محاضرة رقم (3) : فسلجة احياء مجهريه دكتورة : ايمان عبعوب

النمو

يعرف النمو بانه الزيادة المنسقة والمنتظمة في مكونات الخلية وهو نتاج تفاعلات كيمياوية غاية في التعقيد والتنظيم ويؤدي النمو الى زيادة اعداد الاحياء وحيدة الخلية ماعدا الاحياء متعددة النوى اما في الاحياء متعددة الخلايا فان النمو يؤدي الى زيادة عدد الخلايا وبالتالي الى الزيادة في حجم ذلك الكائن .

ان الزيادة الحاصلة في كتلة الخلايا المجهرية قد لا يعتبر تغيرا حقيقيا عن النمو لان كهذه قد تنتج من زيادة في احدى المواد المخزونة بالخلية كما يحصل احيانا في خلايا الفطريات ، ليست الزيادة في الاعداد وعند استثناء هذه الحالة – اي زيادة المواد المخزونة – فان الزيادة في الكتلة يمكن ان تعكس صورة عن النمو .

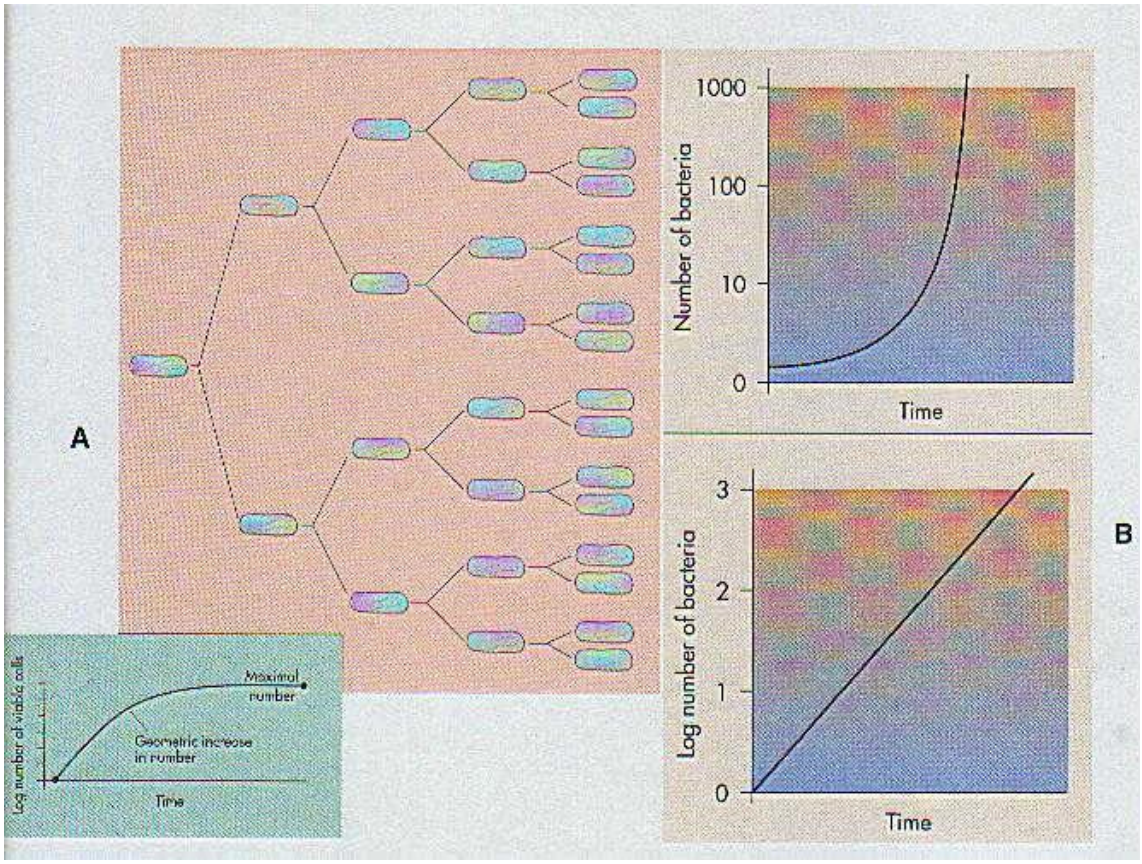
يقود النمو في خلية البكتريا عادة الى انقسامها الى خليتين متشابهتين ويعني ذلك ان النمو والتكاثر في البكتريا مرتبطان بشكل وثيق بحيث يغلب استعمال مصطلح النمو ليغطي كليهما .

تختلف الانواع البكتيرية في الوقت اللازم لبناء خلية متكاملة كذلك تختلف بهذا الشأن حتى في النوع الواحد فبناء خلية جديدة عائدة الى *E.coli* يستغرق (40)دقيقة اذا مانميت في وسط زرعي من الاملاح اللاعضوية وقليل من الكلوكوز بينما يختزل هذا الوقت الى النصف فيما لو نميت تلك الخلايا في وسط زرعي غني بمتطلبات النمو . عموما فالنمو السريع ميزه انفردت بها البكتريا عن باقي الاحياء .

