - D) = K_S D$$

$$S = K_S D / K_{max} - D _____ 10$$

المعادلة رقم (10) تزودنا بالعلاقة الاساس بين تركيز مادة التفاعل (المادة المحددة للنمو S) وبين معدل التخفيف D واشتقت هذه المعادلة على اساس التوازن الحاصل في وزن الخلايا الجافة اثناء تشغيل الموازن الكيميائي .

وبامكاننا ان نحصل على علاقة هامة بين كتلة الخلايا وتركيز المادة المتفاعلة اذا ما اخذنا هذه المرة التوازن في استهلاك المادة المتفاعلة المحددة للنمو . ففي حالة الموازن او المنظم الكيميائي يبقى تركيز المادة المتفاعلة (S) ثابتا اي :

المادة المضافة = المادة المستعملة للنمو + المادة المفقودة من خلال الحجم الفائض

$$DSr = (dx/dt)(ds/dx) + Ds _____ 11$$

تتناسب كمية الخلايا الناتجة من النمو على وسط زرعي مع تركيز المادة المحددة للنمو اذا توفرت بقية المغذيات بتراكيز تفيض عن حاجة الخلايا اثناء النمو ويعبر رياضيا عن هذه العلاقة كما يلي

$$(dx/dt) = y(ds/dt) _____ 12$$

Y = معامل الانتاج او معامل الحاصل yield facter

وزن الاحياء النامية / وزن المادة المستهلكة $Y = dx/ds$ _____ 13

$$Dx/dt = y\, ds/dt$$

تحذف dt من طرفي المعادلة وتصبح

$$Dx = yds$$

$$1/y = ds/dx _____ 14$$

$$Dx/dt = kx _____ 15$$

وبتعويض معادلتي 14 و 15 في معادلة 11 يصبح

$$DSr = (kx/y) + Ds$$

وفي حالة التوازن يكون معدل النمو = معدل التخفيف

D=K تنتج المعادلة رقم 16 كالاتي

$$Kx/y = D(Sr-S)$$

$$X=yD(Sr-S)/k \quad _____ 16$$

$$X=y(Sr-S)$$

المادة المفقودة المادة المضافة

ويتضح من هذه العلاقة العكسية بين تركيز الخلايا وتركيز المادة المحددة للنمو (اي بين X وs) وتركيز الخلايا في المزرعة المنماة ، بهذا الاسلوب يبقى تقريبا ثابتا على امتداد مدى واسع من التخافيف ويفقد نظام الموازن الكيمياوي استقراريته عندما تزداد قيمة معدل التخفيف عن قيمة الحرجة للتخفيف Dc حيث يقود هذا الى عملية غسل الخلايا من المزرعة Dc=critical dilution value