المحاضرة السابعة

6- سبورات البكتريا – bacterial spores :

السبورات عبارة عن خلايا ساكنة حيوياً تمتلك عادة جدار سميك ويمكنها أن تنبت وتنمو وتتحول إلى خلايا خضرية عند توفي الظروف المناسبة وعادة يوجد سبور واحد في كل خلية والسبورات تقسم إلى مجموعتين هما السبورات الداخلية والسبورات الخارجية .

أ- السبورات الداخلية – endospores :

تتكون هذه السبورات داخل الخلية ويختلف شكل السبور وموقعه حسب نوع البكتريا فمنها يقع في مركز الخلية كما في جراثيم Bacillus cereus أو يكون طرفياً كما في جراثيم الكزاز Clostridium tetani أو قد يكون قريباً من الطرف كما في جراثيم Clostridium subterminale

والسبورات الداخلية لها مقاومة شديدة للجفاف وللصبغ وللمواد المطهرة والإشعاع ومقاومة للحرارة فمثلاً سبورات جراثيم Cl. Botulinum تقاوم الغليان لعدة ساعات وأن معظم السبورات تقاوم حرارة 80 م° لمدة 10 دقائق وأن أهم العوامل المساعدة للسبور في مقاومة الحرارة هو قلة الرطوبة الموجودة في السبور واحتوائها على كمية كبيرة من حامض ثنائي بيكولينيك dipicolinic acid وأن هذا الحامض غير موجود في جدار الخلايا الخضرية – ويوجد هذا الحامض متحداً مع الكالسيوم بشكل (Ca-PDA) (calcium - dipioclinic) الذي يلعب دور مهم في مقاومة السبور للحرارة .

تكون السبورات قادرة على البقاء ساكنة لعدة سنين ولكن يمكنها أن تنبت إلى خلايا خضرية عند توفر الظروف الملائمة للإنبات خلال دقائق وتتضمن عملية الإنبات مرحلتين :

المرحلة الأولى : هي انتهاء السكون التي تتأثر بمؤثرات المحيط مثل الحرارة إذ أن معاملة السبورات إلى درجة 60 – 70 م° لعدة دقائق تكفي لإنهاء مرحلة السكون .

المرحلة الثانية : هي النمو وفي هذه المرحلة يبدأ السبور بالانتفاخ ويتكسر الغلاف وتحدث عملية تحطيم جدار وغلاف السبور نتيجة تأثير الإنزيمات المحللة .

ب- السبورات الخارجية – exospores :

وهي السبورات التي تتكون خارجياً أي خارج الخلية الخضرية كما في التبرعم الذي يحصل في أحد أطراف الخلايا وهذه السبورات تكون مقاومة للجفاف والحرارة ولكن مقاومتها أقل من السبورات الداخلية وذلك

المحاضرة السابعة

لعدم احتوائها على حامض ثنائي بيكولينيك وتلاحظ هذه السبورات في الخلايا البكتريا المؤكسدة لغاز الميثان والتابعة لجنس **Methylosinus** .

7- الحويصلات – Cysts :

وهي تراكيب ذات جدار سميك ويستخدم للسكون والسبات الحيوي وهو مقاوم للظروف الصعبة وتتشابه الحويصلات مع السبورات الأ أنها لا تمتلك المقاومة العالية للحرارة كما في السبورات الداخلية وتختلف أيضاً في تركيبها الكيمياوي عن السبورات الداخلية ومثال على الحويصلة هو التركيب الذي ينتج من قبل جنس البكتريا **Azotobacter** .

تنمية البكتريا Cultivation of bacteria

يمكن تنمية البكتريا ودراستها تحت الظروف المختبرية حيث طورت العديد من الأوساط الغذائية المختلفة لتنمية الأنواع المختلفة من البكتريا فلكل نوع من البكتريا له وسط خاص به للنمو وكذلك فأن تنمية البكتريا تتأثر بالظروف الفيزيائية المحيطة بالبكتريا مثل درجة الحرارة وتركيز أيون الهيدروجين وتركيز الغازات .

العوامل اللازمة لتنمية البكتريا (العوامل الكيميائية المؤثرة في النمو) :

أ- الاحتياجات الغذائية :

أن جميع الكائنات الحية أبتداءاً من البكتريا وأنتهاءاً بالحيوانات الكبيرة والإنسان تشترك في احتياجات غذائية ضرورية للنمو والفعاليات الحيوية ومن هذه الاحتياجات مايلي :

1- مصدر الكربون :

الكربون ضروري لجميع الأحياء المجهرية وذلك لتصنيع وتكوين مركبات الخلية فبعض الأحياء المجهرية تستطيع أن تستخدم ثاني أوكسيد الكربون مصدراً أساسياً للكربون وتسمى ذاتية التغذية **autotrophs** ، أما البعض الآخر يمكن استخدام الكربون الضروري مصدراً أساسياً للكربون وهذه تسمى غير ذاتية التغذية **Heterotrophs** ولا تستطيع أن تستخدم ثاني أوكسيد الكربون مصدراً وحيداً للكربون .

المحاضرة السابعة

2- مصدر الطاقة :

بعض الأحياء المجهرية تعتمد على الضوء للحصول على الطاقة وتسمى بضوئية التغذية phototrophs في حين نجد أن بعض الأحياء المجهرية تعتمد على المركبات الكيميائية مصدراً للطاقة وتسمى بكيميائية التغذية Chemotrophs .

3- مصدر النيتروجين :

أن جميع الأحياء المجهرية تحتاج إلى النيتروجين لبناء الخلية ويمكن لبعض أنواع البكتريا استخدام النتروجين الجوي وبعضها الآخر يمكنها استخدام مركبات النتروجين غير العضوية مثل النتريت NO_2 والنترات NO_3 وأملاح الأمونيا NH_4^+ وبعضها الآخر يمكنها استخدام النتيروجين من مصادر عضوية كالأحماض الامينية أو نواتج التحلل المائي للبروتين . أن زيادة النسبة بين الكربون / النيتروجين تكون مناسبة لنمو الفطريات بينما انخفاض هذه النسبة يكون مناسباً لعملية تكوين السبورات .

4- عنصر الكبريت والفسفور :

تحتاج البكتريا إلى عنصر الكبريت لتصنيع الأحماض الامينية التي يدخل الكبريت في تكوينها مثل السستين cysteine والمثيونين Methionine . وأن بعض البكتريا تحصل على الكبريت من مصادر عضوية وبعضها الآخر يحصل عليها من مصادر غير عضوية بينما نجد أن بعض البكتريا يمكنها استخدام الكبريت المعدني ، أما عنصر الفسفور فأنه يجهز بصورة فوسفات وهو ضروري في عملية تخليق الأحماض النووية (DNA) والنيوكليوتيدات ويدخل في تركيب الليبيدات المفسفرة (phospholipids) .

5- العناصر المعدنية :

تعد أيونات العناصر المعدنية ضرورية لجميع الكائنات الحية ومن ضمنها البكتريا ومن هذه الأيونات المعدنية هي الحديد Fe^{+2} والمغنيسيوم Mg^{+2} والكالسيوم Ca^{+2} والبوتاسيوم K^+ وهناك عناصر نادرة تحتاجها الكائنات الحية بتراكيز واطئة مثل الخارصين Zn^{+2} والنحاس Cu^{+2} والمنغنيز Mn^{+2} والمولبونيوم Mo^{+6} والنيكل Ni^{+2} والبورو B^{+2} والكوبلت Co^{+2} .

المحاضرة السابعة

وتعد عناصر الحديد والمغنيسيوم والخارصين والنحاس والمنغنيز والمولبونيوم عوامل مساعدة لمختلف الإنزيمات وأن أنواع البكتريا لا تحتاج إلى عنصر الصوديوم Na^+ ولكن البكتريا النامية في البحار والبكتريا التي تقوم بالتمثيل الضوئي تحتاج إلى عنصر الصوديوم وهناك بكتريا المحبة للملوحة لها احتياجات كبيرة لكلوريد الصوديوم حيث لا يمكنها النمو الأ بوجود مالا يقل عن 12 – 15% من كلوريد الصوديوم وهذه الكمية العالية من الملح تحتاج إليها الخلية للحفاظ على بنية الجدار الخلوي وثبات فعالية بعض الإنزيمات .

