فسلجة الاحياء المجهرية Microbial Physiology

العملي

Lab (1): Culture media

الاوساط الزرعية:

يمكن تعريفها على انها مجموعة من المتطلبات الغذائية الاساسية الواجب توافرها لدعم نمو البكتريا و تكاثرها, هذه الاوساط تشتمل على :

1. مصدر للكاربون **2.** مصدر للنتروجين **3.** ماء **4.** مصدر فوسفات **5.** معادن مختلفة مثل الحديد Fe^{++} و المنغنيز Mg^{++} .

تصنيف الاوساط الزرعية:

- تصنف الاوساط الزرعية حسب قوامها الى :

1- الاوساط الصلبة Sold media : وهي الاوساط التي تحوي نسبة 3 – 1.5 % اكار من الوسط الزرعي مثل **Nutrient agar**.

2 – الاوساط شبه الصلبة Semisold media : وهي الاوساط التي تشبه الجلي في شكلها و قوامها وهي اوساط سائلة يتم اضافة الاكار اليها بنسبة 0.5-0.3 % يستفاد منها في الكشف عن حركة البكتريا.

3 – الاوساط السائلة Liquid media: وهي الاوساط التي تحوي على نفس المواد الغذائية التي يحتويها الوسط الصلب لكن بدون اضافة مادة التصليب الاكار مثل **Nutrient broth** .

** **الاكار:** هو عبارة عن مادة كاربوهيدراتية معقدة مستخلصة من الطحالب الحمراء المعروف بجنس *Gelidium* ويعد مادة مصلبة مثالية للاوساط الزرعية كونه لايتدخل في تغذية الكائن المنمى على الوسط , يذوب بدرجة حرارة 100م و يتصلب بدرجة 45م.

- تصنف الاوساط الزرعية حسب طبيعتها الى:

1- الاوساط الطبيعية او غير المعرفة Natural (Non-Synthetic)media :
وهي الاوساط التي تحوي على مواد اغنائية طبيعية غير معروفة التركيب و التركيز مثل الحليب و الدم مثالها **Blood agar , Milk agar.**

2- الاوساط المصنعة او المعرفة Defined(Synthetic) media: وهي الاوساط التي تحوي على مواد كيميائية ذات تراكيب و تراكيز معروفة مثالها **Nutrient agar.**

3- الاوساط نصف المصنعة Semi-Synthetic media: وهي الاوساط التي تحوي على مواد طبيعية مضافا اليها مواد كيميائية معروفة التركيب مثالها **Nutrient agar مضافا له Blood.**

- تصنف الاوساط حسب استخدامها و محتواها الى :

1. الاوساط الحية Living media: وهي الاوساط التي تتكون من خلايا و انسجة حية والتي تستخدم لزراعة الفيروسات و الخلايا السرطانية مثالها **Tissue culture, Cell Lines.**

2. الاوساط الاغنائية Enrichment media: وهي الاوساط العادية البسيطة مضافا اليها مواد غذائية غنية مثل الدم و المصل او مستخلصات النباتات و الحيوانات لمواجهة متطلبات نمو الجراثيم صعبة الارضاء Fastidious bacteria مثالها **Blood agar.**

3. الاوساط الاختيارية Selective media : وهي عبارة عن اوساط تحوي مواد بتراكيز معينة تسمح بنمو مجموعة من البكتريا وتمنع مجموعة اخرى من النمو مثالها **MacConkey agar** يحتوي على Crystal violate وهي مادة مثبطة لنمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام.

4. الاوساط المفرقة Differential media: وهي الاوساط التي تحوي مواد معينة تسمح بنمو نوع معين من البكتريا بحيث تميزه ويمكن تفريقه عن الانواع الاخرى مثل الاوساط الحاوية على الدم تستطيع ان تفرق بين البكتريا المحللة للدم عن تلك غير المحللة وكذلك مثالها **MacConkey agar** الذي يحتوي على Lactose sugar and Neutral red الذي يمكن من خلاله التفريق بين البكتريا المخمرة لسكر اللاكتوز عن تلك غير المخمرة.

5. اوساط الحفظ Maintaining media: وهي الاوساط التي تستخدم للحفاظ على حيوية الكائن المجهري لفترات طويلة اي تستخدم للحفظ وهي تحوي على مواد معينة تساعد على بقاء الكائن المجهري

لفترة اطول مثل مادة الكليسيرول التي تضاف الى Nutrient broth بنسب معينة لتساعد على نمو الكائن المجهري بشكل بطيء لان النمو السريع يصاحبه موت سريع.

6. الاوساط المحفزة Stimulatory media: وهي الاوساط التي تحوي على مواد تعمل على تحفيز الكائن المجهري لانتاج مواد معينة مثل انتاج السموم و الصبغات و الابواغ ...الخ .

7. اوساط النقل Transport media: وهي الاوساط التي تستخدم لغرض نقل العزلات البكتيرية من اماكن عزلها الى المختبر مثالها **Glycerol saline** الذي يستخدم لنقل عينات البراز.

8. الاوساط العامة General media: وهي الاوساط التي تنمو عليها العديد من الاحياء المجهرية مثالها **Nutrient agar**.

تحضير الاوساط الزرعية

1. زن مسحوق الوسط الجاهز الجاف وحسب التعليمات المثبتة على علبة الوسط.

2. اذبها في حجم من الماء المقطر المحدد في التعليمات, تتم الاذابة اما بالتحريك او قد يحتاج الى التسخين .

3. وزع المحلول(الوسط) اذا كان سائلا في انابيب اختبارو غطها.

4. ضع الانابيب او الفلاسك اذا كان الوسط صلبا في جهاز التعقيم Autoclave لمدة 15 دقيقة ودرجة حرارة 121م لهدف التعقيم.

5. اخرجها من الجهاز وانتظر حتى تبرد قليلا(تجنب التبريد لفترات طويلة حتى لايتصلب الوسط قبل صبه اذا كان الوسط صلبا) و صبها في اطباق معقمة موضوعة على طاولة نضيفة مطهرة و محاطة بلهب بنسون مشتعل , و اتركها لتتصلب ثم احفضها في الثلاجة اذاكانت الاوساط صلبة توضع مقلوبة في الثلاجة لتجنب التكثيف اما اذا كانت الاوساط سائلة فلاداعي للصب حيث تخرج الانابيب من جهاز التعقيم وينتظر حتى تبرد ثم تحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام.

Lab (2): Sterilization

التعقيم: هي العملية التي يتم فيها قتل او ازالة جميع الاحياء المجهرية الحية.

فوائد التعقيم:

1. منع التلوث الغذائي.
2. منع حصول الامراض سواء للانسان او النبات او الحيوان.
3. منع تلوث المزارع البكتيرية النقية المستخدمة في المختبرات.

تصنيف التعقيم:

ا- طرق التعقيم الفيزياوية **Physical sterilization methods:** تشمل

* **الحرارة Heating:** وتشمل **1.** الحرارة الجافة Dry heat **2.** الحرارة الرطبة Wet heat
3. التندلة Tyndallization **4.** البسترة Pasteurization

* **الاشعاع Radiation**

* **الترشيح Filtration**

* **الطرق الميكانيكية Mechanical methods**

2- طرق التعقيم الكيميائية Chemical methods

* **الحرارة الجافة Dry heat :** يتم التعقيم بواستطها من خلال التعرض للحرارة المباشرة مثل استخدام الشعلة Burner او استخدام الفرن وتستعمل لغرض تعقيم اللوب و الادوات الزجاجية.

* **الحرارة الرطبة Wet heat** : تستعمل هذه الطريقة لتعقيم الاوساط الزرعية بواسطة جهاز الموصدة Autoclave وكذلك تستخدم لتعقيم المواد الطبية المعدنية و الزجاجية تحت درجة حرارة 121م و ظغط 15 جو و لمدة 10-30 دقيقة .

* **التندلة Tyndalization:** وهي اجراء عملية غليان لدرجة 100م لمدة 30 دقيقة للمواد (السوائل) التي لاتتحمل درجات الحرارة العالية حيث تؤثر على تركيبها مثل السوائل او الاوساط الحاوية على مواد سكرية وعلى مدى ثلاثة ايام حيث بعد عملية الغليان الاولى ومن ثم التبريد و الحضن تتحول الابواغ

المقاومة للحرارة الى ابواغ حساسة للحرارة ومن ثم عملية التسخين الثانية تتحول هذه الابواغ الى الطور الخضري الحساس للحرارة ومن ثم تقتل في عملية الغليان الاخيرة.

* **البسترة** : وهي عملية تسخين السوائل مثل الحليب الى درجة 63م لمدة 30 دقيقة او 72م لمدة 15 دقيقة لغرض قتل الخلايا الخضرية مثل ***Mycobacterium tuberculosis*** and *Brucella* .

* **الاشعاع** : هو عملية تعقيم باستخدام اشعة مختلفة مثل UV ray لغرض قتل البكتريا وتستعمل هذه الطريقة في المستشفيات في تعقيم غرف العمليات.