وفيما يتعلق بنمو الخلية المفردة فمع انه يشتمل زيادة منسقة لمكونات الخلية الا ان الاجزاء المختلفة من الخلية لاتحدث فيها الزيادة بالوقت ذاته انما يحصل ذلك ضمن سياق معين. فالخلية العصوية من نوع *E. coli* يحدث فيها اولا زيادة في الطول الامر الذي يتطلب مدا او زيادة في جدار الخلية وغشاءها وهو الذي يوحي بان مواد جديدة تضاف بشكل وباخر الى الجدار او الغشاء دون احداث خلل في خصائصها فيبدو ان نمط الاضافة يكون اكثر وضوحا في حالة الخلايا الكروية الشكل منه في الخلايا العصوية حيث يتكون جدار عرضي قريبا من مركز الخلية قاسما الخلية الام بعد بلوغها ضعف حجمها الاصلي الى خليتين متقاربتين في الحجم والوظيفة ولعملية تضاعف DNA دور في عملية انقسام الخلية ويوجد اختلاف ملحوظ بين الانواع الجرثومية في نمط بناء الجدار العرضي وتوزيع مادة الخلية الى الام الى الخليتين البنةيتين ومدى ارتباط الخلايا الناتجة من الانقسام يتوقف توليد خلية البكتريا لخلايا جديدة على مدى ملائمة البيئة لذلك وبالرغم من وجود اختلافات مابين انواع البكتريا في تفاصيل عملية الانقسام فان نمو الخلايا البكتيرية في وسط زرعي سائل يخضع لقواعد معينة

ديناميكيات نمو الجماعة البكتيرية Dynamics of bacterial population growth

يمكن قياس نمو الجماعة البكتيرية بدلالة الزيادة في عدد الخلايا القابلة للحياة viable cells ويعبر زمن التضاعف (الجيل) doubling or generation time بصورة مناسبة عن معدل نمو الجماعة البكتيرية . تكون الزيادة في اعداد الخلايا في الجماعة البكتيرية النامية لوغاريتيمية او اسية Exponetial or Logarithmic وذلك لان كل خلية منها تكون خليتين يكون كل منها بدوره خليتين اثنين – فيصبح المجموع اربعة خلايا – وهكذا ولو مثل عدد الخلايا برسم بياني مقابل زمن الحضن يتولد خطا مستقيما عندما يكون المحور الصادي y (الاحداثي الراسي ordinate) يمثل عدد الخلايا مقياسا لوغارتيميا ولااحداثي السيني X (الاحداثي الافقي abscissa) يمثل زمن الحضن مقياسا حسابيا يشير الخط المستقيم الى وجود نسبة مئوية مماثلة للزيادة في عدد خلايا خلال اية فترة زمنية ثابته



شكل A : يوضح طريقة تكاثر البكتريا و B يوضح مخطط بياني مابين اختلاف في اعداد الخلايا البكتريا مع الزمن مقارنة مع لوغاريتيم عددها في اوقات مختلفة

يعتمد العدد الكلي للخلايا على عددها الموجود اولا وعدد الاجيال وحيث ان العديد من البكتريا تستطيع الانقسام بفترات قصيرة قد تصل احيانا الى (10) دقائق لهذا يصل عدد الخلايا في الجماعة البكتيرية الى مستويات عالية بزمن قصير نسبيا وبالتالي فمن المناسب جدا ومن الضروري احيانا تعين عدد الخلايا في الجماعة على المقياس اللوغارتيمي فتكون معادلة النمو الاساسية كالتالي :

$$N_t = 2^n N_0 _____ 1$$

N_t = عدد الخلايا البكتيرية بعد فترة من الزمن مقدارها (t)

N_0 = العدد الاولي للخلايا البكتيرية (قبل الانقسام والتضاعف)

n = عدد الاجيال (عدد التضاعف)

2 = باعتبار ان اعداد الخلايا البكتيرية تتضاعف بعد الانقسام (يصبح العدد ضعف العدد الاصلي)

ان رسم منحني النمو بين لوغاريتم العدد او لوغاريتم الكتلة وبين الزمن يفضل على رسم المنحني باعداد الخلايا او الكتلة (دون اخذ لو غاريتمها) وذلك لما يلي :

1 – عدم وضوح ما يحصل من انقسامات في الزرع وفي الفترات الاولى من النمو الا عندما تصبح الاعداد كبيرة .

2 – يمكن معرفة التغاير الحاصل في سرعة نمو الزرع لعدة مزارع .

حساب ثابت السرعة للنمو Measurement of growth rate constant

ويعرف بانه عدد الاجيال او التضاعفات الحاصلة في زرع معين لكل وحدة زمن اي كمية النمو الحاصل في كل جيل او تضاعف ويساوي

$$K=n/t _____ 2$$

حيث K = معدل الزيادة لكل جيل ويسمى ثابت سرعة النمو على اساس ان سرعة النمو (معدل الزيادة)ثابته .

n= عدد الاجيال (عددالتضاعف) t =الزمن (زمن التضاعف)