6- الماء :

الماء ضروري لجميع الأحياء المجهرية لغرض النمو والبكتريا تحتاج إلى الماء لأن جميع المواد الغذائية التي تحتاج إليها للنمو يجب أن تكون مذابة في الماء بكي تتمكن من دخول الخلية وأن أرتفاع الحرارة النوعية للماء يتيح له القابلية على مقاومة التغيرات المفاجئة في درجات حرارة المحيط البيئي حول الخلايا وكذلك يعد الماء العامل الكيميائي الذي يحتاج إلأيه في جميع تفاعلات التحلل التي تقوم بها الخلية .

7- الفيتامينات :

تحتاج الأحياء المجهرية إلى الفيتامينات إما كمرافقات إنزيمية coenzymes أو كوحدات بناء للإنزيمات نفسها ولبعض أنواع البكتريا القدرة على تخليق جميع الفيتامينات التي تحتاج إليها من مكونات الوسط الغذائي ولكن البعض الآخر لا يمكن تصنيعها لذا يجب أن تجهز الأوساط الغذائية بهذه الفيتامينات .

المحاضرة الاولى

تعريف علم الأحياء المجهرية ومراحل تطوره :

هو أحد فروع علوم الحياة الذي يهتم بدراسة الكائنات الحية الصغيرة والتي لا يمكن رؤيتها بالعين المجردة ويتم رؤيتها بالمجاهر وهي تشمل البكتريا والفطريات والطحالب والابتدائيات (البروتوزا) والركتيسيا والفايروسات ويهتم بدراسة هذا العلم بدراسة شكل هذه الكائنات وتركيبها وفسلجتها وتصنيفها وأيضها وتأثيرها على الإنسان والحيوانات والنباتات .

أقسام علم الأحياء المجهرية :

يقسم حسب طبيعة الكائن المجهري إلى :

1- علم الطحالب – phycology :

وهو يختص بدراسة الطحالب وهي كائنات بسيطة تتكون من خلية واحدة وقسم تتكون من خلايا متشابهة وهي تحتوي على الصبغات مثل صبغة الكلوروفيل وتقوم بعملية التركيب الضوئي وغالباً توجد الطحالب في المياه أو على التربة الرملية.

2- علم الفايروسات – Virology :

وهو يختص بدراسة الفايروسات وهي كائنات صغيرة جداً لا يمكن رؤيتها الا باستعمال المجهر الإلكتروني وتسبب أمراض للنباتات والحيوانات والإنسان وللبكتريا ولمجاميع أخرى من الأوليات . (قوة تكبير المجهر 25000 – 200000) مرة . وتزرع الفايروسات فقط على الخلايا الحية مثل (أجنة بيض الدجاج – خلايا الكلية) .

3- علم البكتريا – Bacteriology :

وهو يختص بدراسة البكتريا وهي كائنات بدائية النواة وتتكون من خلية واحدة أو تجمعات من خلايا متشابهة وتتكاثر بالانشطار الثنائي .

المحاضرة الاولى

4- علم الابتدائيات أو علم الأوالي (البروتوزوا) – Protozoology :

وهو يختص بدراسة الابتدائيات (الأوالي) وهي كائنات حقيقة النواة أحادية الخلية وبعضها مفيد للحيوانات والإنسان والبعض الآخر سام ويسبب أمراض للإنسان والحيوان مثل (الأميبا والانتاميبا والكوكسيديا والثاليريا والبابيزيا وانابلازما وهيموبلازما) .

5- علم الفطريات – Mycology :

وهو يختص بدراسة الفطريات التي تضم الأعفان والخمائر وهي كائنات حقيقية النواة وخالية من الكلوروفيل وتكون عادة متعددة الخلايا وتتكاثر الفطريات بالانشطار أو التبرعم أو السبورات .

تقسيم ثاني : تقسم الأحياء المجهرية من الناحية التطبيقية أو حسب وجودها في الطبيعة إلى ما يلي :

1- الأحياء المجهرية الطبية :

ويختص بدراسة الأحياء المجهرية التي تسبب الأمراض للإنسان وطرق تشخيصها والوقاية منها.

2- الأحياء المجهرية للهواء :

ويختص بدراسة الأحياء المجهرية التي تصل إلى الهواء وتأثير الظروف الجوية عليها وأساليب تعقيم الهواء .

3- الأحياء المجهرية للمياه ومياه الفضلات :

ويختص بدراسة طرق تصفية المياه وفحوصات الأحياء المجهرية التي تجرى على المياه ودراسة طرق معالجة مياه الفضلات .

المحاضرة الاولى

4- الأحياء المجهرية للأغذية والألبان :

ويختص بدراسة الأحياء المجهرية المسببة لتلف وفساد الأغذية ودراسة طرق حفظ الأغذية ودراسة الأمراض التي تنتقل بواسطة الأغذية .

5- الأحياء المجهرية للتربة :

ويختص بدراسة الأحياء المجهرية في التربة وتأثيراتها في خصوبة التربة .

6- الأحياء المجهرية الصناعية :

ويختص بدراسة الأحياء المجهرية ذات الأهمية الصناعية مثل إنتاج المضادات الحيوية وإنتاج الأمصال والكحول والأحماض العضوية والأحماض الأمينية والفيتامينات والهرمونات والأنزيمات ومنتجات أيضية عديدة أخرى .

نبذة تاريخية عن تطور علم الأحياء المجهرية :

نشأ علم الأحياء المجهرية عندما تعلم الإنسان صنع العدسات من قطع الزجاج وتركيبها لتعطي قوة تكبير كافية لرؤية الأحياء المجهرية .

خلال القرن الثالث عشر صرح روجر بيكن أن الأمراض تسببها كائنات حية غير مرئية وتوصل إلى نفس النتيجة فرانكاسترو فيرونا في القرن الخامس عشر .

وفي القرن السابع عشر أشار الراهب كيرجر بوجود ديدان غير مرئية بالعين المجردة في اللحم والحليب المتفسخ ويعد الهولندي ليفنهوك أول من سجل ملاحظاته وبوصف دقيق من الرسوم عن البكتريا والبروتوزوا (الأوالي والابتدائيات) وساعده في ذلك هوايته في تركيب العدسات وصنع المجهر البسيط إذ تمكن من صناعة أكثر من 250 مجهر تتكون من عدسات صنعها بيده وثبتها في إطارات فضية ونحاسية ذات قوة تكبير بين (200 – 300) مرة وقد سمى البروتوزوا باسم الحيوانات المجهرية animalcules .

المحاضرة التاسعة

نمو وتكاثر البكتريا Bacterial growth and reproduction

تعريف النمو البكتريا – وهي الزيادة في عدد الخلايا الجرثومية الكلية وليست الزيادة في حجم الخلية أو كتلتها ، لذا عند تلقيح وسط غذائي بمزرعة بكتريا وبعد حضنها تحت الظروف المناسبة (37م°) . تحدث زيادة هائلة في أعداد هذه البكتريا أي يحصل لها نمو بعدة طرق :

1- عادة تتكاثر البكتريا بواسطة الانشطار الثنائي Binary fission : والذي تنقسم فيه الخلية المفردة إلى خليتين متماثلتين وهي طريقة تكاثر لا جنسي وهي أكثر الطرق شيوعاً في البكتريا .

2- طريقة التبرعم – Budding : إذ يخرج برعم صغير من أحد أطراف الخلية الأم ثم يبدأ هذا البرعم الصغير بزيادة حجمه حتى يصبح مماثلاً للخلية الأم ثم ينفصل عنها مثل جراثيم تسمى Hyphomicrobium vulgar

3- طريقة تكوين الكويندیات : حيث تبدأ خلية البكتريا بتكوين جدار للخلايا الجديدة في أحد الأطراف ثم يكتمل تكوين هذه الخلايا بمرور الوقت مثل جراثيم Streptomyces spp.

4- طريقة تجزئة الخيط : تتكاثر بعض من أنواع البكتريا الخيطية بتجزئة الخيط كما في جراثيم الـ Nocardia spp. .

5- يزداد عدد الخلايا البكتيرية المتكاثرة بطريقة الانشطار الثنائي تبعاً لنظام أسي فإذا بدأنا بخلية واحدة فإن الزيادة تكون أسية كما يأتي :

6- 1 12 22 32 42 52 62 72 82 92 102 2ن

7- حيث تمثل (ن) عدد الأجيال المتكونة – وأن الفترة اللازمة لزيادة عدد البكتريا إلى الضعف تسمى وقت الجيل generation time أي أن ظهور أي جيل جديد يعني مضاعفة للعدد الأصلي .

