

## المحاضرة السادسة - درس الأحياء المجهرية المتقدم - الجزء العملي-

### التقدير الكمي للنمو البكتيري Quantitative measurements of bacteria growth

من الضروري احيانا للباحث ان يعرف عدد الخلايا في عينة ما كان يكون عدد البكتريا الموجودة في نموذج مثل 1 مل من الحليب أو ماء الشرب أو مستحضر تجاري .... الخ.

#### اولا :الطرق المباشرة Direct Methods

- 1-طريقة بريد Breed count
- 2-باستخدام شريحة العد Haemocytometer ( counting chamber )
- 3-انابيب ماكفار لاند McFarland .
- 4-قياس درجة التعكر Turbidity .

#### ثانيا :الطرق غير المباشرة Indirect Methods

- 1-طريقة العد بالاطباق Plate count .
- 2-الوزن الجاف Dry weight .
- 3-طريقة الترشيح Filter membranes .

#### اولا :الطرق المباشرة Direct Methods

##### 1- تعداد بريد Breed count

تستخدم هذه الطريقة لتعداد الاحياء المجهرية في منتجات الالبان وهي من الطرق السهلة والسريعة وكالاتي:

- 1-ارسم على شريحة نظيفة مربع مساحته 1 سم<sup>2</sup> في منتصف الشريحة.
- 2- رج عينة البكتريا ثم انقل 0.01 سم<sup>3</sup> اما بواسطة ماصة معقمة ومدرجة أو بواسطة بواسطة اللوب standard .
- loop وانشر العالق ضمن المساحة المحددة
- 3-جفف وثبت بالتسخين ( عند تقدير البكتريا في الحليب يزال الدهن اولا بالزايول ثم يثبت السلايد بالكحول 95 % لمدة دقيقة ثم يترك ليجفف بالهواء.)
- 4-اضف صبغة Methylene Blue لمدة نصف دقيقة ثم أغسل جفف، احسب معدل عدد خلايا البكتريا في 1 سم<sup>3</sup> من العينة الأصلية

##### 2-استخدام الهيموسايتوميتر لتعداد خلايا البكتريا Counting chamber (Hemocytometer)

وهي طريقة سريعة للتعداد المباشر لخلايا البكتريا ويستخدم فيها شريحة خاصة اضافة إلى المجهر الضوئي .

##### (Hemocytometer)

يمكن تعداد العدد الكلي للبكتريا المعلقة في سائل ما وذلك بوضع العالق على الشريحة .عمق السائل بين الغطاء والشريحة مساوي إلى 0.1 ملم ما سطح الشريحة فهو مقسم إلى مربعات صغيرة ثم أصغر فأصغر .وان أصغر مربع مساحته تبلغ 1/400 ملم<sup>2</sup> أي أن في المليمتر المربع الواحد هناك 400 مربع صغير .

##### طريقة العمل:-

- 1-يخفف عالق البكتريا بتخفيف عشرية ويتم اختيار التخفيف الذي يبدو قليل التضييب.
  - 2-اغسل شريحة الهيموسايتوميتر والغطاء وجفف بقطعة قماش نظيفة.
  - 3-ضع الغطاء فوق الشريحة.
  - 4-رج أنبوبة العالق لمجانسته ثم انقل قطرة من العالق باستخدام ماصة باستور أو قطارة أو سرنجة.
  - 5-ضع فتحة الماصة بحذر لتلامس حافة الغطاء الملامس لحافة الشريحة لتدخل القطرة بالخاصية الشعرية .في هذ الخطوة سيدخل حجم 0.1 سم<sup>3</sup> من العالق ليتوزع تلقائياً على المربعات في الشريحة .
- الحسابات :توضع الشريحة تحت قوة التكبير الصغرى ونبدأ بالتعداد .
- 1-في حالة تعداد البكتريا في المربعات الصغيرة.