ومن المعادلة رقم (2) يصبح $n=kt$

وبتعويض معادلة رقم (3) في المعادلة رقم (1) يصبح كالاتي

$$N_t = 2^{kt} N_0 _____ 4$$

ناخذ $\log_2$ لطرفي المعادلة رقم (4) فتصبح كالاتي

$$Log_2 N_t = log_2 2^{kt} log_2 N_0$$

$$Log_2 N_t/log_2 N_0 = log_2 2^{kt} = 1x\ kt$$

$$Log_2 N_t/N_0 = Kt$$

$$Log_2 N_t - log_2 N_0 = kt$$

$$K = Log_2 N_t - log_2 N_0 / t _____ 5$$

(t) في المعادلة رقم (5) = التغير في الزمن = $t_1 - t_0$

t_1 = الزمن الاخير (حيث اعداد البكتريا N_1

t_0 = الزمن الاول (حيث اعداد البكتريا N_0

ولحساب زمن الجيل والذي يعرف بانه الوقت الذي يستغرقه الزرع لكي يضاعف عدده فيكون كالتالي :

$$G = t/n$$

$$G = 1/n$$

معادلة رقم (5) قلنا بأنها تصح إذا تذبذبت هذه السرعة كمايحصل في المزارع المستمرة فلا يصح استعمالها عندئذ ، لذا يجب حسابها بطريقة اخرى وكما يلي :

حيث يستعمل في هذه الحالة ثابت سرعة النمو الآني او اللحظي (Instantantaneous) ويرمزله μ ويمكن حسابه كالاتي

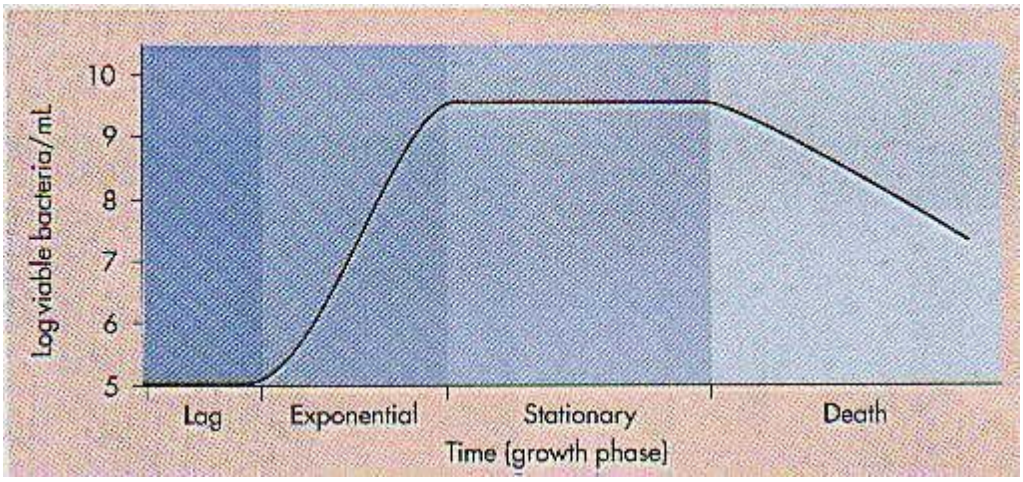
$1/0.693 = 1/\ \mu$

اطوار النمو البكتيري Phases of bacterial growth :

تنمو الاحياء المجهرية بطريقتين اما بازدياد العدد او بازدياد الحجم اوبكلايهما ولكن هنا النمو لايمكن ان يستمر الى ما لانهاية بسبب تحديد الغذاء المتوفر او تراكم المواد المطروحة نتيجة الفعاليات الحيوية والتي تكون سامة ومثبطة للنمو ويحدث هذا الامر في البيئة بصورة طبيعية واذا لم يحدث فان الاحياء المجهرية قد تطغى على الكرة الارضية نتيجة لنموها اللوغاتيمي

وقصر فترة زمن جيلها فيتوقف نمو المزارع البكتيرية عندما تصل كثافة نموها الى 10^7 خلية (في البيئة بصورة طبيعية).

فبعد ان يتوقف نمو الاحياء المجهرية تبدا اعدادها بالتناقص واذا كان الزرع راكدا اي لا توجد اضافة لمواد غذائية جديدة او ازالة للمواد السامة عندئذ يمر النمو باطوار مختلفة تعرف باطوار النمو . البكتيريا والخمائر تمران بنفس الاطوار رغم اختلافهما بكمية الزرع الناتج والفترات الزمنية للاطوار المختلفة . درست اطوار النمو في البكتريا بصورة اوسع من بقية الاحياء المجهرية الاخرى لذلك سنختار مثالا لهذه الدراسة ، عندم تنقل بكتريا من وسط لاخر تجتاز الجماعة البكتيرية تعايشا مميزا معروفا في معدل زيادة عدد الخلايا كما في الشكل التالي .



والاطوار المصنفة لهذا التعاقب هي :

1 – طور الركود Lag phase

2 – طور النمو اللوغارتيمي او الآسي Exponential or Logarithmic phase

3 – طور الثبات Stationary phase

4 – طور الهلاك او الموت Decline or Death phase

1 – طور الركود او التطبع Lag phase

عندما تنقل البكتيريا من وسط الى اخر جديد لا تزداد اعداد البكتيريا القابلة للحياة مباشرة ولكن تنمو كل خلية فيها وذلك بزيادة كتلتها اذ تكبر الخلايا بالحجم ويحدث تخليق شامل لكل المحتويات الخلوية . تعد هذه الفترة مرحلة تجهيز (tooling up) اي النمو دون انقسام خلوي حيث تخلق الخلية وتتراكم الجزيئات المطلوبة للانقسام واكثر هذه الجزيئات اهمية هي جزيئات ATP التي تمثل عمله الطاقة والمصدر المجهز لها . كذلك الرايبوسومات المطلوبة لتخليق البروتينات واخيرا الانزيمات الضرورية للنمو .