8- منحني النمو الطبيعي – Normal growth curve :

9- إذا لقحت خلية بكتيرية واحدة من وسط غذائي وحضنت بدرجة 37م° فأن الخلية البكتيرية تبدي خواص منحني النمو الذي يتألف من أربعة أطوار وهي :

1- طور الركود – lag phase :

في هذا الطور لاتزداد أعداد البكتريا وإنما تبقى ثابتاً مؤقتاً وهذا لايعني أن الخلايا في دور سبات ولكن الخلايا تتهيأ للنمو وتبدأ بتخليق الأحماض النووية وتصنيع الأنزيمات التي تستخدمها الخلية في عملية الانقسام .

المحاضرة التاسعة

2- طور النمو اللوغاريتمي – Logarithmic phase :

سمي بهذا الاسم لأن عدد الخلايا تزداد زيادة كبيرة (زيادة أسية) وبمعدل عال تحت الظروف المثالية من درجة الحرارة وتوفر المواد الغذائية – أن جميع الخلايا في هذا الطور تكون متماثلة من حيث التركيب الكيميائي والفعالية الحيوية . وتستخدم الجراثيم في هذا الطور في بعض الاختبارات الجرثومية في المختبر لأنها متماثلة في صفاتها الكيميائية والحيوية .

3- طور النمو الثابت – Stationary phase :

في هذا الطور يتباطأ معدل تكاثر الخلايا وعلى الرغم من أن خط النمو يبقى مستقيماً الأ أنه ليس هناك زيادة

في معدل النمو وذلك للأسباب التالية :

أ- بسبب قرب نفاذ أو استهلاك المادة الغذائية في الوسط .

ب- بسبب إنتاج مواد آيضية سامة نتيجة النمو .

جـ- بسبب توقف عملية الانقسام بسبب قلة الغذاء وبسبب زيادة السموم .

د- بسبب تساوي معدل نمو الخلايا مع معدل موت الخلايا الجرثومية .

4- طور الموت – Death phase :

بعد طور النمو الثابت فأن معدل موت الخلايا يكون أعلى من معدل إنتاج خلايا جديدة وهذا يحدث بسبب :

1- نفاذ العناصر الغذائية الأساسية في الوسط تماماً .

2- تراكم النواتج السامة المثبطة لنمو البكتريا بشكل كبير ويتناقص عدد الخلايا الحية في هذا الطور بمعدل أسي أو لوغاريتمي وفي نهاية هذا الطور نلاحظ أن معدل الموت للخلايا يقل والسبب يعود إلى :

أ- قلة أعداد الخلايا الحية المتبقية مما يجعل المادة الغذائية المتبقية في الوسط تكفي لاستمرار نمو الخلايا .

ب- تصبح الخلايا البكتيرية الميتة في الوسط مصدراً غذائياً جديداً للخلايا الحية وقد تعيش هذه الخلايا البكتيرية

الحية عدة أشهر أو عدة سنوات .

ويستفاد من دراسة أطوار نمو الجراثيم في التحكم في عملية حفظ الأغذية وذلك بإبقاء الجراثيم في طور الركود Lag phase لأطول فترة ممكنة باستخدام الحفظ بالتبريد .

المحاضرة التاسعة

الطرق المستعملة في تنمية البكتريا :

هناك عدة طرق مختبرية يمكن التحكم بها في تنمية البكتريا منها :

1- مزارع الوجبات :

في هذه الطريقة تلقح بيئة طازجة سائلة بعدد من خلايا البكتريا المراد تنميتها وتحضن تحت ظروف مناسبة للنمو (37م°) وهذا الأسلوب من طرق التنمية يمكن أن يحصل في حالة تلوث علب مادة غذائية بواسطة خلايا بكتيرية وفي هذه الطريقة نجد أن البكتريا النامية تبقى لأجيال قليلة بحيث أن الخلية الفتية يتضاعف عددها ولكن بشكل محدود .

2- المزارع المستمرة :

يمكن تنمية البكتريا في مزارع مستمرة التي يتم فيها تجهيز الوسط بالعناصر الغذائية الجديدة باستمرار ويصاحبه إزالة مستمرة لنواتج التخليق الحياتي (الايض) مع جزء من الوسط الغذائي . ففي العمليات الصناعية الكبيرة يفضل المحافظة على نمو البكتريا بمعدل عالي وثابت بحيث تبقى الخلايا باستمرار في طور النمو اللوغاريتمي وإبطاء وصول الخلايا البكتيرية إلى طور النمو stationary phase وذلك من خلال تجهيز وسط النمو بالمواد الغذائية الطازجة بمعدل يساوي معدل سحب الوسط الحاوي على الخلايا الناضجة ونواتج النمو .

ويبنى هذا من المزارع المستمرة على أحد الأساسين الآتيين :

أ- الحالة الكيميائية – Chemostat :

ويتم فيها التحكم في تركيز العناصر الغذائية الأساسية في وعاء النمو وعلى هذا الأساس يتحكم في معدلي إضافة المادة المغذية الطازجة (معدل التخفيف) وسحب الوسط المملوء بالخلايا الناضجة عند قيم ثابتة .

ب- الحالة العكرة – Turbidostat :

ويتم فيها المحافظة على المجموع الخلوي الكلي ثابتاً باستخدام جهاز قياس العكارة في وعاء المزرعة وفي ضوء ذلك يتم التحكيم بمعدل إضافة المادة الطازجة وبمعدل خروج ناتج الخلايا .

المحاضرة الثالثة

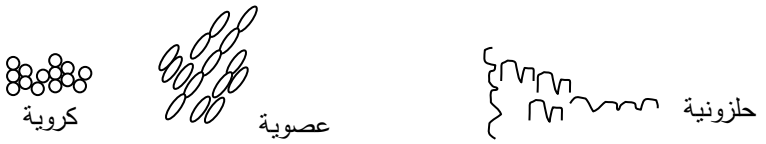
وتمتلك بعض أجناس البكتريا بروزات وعلى تراكيب داخلية عند فحصها بالمجهر الإلكتروني وفيما يلي بعض الصفات المظهرية للبكتريا :

1- حجم البكتريا :

يتراوح قطرها من (0,5 – 1) ما يكرو ميتر (الما يكرو ميتر = 10^{-6} من المتر) ونظراً لصغر حجم البكتريا فان النسبة بين مساحتها السطحية إلى حجمها تكون أكبر من خلايا الكائنات الحية الكبرى إذ أن كبر المساحة السطحية لها والتي من خلالها تدخل المواد الغذائية أو تخرج منها الفضلات مقارنة بحجمها الصغير يسبب زيادة في معدل النمو وتزداد التفاعلات الحياتية لخلية البكتريا وأن مواد الخلية التي تحتاج للتغذية تنتشر بالقرب من سطح الخلية ولا تحتاج خلية البكتريا إلى جهاز دوران لتوزيع الغذاء .

2- شكل البكتريا وترتيبها :

يتحدد شكل الخلية البكتيرية بواسطة الجدار الخلوي والخلية البكتيرية المثالية إما أن تكون كروية (Coccus) أو عصوية مستقيمة bacillus أو حلزونية spirillum . وتترتب خلايا البكتريا بأوضاع مميزة لكل نوع من أنواع البكتريا



وعلى الرغم من أنه نادراً ما تكون خلايا النوع الواحد مرتبة بنفس الطريقة فان الترتيب السائد هو المميز.

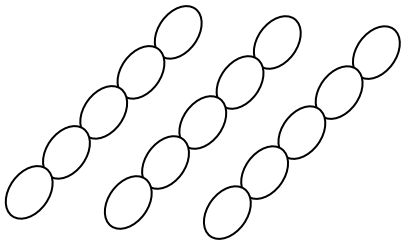
1- وتبدو الخلايا الكروية في عدة أشكال تجمعية تبعاً لمستوى الانقسام الخلوي لها فيما إذا كانت الخلايا الجديدة الصغيرة تبقى معاً بعد الانقسام .

2- الخلايا العصوية : ولا تتجمع الخلايا العصوية في تجمعات كما يحدث في الخلايا الكروية ومعظمها يوجد فردياً أو على شكل أزواج

المحاضرة الثالثة

ولكن بعض الأنواع كما في جراثيم Bacillus subtilis نشكل سلسلة من الخلايا العصوية وتسمى بالـ Streptobacilli .