* **الترشيح:** تتم عملية التعقيم بهذه الطريقة بوساطة استخدام مرشحات مختلفة لغرض تعقيم السوائل الحساسة للحرارة مثل المستحضرات الطبية و الادوية و كذلك السوائل البروتينية.

* **الطرق الكيميائية:** هي عملية التعقيم باستخدام مواد كيميائية مثل الكحولات و الفينولات و غيرها لغرض تعقيم المواد الصلبة الحساسة للحرارة مثل المواد البلاستكية و المواد الكهربائية , تاثير هذه المواد الكيميائية يعتمد على تركيزها و الوقت و نوع الاحياء المجهرية و الحرارة و الخ.

هنالك بعض المواد المضادة للاحياء المجهرية Antimicrobial agents هي:

- **المطهرات Disinfectants :** هي عوامل ضد ميكروبية تستخدم لتحطيم الميكروبات الموجودة على الاشياء غير الحية مثل سطوح المكاتب و جدران المستشفيات. ويجب التفريق بين المطهرات و المنظفات, مثالها الفينولات و الكحولات غيرها.
- **المضادات Antiseptics:** هي مضادات ميكروبية تستخدم لتطهير اجزاء الجسم الحية مثل الجلد و الانسجة لمنع حدوث الاصابة بالامراض و التعفن.

  بعض انواع المضادات تكون ذات فعالية قاتلة للميكروبات Bactericidal و البعض الاخر ذات فعالية مثبطة للنمو الميكروباتBacteristatic مثالهاالديتول وغيرها.

هنالك بعض المواد الكيميائية المعالجة للاحياء المجهرية Chemotherapeutic agents وهي: مواد مضادة للميكروبات تؤخذ من قبل الكائنات الحية لغرض معالجة الاصابات مثالها المضادات الحيوية **Antibiotics**.

Lab (3): The growth of bacterial population and measurement of bacterial growth

النمو الميكروبي و طرق قياسه :

النمو Growth: هو الزيادة الطبيعية في كمية الخلايا المتنامية بالاعتماد على مقدرة الخلية على تكوين بروتوبلازم جديد من البيئة المغذية المختلفة. في معظم البكتريا , النمو هو الزيادة في كتلة الخلية و عددها وعملية انقسام الخلية البكتيرية الواحدة الى خليتين بنويتين جديدتين تعرف بالانقسام الثنائي Binary fission.

طرق قياس النمو الميكروبي

هنالك طرق مختلفة لقياس النمو الميكروبي ولكن لا توجد تقنية تعطينا صورة مطلقة للنمو الميكروبي الحاصل ولكن باستخدام طرق القياس المختلفة يمكن التوصل الى شكل تقريبي للنمو الميكروبي.

يمكن قياس النمو الميكروبي بالاعتماد على متغيرين مختلفين هما كتلة الخلايا Cell mass و عدد الخلايا Cell numbers .

طرق قياس كتلة الخلايا Methods for measurement of cell mass

تقسم طرق قياس كتلة الخلايا الى :

اولا // طرق القياس الفيزيائية المباشرة Direct physical measurement:

وتشمل قياس (**الوزن الجاف Dry weight او الوزن الرطب Wet weight و قياس حجم الخلايا بعد القيام بالطرد المركزي**)

- **قياس الوزن الجاف :** هي طريقة كمية مباشرة لقياس كتلة الخلايا .

طريقة العمل:

1. نؤخذ عينة من النمو الميكروبي المراد قياسه و يجرى لها طرد مركزي او ترشح .
2. يؤخذ الراسب او الراشح و يغسل عدة مرات لازالة المواد غير المرغوب فيها .
3. يجفف الراسب او الراشح بالفرن ثم يوزن.

تستخدم هذه الطريقة لقياس نمو الاعفان و هي غير دقيق لقياس نمو البكتريا لكونها تحتاج الى كميات كبيرة من الاوساط الزرعية .

ثانيا // طرق القياس الكيميائية المباشرة Direct chemical measurement

يمكن قياس النمو الميكروبي من خلال قياس كمية بعض المكونات الكيميائية للخلية مثل (total N او total protein او total DNA content) .

- **قياس نتروجين الخلية** : يدخل النتروجين في التركيب الاساسي للبروتينات ونمو المجتمع الميكروبي يمكن ان يقاس من خلال قياس كمية نتروجين الخلية.

طريقة العمل : تؤخذ العينة ويجرى عليها نفس خطوات التجربة السابقة (قياس الوز الجاف) ومن ثم يؤخذ الراسب ويجرى له عملية تحليل كيميائي لحساب كمية النتروجين في الخلية , هذه الطريقة ايضا محدودة وتستخدم فقط مع معلق الخلايا القليلة.

ثالثا//طرق قياس الفعالية الكيميائية غير المباشرة Indirect measurement of chemical activity: وتشمل قياس (معدل انتاج او استهلاك الاوكسجين او معدل انتاج او استهلاك ثنائي اوكسيد الكاربون و غيرها)

رابعا // قياس العكورة Turbidity measurement : هي طريقة قياس كمية الضوء النافذ في معلق الخلايا . العكورة او الكثافة الضوئية تشير مباشرة الى كتلة او عدد الخلايا .

طريقة العمل:

1. يؤخذ كمية من معلق الخلايا المحضر (خلايا بكتيرية منماة علىNutrient broth) وينقل انبوبة جهاز Spectrophotometer .

2. يحضر المحلول القياسي لتصفير الجهاز و المقارنة بالمنحنى القياسي.

3. توضع العينة في الجهاز بعد تصفيره و تضبط على طول موجي معين ثم توخذ القراءة لعمل منحنى قياسي و تحديد كتلة او عدد الخلايا لهذه العينة.

مزايا هذه الطريقة : سهلة و غير معقدة.

مساؤها:

1. حساسيتها محدودة حيث يمكن قياس اعداد الخلايا البكتيرية الى حد 10^7/ ml.

2. يمكن قياس العكورة للمعلقات ذات الكثافة المعتدلة . حيث المعلق ذو الكثافة القليلة او الكثيرة يعطي نتيجة خاطئة.

3. لايمكن قياس عكورة المواد ذات الالوان الداكنة مثل البكتريا المنتجة للصبغات لانها تؤثر على امتصاص الضوء وبذلك تعطي نتيجة خاطئة.

4. استخدام قياس العكورة سوف يعطينا اعداد كل من الخلايا الحية و الميتة.

طرق قياس اعداد الخلايا Methods for measurement of cell Numbers

اولا // العد المجهري المباشر Direct microscope counts : وهي استخدام سلايد خاص يعرف Counting chambers تحت المجهر لعد الخلايا مباشرة من دون الحاجة الى الحضن , تستخدم هذه الطريقة لمشاهدة و قياس نمو البكتريا في البيئات الطبيعية مثل الكشف عن البكتريا المحبة للحرارة التي تنمو في الصيف , ويمكن زيادة حساسية هذه الطريقة باجراء طرد مركزي او ترشيح للعينة.

في هذه الطريقة لايمكن تمييز الخلايا الميتة عن الحية حيث تضهر متشابهة و كذلك لايمكن عد الخلايا في المعلق عندما يكون عددها اكثر من 10^7 / ml, كما هذه الطريقة تعتبر صعبة لقياس اعداد الخلايا المتحركة.

ثانيا // Electronic counting chambers : هو استخدام جهاز الكتروني خاص لحساب عدد الخلايا و كذلك قياس احجامها مثل خلايا الدم.

ثالثا // عد الخلايا بالطريقة غير المباشرة او طريقة صب الاطباق Indirect viable cell counts or plate counts: هي طريقة صب العينة في الوسط المناسب ,علما انه يجب تخفيف العينة قبل صبها . بعد انتهاء فترة الحضن سوف تضهر المستعمرات , كل مستعمرة نامية تعرف Colony forming unit (cfu) عدد cfu's يشير الى عدد خلايا البكتريا المتغاير في العينة .

no. of bacteria / ml = dilution factor x cfu's

فوائد هذه الطريقة :

حساسيتها عالية ويمكن حساب النمو الميكروبي حتى اذا توافرت خلية بكتيرية واحدة.

مساؤ هذه الطريقة:

1. فقط الخلايا الحية يمكن ان تعطينا مستعمرات يمكن حسابها .

2. يمكن نمو الخلايا يؤدي الى تكوين مستعمرة واحدة.

رابعا // طريقة العد الاكثر احتمالا The most probable number (MPN) method : تستخدم هذه الطريقة مع الميكروبات التي سوف تنمو فقط على الاوساط السائلة ولا تستطيع النمو على الاوساط الصلبة, وتعتبر طريقة احصائية.

سلسلة تخافيف تحضر الى حد تخفيف خالي من النمو ثم تجرى مقارنة بين التخافيف الايجابية باستخدام جدول خاص .

