النمو في البكتريا Growth in Bacteria

أولا: متطلبات النمو البكتيري

للنمو البكتيري متطلبات أساسية يجب توفرها للحصول على نمو جيد وتتضمن مايلي:

1- السيطرة على الأس الهيدروجيني

يمثل الأس الهيدروجيني الحامضية النسبية للمحاليل، ويعرف بأنه اللوغاريتم السالب لأيون الهيدروجين، فالبكتريا عند نموها على الوسط الزرعي ينتج من فعالياتها الأيضية مركبات حامضية كما في حالة التخمر للبكتريا النامية على وسط الكلوكوز أو يمكن أن تنتج قاعدة اذا قامت البكتريا بتحليل أو استخدام الأيونات السالبة في الوسط كما في حالة تحرر كاربونات الصوديوم Na_2CO_3 الناتج من أكسدة جزيئة sodium succinate ، كما ان التفاعلات الأيضية للبروتينات والأحماض الأمينية تغير الأس الهيدروجيني الى القاعدية نتيجة تحرر الأمونيا، وفي كلتا الحالتين يحدث تغير في الأس الهيدروجيني مما يسبب توقف نمو البكتريا لأن غالبية أنواع البكتريا تنمو عند الأس الهيدروجيني المتعادل (7).

توجد اليات متعددة للسيطرة على التغير في الأس الهيدروجيني، فاذا كان التغير في الحامضية او القاعدية ليس طفيفا" أو مفاجئا" فان الأوساط الزرعية بمكوناتها تستطيع معالجة هذا التغير الطفيف في الأس الهيدروجيني، ومن أبرز مكونات الوسط التي تقاوم التغير في الأس الهيدروجيني هي الأحماض الأمينية لأنها تمتلك جذر الأمين القاعدي NH_3 وجذر الكاربوكسيل الحامضي COOH لذا يطلق على الأحماض الأمينية بالمواد الأمفوتيرية Amphoteric materials لأنها تتحد مع الحوامض والقواعد في نفس الوقت، أما اذا كان التغير في الوسط الزرعي كبيرا" بحيث لا تستطيع مكونات الوسط السيطرة عليه فيتم استخدام المحاليل الدارئة مثل

دوارئ الفوسفات مثل KH_2PO_4 وهو ملح ضعيف الحامضية و K_2HPO_4 وهو ملح ضعيف القاعدية أو دوارئ الكاربونات مثل Na_2CO_3 و Na_2HCO_3 .

2- توفير ثنائي أوكسيد الكاربون

ان زراعة الأحياء المجهرية الضوئية ذاتية التغذية Photoautotrophic والكيميائية ذاتية التغذية Chemoautotrophic تواجه مشكلة من ناحية توفير ثنائي أوكسيد الكاربون بكميات تكفي لنمو هذه الأحياء. وبالرغم من وجود هذا الغاز في الجو الذي قد ينتشر في الوسط الزرعي بكميات تسمح بالنمو الا ان تركيز هذا الغاز في الجو قليل جدا، فهو لا يتعدى 0.3% في الأماكن المفتوحة، أما في الأماكن المغلقة أكثر بقليل، ولهذا فان معدل نمو الأحياء ذاتية التغذية يتحدد كثيرا" تحت هذه الظروف، ولحل هذه المشكلة يتم ضخ هواء يحتوي على كميات كبيرة من ثنائي أوكسيد الكاربون قد تصل الى 5%. الا ان هذا الحل سيولد لدينا مشكلة اخرى وهي التغيير الذي سيطرأ على الرقم الهيدروجيني للوسط الزرعي، ولهذا يتم تحوير مكونات المحلول الدارئ المستخدم في مزارع من هذا النوع. أما في حالة الأحياء ذاتية التغذية التي تستطيع النمو تحت ظروف لاهوائية في قناني محكمة الغلق مثل بكتريا الكبريت الخضراء والبنفسجية فيتم توفير ثنائي أوكسيد الكاربون لها عن طريق اضافة بيكاربونات الصوديوم $NaHCO_3$ للوسط الزرعي. ومما تجدر الاشارة اليه أنه لا يمكن استخدام بيكاربونات الصوديوم في قناني مفتوحة وذلك لأن تحرر ثنائي أوكسيد الكاربون الى الجو سيترك وسطا" زرعيا" شديد القاعدية.