والوقت الذي يستغرقه التطبع او التاخير في الانقسام يختلف من حالة الى اخرى يطول هذا الوقت اذا كانت الاختلافات كبيرة في مكونات الوسط الجديد عن مكونات الوسط القديم والحالة بالعكس تماما فيما اذا تشابه الوسطان القديم والجديد في مكوناتهما .

فعندما تنقل بكتريا كانت نامية على وسط حاوي على سكر الارابينوز الى وسط حاوي على سكر الكلوكوزفانها لاتاخذ فترة تطبع طويل بسبب استمرارها بالانقسام لانها تملك الانزيمات الخاصة باستغلال المصدر الغذائي في الوسط الجديد بجاهزية جيدة توفر لها فرص استغلال الكلوكوزبسرعة كبيرة وبنتاجية اوفر .

اما لو نقلت هذه البكتريا النامية على وسط الارابينوز الى وسط حاوي على سكر الزايلوز فانها تحتاج الى فترة تطبع او تكيف طويلة لانها تحتاج ان تبني انزيمات قادرة على استغلال سكر الزايلوز . ان هذه الانزيمات التي تتكون تحت تاثير المادة التي يعمل عليها الانزيم تسمى بالانزيمات المستحثة او المتكيفة Induced or Adaptive enzyme في بعض الاحيان تكون معظم الخلايا البكتيرية في اللقحة المنقولة غير قادرة على استغلال المادة الغذائية الوسط الجديد ولكن هنالك نسبة قليلة من هذه الخلايا تستطيع ات تستغل المصدر الغذائي في الوسط الجديد هذه النسية القليلة من الخلايا المختلفة عن المجموع العام للقحة البكتيرية والتي يمكن ان نطلق عليها بالخلايا الطافرة تحتاج الى وقت اطول لكي تتكاثر في اعدادها وتصبح هي الخلايا السائدة ولذا فمقارنة بالاعداد السابقة للقحة البكتيرية المستعملة لايبدو بان هنالك اي زيادة واضحة في الاعداد البكتيرية .

لا يحدث طور التطبع في حالة نقل اللقاح من زرع كان في طور النمو الاسي او اللوغارتيمي ووضعه في وسط جديد له نفس المكونات الغذائية للوسط الذي كان فيه وطول طورالتطبع في هذه الحالة يعتمد على طول او قصر زمن الجيل او التضاعف .

اذا اخذنا اللقاح من زرع في طور الثبوت ونقلناه الى وسط جديد فان طور التاخر الحاصل يمكن تفسيره بالوضع الكيمياوي للخلايا حيث تمتلك الخلايا نسبة اقل من الرايبوسومات ربما ان كمية البروتين المتكونة تعتمد على كمية الرايبوسومات فيحصل تاخير في تكوين البروتين وبالتالي يحصل تاخير في النمو كما وان الخلايا اللقاح هذه صغيرة الحجم ويجب عليها ان تكبر في حجمها قبل ان تنقسم . اما اذا اخذنا اللقاح من الزرع وهو في طور اللقاح او الانحدار والذي يحتوي على الكثير من الخلايا الميته فالخلايا هنا في طور التطبع لاتزداد في الكتلة فقط ولكن يزداد تاثرها بالعوامل الاخرى كالحرارة والضغط الازموزي وتحتاج الى فترة تطبع اطول .

2 – طور النمو اللوغارتيمي او الآسي Exponential or Logarithmic phase

تنقسم الخلايا خلال هذا الطور الى اقصى معدلاتها والطريقة الملائمة للتعبير عن معدل نمو المزرعة تكون بدلالة عدد الانقسامات الخلوية التي تحدث في كل ساعة ان المزرعة التي يكون زمن جيلها (generation time) 30 دقيقة لها معدل نمو 2 في حين تلك التي تملك زمن تضاعف 60 دقيقة فانها ذات معدل نمو 1 . كلما كان معدل النمو اكبر كلما كان تضاعف الخلايا اسرع . ويبدا هذا الطور عندما تكون سرعة النمو ثابته وخلال هذا الطور تكون جميع الخلايا حية تقريبا وحجمها ثابت وان الاضافة الحاصلة في كمية البروتوبلازم لها علاقة ثابته

مع الاعداد وان قياس الزيادة الحاصلة في الكثافة او العدد يعطي فكرة عن الزيادة الحاصلة في النهاية ويقال عن الزرع في هذا الطور بانه متوازن اي ان محتويات الخلايا الموجودة تزداد بصورة متساوية وبمعامل أسي . ان القيمة العددية لثابت سرعة النمو تتاثر بعوامل عديدة منها وراثية ومنها بيئية فالنمو المتوازن يكون غير محدد عندما تكون مكونات الوسط الزرعي متوفرة بكثرة بحيث لاتحد من سرعة النمو التي وصل اليها الزرع لذا يعرف النمو المتوازن بانه النمو الذي تحصل فيه زيادة عددية وبسرعة اسية للاحياء او اي من مكوناتها ويحصل ثبوت لاحجام الخلايا تكافىء سرعة النمو للخليتين المتولدتين حديثا . ومن العوامل الوراثية التي تؤثر على ثابت سرعة النمو هي فترة زمن الجيل حيث تختلف فترة زمن الجيل باختلاف انواع الاحياء المجهرية فبعض انواع البكتيريا المعوية لها زمن جيل يترواح بين 15-30 دقيقة بينما نجد زمن الجيل في البكتريا المسببة لمرض السل يصل الى 15 ساعة