Lab (4): The bacterial growth curve and phases

في المختبر تحت الضروف المفضلة سيكون نمو المجتمعات البكتيرية بشكل متوالية هندسية geometric progression مرتبة و متعاقبة يعني :2^n,.....2^3,2^2,2^1,2^0 or 1,2,4,8, ect حيث n هي عدد الاجيال. هذا يسمى النمو اللوغارتمي exponential growth , وفي الحقيقة الطور اللوغارتمي هو جزء من دورة حياة البكتريا.

اطوار النمو الميكروبي Phases of bacterial growth:

1. طور الركود Lag phase:

بعد تلقيح الخلايا البكتيرية في وسط محضر حديثا سيبقى عدد الخلايا ثابتا مؤقتا. كذلك سوف لاتنقسم الخلايا الابوية في هذا الطور ولكن يمكنها النمو في الحجم و الكتلة , يتم تصنيع الانزيمات , البروتينات, RNA, الخ وكذلك تحصل زيادة في العمليات الايضية في هذا الطور.

طول طور الركود يعتمد على العديد من العوامل المختلفة وتشمل:

1. حجم كمية الخلايا الملقحة inoculums .

2. الوقت اللازم للافاقة من الضرر الفيزيائي او الصدمة اثناء عملية نقل الخلايا.

3. الوقت اللازم لتصنيع الانزيمات الضرورية و عوامل الانقسام.

4. الوقت اللازم لتصنيع الانزيمات المحفزة و الضوررية لاستهلاك المادة الاساس الموجودة في الوسط.

2. الطور اللوغارتميExponential (Log) phase :

في هذا الطور تنقسم كل الخلايا بواسطة الانشطار الثنائي Binary fission وتنمو بطريقة المتوالية الهندسية ويكون انقسامها ثابتا اعتمادا على مكونات الوسط و ظروف الحضن . ويسمى الوقت اللازم لتضاعف الخلايا البكتيرية بزمن الجيل generation time (G) حيث ان G = t/n و n هو عدد مرات التضاعف و t هي زمن التضاعف.

3. طور الثبوت العددي Stationary phase:

لايمكن للطور اللوغارتمي ان يستمر الى الابد و خصوصا في النظام المغلق batch culture وذلك للاسباب التالية:

1. استهلاك المواد المغذية.

2. تراكم المثبطات و النواتج الايضية النهائية في الوسط.

3.نتيجة لنمو الخلايا و ازدياد اعدادها يحصل ازدحام و ينفذ المكان.

في هذا الطور تتوقف الخلايا عن النمو و يحصل توازن بين الخلايا المنقسمة و الخلايا الميتة. يشبه طور الثبوت العددي طور الركود حيث لايحتاج فترة طويلة, البكتريا في هذا الطور تبدأ بانتاج المركبات الايضية الثانوية بعد مرحلة النمو الفعال مثال المضادات الحيوية , وخلال هذا الطور ايضا تبدأ البكتريا بتكوين السبورات من خلال عملية Sporulation .

4. طور الموت Death phase:

في هذا الطور يقل عدد الخلايا الحية و يزداد عدد الخلايا الميتة ولا يمكن ملاحظة هذا الطور تحت المجهر. لايحدث الموت للخلايا في هذا الطور بشكل فجائي و انما تدريجي و معدل موت الخلايا يعتمد على الظروف البيئية و نوع البكتريا.

زمن الجيل Growth rate and generation time:

يسمى تضاعف البكتريا خلال الطور اللوغارتمي تحت ظروف غذائية ثابتة بانه Bacterium's generation و يترواح زمن الجيل للبكتريا من 12 دقيقة الى 24 ساعة او اكثر. مثلا زمن الجيل لبكتريا *E. coli* في المختبر هو من 20-15 دقيقة ولكن في القنوات الامعائية زمن الجيل للبكتري القولونية هو 24-12 ساعة . معظم انواع البكتريا المزروعة في المختبر يتراوح زمن الجيل لها من 15 دقيقة الى 1 ساعة. بعض انواع البكتريا يكون زمن الجيل لها اطول مثل بكتريا *Mycobacterium tuberculosis* و *Treponema pallidum* ويستفاد من طول زمن الجيل في امراضيتها.

Calculation of Generation time حساب زمن الجيل/

عندما يبدأ النمو في الطور اللوغارتمي بواسطة الانشطار الثنائي , الزيادة في المجتمع الميكروبي يكون على شكل متوالية هندسية. اذا بدأ النمو بخلية واحدة عند الانقسام سوف يصبح عدد الخلايا اثنان في الجيل الاول, واربع خلايا في الجيل الثاني و 8 خلايا في الجيل الثالث و هكذا الخ. اذن زمن الجيل هو الوقت اللازم للخلايا (او المجتمع الميكروبي) للانقسام.

G (**generation time**) = (time, in minutes or hours) / (number of generations)

G = **t** / **n**

t= time interval in hours or minutes

B = number of bacteria at the beginning of a time interval

b= number of bacteria at the end of the time interval

n= number of generations (number of times of cell population doubles during the time interval)>

b= B x 2^n (This equation is an expression of growth by binary fission)

Solve for n:

logb = logB + nlog2

n= (logb – logB) / log2

n= (logb – logB) / 3.301

n= 3.3 logb/B

G = t / n

Solve for G

G = t / 3.3 logb/B

Example: What is the generation time of a bacterial population that increases from 10000 cells to 10000000 cells in four hours of growth ?

G = t / 3.3 logb/B

G = 240 minutes / 3.3 log $10^7/10^4$

G = 240 minutes / 3.3 x 3

G = 24 minutes

Lab (5): Growth yield

محصلة النمو //

ان كا كائن حي مجهري كي ينمو مختبريا لابد ان يتغذى و تتم عملية التغذية بتوفير المغذيات (وهي مركبات يستهلكها الكائن المجهري من البيئة لغرض تلبية احتياجاته الاولية اللازمة لعمليات الايض الحيوي).

ولاجل الحصول على الطاقة يجب توفير المغذيات التي لها تأثير مباشر على كافة الفعاليات الحيوية وكذلك على النمو بشكل مباشر و الذي هو محصلة لكل الفعاليات الحيوية في الخلية. و هنالك قاعدة عامة تنص على ان تزويد الخلايا مختبريا بمواد مختزلةreduced component الى مستوى مكونات الخلية يؤدي الى الاسراع بنمو الخلايا, حيث يوفر الجهد و الطاقة لاختزال المواد المغذية الى المستويات المطلوبة و ممكن في هذه الحالة ان تقوم الخلية الحية بادماج incorporation هذه المواد في مكونات الخلية لذا يرتفع معدل النمو وهذا وهذا مايحصل عندما تنمو الخلايا البكتيرية مختبريا في الاوساط الاغنائية enrichment media و الحالة العكس تحصل عندما تنمو الخلايا في الاوساط الفقيرة poor media , مثلا في الاحياء المجهرية كيميائية مختلفة التغذية chemohetrotrophes يحصل انتاج اكبر للكتلة الحيوية في الاوساط الاغنائية فهنا يمكن تقدير ثابت اخر من ثوابت النمو الذي هو محصلة النمو. الفرق بين الكتلة الحيوية (عدد الخلايا) المستخدمة في بداية النمو كلقاح inoculum و بين الكتلة الحيوية للمزروع عند دخوله طور الركود العددي stationary phase عندما يكون النمو محددا باحد المواد الغذائية كان يكون السكر غالبا سكر glucose فتظهر علاقة خطية linear relationship بين تركيز المادة المحددة للنمو limiting nutrient و نمو الخلايا بالوسط الزرعي.

يمكن حساب محصلة النمو growth yield (y) :

$$y= (b –a)/ (co-c)$$

$$y= (\log10\ b – \log10\ a)/ co-c$$

b= is the dry weight as No. of cells / 1ml at point during growth just before the stationary phase

a= is the dry weight as No. of cells / 1ml after inoculation

co= is the initial concentration of nutrient

c= is the concentration of nutrient when growth stops

وممكن ايجاد منحنى معايرة standard curve لمادة مغذية معينة و استخدامها في التقديرات الحيوية Bioassays وهي طريقة تستخدم بها البكتريا لمعرفة كمية مادة معينة مثل احد الفيتامينات بالاغذية او في نماذج اخرى ولاتزال تستخدم حاليا على نطاق واسع حتى انها استخدمت لعزل عدد من الفيتامينات مثل B12 وذلك بتنقيتها حيث تستخدم كعامل نمو لانواع من بكتريا عصيات اللبن.

وتستخدم Bioassay في تشخيص بعض الامراض مثل مرض السلسلة الكيتونية الفنيلية وهو احد امراض التخلف العقلي في الانسان حيث يحدث المرض نتيجة لفقدان الانزيم الذي يحول Phenylalanine الى Tyrosine عندها يحدث تراكم للحامض Phenylalanine بصورة

مفاجئة , ويكشف عن هذا المرض بسهولة مختبريا. حيث ينمى احد انواع البكتريا التي تحتاج هذا الحامض الاميني في وسط زرعي يفتقر هذا الحامض و يضاف دم المريض للوسط فعند حدوث نمو يدل على ايجابية الكشف ثم يقرر تركيزه بطريقة Bioassay .