3- التخلص من ترسبات المعادن

ان غالبية الأوساط الزرعية تحدث فيها مشكلة خلال عملية تعقيمها بالمؤصدة Autoclave وهي حدوث ترسبات في الوسط لأن غالبية الأوساط تحتوي على الفوسفات بتراكيز عالية نسبيا"، ويحدث هذا الراسب نتيجة تكوين مواد معقدة غير ذائبة من تفاعل الفوسفات وأيونات بعض المعادن الثقيلة وخصوصا" الحديد والكالسيوم. وبالرغم من أن هذه المعقدات الكيمياوية لا تقلل من القيمة الغذائية للوسط الزرعي، الا انها قد تجعل عملية النمو الكمي للأحياء المجهرية صعبة للغاية. ويمكن حل هذه المعضلة عن طريق تعقيم المحلول الحاوي على مركبات هذه المعادن ثم اضافتها الى بقية المكونات في الوسط الزرعي المعقم بعد تبريده. كما يمكن التغلب على هذه الظاهرة بإضافة كمية

قليلة من العوامل الكلابية Chelating agents حيث يكون مادة معقدة ذائبة مع هذه المعادن، وبذلك يمنع تفاعلها مع الفوسفات، ومن هذه العوامل هو حامض Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (EDTA) بتركيز 0.01%.

4- السيطرة على الأوكسجين

تختلف الكائنات الهوائية واللاهوائية الاجبارية في حاجتها للأوكسجين وطريقة زرعها، فالبكتريا الهوائية تكون سهلة الزرع من ناحية توفير الاوكسجين لها عن طريق زرعها بطريقة التخطيط Streaking وباستخدام الناقل البكتيري Loop او باستخدام الناشر الزجاجي Spreader على سطح الأكار، أما في حالة الأوساط السائلة كالأنابيب أو الدوارق التي يكون معدل النمو فيها أسرع من حالة الأوساط الصلبة فيفضل استخدام دوارق كبيرة الحجم مع الحركة المستمرة باستخدام الحاضنة الهزازة Shaker incubator أو يتم ضخ الهواء مباشرة الى الدوارق.

أما زراعة البكتريا اللاهوائية فهي عملية أكثر تعقيدا" لأنها تتطلب ازالة مطلقة للأوكسجين لأن الاوكسجين يكون قاتل لهذه البكتريا، ويمكن استخدام عدة طرق لزراعة البكتريا اللاهوائية الاجبارية منها استخدام دوارق محكمة الغلق وتملأ بالوسط الزرعي السائل المفرغ من الأوكسجين باستخدام المجففات المفرغة Vaccum desiccators ، كما يمكن تفريغه عن طريق غليان الوسط. ويمكن زراعة هذه البكتريا على الأوساط الزرعية الصلبة وهي أفضل من الأوساط الزرعية السائلة لسهولة التخلص من الأوكسجين، وفي كلا النوعين من الأوساط الزرعية (السائلة والصلبة) توضع البكتريا بعد زرعها في قناني مغلقة تسمى Anaerobic jar مع اضافة خليط من غاز النتروجين او الهيدروجين مع غاز ثنائي اوكسيد الكاربون، والطريقة السائدة حاليا في زراعة البكتريا اللاهوائية هي وضع شمعة داخل القنينة المغلقة ثم تغلق بإحكام وبمجرد انطفاؤها فهذا يعد دليلا" على نفاذ كمية الاوكسجين في القنينة.