وفي جراثيم الوتديات الدفتيرية Coryncbacterium diphtheria تترتب الخلايا العصوية واحدة جنب الآخرى بما يشبه عيدان الشخاط وتشكل زوايا مع بعضها الآخر.



مثل الأحرف الصينية

وهناك جراثيم تسمى بالـ .Streptomyees Sp تشكل خيوط متفرعة طويلة ومتعددة النوى تدعى بالهايفات ومجموعة الهايفات تسمى بالمايسيليوم .

3- البكتريا المنحنية – Curved bacteria : تنحني البكتريا بوجود ثنية كاملة بينما تلاحظ البكتريا التي لها أقل من ثنية واحدة بشكل يسمى بالضمة Vibrio .

بينما البكتريا التي تمتلك أكثر من ثنية كاملة لها شكل يسمى بالحلزوني helical فمثلاً بكتريا الـ spirilla لها صفة حلزونية صلبة نسبياً .

بينما تكون أنواع جنس بالـ Spirochetes قابلية للالتواء بدرجة كبيرة .

المحاضرة الثالثة

4- أشكال أخرى : مثلاً جراثيم الباستوريلا تشكل أزواج من الخلايا وجراثيم الجمرة الخبيثة بشكل خلايا عصوية ذات نهاية مربعة بدلاً من نهاية دائرية، أو خلايا على شكل أقراص كأنها مجموعة من النقود المعدنية كما في جنس Caryophanon .

3- البكتريا المنحنية – curved bacteria :

تنحني البكتريا المنحنية بوجود ثنية كاملة بينما تلاحظ البكتريا التي لها أقل من ثنية واحدة بشكل يسمى بالضمة Vivrio .

بينما البكتريا التي التي تمتلك أكثر من ثنية كاملة لها شكل يسمى بالحلزوني helical فمثلاً بكتريا الـ Spirilla لها صفة حلزونية صلبة نسبياً ، بينما تكون أنواع جنس الـ Spirochetes قابلة للالتواء بدرجة كبيرة .

4- أشكال أخرى :

مثلً جراثيم الباستوريلا تشكل أزواج من الخلايا وجراثيم الخبيثة بشكل خلايا عصوية ذات نهاية مربعة بدلاً من نهاية دائرية أو خلايا على شكل أقراص كأنها مجموعة من النقود المعدنية كما في جنس Caryophanon .

المحاضرة الثامنة

ب- الأحتياجات الفيزيائية للنمو (العوامل الفيزيائية المؤثرة في النمو) :

إضافة للاحتياجات الغذائية لنمو البكتريا فأنه من الضروري أن تتوافر الظروف الفيزيائية الملائمة لنمو البكتريا مثل درجة الحرارة وتركيز أيون الهيدروجين في الوسط وتركيز الغازات .

1- درجة الحرارة :

تتأثر البكتريا كثيراً بدرجة الحرارة وذلك لأن الحرارة تتحكم بمعدل التفاعلات الكيميائية التي تحدث داخل الخلية وأن درجة الحرارة التي يحصل فيها النمو السريع للبكتريا وخلال فترة قصيرة تسمى بدرجة حرارة النمو المثالية optimum growth temperature وحسب احتياجات البكتريا للحرارة يمكن تقسيم البكتريا إلى المجاميع التالية :

أ- البكتريا المحبة للبرودة – psychrophiles :

وهي مجموعة الجراثيم التي لها القابلية على النمو في درجة الصفر المئوي أو أقل ولكنها يمكن أن تنمو بشكل أفضل بدرجة حرارة أعلى ولها درجة نمو مثالية هي 15 م° ، أما درجة الحرارة العظمى لها هي 20 م° (مثل جراثيم الليسيريا) .

ب- البكتريا المحبة للحرارة المتوسطة – Mesophiles :

وهي مجموعة الجراثيم التي تنمو بين (25 – 40) م° وتضم عدد كبير من الأنواع والأجناس أكثر من مجموعة البكتريا المحبة للبرودة ومجموعة البكتريا المحبة للحرارة العالية وأن غالبية البكتريا المرضية للإنسان والحيوان تقع في هذه المجموعة حيث أنها تنمو جيداً في درجة حرارة الجسم الإنسان والحيوان (37م°) .

جـ- البكتريا المحبة لدرجة الحرارة العالية – Thermophiles :

وتضم هذه المجموعة الأنواع البكتيرية التي يمكنها النمو في درجة حرارة مثالية هي 45 م° وبمدى حراري بين (40 – 65م°) .

2- تركيز أيون الهيدروجين (PH) – (الأس الهيدروجيني) :

تنمو معظم أنواع البكتريا عند أرقام هيدروجينية مثالية تتراوح بين (6,5 – 7,5) ولكن عموماً يكون المدى أوسع وذلك بحدود رقم هيدروجيني بين (5 – 9) . وهناك قليل من البكتريا لها أرقام هيدروجينية مثالية تتراوح بين (2 – 3,5) حتى يمكنها أن تنمو بسرعة وتسمى بالبكتريا الحامضية Acidophilic bacteria ومثال عليها جراثيم Thiobacillus thiooxidans .

المحاضرة الثامنة

وهناك بكتريا عزلت من الينابيع القاعدية ولوحظ بأنها تنمو جيداً عند رقم هيدروجيني بين (9 – 9,5) ويمكنها النمو بمدى هيدروجيني أوسع بين (8 – 11,4) وتسمى بالبكتريا القاعدية Basophilic bacteria .

3- الغازات – Gases :

يعد الأوكسجين وثاني أوكسيد الكربون من الغازات المهمة التي لها تأثير كبير في نمو البكتريا ويمكن تقسيم البكتريا حسب احتياجاتها للأوكسجين إلى الأنواع التالية :

أ- البكتريا الهوائية – Aerobic bacteria :

وهي الجراثيم التي تحتاج إلى الأوكسجين في نموها ويمكنها النمو حتى في النسبة الطبيعية للأوكسجين الموجودة في الجو مثل جراثيم المكورات العنقودية والمكورات السبحة والوتديات .

ب- البكتريا اللاهوائية :

وهي الجراثيم التي لا تستطيع النمو بوجود الأوكسجين حيث يعتبر الأوكسجين ساماً لها مثل جراثيم المطثيات Clostridia .

جـ- البكتريا اللاهوائية الاختيارية :

وهي الجراثيم التي عند عدم وجود الأوكسجين وكذلك عند وجود الأوكسجين وهي لا تتثبط بوجود الأوكسجين .

د- البكتريا المحبة لقيل من الأوكسجين :

وهي الجراثيم التي تحتاج إلى كميات قليلة من الأوكسجين للنمو ولكنها لا تستطيع أن تتحمل المستوى الطبيعي للأوكسجين في الهواء .

جـ- الأوساط الغذائية للبكتريا – Bacterial media :

وهي الأوساط (البيئات) الحاوية على العناصر الغذائية الضرورية لنمو وتكاثر الجراثيم فإذا كانت هذه الأوساط معروفة التركيب وتحضر مختبرياً تسمى بالأوساط الغذائية التركيبية Synthetic media – أما إذا كانت المكونات الغذائية للوسط غير معروفة التركيب فتسمى بالأوساط المعقدة complex media – أن الأوساط الغذائية تكون على نوعين إما أوساط سائلة أو أوساط صلبة وعادة تتصلب الأوساط الغذائية بإضافة مادة الاكار إليها بنسبة 1,5 – 2% والاكار لا يعتبر مادة غذائية ولكنها تستخدم لتصليب الوسط وتبعاً للغرض الذي يستخدم لأجله الأوساط الغذائية يمكن تقسيمها للأنواع التالية :

المحاضرة الثامنة

1- الأوساط الانتقائية (الانتخابية) – Selective media :

وهي الأوساط المجهزة بعناصر غذائية تشجع على نمو نوع (واحد) من البكتريا وتثبط نمو الأنواع الأخرى ومثال عليها الوسط المستخدم لتنمية البكتريا المحللة للسليلوز حيث يضاف السليلوز للوسط كمصدر للكربون ولذا فان البكتريا لاتحلل السليلوز لاتنمو في هذا الوسط .