#### ثانيا :الطرق غير المباشرة Indirect Methods

## التعداد الحي (Plate Count) Viable Count

في طرق التعداد المباشر يتم تعداد الخلايا الحية والميتة ولكن في معظم الحالات يهمننا ان نعرف اعداد الخلايا الحية والخلية الحية هي التي تستطيع ان تنمو وتتكاثر لتكون مستعمرات وتعتمد طريقة العد بالاطباق Plate Count على اساس ان كل خلية حية توضع في وسط مغذي صلب وتحت ظروف مناسبة تنمو وتتضاعف لتعطي مستعمرة. عدد المستعمرات التي تظهر على الطبق بعد التحضين يمثل عدد الخلايا الحية في العالق او العينة الاصلية. هناك طريقتان لاجراء هذ الطريقة :

### 1- Spread Plate Method.

### 2- Pour Plate Method.

في الطريقة الاولى Spread plate ينشر 0.1 سم<sup>3</sup> من التخفيف المناسب شرط ان لا يتعدى وسط الاكار باستخدام ناشر زجاجي معقم. ثم يحضن لحين ظهور المستعمرات عند ذلك تعد المستعمرات.

اما في طريقة صب الاطباق Pour Plate ، فينقل حجم معين (0.1-1 سم<sup>3</sup>) إلى طبق معقم فارغ ثم يصب الوسط ويمزج جيدا بتدوير على شكل حرف "8" ثم يترك ليبرد ويحضن يتم اختيار الاطباق التي تظهر فيه 30-300 مستعمرة. من الضروري جدا اجراء تخفيف عشرية .

**مميزات** هذه الطريقة : تعطي تقدير دقيق الأعداد الحية فقط وممكن الكشف عن وجود عدد قليل جداً من الخلايا الحية لكل سم<sup>3</sup> من العينة في هذه الطريقة. **اما مساوئها:** ليس هناك وسط مغذي معين لكل انواع البكتريا. فالوسط المستخدم قد لا يلائم البكتريا وقت التحضين والفترة الزمنية أيضاً لها تأثير على اعداد البكتريا. اضافة إلى ان بعض المستعمرات قد تكون صغيرة يصعب رؤيتها وعدها لتلافي عمل مكررات لحصول على نتائج دقيقة. والفترة الزمنية اللازمة لتحضير الطبق هي 24 ساعة لكي يتسنى لكل خلية أن تنمو إلى مستعمرة إضافة إلى صعوبة تنمية كل أنواع البكتريا على وسط معين. **ملاحظة :** في حالة اندماج خليتين بكتريتين أو أكثر ( وهي حالة طبيعية في بكتريا المسبقيات) لتعطي مستعمرة واحدة فإن ما يتم تعداد يدعى ( Colony Forming Unit (CFU بدلاً من خلية لكل مل **المواد المطلوبة:**

1- مزرعة لبكتريا *Escherichia coli* بعمر 24 ساعة

2- ست أنابيب تحتوي كل منها على 9 سم<sup>3</sup> من السلاين المعقم.

3- ماصات معقمة.

4- ست أطباق بتري معقمة.

5- وسط الأكار المغذي 500 سم<sup>3</sup> في دورق معقم.

### طريقة العمل:

1- أنقل 1 سم<sup>3</sup> من المزرعة البكتيرية إلى أنبوبة تحتوي على 9 سم<sup>3</sup> من الماء المقطر أو السلاين المعقم. ترج الأنبوبة

لمجانسة العالق سيكون التخفيف في هذه الأنبوبة هو 1/10

2- اجراء التخفيف اللازمة حسب عكارة المزرعة الاصلية .

3- بعد تحضير التخفيف يتم التعداد بأحد الطريقتين:

أ- طريقة النشر:

1- يصب وسط الأكار المغذي في ثلاثة أطباق معقمة.

2- تترك إلى أن تبرد وتجمد جيداً.

3- أنقل 1 سم<sup>3</sup> من التخفيف المناسب إلى الطبق بعد كتابة التخفيف والبكتريا على ظهر الطبق وهكذا إلى بقية التخفيف

4- يعقم الناشر الزجاجي باللهب الكحولي يبرد ثم ينشر عالق البكتريا على سطح الأكار ويترك لمدة خمسة دقائق. يقلب

ويحضن بدرجة حرارة ° 37 م لمدة 24-48 ساعة .