ان الاحياء المجهرية تختلف في كفاتها بتحويل المواد المغذية بالاوساط الزرعية مثل مصادر الطاقة و الكاربون الى مواد خلوية وعموما هذه الكفاءة تكون ضمن المدى% 50 – 20 اي ان الخلايا غير كفوءة 100% بهذا التحويل ويرجع هذا الى تفاوت الخلايا في كفاءة انتاجية ATP عند تكسير المواد.

ففي الخلايا المخمرة Fermentative bacteria و التي تتطلب توفر وسط غذائي غني فقليل من المواد العضوية يدخل للتراكيب الخلوية اما القسم الاكبر يستعمل لانتاج الطاقة و في عمليات النقل الفعال Active transport .

ففي حالة التخمر تم تتبع حاصل النموy بجعل المادة المحددة للنمو معلمة فوجد ان جزء يسير يدخل في بناء المادة الخلوية و الكمية الاكبر من المادة المغذية تستعمل لانتاج الطاقة , وحسب كمية ATP الناتجة من التخمر وجد انها ذات قيمة عالية بالقارنة بالمادة الخلوية.

Lab (6): Effective environmental factors on microbial growth

تأثير العوامل البيئية على نمو الكائنات الحية المجهرية

هناك العديد من العوامل المؤثرة في نمو الكائنات الحية المجهرية وقد تكون هذه العوامل فيزيائية مثل الحرارة والضغط او عوامل كيميائية مثل الحاجة للغذاء و الاستجابة لاثر السموم او عوامل حيوية وهو تأثير الكائنات المحيطة او مايسمى بالعوامل البيئية Environmental influences و التي يمكن من خلالها التحكم في نمو هذه الكائنات و يمكن ايضا ان تؤثر بطبيعة معيشتها و التي يمكن ان تقتل هذه الكائنات. ويوجد لكل نوع ميكروبي مجموعة من الظروف المثلى الا انها تختلف عن بقية الكائنات الحية بقدرتها على مقاومة الظروف بشكل اكبر لان الخلية البكتيرية تكتسب الحرارة من الوسط المحيط بها اما استجابتها للتعرض للبرودة الشديدة او الجفاف الشديد فتظهر فقط في توقف النشاط الانزيمي دون الموت للخلايا على عكس صور الحياة الاخرى.ومما هو جدير بالذكر ان معظم صور الحياة تشترك في نفس الظروف البيئية العادية الا ان هناك شواذ لهذه القاعدة و خاصة في عالم الميكروبات. وهذه قد يتداخل تأثيرها بدرجة يصعب معها تحديد العامل المؤثر على الكائن المجهري, ويمكن ان نستخدم هذه العوامل البيئية من خلال التحكم فيها في حفظ المواد من خلال التأثير على النمو الميكروبي.

العوامل البيئية المؤثرة على النمو الميكروبي:

اولا// العوامل الفيزيائية: وتشمل الحرارة, تركيز ايون الهيدروجين, الظغط الاوزموزي و الاشعاع.

ثانيا// العوامل الكيميائية: و تشمل استخدام CO_2 , استخدام مصادر النتروجين و الكبريت و الفوسفات, العناصر النادرة مثل Fe و Mg , وجود او غياب الاوكسجين.

تأثير الحرارة على النمو الميكروبيEffect of temperature on microbial growth:

تعتبر درجة الحرارة من اهم العوامل المؤثرة على النمو الميكروبي و النشاط الانزيمي, فمن المعروف ان البكتريا تختلف في متطلباتها من الحرارة فلكل نوع درجة حرارة مثلى **Optimum temperature** وهي الدرجة التي يكون عندها النمو و النشاط الانزيمي اكبر ما يمكن, و درجة حرارة دنيا **Minimum temperature** يمكن للميكروب ان ينمو ويتكاثر عندها و اي انخفاض عن هذه الدرجة يؤدي الى وقف النمو للكائن المجهري, و ايضا توجد درجة حرارة عظمى **Maximum temperature** و هي اقصى درجة يمكن للكائن المجهري ان ينمو عندها و اذا ازدادت عن ذلك يؤدي الى توقف النمو كليا.

و ترتبط درجة الحرارة المثلى بدرجة حرارة الوسط الطبيعي لنمو الكائن المجهري. و يعتبر التأثير الفعلي للحرارة على الكائنات المجهرية بتأثيرها على النشاط الانزيمي في الخلية فبانخفاض الحرارة ينخفض النشاط الانزيمي مما يؤدي الى انخفاض معدل النمو و عند درجة

الحرارة الى التجميد يتوقف النشاط الانزيمي تماما فيتوقف النشاط الايضي تبا لذلك و ذالك لعدم قدرة الخلايا على الحصول على الماء.

اما عند ارتفاع درجة الحرارة عن الدرجة المثلى فيزداد النشاط الانزيمي و الايضي الا ان ارتفاع الحرارة يؤدي ايضا الى زيادة معدل تحطيم الانزيمات و البروتينات و بالتالي الاضرار بالخلايا و موتها.

وتعد هذه الدرجات الثلاث من التقديرات المهمة لتصنيف و تعريف كل نوع من الكائنات المجهرية اذ عن طريقها يمكن تقسيمها الى ثلاث مجاميع هي :

1. الميكروبات المحبة للحرارة المنخفضة Psychrophilic : هي الميكروبات التي نمو في درجة حرارة من اقل من الصفر مئوي الى C^{o} 20.

2. الميكروبات المحبة للحرارةالمعتدلة Mesophilic : هي الميكروبات التي نمو في درجة حرارة (C^{o} 15-45).

3. الميكروبات المحبة للحرارة المرتفعة Thermophilic : هي الميكروبات التي نمو في درجة حرارة اعلى من C^{o} 50.

تجربة 1 // تأثير درجة الحرارة على النمو و تقدير درجة الحرارة المثلى لبعض انواع من البكتريا:

1. لقح اربعة انابيب من (NA مائلة) بكميات متساوية من مزرعة بكتريا *E. coli* نامية في NB بعمر 24 ساعة.

2. لقح اربعة انابيب اخرى بكميات متساوية من بكتريا *Bacillus subtilis* بنفس العمر.

3. لقح اربعة انابيب اخرى بكميات متساوية من بكتريا *Pseudomonas* بنفس العمر.

4. قسم الانابيب جميعها الى اربعة مجاميع كل مجموعة تحتوي على ثلاثة انابيب.

5. احضن مجموعة عند درجة حرارة 55 مْ و مجموعة اخرى عند 37 مْ و اخرى في درجة حرارة الغرفة و الاخيرة عند 5 مْ و ذلك لمدة 48 ساعة و لمدة اسبوع. ويتم ملاحظة النمو.

6. افحص الانابيب في كل مجموعة و لاحظ النمو و قدر كميته.

7. سجل النتائج في جدول للمقارنة بين الانواع المختلفة من البكتريا من حيث تأثير درجة الحرارةالمختلفة على كل نوع و كذلك معرفة درجة الحرارة المثلى لكل نوع من انواع البكتريا الثلاث السابقة .

** يمكن اجراء نفس الخطوات لدراسة تأثير درجة الحرارة على الفطريات و تحديد درجة الحرارة المثلى لنموها.

تجربة 2// تقدير درجة الحرارة القاتلة لخلايا البكتريا Lethal effect of temperature:

يلزم في بعض الاحيان تحديد درجة الحرارة المرتفعة التي تقتل خلايا نوع معين من البكتريا عند تعريضها للحرارة لمدة 10 دقائق و تعرف هذه الدرجة بدرجة الحرارة المميتة Thermal death point. او يمكن تقدير الزمن اللازم لقتل الخلايا البكتيرية عند تعريضها لدرجة حرارة معينة من الحرارة المرتفعة و تسمى بالوقت الحراري المميت Thermal death time.

و نلاحظ انه يمكن تداخل هذه التقديرات مع عوامل اخرى تؤثر فيها مثل الرقم الهيدروجيني و الظغط و كثافة المعلق البكتيريو غيرها.

وتعد هذه الطرق غير دقيقة تماما نظرا لانه لاتقتل جميع الخلايا في نفس الوقت عند درجة الحرارة المستعملة او عند تعريضها لفترة معينة عند درجة حرارة ثابتة.

وتهدف هذه الدراسات الى تحديد افضل درجة حرارة و اقل زمن ممكن للتخلص من الخلايا الضارة مع الاخذ بعين الاعتبار عدم تأثر بعض المواد المعاملة حراريا و خاصة المفيدة بحيث تحافظ على مفعولها او قيمتها مثل البروتينات التي تتكسر عند درجات الحرارة المرتفعة.