2- الأوساط التفريقية – Differential media :

تحتوي هذه الأوساط على مركبات يمكن بواسطتها التمييز بين أنواع مختلفة من البكتريا مثل وسط أكار الدم Blood agar حيث أن هناك أنواع خاصة من البكتريا قادرة على تحليل كريات الدم وتكون مناطق رائقة حول المستعمرات بينما نجد أن البكتريا لايمكنها تحليل الكريات الحمراء لاتكون مثل هذه المناطق الرائقة .

3- أوساط لعد البكتريا :

وهي أوساط غذائية عامة تستخدم لعد جميع أنواع البكتريا ويمكن لكافة أنواع الجراثيم النمو عليها ومثال عليها هو الاكار المغذي Nutrient agar .

4- أوساط لتشخيص البكتريا :

حيث تستخدم للكشف عن خواص معينة في البكتريا وتستخدم مثل هذه الأوساط لتحديد نوع النمو الناتج كأن يكون غازاً أو يسبب تغيير لون البيئة .

5- أوساط الإدامة أو الحفظ – Maintenance media :

حيث تستخدم مثل هذه الأوساط لإدامة وتنشيط حيوية البكتريا المخزنة فيها ومثال عليها المرق المغذي والأكار المغذي.

6- الأوساط المدعمة – Enriched media :

وهي أوساط سائلة عادة يضاف لها مركب معين لتنشيط نمو نوع معين من الجراثيم وتمنع بقية الأنواع مثل إضافة البترول (الهايدروكاربون) مصدراً وحيداً للكاربون إلى الوسط السائل لتنشيط البكتريا القادرة على تحليل مادة البترول وتثبيط نمو بقية أنواع البكتريا .

المحاضرة الثانية عشر

طرق زراعة الفايروسات :

من أهم طرق زراعة الفايروسات الحيوانية مايلي :

1- مزارع أجنة الدجاج – Chick embryo culture :

في هذه الطريقة يتم تحضين البيض المخصب للدجاج لمدة تتراوح من (5 – 1) يوماً ثم يحقن الفايروس تحت ظروف التعقيم من خلال فتحة تعمل في قشرة البيض ويتم الحقن في أحدى المناطق التالية :

1-في كيس المح .

2-في التجويف الرهلي Allantoic cerity .

3-في الغشاء الرهلي الكربوني Chorio allantoic membrane .

ثم تقفل الفتحة بشمع البارافين ويعاد تحضين البيض بدرجة 36م° للفترة المناسبة لنمو الفايروسات ثم يعاد فتح البيض للفحص والتشخيص .

ولقد استخدمت هذه الطريقة لإنتاج اللقاحات ضد فايروسات جدري الإنسان والحمى الصفراء والأنفلونزا ، ولكن هذه الطريقة لاتستخدم لكافة الفايروسات .

2- حقن الحيوانات المختبرية :

ومن الحيوانات المستخدمة هي الفئران وخنازير غينيا والأرانب والقرود وتعتبر هذه الطريقة وسيلة مفيدة وجيدة للتشخيص وذلك لان هذه الحيوانات يمكنها إظهار أعراض مثالية للمرض .

وكذلك يمكن فحص مقاطع نسيجية من هذه الحيوانات بواسطة المجهر .

ويمكن حقن الحيوانات المختبرية أو من خلال الدورة الدموية أو خلال الجهاز التنفسي أو عن طريق القناة الهضمية .

3- المزارع النسيجية – Tissue culture :

وهي طريقة سهلة وأقتصادية نسبياً مقارنة بحقن الحيوانات المختبرية ويمكن بسهولة ملاحظة التأثيرات التي تطرأ عليها عند نمو الفيروس عليها . وفي عام 1941 نجح العالم John Enders وشركاؤه في زراعة فيروس شلل الأطفال في مزارع خلوية غير عصبية ونالوا جائزة نوبل على هذا العمل الكبير .

وتكون المزارع النسيجية (الخلوية) على ثلاثة أنواع :

أ- المزارع الخلوية البدائية :

في هذه الطريقة يؤخذ نسيج طبيعي لأحد الحيوانات (فئران – دواجن – قردة – أرانب – إنسان) من

المحاضرة الثانية عشر

أعضاء خاصة مثل الكلية أو الكبد أو الرئة ثم تزرع وأن طبقة الخلايا المتكونة على سطح وعاء الزرع تسمى بالمزارع البدائية أو الأولية primary cathures وهي خلايا وحيدة الطبقة تغطي سطح وعاء الزرع ولا يمكن زراعة هذه المزارع لمرات كثيرة .

ب- المزارع الخلوية المزدوجة – diploid cell culture :

وهي مشتقة من المزارع الخلوية البدائية ومأخوذة من أعضاء خاصة مثل الرئتين والكلية ومن أجنة الحيوانات ولهذه المزارع نوع واحد من الخلايا ويمكن زراعتها من (50 – 100) مرة قبل أن تموت هذه الخلايا وتمتلك هذه الخلايا خواص مزدوجة للكروموسومات أي من نوع diploid وليس Haploid وتعتبر هذه الخلايا مضيفاً جيداً لمعظم الفايروسات المستخدمة في لقاحات الإنسان .

جـ- المزارع المستمرة – Continuous cell lines :

عادة تؤخذ خلايا هذه المزارع من خلايا سرطانية حيث تحتوي على عدد كروموسومات نو Haploid وليس diploid ولهذا النوع من الخلايا قابلية على الألتصاق بالسطوح أقل من بقية أنواع المزارع لهذا تكون طبقات متعددة على سطح وعاء الزرع ويكون هذا النوع من الزرع مفيداً في الدراسات التي تحتاج إلى أعداد كبيرة من الخلايا وذلك لسهولة إكثارها ولكن لاتستخدم في إنتاج اللقاحات الفايروسية للإنسان لأنها مأخوذة من خلايا سرطانية .

ويمكن إعادة زراعة هذه الأنواع من المزارع بسهولة في بيئة سائلة مجهزة بالسيرم وتتم الزراعة تحت ظروف معقمة بدون تلوث بكتيري أو فطري وتضاف لها مضادات حياتية لمنع التلوث . نمو الفايروسات تعمل تغيرات مدمرة للخلايا كلما أزداد نشاط الفيروس وتسمى التغيرات التأثير الممرض للخلايا Cytopathic effect (تنخر الخلايا – موت الخلايا – تشوهات في الخلايا) .

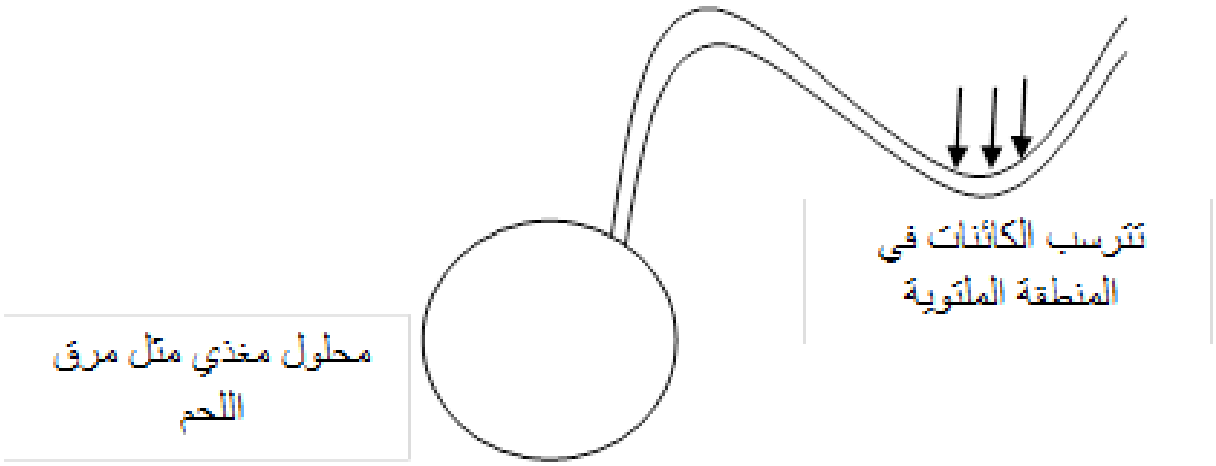
المحاضرة الثانية

نظرية التوالد الذاتي والحيوي Biogenesis and Spontaneous generation:

بعد أن شاهد ليفنهوك الأعداد الكبيرة من الأحياء المجهرية الموجودة في الطبيعة بدأ العلماء يفكرون في أصل هذه الكائنات وكان هناك مدرستان لتفسير أصل هذه الكائنات الحية فقد كان بعض العلماء يعتقدون أن هذه الكائنات الدقيقة تكونت بصورة ذاتية من أشياء غير حية مثل (اللحم – الحليب – مرق اللحم) وهذا ما يعرف بمبدأ التوالد الذاتي بينما أعتقد البعض الآخر من العلماء بأن هذه الكائنات الدقيقة الحية ولدت من أشياء حية وهو ما يعرف بمبدأ التوالد الحيوي(من كائنات حية) . فمثلاً كان يعتقد بان يرقات الذباب تتولد ذاتياً من اللحم المتفسخ وبقيت نظرية التوالد الذاتي مقبولة إلى ظهور عصر النهضة الأوربية إذ بدأت التجارب التي تفند نظرية التوالد الذاتي .