ب- طريقة صب الأطباق

1- بعد تحضير التخفيف ينقل 0.1-0.2 سم<sup>3</sup> إلى طبق بتري معقم وفارغ.

2- يبرد وسط الأكار المغذي في الدورق إلى درجة ° 45 م.

3- يصب الوسط في الأطباق.

- 4- تدور الأطباق باليد على شكل رقم " 8 " أو إلى الإمام الخلف، يمين ويسار.
- 5- تترك الأطباق إلى أن يجمد الوسط. ثم تترك وتحضن .
- 6- بعد الانتهاء من فترة التحضن يتم اختيار الأطباق التي تحتوي بين 30-300 مستعمرة .
- 7- يتم تعداد أعداد المستعمرات في الأطباق المناسبة.

## تأثير العوامل البيئية في نمو البكتريا The Effect of environmental factors on bacterial growth

يعتمد نمو الكائنات المجهرية على نوعين من العوامل:

1-العوامل الذاتية أي الوراثة وهي التي تحدد كيفية تصرف الكائن تجاه بيئته وهي المسؤولة عن التباين في القدرات بين نوع وآخر في نفس البيئة.

2-العوامل البيئية التي تؤثر على سرعة وكمية النمو وتشمل عوامل فيزيائية مثل الحرارة، الضوء، الضغط، PH وغيرها أو كيميائية مثل وجود بعض السموم في الوسط الغذائي، الاحماض الامينية، الماء، مصادر C , N<sub>2</sub>O ، الطاقة وغيرها كل هذه العوامل تكون على شكل شبكة متداخلة من المتطلبات يؤثر البعض منها على الاخر لدراسة هذه العوامل تساعدنا على تفسير توزيع الاحياء المجهرية في البيئة وتسهل لنا اكتشاف وتطوير طرق جديدة للسيطرة عليها أو تنشيطها .

### 1-تأثير درجة الحرارة Effect of temperature

من العوامل المهمة ان لم تكن الالهة التي تتحكم في كل تفاعل كيميائي داخل الخلية الحية، وبالتالي على تكاثر الخلية لكل كائن مجهري هناك مدى لدرجات الحرارة للنمو، بعضها ينمو بدرجات حرارية منخفضة 0 م ، بينما البعض الاخر تنمو بدرجات عالية جدا قد تصل تتعدى درجة الغليان 100م وممكن التعبير عن المدى الحراري لنمو الاحياء المجهرية بما

يسمى Cardinal temperature

#### 1-درجة الحرارة الدنيا Minimum temperature

وهي اقل درجة يستمر فيها النمو والفاعليات الحيوية

#### 2-درجة الحرارة المثلى Optimum temperature

مدى ضيق من درجات الحرارة ما بين الدنيا والقصى يكون فيها النمو الافضل والاسرع.

#### 3-درجة الحرارة القصوى Maximum temperature

اعلى درجة يحصل فيها النمو، أي زيادة عنها يتوقف النمو ولو استمرت درجة الحرارة اكثر يتوقف نشاط الانزيمات، الحوامض النووية، وتموت الخلية. لذلك فان الحرارة من العوامل المهمة في السيطرة على النمو الاحياء المجهرية وممكن تقسيم الاحياء حسب تحملها لدرجات الحرارة إلى:

#### 1-المحبة لدرجات الحرارة المعتدلة Mesophiles

تنمو بدرجات حرارة بين 10-50م المثلى لها 20-40م

تنمو بمدى يمكنها التواجد على اجسام الكائن الحي ، النباتات، الانسان مثال: *Escherichia coli* التي تفضل النمو في درجة حرارة 35-40 م اما الانواع المتواجدة في التربة فالمثلى لها 30م (للتربة درجة حرارة اقل من الجسم) لذلك فان الجسم ولكي يتغلب على الاحياء المجهرية الممرضة يعطي اعزاز لرفع درجة الحرارة (الحمى) ليوقف نمو البكتريا ولكن لو ارتفعت درجة حرارة الجسم إلى 45 ° م قد تؤثر على حياة المصاب.