5- توفير الضوء

ان الضوء هو من المتطلبات الأساسية لنمو البكتريا التي تقوم بعملية البناء الضوئي مثل السيانوبكتريا وغيرها من الأنواع التي تحتاج الى توفير الضوء عند زراعتها مختبريا" من خلال وضعها في حاضنة مزودة بمصدر ضوئي.

ان عملية توفير الاضاءة المناسبة يمنع السيطرة على درجة الحرارة والتي تعد من المشكلات التي تواجه زراعة هذه الأنواع من البكتريا، وأهم جانب في توفير الاضاءة مختبريا هو أن تكون ضمن الطول الموجي المقارب للمدى الاشعاعي لضوء الشمس، فالطحالب حقيقية النواة تحتاج الى ضوء ذو طول موجي أقل من 700 نانومتر أما البكتريا الخضراء والبنفسجية فتنمو في ضوء ذي طول موجي ينحصر بين 100-700 نانومتر.

ثانيا": النمو في البكتريا

النمو هو الزيادة الحاصلة في عموم المكونات الكيميائية للكائن الحي. وان الزيادة في مجموع الكتلة لا تعني بالضرورة نمو الكائن الحي، فهي قد تكون نتيجة تخليق وتخزين بعض المواد المخزونة داخل الخلية مثل النشأ، دون أن يرافق هذه العملية تخليق المواد الحيوية الأساسية المتمثلة بالبروتينات والحوامض النووية. ويحدث النمو عادة نتيجة الانقسام الخلوي. وهذا يؤدي الى الزيادة في حجم الكائن الحي متعدد الخلايا. اما في الكائنات أحادية الخلية فانه يؤدي الى زيادة في عدد الأفراد.

تتضاعف جميع الخلايا الخضرية Vegetative cells عن طريق الانقسام الخلوي غير الجنسي، الا ان هذا النوع من الانقسام لا يحدث في الفايروسات، وينتج الانشطار هذا عن انقسام الخلية الى خليتين أو أكثر، وان كلا من هذه الخلايا المتولدة تستمر في الانشطار الى ما لا نهاية بشرط توافر الغذاء والطاقة اللازمين لديمومة النمو والتكاثر، فضلا عن توافر الظروف البيئية المناسبة من الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة وكمية الأوكسجين.

تتكاثر معظم البكتريا عن طريق الانشطار الثنائي العرضي Transverse binary fission اي انقسام الخلية الواحدة الى خليتين اثنين متساويتين، وتتم هذه العملية بعد أن يتكون جدار خلوي عرضي. هذا وتجدر الاشارة هنا الى أن جميع فعاليات الخلية البكتيرية موجهة لأغراض نموها وتكاثرها. فبعد أن تتوافر الظروف البيئية المناسبة تستطيل الخلية، وهذا يبدو أكثر وضوحا في العصيات البكتيرية مما هو في المكورات. وفي نفس الوقت تبدأ المادة النووية باستنساخ نفسها. وضمن نظام معين تتوزع المادة النووية في

كل نصف من نصفي الخلية المنقسمة ليتم بعد هذا الانشطار الكامل تكوين جدار عرضي في منتصف الخلية المنقسمة.

ان الانقسام في البكتريا يحصل بواسطة الانقسام الخلوي، الا انه في بعض الأحيان يحصل النمو دون أن يحصل انشطار للخلية، فهناك أنواعا كثيرة من البكتريا العصوية لا تستطيع القيام بعملية الانشطار بسبب تأثير عوامل خارجية كثيرة؛ فهي تحت هذه الظروف تعاني من استنساخ المادة النووية ونمو الجدار الخلوي والغشاء السايتوبلازمي والمحتويات الخلوية، الا انها لا تنشطر، وانما تطول وتنمو الى خيوط طويلة غير مجزأة. أما العوامل المانعة للانشطار فهي كثيرة منها المنظفات وأملاح الصفراء والأشعة فوق البنفسجية وبعض المضادات الحيوية فضلا عن النقص في المواد المغذية أو حدوث الطفرات. الا انها لا تمنع نمو الخلية.