3 – طور الثبات Stationary phase

تصل الخلايا الى طور الثبات عندما لايزداد العدد الكلي للخلايا القابلة للحياة وقد ينتج هذا الثبات في اعداد الخلايا من احد حدثين مختلفين معتمدة في ذلك على الكائن الحي والظروف الغذائية حيث تتوقف كل خلية في الجماعة عن التضاعف دون موت اي منها ا وان يكون هناك توازن في انقسام الخلايا وموتها ويبقى العدد الكلي للخلايا القابلة للحياة في كلا الحالتين ثابتا مع ذلك يزداد العدد الكلي للخلايا الحية والميته في الحالة الثانية . يتغير أمد هذا الطور معتمدا على نوع الكائن الحي والظروف البيئة حيث تبقى بعض الاحياء لبضع ساعات فقط في حين تبقى احياء اخرى لعدة ايام . وعموما اذا تراكمت النواتج السمية في الطور الآسي تبدا الخلايا عند ذلك بالموت سريعا حيث تنحل بعض الخلايا بصورة سريعة جدا حالما يتوقف تضاعفها بفعل الانزيم المحدث للانحلال lytic enzyme الموجود في الجدار الخلوي وقد يكون هذا الانزيم هو نفسه المختص باتساع جدران الخلايا خلال انقسامها . يتوقف نمو الزرع البكتيري اما لنفاذ المواد الغذائية او ازدياد المواد المطروحة خارج الخلية نتيجة فعالياتها الحيوية .

4 – طور الهلاك او الموت Decline or Death phase

تؤشر بداية هذا الطور بالنقصان الحاصل في العدد الكلي للخلايا القابلة للحياة في الجماعة ، تموت الخلية عندما لا تكون قادرة على التضاعف وسرعة الموت في هذا الطور تكون اسية ايضا ولذلك يصبح تطبيق المعاملات الحسابية المعطاة لحركيات النمو على هذا الطور واذا قسنا كتلة الزرع في هذا الطور نجد انها ثابته او تاخذ بالانحدار البسيط حتى لو كانت اعدادا كبيرة من الخلايا ميته وخاصة اذا لم يحدث انحلال للخلايا ولكن لو حصل التحلل للخلايا فان كتلة الزرع تقل مع العدد الحي ان موت الخلايا نتيجة لانعدام الغذاء لايكون فجائيا في هذا الطور لان عدم توفر الغذاء في الوسط الزرعي يؤدي الى استغلال خزين المواد داخل الخلية ولفترة من الزمن اذا انتهى هذا الخزين فإنها تلجأ الى استغلال وحرق بعض تراكيبها للاستمرارفي اداء فعالياتها الحيوية اما اذا كان موت الخلايا يحدذ نتيجة تراكم السموم فان سبب الموت يعتمد على طبيعة السم وميكانيكية تاثير هذا السم وموقع تاثيره على التراكيب الخلوية او الانزيمات .... الخ وقد يتواجد البوغ الداخلي Endospore وهو اكثر الاشكال الخلوية مقاومة في بعض

المزارع البكتريا خلال هذا الطور وهذه الابواغ الناشئة من الخلايا الخضرية خلال طور الثبوت اكثر مقاومة للموت في هذا الطور من الخلايا الخضرية .

قياس النمو Measurement of growth

الخيار في قياس النمو يحدده مدى سهولة ودقة الطريقة المتبعة لتحقيقه ومن الطرائق المتبعة في قياس النمو البكتيري هي :

1 – حساب اعداد الخلايا الحية

2 – حساب العدد الكلي للخلايا (الحية والميته)

3 - حساب وزن الخلايا الجاف

4 - قياس الكثافة الضوئية للنمو البكتيري (قياس غير مباشر لتقدير كتل الخلايا من قياس تشتت الضوئي الحاصل بواسطة الخلايا البكتيرية)