- فقد أوضح الطبيب الإيطالي فرانسيسكو ريدي بأن اليرقات التي تنشأ من اللحم المتفسخ هي يرقة الذباب وهذه اليرقات لا تظهر أبداً في حالة حفظ اللحم في وعاء وتغطيته بالشاش فبذلك لا يستطيع الذباب من الوصول إلى اللحم ووضع بيوضه عليه وبهذه التجربة فند ريدي الاعتقاد الذي كان سائداً بأن يرقة الذباب تتولد ذاتياً من اللحم .

- وكذلك فأن ظهور الأحياء المجهرية في مرق اللحم كان يؤيد أصحاب نظرية التوالد الذاتي إلى منتصف القرن التاسع عشر إذ قام العالم الإيطالي سبالانزاني بسلسلة من التجارب إذ أنه بين أن الحرارة تمنع ظهور الأحياء المجهرية في مرق اللحم فقام بتسخين مرق اللحم لمدة ساعة في دورق مقفل فلم يلاحظ ظهور الأحياء المجهرية فيها .



المحاضرة الثانية

وقد اندثرت نظريه النشوء الذاتي إلى الأبد بالنتائج التي حصل عليها لويس باستور عندما قام بتجربته الشهيرة حيث أستعمل دورقاً ذات أنبوبة شعرية طويلة ومعقوفة وملتوية تشبه عنق الإوزة حيث قام بوضع محلول مغذي في الدورق وسخنه وتركه لفترة ولم تظهر أية كائنات مجهرية في المحلول المغذي لأنها كانت تستقر في المنطقة الملتوية في الأنبوبة .

تجارب باستور :

كانت الصناعة الأساسية في فرنسا هي صناعة النبيذ والبيرة ووجد باستور بأن تخمر الحبوب وعصير الفواكه ينتج منه الكحول بواسطة الأحياء المجهرية ولاحظ بأن وجبات النبيذ ذات النوعية الجيدة كان فيها نوع واحد من الأحياء المجهرية بينما وجبات النبيذ ذات النوعية الرديئة وجد فيها عدة أنواع من الأحياء المجهرية وأكد باستور بأن اختيار الكائن المجهري الملائم يعطي منتجات ذات نوعية جيدة وأقترح بإزالة الأنواع غير المرغوب فيها من الأحياء المجهرية وذلك بالتسخين بدرجة 62,8°م لمدة نصف ساعة أدت هذا الغرض وهذا يسمى بعملية البسترة التي تستخدم إلى حد اليوم إذ أنها تعقم الحليب مثلاً وبدون حدوث تغير في نكهة الحليب والنبيذ وكذلك أثبت باستور بان وضع سدادات قطنية على فوهات الأوعية الحاوية على بيئات غذائية تبقى خالية من التلوث بالأحياء المجهرية فيدخل الهواء إلى البيئات ويخرج منها دون تلوث هذه الأوساط وهذا يستخدم لحد الآن .

أعمال كوخ :

أكتشف كوخ البكتريا المسببة لمرض الجمرة الخبيثة Anthrax في الماشية وأكتشف كذلك البكتريا المسببة لمرض الكوليرا Vibrio cholera وعزل البكتريا المسببة لمرض السل Mycobacterium tuberculosis وسميت بعصيات كوخ ، ويعد كوخ أول من عزل البكتريا بصورة نقية وأستعمل الصبغات لتصبيغ البكتريا وأول من أستخدم مادة الآكار في تصليب الأوساط الغذائية لذا يعد كوخ هو الرائد في تطوير التقنيات المختبرية في مجال الأحياء المجهرية.

المحاضرة الثانية

اكتشاف الفايروسات :

أن أهم المبتكرات التقنية لمعهد باستور في فرنسا هو صناعة المرشحات التي لها قابلية حجز البكتريا فتعطي راشحاً خالياً من البكتريا وكانت تفحص السوائل الحاوية على الأحياء المجهرية المرضية للتأكد من وجود البكتريا المسببة للأمراض خلال هذه المرشحات فإذا كان الراشح ليس له القدرة على حدوث إصابة مرضية يعد مؤشراً على وجود البكتريا المرضية في السائل الأصلي.

وفي عام 1892 أستخدم العالم الروسي ايفانوفسكي هذا الاختبار على مستخلص من نبات التبغ المصاب بمرض الموزاييك ولاحظ بان له قدرة على إصابة النباتات غير المصابة بهذا المرض وأكتشف بعدها العلماء بأن بعض أمراض الحيوانات والنباتات سببها كائنات صغيرة جداً وهي أصغر من الجراثيم إذ تستطيع العبور من خلال مرشحات البكتريا وهذه سميت بالفايروسات .

وقام العالم ستانلي بعزل الفايروسات المسببة لمرض موزاييك التبغ على شكل بلورات وحصل على جائزة نوبل عام 1946 لاكتشافاته القيمة في موضوع الفايروسات

الصفات الظاهرية أو المورفولوجية للبكتريا :

تختلف البكتريا في أحجامها وأنواعها وأشكالها وتركيبها وطريقة تجمعها وحركتها وعلى الرغم من وجود الآف الأنواع من البكتريا فأن الخلايا المفردة البكتيرية قد تكون شكلها كروية أو عصوية أو حلزونية .

وتتجمع بعض أنواع البكتريا في مجاميع مختلفة على هيئة أزواج أو عناقيد أو سلاسل أو خيوط ومن المهم أن نتعرف على أشكال البكتريا وتجمعاتها لأهميتها في تصنيف البكتريا . وتمتلك بعض أجناس البكتريا بروزات وعلى تراكيب داخلية عند فحصها بالمجهر الإلكتروني وفيما يلي بعض الصفات المظهرية للبكتريا :

المحاضرة الخامسة

تشريح البكتريا :

عند فحص خلية البكتريا نلاحظ أن الخلية البكتيرية تحتوي على كثير من المكونات والتراكيب بعضها يكون موقعها خارج الخلوي وهي الأجزاء غير الأساسية للبكتريا وبعضها يكون موقعها داخل الجدار الخلوي وهي الأجزاء الأساسية للبكتريا .

أ- التراكيب التي تقع خارج الجدار الخلوي – وتشمل :

1. **جدار الخلية .**
2. **الكبسولة .**
3. **الاسواط .**
4. **الأهداب .**

ب- التراكيب الداخلية (داخل الجدار الخلوي) – وتشمل :

1. **الغشاء السايتوبلازمي .**
2. **البروتبلاست .**
3. **السايتوبلازم .**
4. **المادة النووية .**
5. **الحبيبات المخزونة في السايتوبلازم .**
6. **سبورات البكتريا .**

المحاضرة الخامسة

أ- التراكيب التي تقع خارج الجدار الخلوي (الأجزاء غير الأساسية للبكتريا) :

1- جدار الخلية – cell wall :

وهو تركيب يعطي للخلية شكلها المميز حسب النوع حيث أن الوظيفة الرئيسية لهذا التركيب هو الحد من تمدد الخلية وأنفجارها نتيجة دخول الماء إليها وسمك الجدار بحدود (20 – 25) نانوميتر في البكتريا الموجبة لصبغة كرام وبحدود (10 – 15) نانوميتر في البكتريا السالبة لصبغة كرام ويشكل جدار الخلية بحدود 10 – 40% من وزن الخلية حسب نوع البكتريا .