خطوات العمل:

1. ضع 1 مل من مزرعة بكتريا *E. coli* بعمر 24 ساعة في كل من خمس انابيب معقمة و فارغة.

2. جهز حمام مائي عند 45مْ ثم ضع به احد الانابيب لمدة 10 دقائق ثم صب محتوياته في طبق بتري معقم.

3. ارفع درجة حرارة الحمام المائي عند 50 مْ , 55 مْ, 60 مْ و ضع الانابيب الاخرى بالتوالي كل على حدة وذلك كما في الخطوة السابقة.

4. فرغ محتويات الانبوبة الخامسة في طبق بتري معقم دون تعريضها للمعاملة الحرارية بغرض المقارنة.

5. خذ كمية من الاكار المغذي المعقم و عند درجة حرارة 45 مْ ثم صب كميات متساوية من الاكار في اطباق بتري ثم اضف كمية من العينة اليها و اخلطها جيدا في الاطباق.

6. احضن الاطباق عند 37 مْ لمدة 48 ساعة.

7. دون النتائج في جدول ثم قارن عدد المستعمرات للتعرف على درجة الحرارة العظمى المناسبة لقتل البكتريا المستخدمة في التجربة.

ملاحظة/ يمكن تكرار هذه التجربة على امواع مختلفة من البكتريا للتعرف على اختلاف تاثير الحرارة عاى الانواع المختلفة و كذلك تحديد درجة الحرارة المميتة لكل نوع.

تجربة 3// تقدير الزمن اللازم لقتل الخلايا البكتيرية عند درجة الحرارة مرتفعة معينة (الوقت الحراري المميت) لنوع من البكتريا:

1. ضع 1 مل من مزرعة بكتريا *E. coli* بعمر 24 ساعة في كل من خمس انابيب معقمة و فارغة.

2. جهز حمام مائي عند 60 مْ مثلا ثم ضع الانابيب الخمسة في الحمام المائي لمدة 5 – 10 – 15 – 20 – 25 دقيقة بالتتابع.

3. صب كل انبوب في طبق بتري معقم ثم اضف عليه الاكار المغذي و اخلطه مع العينة و اتركه حتى التصلب.

4. احضن الاطباق عند 37 مْ ولمدة 24 ساعة ثم تؤخذ النتائج لتحديد الوقت اللازم لقتل الخلايا البكتيرية عند 60 مْ.

يمكن اعادة هذه التجربة لتحديد الوقت اللازم لقتل الخلايا البكتيرية عند درجات حرارة مختلفة وكذلك لدراسة الوقت اللازم لقتل انواع اخرى من البكتريا عند درجات مختلفة. كما يمكن استخدام هذه الدراسة لمعرفة الوقت اللازم لقتل خلايا الفطريات.

تجربة 4// مقاومة الميكروبات للحرارة Heat resistance of microbes:

1. حضر انبوبتين من مزارع سائلة لكل من *Aspergillus , E. coli ,Bacillus cereus niger ,Saccharomyces cerevisiae* .

2. احضن انبوبة من كل نوع عند 80 مْ لمدة 10 دقائق و بعد ذلك برد الانابيب بسرعة بالماء البارد و اترك الانبوبة الثانية من كل نوع بدون تعريض للحرارة.

3. اترك الانابيب جميعها في درجة حرارة الغرفة لمدة 4-6 أيام.

4. لقح انابيب محتوية على بيئة الاكار الكلوكوز المائلة ثم احضن الانابيب عند درجة حرارة الغرفة لمدة 4 أيام ثم لاحظ النمو بعد انقضاء فترة الحضن.

5. جهز شريحتين من كل انبوبة و اصبغ احداهما بصبغة كرام و الاخرى بصبغة السبورات.

نلاحظ ان بعض الميكروبات المستخدمة قتلت بفعل الحرارة العالية اما الانابيب التي لم تعرض للحرارة العالية بقيت الخلايا فيها حية, بعض هذه الكائنات قد تكون لها سبورات و ذلك لتحافظ على حيويتها و لتستطيع مقاومة الحرارة العالية.

Lab (7): Effect of hydrogen ion concentration on microbial growthتأثير تركيز ايون الهيدروجين على النمو الميكروبي

في الطبيعة تكون البيئات ذات قيم pH مختلفة و هذا يعكس اختلاف المحتوى الميكروبي للبيئات المختلفة لذا يحصل تنوع في الاحياء المجهرية حيث تتحمل دالة حموضة تقع بين ثلاث الى اربع وحدات في حين يقع مدى النمو الامثل Optimum growth بقيمة pH واحدة, عليه ان هناك قيم pH مثلى Optimum و Maximum و Minimum لكن البكتريا تحبذ النمو عند قيم pH 4-9 و الفطريات تحبذ المعيشة في القيم الاكثر حموضة و الممتدة من 6-5 اما الخمائر فتعيش في مدى محصور بين 5.5-4.5 لكن هذا لا يمنع وجود بعض الشواذ اي وجود انواع ضمن المجاميع السابقة تعيش في بيئات متطرفة من ناحية الحموضة او القاعدية.

عند تنمية الاحياء المجهرية مختبريا في نظام المزرعة المغلقة Batch culture و بتزايد النمو يحصل تغير بقيم pH حسب طبيعة النظام الانزيمي للبكتريا او الكائن المجهري النامي لذا لابد من تنظيم pH للاوساط الزرعية باستخدام الدارىء Buffers (حامض ضعيف و ملحه او قاعدة ضعيفة و ملحها) للمحافظة على دالة الحموضة من التطرف و التغير السريع حيث تأخذ او تعطي ايون الهيدروجين لغرض المحافظة على تركيز معين ل pH و يستعمل Phosphate buffer اتنظيم pH ضمن المدى المتعادل للمحاليل و الاوساط الزرعية اما المدى الحامضي فيتم تنظيمه بواسطة دارئ Acetic buffer , اما ضمن المدى القاعدي فيتم التنظيم بواسطة Borate buffer.

ان تغيرات pH للاوساط الزرعية يؤثر على نضوحية الخلايا للايونات الهيدروجين و المركبات المتأينة, كما انه يؤدي الى ترسيب البروتينات عند نقاط تعادلها الكهربائي Isoelectric point (نقطة pH التي تحدث فيها تعادل الشحنات السالبة و الشحنات الموجبة) كما انه يؤثر على ذوبانية المغذيات, و تغيرات pH تحدد طبيعة التفاعلات الحيوية التي تحدث ضمن خلايا الاحياء المجهرية حيث ان كل الفعاليات الحيوية يسيطر عليها من قبل الانزيمات ولكل انزيم قيمة pH مثلى لعمله فمثلا بكتريا *Bacillus* لها اهمية من الناحية الصناعية فاذا نميت في pH=7 سوف تعمل انزيمات معينة و اذا تغير pH الى 5 سوف يتوقف عمل الانزيمات الاولى و تظهر انزيمات جديدة ملائمة الى قيمة5, و اذا تغير قيم pH الى 9 سوف تظهر انزيمات اخرى و هذا يعني ان كل العمليات المسيطر عليها من قبل الانزيمات سوفتختلف حسب pH الوسط.

على الرغم من اختلاف pH للاوساط الزرعية المنماة فيها البكتريا يبقى pH الداخلي متعادل او قريب من التعادل و هذا التنظيم يحدث بفعل عمليتان متعاكستان هما Decarboxylation و Deamination و تحدث العمليتان ضمن منطقة الجبلة Periplasm حيث تحتوي هذه المنطقة على احماض امينية حرة Free amino acids فعند انخفاض دالة الحموضة تحصل ازالة لمجموعة الكاربوكسيل من الاحماض الامينية الحرة فتتكون الامينات فيرتفع pH مرة اخرى, اما عند ارتفاع pH يحصل ازالة لمجوعة الامين فالذي يبقى بعد عملية الازالة هو Organic acid و هذه الاحماض العضوية ترجع pH مرة اخرى الى المدى المتعادل.

في الطبيعة تعيش الاحياء المجهرية ضمن بيئات مختلفة لقيم pH فعليه نستطيع ان نقسمها الى مجاميع اعتمادا على Optimum pH.

1. الميكروبات المحبة للقاعدية Alkaliphiles: و هي الكائنات التي تعيش ضمن مدى pH (7-10). مثالها بكتريا *Proteus spp* و هي بكتريا مرضية تسبب التهاب المجاري, و ايضا بكتريا *Bacillus alcalophilus* تسبب تلف اللحوم.

2. الميكروبات المحبة للتعادل Neutrophiles: و هي الكائنات التي تعيش ضمن مدى pH (6-8). مثالها معظم البكتريا المرضية.

3. الميكروبات المحبة للحامضية Acidophiles: و هي الكائنات التي تعيش ضمن مدى pH (2-5). مثالها الفطريات.