5 – تقدير بعض مكونات الخلية مثل DNA, RNA ، البروتين او بعض مكونات جدار الخلية

1 - حساب اعداد الخلايا الحية

يستند حسابها على قدرتها على تكوين المستعمرات وتتطلب خطوات العمل تخفيف المزرعة او العينة بشكل مناسب وتوزيع العينات المخففة على وسط متصلب يتبعه حساب المستعمرات النامية بعد فترة حضن مناسبة لهذه الطريقة بعض السلبيات منها : تداخل عمليات النمو اثناء فترات التخفيف ، واختلاف اعداد الخلايا وان تساوت الحجوم الماخوذة من العينة ذاتها ويعزى ذلك الى حقيقة كون الخلايا موزعة عشوائيا في المعلق . كذلك يمكن تحديد عدد الخلايا الحية بطريقة تخفيف حتى النهاية Dilution end point method يدعى العدد المستحصل بهذه الطريقة بالعدد الاكثر احتمالا Most Probable Number (MPN) لكونه مشتقا باسلوب احصائي فالمزرعة او العينة تخفف بحيث تنتهي بتخفيف من المحتمل جدا ان يكون خاليا من البكتيريا الحية بعدها يضاف ذلك الحجم المخفف الى سلسلة من الانابيب المحتوية على وسط زرعي مناسب وتحضن الانابيب بعد تلقيحها بالعينة المختبرة فاذا افترضنا ان الانابيب ذات الاوساط الرائقة لم تستلم اي من الخلايا الحية وان الانابيب التي تبدو فيها الاوساط عكرة قد احتوت على خلية او اكثر فيكون بالامكان حساب معدل عدد الخلايا الحية (m) في العينة المزروعة من الصيغة التالية :

$P(o) = e^{-m}$ حيث تمثل p(o) نسبة الانابيب الرائقة

تعتمد الطريقة اعلاه على ملاحظة ظهور مستعمرات (ايا كانت الطريقة المستعملة في العزل والتعداد) او العكورة بالعين المجردة

2 – حساب العدد الكلي للخلايا :

وهذا الحساب يحدد مجهريا بتعداد الخلايا باستخدام مايسمى بحجرة العد counting chamber او بعدادات الكترونية كعداد كولتر Colter counter وتعمل هذه العدادت الالكترونية على اساس التوصيل الكهربائي لخلية البكتيرية اقل مما هو عليه للمحلول الفسلجي والعداد يتكون من حجرتين متصلتين احداهما والاخرى من خلال ثقب او فتحة صغيرة ولعد البكتريا تضاف العينة الى احدى الحجرتين ومنها تضخ ببطئ الى الحجرة الاخرى فكل مرة تمر فيها خلية بكتيرية من خلال الفتحة ينخفض التوصيل الكهربائي وينتج عن ذلك اشارة فولتية puls وحساب هذه الاشارات يعني حساب اعداد البكتيريا واذا ماحددنا حجم المعلق المضخ خلال الفتحة يصبح من السهل تحديد تركيز الخلايا بسرعة في ذلك المعلق وان الاشارة الفولتية تتناسب مع حجم الخلية المارة من خلال الفتحة وبذا نحصل على توزيع حجمي للخلايا بالاضافة الى تركيزها .

3 – حساب وزن الخلايا الجاف

ويتم بعزل الخلايا البكتيرية من الوسط الزرعي اما بالترشيح او النبذ (الطرد المركزي) ثم غسلها بالماء المقطر لازالة ما علق فيها من مواد موجودة في الوسط الزرعي ثم تجفيفها عند درجة حرارة 105 ° م ولانها تتطلب كثير من حجم المزرعة فانه لا يصلح استخدامها بشكل مستمر ودوري لاغراض متابعة النمو البكتيري كما ان وزن الخلايا الجافة قد لايكون دائما مؤشر لكمية المواد الحية في الخلية فمثلا تتكدس مادة B-hydroxyl butyrate في بعض البكتريا في نهاية الطور الاسي وخلال طور الثبات مكونه مايقارب 74 % من وزن الخلايا الجافة

4 – قياس الكثافة الضوئية للنمو

خواص تشتت الضوئي تخدمنا بطريقة سريعة وبسيطة لكنها غير مباشرة لتقدير كتلة الخلايا او متابعة النمو الاساس النظري الذي ترتكز عليه هذه الطريقة هو ان الضوء المسلط على معلق بكتيري تقل شدته بما يعادل مجموع الضوء الممتص والمشتت من قبل الخلايا . وبما ان امتصاص البكتريا للضوء عادة لايشكل الا قدرا ضئيلا من النقص الحاصل في شدة الضوء لان معظم الخلايا غير ملونة فلذا يعزى ذلك النقص الحاصل في شدة الضوء المسلط الى تشتيته الحاصل بفعل الخلايا البكتيرية . ان كمية الضوء المشتت تتناسب مع نسبة حجم الدقائق الى طول موجة الضوء الساقط ولذا يكون القياس اكثر دقة (حساسية) كلما قصر طول الموجة فمن المفيد تغير طول الموجه اما الى منطقة يتعاظم فيها التشتيت لكي تزداد حساسية او دقة الجهاز في الاستشعار او الى منطقة لايحدث فيها امتصاص للمواد الملونة الموجودة في الوسط الزرعي . يستعمل جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer حيث يقاس الضوء غير المشتت بحيث تكون وحدة الاستشعار الضوئي يزاوية 180 ° م نسبة الى الضوء الساقط والمطياف الضوئي جهاز مصمم اصلا لقياس الامتصاص Absorbance والذي يساوي :

$$A=\log I_0 / I$$

I_0 =نسبة الضوء الساقط

I = نسبة الضوء المار

وللامتصاص علاقة بتركيز المحلول حسب قانون Lambert – beer حيث :

$$A=eIC$$

e = معامل الامتصاص

l = طول مسارالضوء في المحلول

C = تركيز المادة المذابة

فاذا عرفت قيمة e ، l وقسنا A بالمطياف الضوئي يسهل علينا معرفة C .