يتركب الجدار الخلوي من مادة تسمى ببتيدوكلايكان peptidoglycan وأحياناً تسمى الميورين murein وهي مادة غير قابلة للذوبان وتشكل مادة الببتيدو كلايكان 50% من الوزن الجاف لجدار الخلايا الموجبة لصبغة كرام بينما تشكل فقط 10% من الوزن الجاف لجدار الخلايا السالبة لصبغة كرام.

ويحتوي الجدار الخلوي على نسبة من الدهن والتي تكون بحدود 11 – 22% من الوزن الجاف لجدار خلية البكتريا السالبة لصبغة كرام بينما لاتتعدى هذه النسبة 4% في حالة البكتريا الموجبة لصبغة كرام.

ويحتوي الجدار الخلوي أيضاً على سكريات متعددة مرتبطة مع الببتيدوكلايكان . وتحتوي جدار بعض أنواع البكتريا على حامض التيكويك Teichoic acid وهذا يعطي حماية ضد التأثيرات الحرارية .

2- الكبسولات – Capsule :

الكبسولة عبارة عن مادة لزجة تشكل طبقة أو غلافاً هلامياً حول الجدار الخلوي وهو يحيط ببعض الخلايا البكتيرية فإذا كانت هذه الطبقة رقيقة جداً بحيث لاترى بالمجهر الضوئي فتسمى الكبسولة الصغيرة microcapsules وإذا كانت هذه الطبقة اللزجة سميكة جداً بحيث تلتصق عدة خلايا مع بعضها فتسمى بالـ Slime .

المحاضرة الخامسة

وتظهر الكبسولة بالمجهر الضوئي على شكل طبقة جيلاتينية تحيط بالخلية وتستخدم صبغة الحبر الهندي في صبغ الغشاء البكتيري فتظهر الخلفية معتمة وتظهر الكبسولات المحيطة بالخلايا البكتيرية مضيئة .

تتركي الكبسولة من مركبات مختلفة منها كاربوهيدرات معقدة (سكريات متعددة) مثل الـ Dextran ـ أو من خليط من السكريات والأحماض العضوية وفي أغلب أنواع البكتريا تكون الكبسولة غير قابلة للذوبان في الماء وفي أنواع آخرى لها قابلية للذوبان في الماء عالية فهي تزيد من لزوجة البيئة السائلة التي تنمى فيها مثل هذه الأنواع من البكتريا .

وللكبسولة عدة وظائف بالنسبة للبكتريا منها :

أ- يمكن أن تساعد البكتريا على الألتصاق في السطوح فمثلاً البكتريا المسببة لتسوس الأسنان Streptococcus mutant تمتلك كبسولة تساعدها على الألتصاق بسطح الأسنان الأملس .

ب- تمنع خلايا الدم البيضاء من التهام البكتريا المرضية فتزيد من قابلية البكتريا على أحداث المرض .

جـ- تعطى حماية للبكتريا ضد الجفاف المؤقت وذلك من خلال شد جزئيات الماء .

د- يمكن أن تكون حاجزاً أو مانعاً لألتصاق البكتريا مع بعضها ؟.

هـ- بعض الكبسولات تحوي مواد لها شحنات كهربائية مثل حامض الكلوكويورونيك gluco-uronic acid حيث تساعد على ثباتية الخلايا في البيئة بصورة متساوية لان شحنات الجزيئات تجعلها تتنافر بصورة دائمية فتبقى الخلايا منتشرة دون أن تتجمع أو تترسب في القعر .

المحاضرة الرابعة

فحص البكتريا :

هناك طريقتان تستخدمان لتحضير عينة من الأحياء المجهرية للفحص تحت المجهر الضوئي وهما :

1- التحضير الرطب والقطرة المعلقة (لفحص الخلايا الحية) .

2- التحضير المصبوغ الثابت (الغشاء المصبوغ الثابت)(لفحص الخلايا الميتة) .

1- التحضير الرطب والقطرة المعلقة Wet preparation and Hanging Drop : تساعد التحضيرات الرطبة على فحص خلايا الأحياء المجهرية وهي في حالتها الطبيعية الحية وتتلخص هذه الطريقة بوضع قطرة سائلة من المعلق الحاوي على الأحياء المجهرية على شريحة زجاجية وتغطى بغطاء زجاجي رقيق cover slip ولتقليل معدل التبخير من القطرة يمكن إضافة صبغ الأظافر على حواف الغطاء الزجاجي لتوفير لحيم بين الشريحة الزجاجية والغطاء الزجاجي الرقيق .

أما طريقة القطرة المعلقة فتستخدم فيها شريحة زجاجية خاصة فيها تقعر في وسطها تفحص التحضيرات الرطبة حيث توضع قطرة العينة المراد فحصها على غطاء الشريحة (cover slip) وتوضع أربع نقاط من الماء المقطر أو الفازلين في زوايا غطاء الشريحة وحول القطرة ثم تقلب الشريحة الزجاجية بحيث تكون القطرة في وسط التقعر لتكوين القطرة المعلقة بعد قلب الشريحة الزجاجية مرة أخرى بحيث يكون غطاء الشريحة فوق الشريحة الزجاجية.

ويعد فحص الأحياء المجهرية بالتحضيرات الرطبة أو القطرة المعلقة مرغوباً فيه ومفيداً في الحالات التالية : (فوائد هذه الطريقة) :

1- في حالة فحص البكتريا الحلزونية وهي بحالة حية مثلاً لفحص عينة خراج مشكوك في أحتوائه على بكتريا الـ Spirochetes الحلزونية والمسببة لمرض السفلس فالتحضير الرطب لهذه العينة يفحص بالمجهر ذي الحقل المعتم وأن هذه الطريقة تعطي تبايناً واضحاً بين الكائن المجهري وخلفية الحقل المجهري المعتم .

3- تستخدم التحضيرات الرطبة لتحديد حركة البكتريا (إذ تلاحظ حركة البكتريا المتحركة) .

المحاضرة الرابعة

الصبغات الميكروبية :

هناك عدد كبير من الصبغات التي تستخدم لصبغ خلايا الأحياء المجهرية وهذه الصبغات تقسم إلى صبغات قاعدية أو حامضية أو متعادلة ، فالصبغات القاعدية تحمل شحنة موجبة والصبغات الحامضية تحمل شحنة سالبة وتشمل عملية الصبغ على تفاعل تبادل آيوني بين الصبغة وبين المواقع الفعالة على الأسطح أو في داخل الخلايا . نلاحظ أن الصبغات الحامضية تصبغ مكونات الخلايا القاعدية بينما الصبغات القاعدية تصبغ مكونات الخلايا الحامضية .

– مثال على الصبغات القاعدية – صبغة أزرق المثيلين .

– مثال على الصبغات الحامضية – صبغة الايوسين .

– مثال على الصبغات المتعادلة – صبغة الايوسين المثيلين الأزرق .

طرق صبغ البكتريا :

1– الصبغ البسيط : وهي عملية صبغ البكتريا بإضافة محلول صبغة واحدة إلى الغشاء البكتيري الثابت . حيث يغمر الغشاء البكتيري بمحلول الصبغة لفترة دقيقة مثلاً وبعدها تغسل الشريحة بالماء وتترك لتجف وتنصبغ كل الخلايا بشكل متساوي .

2– الصبغ التفريقي : وهي عملية الصبغ المتمييز بين خلايا البكتريا المختلفة أو بين أجزاء من خلية البكتريا الواحدة حيث أن الخلايا البكتيرية تتعرض لأكثر من صبغة واحدة ومن أهم أنواع هذا الصبغ هو :

صبغة كرام – Gram staining :

صنع هذه الطريقة الباحث كريستيلن كرام ولذلك سميت بأسمه إذ يتم تعريض الغشاء البكتيري لعدة محاليل متسلسلة وهي (الجنشيان البنفسجي – ومحلول اليود – كحول (وهو مزيل الصبغة) – والسفرانين) وتقسم الجراثيم حسب هذه الطريقة لقسمين :

المحاضرة الرابعة

1-البكتريا الموجبة لصبغة كرام – وهي التي تحتفظ بالصبغة الأولى (الجنشيان البنفسجي) وتظهر بلون بنفسجي غامق .

2-البكتريا السالبة لصبغة كرام – وهي التي لا تحتفظ بالصبغة الأولى (الجنشيان البنفسجي) وتنصبغ بالصبغة الثانية (صبغة السفرانين) ولذا تظهر بلون أحمر .