تجربة// قياس تأثير تغير تركيز ايون الهيدروجين على النمو الميكروبي:

1. تنمى بكتريا E. coli على وسط N.A ذو pH =7 وتحضن بدرجة حرارة 37 مْ و لمدة 24 ساعة , وبعد انتهاء فترة الحضن تسجل النتائج للنمو.

2. يؤخذ من نفس البكتريا النامية في اعلاه و تنمى ايضا على N.A ويغير pH للوسط الى 4 و يحضن و تسجل نتائج النمو.

3. اعمل زرع ثالث لنفس البكتري على pH =9 و احضن على نفس الظروف و سجل النتائج.

لاحظ الفرق في نمو البكتريا عند تغيير pH. و يمكن اجراء التجربة بنفس الطريقة على بكتريا *Staphylococcus aureus* و خميرة *Sacchromyces*.

تأثير الاشعاع على النمو الميكروبي Effect of radiation on microbial growth:

بعض الاشعاعات مثل الاشعة فوق البنفسجية و الاشعة السينية و اشعة كاما و غيرها ذات تأثير قاتل للبكتريا من خلال التردد القصير للاشعة الذي يؤثر على النشاط الحيوي للخلية و هذه الاشعاعات من اهم الاشعاعات المستخدمة في الدراسات المعملية.فالاشعة فوق البنفسجية ليست سامة فقط للخلايا البكتيرية بل انها ايضا تعمل على تكوين مواد سامة لخلايا البكتريا داخل بيئات االزرع سواءا كانت ملقحة او غير ملقحة.

خطوات عمل التجربة/

1. لقح انبوبتين من الاكار المغذي المسال و المبرد عند 45 مْ احداها ببكتريا E. coli بعمر 24 ساعة و الاخرى ببكتريا Bacillus subtillus بعمر 72 ساعة ثم اخلط اللقاح جيدا بالاكار في كل انبوبة.

2. صب محتويات كل انبوبة في طبق بتري و اتركها لتتصلب.

3. احضر قطعتين من ورق اسود او ورق قصدير و اقطع بها شكلا معينا.

4. غط الطبقين بالورق المثقب ثم عرضهما لمصدر للاشعة فوق البنفسجية لمدة 5-10 دقيقة.

5. بعد وقت التعريض ارفع الورق الاسود المثقب و غط الاطباق بورق سليم ثم احضن الاطباق في الحاضنة عند 37 مْ لمدة 48 ساعة.

6. قارن بين عدد المستعمرات للمناطق التي تعرضت للاشعة وبين المناطق التي لم تتعرض للاشعة و سجل ملاحظتك.

ملاحظة: يمكن تعريض طبقين غير ملقحين للاشعة و ذلك بعد تغطيتهما بالورق الاسود بعد عمل اشكال معينة و ذلك للتعرف على تأثير الاشعة فوق البنفسجية على البيئة نفسها في المناطق المعرضة للاشعة ثم القيام بزرع البكتريا بعد فترة التعريض.

تأثير الضغط الاوزموزي على النمو الميكروبي Effect of osmotic pressure on microbial growth:

لكل من الخلايا الميكروبية و الوسط الغذائي المحيط بها تركيز اوزموزي منفصل يعتمد على المواد المكونة لكل منهما و عند وضع الخلية البكتيرية في بيئة ما تتاثر بالضغط الاوزموزي لهذا الوسط ومما هو معروفان الميكروب يستطيع النمو بشكل جيد في وسط يكون الضغط الاوزموزي له اقل بقليل من تركيز الخلية نفسها مما يساعد على انتقال الماء داخل الخلية و بالتالي انتقال الغذاء اليها. و عندما يكون تركيز الوسط اقل بكثير من التركيز داخل الخلية يؤدي ذلك الى انتقال الماء بكميات كبيرة داخل الخلية مما يؤدي الى انتفاخ الخلية الميكروبية وبالتالي انفجارها و تسمى هذه الضاهرة الانتفاخ الاوزموزي Plasmoptysis, و عندما يكون الضغط الاوزموزي للوسط اعلى من الضغط الاوزموزي داخل الخلية يؤدي ذلك لخروج الماء من الخلية الى الوسط المحيط و بالتالي انكماش الغشاء البلازمي عن الجدار الخلوي و تسمى هذه الظاهرة الانكماش الاوزموزي Plasmolysis .

و تتميز معظم الكائنات الدقيقة بنموها في اوساط متعادلة اوزموزيا الا انه توجد انواع لها القدرة على تحمل الاوساط الاوزموزية العالية بل بعضها لاينمو الا في اوساط ذات التراكيز العالية و يطلق على الكائنات التي تعيش في اوساط ملحية و لكن ليست بيئتها الاصلية بمتحملة الملوحة Salt tolerant و الكائنات التي تنمو في اوساط عالية الملوحة بمحبة الملوحة Halophilic .

و يكمن تأثير الضغط الاوزموزي بانه عامل مجفف له اهمية كبرى في علم الاغذية بحيث تستخدم هذه الظاهرة في حفظ الكثير من الالاغذية مثل المربيات و المخللات و الحليب المكثف و الاغذية المملحة كالاجبان و اللحوم و الاسماك و لايعني ذلك ان هذه الطريقة معقمة للغذاء و لكن تعمل على وقف النشاط الحيوي للميكروبات بحيث لو انخفض الضغط الاوزموزي لعاودت الميكروبات نشاطها ونمت من جديد.

خطوات عمل الطريقة الاولى لدراسة تاثير الضغط الاوزموزي على النمو الميكروبي:

1. حضر 4أنابيب من اكار الكلوكوز العميق محتوية على تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم 0.5-5-15-25% , و 4أنابيب اخرى محتوية على تراكيز مختلفة من السكروز 0.5-5-15-30-60% و صب كل انبوب منها في طبق بتري.

2. قسم كل طبق من الخلف بقلم شمع الى اربعة اقسام و لقح كل قسم بنوع من انواع الميكروبات التالية*E. Coli, Staphylococcus, Saccharomyces, Penicillium* على مساحة 1 سم2 في كل قسم لضمان عدم تداخل المستعمرات مع ملاحظة كتابة المعلومات اللازمة على الطبق.

3. احضن الاطباق على درجة حرارة 30 مْ لمدة اربعة ايام ثم سجل النتائج التي تحصل عليها ملاحظا اي الانواع الاربعة متحملة للاوزموزية العالية بالنسبة للملح او السكر و كذلك تحديد التركيز الملحي او السكري المناسب لكل نوع.

خطوات عمل الطريقة الثانية:

1. جهز انبوبتين بهما محلول سكر السكروز 20% و انبوبتين بتركيز 5% و انبوبتين اخرين بتركيز0.5%.

2. كرر الخطوة الاولى و لكن باستعمال محلول كلوريد الصوديوم 0.3% ,3% ,15%.

3. صب في ست اطباق بتري بيئة اكار مغذي و اتركه ليتصلب.

4. قسم قاعدة كل طبق الى ستة اقسام بقلم تخطيط.

5. قسم الانابيب السابقة الى مجموعتين بحيث تلقح المجموعة الاولى ببكتريا *E. coli* و المجموعة الثانية ببكتريا *Bacillus subtilis*.

6. لقح كل قسم من اقسام احد الاطباق مباشرة بعد الخلط بالتراكيز السابقة لاحد انواع البكتريا ولقح طبق اخر بالتراكيز المختلفة للنوع البكتيري الاخر.

7. بعد مرور ساعة من وجود البكتريا في المحاليل كرر الخطوة رقم 6.

8. بعد مرور24 ساعة من وجود البكتريا في المحاليل كرر الخطوة رقم 6.

9. بعد الحضن لمدة 24 ساعة دون النتائج بالنسبة للمحاليل السكرية و الملحية كل على حدا ملاحظا النمو الامثل لكلا النوعين من البكتريا في اي تركيز و كذلك تحديد اي منهما متحملا للاوزموزية العالية.

Lab (8): Effect of antimicrobial agents on microbial growth

تأثير العوامل الضد ميكروبية على النمو الميكروبي

Antimicrobial agents: هي مواد كيميائية تقتل او تثبط نمو الاحياء المجهرية مثل antiseptics, preservative و drugs و غيرها. قد تكون هذه المواد طبيعية الاصل Natural او صناعية Synthetic ويكون تأثيرها اما قاتل cidal او موقف static للنمو الميكروبي.

يعد تركيزها و الفترة الزمنية من العوامل التي تحدد تأثير هذه المواد على الاحياء المجهرية. وتكون الاحياء المجهرية متباينة في حساسيتها لهذه المواد وتكون السبورات اقل حساسية من الخلايا النامية.

تصنف Antimicrobial agents اعتمادا على مدى تأثيرها الى:

1. Germicides: وهي المواد المضادة للاحياء المجهرية و التي تقتلها و لكن ليس بالضرورة ان تقتل سبوراتها ولا تستعيد الاحياء نشاطها بعد زواله.