2-المحبة لدرجات الحرارة الواطئة (-5 - 15م) والمثلى اقل 15م psychrophiles وهي الكائنات التي تستطيع النمو

بدرجات منخفضة قد تصل الانجماد مثال عليها بعض انواع pseudomonas هذه المجموعة ينمو في المناطق المنجمدة بعض انواع البعض الاخر تنمو جيدا في الغذاء المخزون في الثلاجة لتؤدي إلى فساد الأغذية ولكن هناك انواع مفيدة فمثلا انتاج اغلى انواع الاجبان Roquefort (blue cheese) يعتمد على الكائن المجهري ( الفطر)

*Penicillium roqueforti* الذي يفضل النمو بدرجات حرارة منخفضة.

3-المحبة لدرجات الحرارة العالية تنمو بدرجات حرارة بين 45-80م او اكثر والمثلى 45-50 م Thermophiles تتواجد في التربة القريبة من الراكين والينابيع الساخنة هناك نوع من البكتريا المحبة لدرجات اعلى Hyperthermophilic حيث عزلت حديثا بكتريا تعيش بدرجة حرارة 113 م بل حتى بعض افراد هذه المجموعة بدرجات حرارية عالية إلى الحد الذي يستخدم بعض الباحثين Autoclave لعزلها. العديد منها مكونة للسبورات. هذا التحمل لدرجات الحرارة العالية يعود إلى نوعية احتوائها انزيمات ثابتة حراريا Thermostable . Refrigeration retards food spoilage because it limits growth of mesophiles \*

\*ان التبريد يؤخر من تلف الاغذية لانها تحدد نمو البكتريا المحبة لدرجات الحرارة المعتدلة. هناك تباين بدرجة حرارة مناطق مختلفة من الجسم فالقلب، الدماغ، الجهاز الهضمي تقريبا 37م اما المناطق الاخرى تباين فيها درجات الحرارة لهذا السبب بعض البكتريا تسبب المرض في مناطق محددة من الجسم ولا تؤثر على مناطق اخرى. مثال Hansen's disease (leprosy) يصيب المناطق الباردة من الجسم (الاذن، اليدين، الاقدام، الاصابع Mycobacterium leprae ولأكثر من 30 عاماً استخدم تحفيز الجسم لرفع درجة الحرارة (بإدخال مسبب الملاريا) لعلاج السفلس.

## 2-تأثير درجة الحموضة (PH):Effect of (PH)

العامل الأهم الأخر هو تركيز ايون الهيدروجين الموجب حيث يحدد النشاط الانزيمي خاصة الانزيمات الخاصة بالنمو بناء مادة البروتوبلازم قيمة PH الواطنة تعني تراكيز عالية من  $H^+$  يتبعها تراكيز واطنة من  $OH^-$  وعندما تساوي  $H^+$  و  $OH^-$  فان ذلك يعني التعادل. معظم الابتدائيات والبكتريا تفضل PH المتعادل (5-9) اما الفطريات تنمو بمدى (2-6) بصورة عامة تقسم الاحياء المجهرية تبعاً لتحملها PH

1- Acidophiles المحبة للحموضة المحبة PH 5,5 - 0

2- Neutrophiles المعتدلة الحموضة لدرجة المحبة 5,5 - 8

3- Alkalophiles للقاعدية المحبة 5,8 - 11,5

الاحياء المجهرية التي تسبب امراض في الجهاز الهضمي يجب ان تتكيف لتحمل البيئة الحامضية للمعدة مثلا Shigella, Escherichia coli لها القدرة على تحمل PH 2.5 لمدة ساعتان على الاقل ولتنمية الاحياء المجهرية في المختبر من المهم السيطرة على PH الوسط ومعالجة تراكم الحوامض التي تنتجها اثناء النمو الحوامض والقواعد تتعادل باستخدام مواد كيميائية تدعى الدواري Buffers .