تستطيع البكتريا التكاثر بطرق أخرى غير الانشطار الثنائي العرضي، ففي بعض الأنواع مثل رتبة الأكتينومايسينات Actinomycetales يحصل نمو خيطي يتبعه تجزؤ Fragmentation هذه الخيوط الى وحدات صغيرة تنمو الى خلايا جديدة. وهناك أنواع أخرى مثل الأحياء التابعة الى رتبة Hyphomicrobiales تتكاثر عن طريق التبرعم Budding حيث ينفصل البرعم من الخلية الأم بعد أن يصل الى حجم معين، وينمو بعدها الى خلية كاملة.

تمر عملية النمو في البكتريا بعدة أطوار تسمى بأطوار النمو البكتيري Bacterial growth phase ويسمى المنحنى البياني الذي يوضح أطوار النمو البكتيري بمنحنى النمو البكتيري Bacterial growth curve ، وتقسم أطوار النمو في البكتريا الى أربعة أطوار هي:-

1- **طور الركود Lag phase**

وهو ما يدعى أحيانا بطور الاستقرار الابتدائي او الطور الكامن، فعند زرع خلايا بكتيرية في وسط زرعي معين فان عملية الانقسام لا تبدأ مباشرة بل تبقى كما هي لا تتغير ولا تنقسم لمدة قد تطول أو تقصر اعتمادا على نوع البكتريا، الا ان هذا لا يعني أن الخلايا خاملة أو ساكنة في هذا

الطور، بل هي على عكس ذلك حيث يزداد حجمها بشكل ملحوظ، ومن الناحية العضوية فهي في غاية النشاط اذ انها تكون منشغلة بتخليق بروتوبلازم جديد.

ان البكتريا عند زرعها في وسط زرعي جديد تحتاج الى ان تتعرف على هذا الوسط ومكوناته لكي تهيء نفسها للاستفادة من هذه المكونات، لذلك يحدث تجميع للحامض النووي الرايبوزي RNA ويتم تخليق الأنزيمات والأنزيمات المساعدة Coenzymes وبكميات مناسبة لعمليات التمثيل الذي سيحدث داخل الخلية، ان هذه العمليات تحتاج الى وقت معين لكي تتم، والبكتريا تقوم بالعمليات الأيضية أثناء هذا الوقت، الا أنها لا تنشطر الا بعد أن تتهيأ، حيث تبدأ عمليات الانشطار، وبهذا تعبر المزرعة الى الطور التالي وهو الطور اللوغارتمي.

2- الطور اللوغاريثمي Logarithmic phase

تقوم الخلايا في هذا الطور بالانشطار بصورة منتظمة وبمعدل ثابت، ويصل معدل الانشطار في هذا الطور الى أعلى معدل، ان عملية الانشطار تتم بسرعة عالية جدا بحيث ان العدد البكتيري قد يتضاعف خلال كل 10 دقائق كما في حالة بكتريا *E. coli* اذا ما كانت الظروف البيئية مناسبة، وتكون الخلايا خلال هذا الطور متساوية تقريبا من ناحية المكونات الكيميائية والفعاليات الأيضية والخصائص العضوية الاخرى، وفي واقع الحال فان عدد الخلايا الحية في هذا الطور يتساوى مع العدد الكلي لها، وذلك لأن نسبة الخلايا الميتة تكون واطئة جدا، حيث ان الخلايا جميعها تعد هنا خلايا فتية نشطة. اما حجم الخلايا في هذا الطور فيكون في حده الأدنى، هذا فضلا عن ان الغشاء البلازمي أو الجدار الخلوي يكون رقيق بشكل ملحوظ، والفعالية الأيضية للخلية تكون في أوج نشاطها، ولهذه الأسباب تعزى حساسية الخلايا في هذا الطور للمؤثرات البيئية الخارجية التي لم تكن لتؤثر فيها لو كانت خارج هذا الطور.