2. Germistatic: و هي المواد المضادة للاحياء المجهرية و التي تثبط نموها و عندما تزال تستعيد الاحياء المجهرية نشاطها.

Disinfectants المطهرات: هي المواد التي تقتل الاحياء المجهرية, و لكن ليس بالضرورة ان تقتل سبوراته, غير امنة للانسجة الحية فهي تستخدم للمواد غير الحية (inanimate objects) مثل الارضية و الجدران و غيرها مثالها chlorine compounds, copper sulfate, hypochlorites و مركبات الامونيوم الرباعية.

Antiseptics: مواد كيميائية قاتلة للاحياء المجهرية و غير مؤذية للانسجة الحية بحيث يمكن استخدامها على الجلد و الغشاء المخاطي و هي تتميز عن المطهرات في ان المطهرات تستخدم لقتل الميكروبات على الاوساط غير الحية مثالها الكحول و محلول الايودين.

المضادات الحيوية Antibiotics: هي مواد حية تنتجها الكائنات المجهرية لها القابلية على قتل او تثبيط نمو كائنات مجهرية اخرى مثالها Pincillin و غيرها.

Preservatives المواد الحافظة: هي مواد كيميائية مستقرة لتثبيط النمو الميكروبي في الغذاء غير سامة اذا اكلت مثل النترات و بنزوات الصوديوم و غيرها.

المنظفات Detergents: هي مواد ذات سطوح فعالة surfactant ذات قابلية تنظيف في المحاليل السائلة تمتلك جزيئة المنظف مجموعتين احداها سلسلة هيدروكربونية طويلة و الاخرى مجموعة ايونية ذائبة في الماء.

المنظفات هي مواد صناعية يمكن استعمالها في المختبر و الاغراض المنزلية , بعض هذه المنظفات تعمل كمطهرات و بعضها لا تستعمل كذلك. لاتستطيع المنظفات اختراق الخلايا الميكروبية و لكنها تمتص عبر الاسطح الخارجية لتغير نفاذية الخلايا في دخول و خروج المواد منها.

المنظفات عادة تكون ثنائية الاقطاب تتكون من جزئين:

1. **Lipophilic portion:** و يسمى Lipid soluble الجزء العديم الشحنة.
2. **Hydrophilic portion:** الجزء الحامل للشحنة من المنظفات.

ميكانيكية عمل المنظفات Mechanism of action of detergents:

عندما تذاب المنظفات في محلول مائي فأن الجزء الدهني يتفاعل مع الدهون الميكروبية او قطرات الدهن في الاوساخ بينما الجزء المحب للماء فسوف يبتعد عن الميكروب و يتداخل مع المساحة الداخلية بين المحلول السائل و بين الميكروب, و كنتيجة لذلك فأن الشد السطحي للسائل يقل و يؤدي الى انفجار او تحطيم غشاء الخلية الغني بالدهون بسبب استحلاب الغشاء الخارجي اي خروج المواد من الخلية و الانفجار سوف يحصل في البروتينات المتجمعة المشحونة باتجاه المنظف مما يؤدي الى تحطمها.

السيطرة الميكروبية :Lab (9)

العوامل المؤثرة في عملية السيطرة على الميكروبات :

1. درجة الحرارة وتركيز أيون الهيدروجين pH.
2. نوع الميكروبات وعددها.
3. الحالة الفسيولوجية للميكروب.
4. العوامل البيئية المحيطة.
5. تركيز العامل المستخدم.

ميكانيكية تأثير العوامل المستخدمة في السيطرة على الميكروبات :

تتفاوت الميكانيكية التي تعمل بها مختلف الكيماويات والعوامل الفيزيائية في تأثيرها في الميكروبات والذي يؤدي في النهاية إلى قتلها أو تثبيط فاعليتها ويمكن إيجاز ميكانيكية تأثير هذه العوامل في:

1. تغيير نفاذية الغشاء الخلوي.
2. تدمير البروتين والأحماض النووية.

الطرق الفيزيائية للسيطرة على الميكروبات

أولا// الحرارة heat

تعتبر الحرارة من أكثر الطرق استعمالا لقتل الميكروبات وبالذات في مجال حفظ الأغذية و تعتبر الحرارة من اكثر طرق التعقيم نظرا لتكلفتها الاقتصادية و سهولة السيطرة عليها و تقتل الحرارة الخلايا الميكروبية عن طريق اتلاف النظام الانزيمي للخلايا و تدميرة, عند استخدام عمليات التعقيم بالحرارة يجب أن يؤخذ في الاعتبار عدة عوامل منها:

1- **Thermal Death Point (TDP):** و هي عبارة عن اقل درجة حرارة تكفي لقتل جميع الخلايا الميكروبية الموجودة في المادة السائلة لمدة 10 دقائق.
2- **Thermal Death Time (TDT):** و هي عبارة عن اقصر فترة زمنية تكفي لقتل 90% من الميكروبات في بيئة سائلة عند درجة حرارة ثابتة.
3- **Decimal Reduction Time:** و هي عبارة الوقت بالدقائق الكافي لقتل ٩٠% من خلايا البكتيريا عند درجة حرارة ثابتة و يعتبر هذا العامل مهما جدا و بالاخص في عملية التعليب.

وتستخدم الحرارة في عملية التعقيم سواء كانت في صورة جافة dry heat او في صورة رطبة moist heat. فالحرارة الجافة تقتل الميكروبات بفعل عامل الأكسدة oxidation بينما الحرارة الرطبة تقتل الميكروبات بفعل الرطوبة التي تعمل على تكسير روابط الهيدروجين التي تربط جزيئات الهيدروجين.

1- **التعقيم بالحرارة الجافة Dry heat sterilization**

استخدام اللهب المباشر:و هي من ابسط صور التعقيم و تستخدم في المختبرات لتعقيم ابر التلقيح حيث تتعرض للهب المباشر لدرجة الاحمرار و بهذا يكون قد قضي علي جميع صور الحياة على الابرة.

استخدام الهواء الجاف الساخن: حيث توضع الأدوات المراد تعقيمها في جهاز يشبه الفرن عند درجة حرارة 170درجة مئوية لمدة ساعتين.

2- التعقيم بالحرارة الرطبة sterilization Moist heat *:* الغلي هو أحدى طرق التعقيم بالحرارة الرطبة وللحصول على وسيلة تعقيم آمنة ومضمونة باستعمال الحرارة الرطبة فإنة من الضروري الوصول الى درجة حرارة اعلى من درجة الغليان وذلك باستعمال البخار تحت ضغط داخل جهاز الاوتوكلاف وتستخدم في الحالات التي لا تتأثر فيها المواد المراد تعقيمها بالحرارة أو الرطوبة تحت الضغط ويلاحظ أنه كلما ارتفع الضغط المستعمل زادت درجة الحرارة وكلما زاد الضغط زادت درجة الحرارة و في اجهزة الاوتوكلاف فإن البخار تحت ضغط ١٥ باوند/البوصة المربعة تصل درجة حرارته إلى ١٢١ ْ م، وهذه كافية لقتل جميع صور الحياة الميكروبية بما فيها الجراثيم في مدة 15دقيقة أو أكثر بقليل حسب كمية المادة المراد تعقيمها وتستخدم طريقة التعقيم هذه لتعقيم البيئات المغذية.

3 - البسترة Pasteurization: هي معاملة المادة الغذائية (غالباً الحليب والعصائر) معاملة حرارية تكفي للقضاء على الميكروبات المرضية .

البسترة البطيئة [وتكون على 63.8 مْ لمدة 30 دقيقة]

البسترة السريعة [وتكون على 72 مْ لمدة 15 ثانية]

ثانيا// الترشيح Filtration:

يعرف الترشيح بأنه مرور أي مادة سائلة أو غازية خلال سطح يحتوي على ثقوب صغيرة جدا لدرجة تكفي لمنع مرور الأحياء الدقيقة خلالها وتستخدم هذه الطريقة لتعقيم المواد الحساسة للحرارة مثل المضادات الحيوية, بعض البيئات المغذية, الإنزيمات.

ويستخدم في ذلك مرشحات يتراوح قطر ثقوبها بين أقل من ميكرون إلى عدة ميكرونات ومن المرشحات المستخدمة في ذلك:

1- **مرشح زايتس:** وهو يحتوى على أقراص مختلفة القطر والسمك من مادة الأسبستوس ويراعى ضرورة تعقيم الجهاز قبل استعماله وذلك بوضعه كاملا في الاوتوكليف بعد تغليفه بالورق وسد الفتحة الجانبية للدورق بسدادة من القطن.
2- **مرشحات الزجاج المسامي:** والمرشح عبارة عن قمع زجاجي مثبت به طبقة من الزجاج المسامي ويوجد من هذه المرشحات خمس درجات تبعا لقطر ثقوبها.
3- **المرشحات الغشائية:** ومن أمثلتها ما يعرف بمرشح المليبور والذي يتكون من أغشية رقيقة مصنوعة من استرات السيليلوز.
4- **مرشح عجينه باريس:** وهو مصنوع من عجينه باريس وهي نوع من الجبس يتكون من كبريتات كالسيوم مع كربونات كالسيوم وأكسيد مغنسيوم.
5- **مرشح شمبرلاند:** وهو مصنوع من نوع معين من الخزف أو الصيني.
6- **مرشح بيركفيلد:** وهو مصنوع من الطين الدياتومي.