والبكتريا تختلف عن المواد المذابة فهي تشكل معلقا وليس محلولا وقياس اي او كما يسمى غالبا بالكثافة الضوئية Optical Density (OD) للمعلق البكتيري لا يمثل قياسا مباشرا لتركيز الخلايا ولما كان للتشتيت الضوئي الجزء الاكبر في عملية القياس فان قيمة A تعتمد على التصميم الهندسي للجهاز المستعمل وينبغي تغير Calibration الجهاز حين قساس معلق بكتيري معين وذلك بحساب اعداد الخلايا البكتيرية به وقياس الوزن الجاف لهذه الخلايا بالاضافة الى قياس الامتصاصية لتخافيف معلومة من المعلق

5 – تقدير بعض مكونات الخلية

حيث يستعمل القياس الكيمياوي لمكونات الخلية لغرض متابعة نمو الخلايا مثل قياس البروتين او DNA او مكونات الجدار خصوصا عندما تميل الخلايا للتجمع او الترسب السريع مما يقلل من مصداقية قياس الكثافة الضوئية ويمكن تقدير المكونات الخلوية بتحديد تحويل مواد مؤشرة ة بنظائرمشعة الى مكونات خلوية تاخذ الخلايا حوامض امينية مشعة لتحديد البروتين اة اخذ الخلايا للمركبات المشعة في الوسط الزرعي لعدة اجيال فالكمية الماخوذة من هذه المواد المشعة يمكن اعتمادها مباشرة لتحديد معدل النمو برسم لوغارتيم النشاط الاشعاعي في الخلايا مقابل الوقت اما اذا اضيفت المواد المشعة بعد ان تكون المزرعة قد بلغت كثافة ملموسة فكمية النشاط الاشعاعي في هذه الحالة تعكس كمية ما حول من مواد مشعة الى مواد خلوية وتكون المعادلة كالاتي :

$$dz / dt = k(Z^* + Z_0)$$

Z^* = كمية المكونات الخلوية المتضمنة مواد مشعة

Z_0 = كمية المكونات الخلوية قبل اضافة المواد المشعة

تعاريف مهمة

النمو غير محدود Unrestricted growth

وفي هذا النوع من النمو يتحدد معدل النمو growth rate بمجمل المواد الداخلة في الوسط الزرعي وليس بتركيز اي منها وفي هذا النوع يتناسب معدل الزيادة في عدد الخلايا في المزرعة مع عدد الخلايا الموجودة في اي وقت من الاوقات

النمو الشاذ Aberrant (Linear) growth يكون النمو خطيا ومعدل زيادة محدود وبقدرة تحفيزية على الانقسام ثابته ويكون :

$$X=ct$$

حيث :

X = اعداد الخلايا البكتيرية (كثافة البكترية)

t = الزمن

C = ثابت يمثل القدرة الثابته على الانقسام والتضاعف (حيث تحدد القدرة على الانقسام في هذا النوع من النمو نتيجة لوجود كثير من العوامل المحددة للانقسام دون ان توقف النمو . مثل اضافة حامض p-Flurophenyl alanine مشابه للحامض الاميني phenyl alanine الى مزرعة بكتيرية فعند اضافته سيتم استخدامه في بناء البروتين الخلوي بدلا من الحامض phenyl alanine والبروتين الجديد المتكون والمتضمن شبيه الحامض سيكون غير فعال ولذا سيستمر بناء مكونات الخلية الا ان القدرة التحفيزية على الانقسام وتكوين خلايا جديدة ستكون محددة)

النمو المتزامن Synchronic growth

والذي تكون فيه المزارع البكتيرية ممثلة بخلايا في نفس المرحلة من الانقسام الخلوي الاعتيادي وبهذا يمكن اعتبار نتائج دراسة هذه المزارع وكأنها تمثل مايجري في الخلية المفردة

العوامل المؤثرة على النمو

يخضع النمو تحت تاثير العديد من العوامل منها :

ا– عوامل وراثية

تسمى العوامل الذاتية وهي العوامل التي تحدد تصرف الكائن الحي المجهري تجاه بيئته ومحيطه وهي المسؤولة عن التغاير في التصرفات بين نوع واخر موجدان في نفس البيئة ومن هذه العوامل الوراثية المؤثرة على النمو زمن الجيل الذي تكون السيطرة عليه وراثيا ولكن يمكن تقصيره او اطالته بتغييربعض العوامل البيئية لكن ضمن حدود السيطرة الوراثية فمثلا اذا كان الوقت الادنى لزمن الجيل 15 دقيقة لنوع بكتيري تحت ظروف ملائمة للنمو فلا يمكن تقصيره اكثر من الوقت اذا وفرنا ظروف بيئية ملائمة او مثالية للنمو .