ان معدل انشطار الخلايا في هذا الطور يتأثر كثيرا بالعوامل البيئية المختلفة، فهو قد يطول أو يقصر بالنسبة للنوع البكتيري الواحد اعتمادا على هذه العوامل، فضلا عن ان معدل الانشطار للخلايا يختلف ايضا باختلاف النوع البكتيري، فقد يحدث الانشطار خلال 12 دقيقة وقد يصل الى 33 ساعة في انواع أخرى. ويدعى الوقت اللازم لانشطار الخلية الواحدة الى خليتين بزمن الجيل Generation time وهو ثابت للنوع البكتيري في حالة ثبات الظروف البيئية.

3- طور الثبات أو الاستقرار Stationary phase

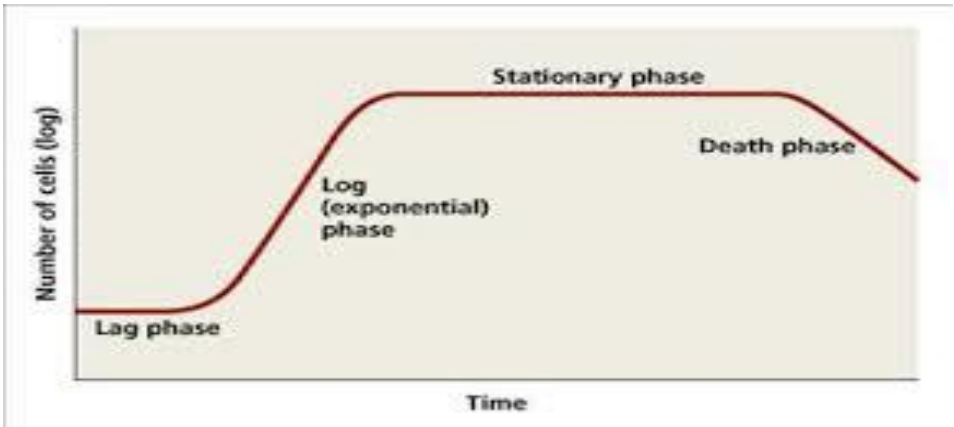
بعد مرور عدة ساعات او حتى عدة أيام على بدء الطور اللوغاريثمي، تبدأ الخلايا بمواجهة صعوبات كثيرة، منها: قلة المواد المغذية وتجمع المواد السامة والفضلات وتغير الاس الهيدروجيني، وبهذا فان عدد الأفراد يبقى ثابتا دون أي زيادة او تغيير لمدة من الزمن، ان ثبوت العدد البكتيري خلال هذا الطور قد يكون نتيجة التوقف التام للانشطار الخلوي أو ربما نتيجة التوازن بين معدل الانشطار ومعدل موت الخلايا.

4-طور الموت Death phase

عندما تزداد الظروف البيئية قساوة، يتغلب معدل موت الخلايا على معدل انشطارها، وهكذا تدخل المزرعة في طور الموت حيث يكون موت الخلايا لوغاريثميا"، أي أن الخلايا تموت بمعدل ثابت.

يعزى موت الخلايا البكتيرية الى عدة أسباب أهمها هو نفاذ المواد الغذائية الرئيسة وتجمع المواد التالفة والسامة مثل الحوامض.

ان الخلايا في هذا الطور تموت لوغاريثميا" بمرور الوقت، الا ان معدلات موتها تختلف كثيرا كما اختلفت معدلات نموها، فبعض الخلايا تموت بسرعة بحيث لا يبقى الا عدد قليل جدا من مزرعة كبيرة خلال بضع ساعات، في حين أن أنواعا أخرى تموت ببطء ، بحيث نجد هناك خلايا حية خلال مدة عدة شهور أو عدة سنين. وكما مبين في الشكل أدناه.



أطوار النمو البكتيري