ثالثا// التجفيف *Dessication*:

يعتبر وجود الماء ضروريا لنمو الأحياء الدقيقة وتكاثرها وفي حالة سحب الماء من المادة تنشأ لدينا حالة الجفاف حيث لا تستطيع فيها الأحياء الدقيقة النمو أو التكاثر ولكنها تستطيع أن تعيش كامنة لعدة سنين وعند إعادة الماء بوسيلة أو بأخرى إلى هذه المادة تستعيد الميكروبات نشاطها المتمثل في النمو والتكاثر.

رابعا// الضغط الأسموزي Osmotic pressure:

يعتمد استخدام الأملاح والسكريات لحفظ الأطعمة وحمايتها من الفساد الميكروبي على تأثير الضغط الأسموزي ذلك أن زيادة تركيز هذه المواد (سكريات و املاح) في الوسط الخارجي

يؤدى إلى خلق ظروف بيئة مرتفعة التركيز تؤدي إلى سحب الماء من داخل الخلية الميكروبية وهذه الطريقة تشبه إلى حد كبير طريقه التجفيف ويلاحظ أنه بمجرد سحب الماء من الخلية ينكمش الغشاء البلازمي ويبتعد عن جدار الخلية وتسمى هذه العملية البلزمة ويقف النمو والتكاثر. وتستخدم هذه الطريقة في حفظ الأطعمة ومنع الفساد الميكروبي فيها وذلك باستخدام التمليح في حالة اللحوم والتسكير في حالة الفواكه.

الطرق الكيميائية للسيطرة على الميكروبات

تستخدم الكيماويات في مقاومة الميكروبات على الأنسجة الحية وبعض الأدوات والسطوح و يجب ان تتوفر في المادة الكيمائية المستخدمة كمطهر لمقاومة الميكروبات التالي:

1- سرعة التأثير.
2- ذات مدى تأثير واسع على الميكروبات.
3- القدرة على التخلل داخل الجسم المعامل.
4- قابليتها للخلط مع الماء لتكوين محلول أو مستحلب ثابت.
5- لا تتأثر بالمواد العضوية التي قد تكون موجودة على المادة المراد معاملتها.
6- لا تتحلل وتفقد فعاليتها عند تعرضها للضوء، أو الحرارة، أو الظروف غير المناسبة.
7- لا تؤثر في المادة المعاملة بالصبغ أو التدمير.
8 - ليس لها تأثير ضار على الإنسان أو الحيوان إذا كانت ستستخدم كمطهر للجروح.

المواد الكيماوية المستخدمة في التعقيم:

1- كحول الإيثايل : يستخدم بتركيز 50-70% لتطهير الأيدي.
2- الفينول : يستخدم بتركيز 2-5% لتعقيم أرضيات الغرف والمعامل وكذلك تعقيم أسطح المناضد التي يجرى عليها عمليات العزل والتنمية للكائنات الحية الدقيقة وأيضا في تعقيم بعض الأدوات والأجهزة .
3- الكلوركس: والمادة الفعالة فيه هي صوديوم هيبوكلوريت ويستخدم بتركيز10% في التعقيم السطحي للأجزاء النباتية المصابة تمهيدا للعزل منها ويستخدم كذلك في تعقيم أسطح المناضد وغيرها.

الآثار الاقتصادية للبكتيريا:

ليست البكتيريا كليا مسببة للأمراض أو مضرة بالكائنات الحية وإنما للبكتيريا فوائد عديدة فلولا وجود البكتريا على سطح الأرض لانتهت الحياة.

1- **البكتيريا والطعام:** الطعام يمثل بيئة جيدة لنمو البكتيريا وتكاثرها وتسبب حالات من التسمم الغذائي مثل (السلمونيلا , لكلوستريديوم).

2- **البكتيريا والصناعات الغذائية:** تلعب البكتيريا دورًا هاماً في الصناعات الغذائية مثل الألبان / الأجبان / الزبدة / المخللات / إنتاج الحموض العضوية مثل حمض الخليك وإنتاج بروتين الخلية الواحدة الذي يستعمل كغذاء للماشية والدواجن.

3- **البكتيريا والصناعة الكميائية:** صناعة المضادات الحيوية الحديثة , صناعة بعض المواد العضوية (الستيرويدات – الفيتامينات).

4- **البكتيريا والبيئة:** تنظيف البيئة ومعالجة المياه العادمة والتخلص من المواد العضوية وغير العضوية من مخلفات المصانع والمنازل بما فيها من عناصر ثقيلة سامة كالرصاص والزئبق ومعالجة المخلفات لإنتاج الطاقة من غاز الميثان ومعالجة التلوث بالبقع النفطية وفي دورات العناصر في الطبيعة كدورة الكربون والكبريت والنيتروجين وكذلك تسهم مع الفطريات في تحليل الأجسام الميتة مما يساعد في خصوبة التربة.

5- **البكتيريا والإنسان:** تعيش بعض أنواع البكتيريا معيشة تكافلية في أمعاء الإنسان والحيوان فهي تساعد في هضم بعض المواد الدهنية وهضم السليلوز كما تساعد في بناء فيتاميني b,k في أمعائه.

6- **البكتيريا والحشرات:** تنتج بعض أنواع البكتيريا العضوية بلورات سامة مرافقة للأبواغ الداخلية تستخدم في القضاء على كثير من الحشرات الممرضة التي تتخذ من هذه البكتيريا غذاء لها.

7- **البكتريا والهندسة الوراثية:** مثل إنتاج بعض الهرمونات مثل الأنسولين عن طريق هندسة الجينات.

Lab (10): الانزيمات الميكروبية, تحفيز انتاجيتها و طرق استخلاصها

تعد الانزيمات من المكونات الحيوية للخلايا, وهي محفزات عضوية معقدة ذات منشأ بيولوجي, وهي مكونة اما من جزء بروتيني فقط (Apoenzyme) و يطلق عليها حينئذ الانزيمات البسيطة Simple enzyme او تكون مكونة من جزء بروتيني و اخر غير بروتيني يعرف بالعامل المساعدCofactore و يطلق عليها حينئذ بالانزيمات المقترنة Conjucated enzymes او Holoenzyme.

الجزء البروتينيApoenzyme: يتراوح في الحجم من ببتيدات متعددة تتالف من احماض امينية ووزن جزيئي 2000 الى كتل من الببتيدات المتعددة لالاف من الاحماض الامينية ووزن جزيئي يصل الى مليون, يوجد في الجزء البروتيني للانزيم مواقع خاصة يطلق عليها بالمواقع الفعالة Active sites وهي المادة التي تعمل على مادة التفاعل.

العوامل المساعدة للانزيم Cofactores: وهي اما جزيئات عضوية يطلق عليها Coenzyme تعمل مقترنة مع الجزء البروتيني لانجاز تغير ضروري في مادة التفاعل او جزيئات لا عضوية ايونية يطلق عليها inorganic cofactor مثل الحديد و المغنيسيوم و النحاس و الزنك و الكوبلت و العديد من المعادن الاخرى تشترك هذه المعادن بوظائف دقيقة بين الانزيم و مادة التفاعل و بصورة عامة المعادن تنشط الانزيم و تساعد في جلب المواد النشطة و مادة التفاعل للارتباط معا, كما تساعد و تشترك مباشرة في التفاعلات الكيميائية مع معقد الانزيم – مادة التفاعل.

تجربة// تحفيز انتاج انزيم Protease

تقوم انزيمات البروتييز بتحليل البروتينات بمختلف انواعها مثل الكازائين و الجيلاتين و الهيموكلوبين و غيرها.

المواد:

1. عزلة من بكتريا *Bacillus* منتجة لانزيم protease.
2. حليب مقشود skim milk معقم بالموصدة.

3. اطباق بتري معقمة. 4. Nutrient agar

طريقة العمل:

1. يحضر 100 مللتر من وسط المرق المغذي الصلب و يعقم بالموصدة ثم يضاف له 3% من الحليب المقشود المعقم بالموصدة بشكل منفصل, تمزج المحتويات جيدا و تصب في اطباق معقمة.

2. يلقح طبق بمزرعة بكتيرية حديثة العمر من بكتريا *Bacillus* و يحضن عند 37مْ لمدة 24 ساعة.

3. يكشف عن تحلل انزيم protease بتكوين مناطق شفافة حول النمو البكتيري دليلا على ان البكتريا انتجت الانزيم للوسط الخارجي و حللت بروتينات الحليب.