ب – عوامل بيئية ومنها

1 – درجة الحرارة : النمو نتاج تفاعلات كيمياوية غاية في التعقيد والتنظيم لذا فمن المتوقع ان ينعكس امر درجة الحرارة في تلك التفاعلات على معدل النمو وقد وجد العالم ارينيوس Arrhenius العلاقة بين درجة الحرارة وسرعة التفاعلات الكيمياوية حسب المعادلة التالية

$$V=S^{-\blacktriangle E/RT} \quad _____ 1$$

صيغة المعادلة اللوغارتيمي للمعادلة (1) $\ln V = (-\blacktriangle E/R)(1/T)$

Constant+حيثV = سرعة التفاعل

▲E = طاقة التنشيط

R = ثابت الفايز

T = درجة الحرارة

S = ثابت محسوب

وقد وصف علماء الطبيعية تاثير درجة الحرارة على التفاعلات او العمليات الحياتية بعامل اطلق عليه اسم معامل الحرارة او قيمة Q_{10} والتي تساوي :

$$Q_{10} = kt+10/kt$$

حيث k = ثابت السرعة t = درجة الحرارة

وقيست قيمة عامل الحرارة لمنظم للعمليات الحياتية فوجدت انها تقع بين 3 و 4 عند درجة حرارة

(18-22 $^{\circ}$ م) وتقل هذه القيمه عند ارتفاع درجة الحرارة ، ان المدى الحراري للنمو في الاحياء المجهرية يقع بين (5 – 80 $^{\circ}$ م) وان هذه الحياء تختلف في تجاوبها مع الحرارة ضمن هذا المدى كل فعالية حياتية تقوم بها الاحياء المجهرية تؤثربدرجة الحرارة لها درجة حرارية دنيا وفضلى (مثلى) وعليا ان المدى الحراري الذي يكون فيه النمو على افضليه وبالسرعة القصوى يسمى المدى الحراري الافضل Optimum temperature وقيمة هذا المدى تعتمد على القياسات المعتمدة للنمو حيث يمكن استعمال سرعة النمو او النمو الكلي . وان الابتعاد عن

المدى الحراري الافضل بكلا الاتجاهين يؤدي الى نقصان في سرعة النمو الذي يكون محسوما جدا عند رفع درجات الحرارة عن درجة الحرارة المثلى ويكون النقصان في درجة اقل عندما تنخفض الدرجة الحرارية عن المثلى .

ان الحد الحراري الاقصى لنمو يتحدد بنوع الانزيمات او مدى تاثر البروتينات داخل الخلية بالحرارة اما الحد الأدنى فهو درجات الحرارية الاوطأ والتي يحدث فيها النمو وتتحدد هذه الدرجة بانجماد الماء وتركيز المواد المذابة فيه ، هذه الدرجات الحرارية الثلاث (الدنيا ، المثلى ، القصوى) تسمى درجات الحرارة الرئيسية Cardinal temperature وتختلف هذه الدرجات الحرارية لكل كائن حي مجهري باختلاف المواد الغذائية في الوسط واختلاف حالته الفيزياوية .

تقسم البكتريا الى ثلاثة اقسام استنادا الى مديات درجة الحرارة التي يحصل فيها النمو فالتي تنمو عند درجة حرارة 50 °م او اعلى تسمى البكتريا المحبة للحرارة Thermophilic والتي تنمو على احسن مايمكن عند درجة حرارة 37 °م تسمى الفة للحرارة المعتدلة Mesophilic وذلك تنمو عند درجة حرارة 5 °م او اقل تسمى الفة او محبة للحرارة المنخفضة (المحبة للبرودة) Psychrophilic تمتاز بروتينات البكتريا المحبة للحرارة العالية عن تلك الموجودة في الانواع الاخرى من البكتيريا في انها لاتمسخ عند درجات الحرارة العالية . ان هذا الثبوت الحراري thermostability لهذه البروتينات حقيقي يستند الى تركيب وتتابع الاحماض الامينية فيها حيث يؤدي تتابع هذه الاحماض الامينية الى تكوين اواصر قوية مثل الجسور التساهمية ثنائية الكبريتيد Covalent bisulfuide bridges والعديد من الاواصر الاخرى التي تثبت تركيب البروتين . قدرة الاحياء المجهرية المحبة للبرودة على النمو بدرجات حرارية قريبه من الصفر تنص على ان التنفس او النمو يستمران بخفض درجة الحرارة ولايتوقفا الا اذا انجمد الوسط الزرعي .

الاساس الكيمياوي لفقدان البروتين خواصه عند ارتفاع درجة الحرارة يكمن في الوهن الحاصل في الاواصر الكيميائية المسؤولة عن الحفاظ على تركيب البروتينات والذي يقود الى تغير طبيعة البروتين اما عند درجة الحرارة المنخفضة يعزى فقدان البروتين لخواصه الوظيفى الوهن الحاصل في الاواصر الكارهه للماء hydrophobic bond .

1 – درجة الموت الحراري Thermal Death point (TDP) : وهي درجة الحرارة التي تحدث عدم قدرة البكتريا على النمو اذا ماوقغت تحت ظروف نمو مثلى وعرضت لهذه الدرجة الحرارية لمدة 10 دقائق

2 – زمن الموت الحراري Thermal Death Time (TDT) : الزمن اللازم لدرجة حرارة معينة قتل البكترية .

2 – الاوساط الزرعية وطبيعتها : تختلف الاوساط الزرعية في مكوناتها ومحتوياتها الغذائية وكلما كان الوسط الزرعي موفرا بالاحتياجات الاساسية للكائن الحي المجهري بصورة مثلى كلما كان مفضلا في امكانية الحصول على معدلات او سرع نمو كبيرة

3 – الرقم الهيدروجيني

4 – الاوكسجين

5 – الماء

6 – الضوء

7 – ثاني اوكسيد الكاربون

8 - الضغط