وسبب ذلك هو وجود اختلاف في تركيب جدار الخلايا البكتريا المختلفة فنلاحظ أن سمك الجدار الخلوي للبكتريا الموجبة لصبغة كرام يكون أكثر من سمك السالبة الكرام وذلك فأن البكتريا السالبة الكرام وكذلك فأن البكتريا السالبة الكرام تحتوي في جدارها على نسبة دهن أعلى من البكتريا الموجبة الكرام فعند إضافة الكحول تزيل الدهن الموجود في جدار البكتريا السالبة وتتكون مكانها ثقوب في جدار الخلية وأن الصبغة الجنشيان البنفسجي مع اليود سوف تزال أثناء عملية إضافة الكحول وتصبح البكتريا عديمة اللون ومستعدة للاصطباغ بصبغة السفرانين الحمراء وكذلك فأن البكتريا الموجبة لصبغة كرام تحتوي جدارها على نسبة قليلة من الدهن فتحتفظ بصبغة الجنشيان البنفسجي – اليود ولا يمكن إزالته بالكحول .

وكذلك فأن جدار البكتريا الموجبة لصبغة كرام تحتوي على نسبة أعلى من مركب ببتيدوكلايكان peptidoglycan بينما جدار البكتريا السالبة تحتوي على نسبة قليلة جداً من هذا المركب وهذا المركب له دور في تكوين شبكة لحجز المركب المعقد (الجنشيان البنفسجي – اليود) كما في حالة البكتريا الموجبة لصبغة الكرام .

المحاضرة الرابعة

3-الصبغات التفريقية الأخرى : هناك طرق كثيرة من الصبغات تستخدم لصبغ بعض مكونات الخلية وتشمل الآتي :

نوع التصبيغ	التطبيق (استخداماته)
أ- تصبيغ السبورات الداخلية	لتوضيح تركيب السبور وأماكن تواجده داخل البكتريا
ب- الصبغات المقاومة للأحماض	لصبغ عصيات السل التي تتقبل الحامض
جـ- الصبغات الكبسولات	لتوضيح الكبسولات المحيطة بخلية البكتريا
د- صبغات الاسواط	لتوضيح الاسواط على الخلية البكتيرية
هـ- صبغات سايتوبلازمية	لصبغ حبيبات النشأ والكولاجين وغيرها
و- صبغة الـ Giemsa	لصبغ الركتيسيا وبعض البروتوزوا (الأوالي)
ز- الصبغ السالب	تصبيغ الخلفية معتمة بينما الكبسولة تبقى مضيئة

المحاضرة السادسة

الذبح الاضطراري Emergency Slaughter

الهدف : هو ذبح الحيوانات اضطراريا سواء كانت مريضة (مرض معدي او مرض غير معدي) او بسبب اصابتها بحوادث مثل كسر الارجل.

طريقة الذبح الاضطراري :(تقنية الذبح)

اولا: عند وصول الحيوانات حية الى المجزرة ويتم معاملتها كما يأتي:

1- يتم عمل شريحة دم للفحص عن مرض الجمرة الخبيثة.
2- الفحص العياني قبل الذبح ويشمل:
علامات الصحة مثل درجات الحرارة والنبض والتنفس وفحص الجلد والاغشية المخاطية .
3- الذبح Slaughtering
4- السلخ Skinning
5- إزالة الاحشاء Evaceration
6- فحص اللشة بعد الذبح Postmortem inspection

ثانيا : عند وصول الحيوان ميتا (مذبوحا) إلى المجزرة: ويتم معاملته كما يأتي :

1- عمل شريحة دم للفحص حول مرض الجمرة الخبيثة.
2- تحديد وقت ونوع الذبح.
3- السلخ وازالة الاحشاء.
4- فحص اللشة بعد الذبح.
5- الحكم على الذبيحة ،ويشمل ما يلي :
ا- درجة النزف : داخل اللشة ،في الاعضاء ، في الاوردة بين الاضلاع.

ب- حالة اللحم والاعضاء.

ج- لون الدهن والاغشية المصلية.

ثالثا : عند وصول الحيوان مذبوحا ومسلوخا : يتم معاملته كما يلي :

1- يجب ا تكون الاعضاء الداخلية مع لشة الحيوان.
2- عمل مسحة دم من الكلية للفحص عن مريض الجمرة الخبيثة.
3- فحص اللشة والاعضاء بالعين المجردة بشكل دقيق.
4- الفحص المختبري.

الحكم على اللشة : ويعتمد ذلك على :

1- درجة النزف : في الكلية، في اللحم، في الاوردة بين الاضلاع.
2- حالة اللحم والاعضاء.
3- لون الدهن والاغشية المصلية.

المحاضرة السادسة

الفحوصات الصحية للثة بعد الذبح Post mortem inspection

فحص اللثة بعد الذبح والسلخ:
الاساسيات : Essentials
1- يجب ان يتم الفحص بعد الذبح والسلخ مباشرة.
2- يجب ان يتم الفحص في الضوء الطبيعي او تحت الضوء الاصطناعي.
3- يجب ان يتم الفحص في قاعة الذبح.
4- يجب ان يكون الرأس والاحشاء الداخلية مع اللثة.

طريقة (خطوات) الفحص Procedure of inspection

العضلات Muscles

1- الفحص العياني Visual inspection
2- عمل قطع في العضلات Muscle incision

الاعضاء الداخلية Internal organs

1- الفحص العياني Visual inspection
2- طريق الجس اليدوي Palpation
3- عمل قطع في العضو الداخلي.

العقد اللمفاوية Lymph nodes

1- عمل قطع في العقد اللمفاوية.

طريقة الفحص في الحيوانات المختلفة (الفحص بعد الذبح والسلخ)

الابقار Cattle

ا- فحص الرأس والعقد اللمفاوية :

1- فحص الاسنان لتقدير .
2- فحص اللثة والشفة ،لتحديد التهابات الفم ومرض الحمى القلاعية والطاعون البقري.
3- فحص اللسان :الفحص العيني Visual
الفحص بالجس Palpation
عمل قطع باللسان Incision

المحاضرة السادسة

وذلك للكشف عن حالات التهاب الفم Stomatitis والحمى القلاعية FMD والطاعون البقري Cattle plague والفطار الشعي Action mycosis والفطار العصوي Actionbacillosis

4- **اللوزتين Tonsils :**
للكشف عن حالات التهاب اللوزتين.

5- العقد اللمفاوية :
البلعومية والنكفية.

6- عضلات الماضغة Maseter Muscle للكشف عن حالات Cycticercus bovis

المحاضرة العاشرة

طرق القياس الكمي لنمو البكتريا

يوجد عدد من الطرق التي يمكن أتباعها في حساب أعداد البكتريا وفيما يلي أهم الطرق البكتريولوجية المستعملة لعد البكتريا :

1-العد المجهري المباشر :

حيث يمكن بسهولة عدد خلايا الجراثيم في حجم من العينة وذلك باستخدام الطرق التالية :

أ- باستخدام شريحة بتروف هاوسر Petroff – Housser وتسمى أيضاً بجهاز عد خلايا الدم الحمراء Hem cytometer وهي شريحة زجاجية خاصة فيها تقعر صغير عمقه 0,2 ملم وإن قاعدة هذا التقعر مقسم إلى مربعات صغيرة مساحة كل واحد منها 0.0025 ملم^2 ويملأ هذا المربع بسائل حجمه بقدر 1/20000000 سم^3 .

فيوضع المحلول البكتيري في هذا التقعر ثم يغطى بغطاء شريحة وبعدها تفحص الشريحة تحت المجهر وتحسب عدد الخلايا في عدد من المربعات وبقدر العدد الكلي للبكتريا في 1 سم^3 من متوسط عدد الخلايا البكتيرية من كل مربع مضروباً في × 20 مليون ومن مساوئ هذه الطريقة أنها تحسب العدد الكلي للبكتريا الحية والميتة .

ب- طريقة بريد – Breed :

في هذه الطريقة ينتشر 0,01 سم^3 من المحلول البكتيري على مساحة قدرها سنتمتر مربع واحد على سطح شريحة زجاجية ثم يجفف الغشاء ويثبت ويصبغ بالصبغة المناسبة ثم يقدر عدد البكتريا في 50 حقل مجهري ثم يحسب معدل أعداد البكتريا في الحقل المجهري الواحد ثم يطبق القانون التالي لإيجاد أعداد البكتريا :

$$\text{عدد البكتريا} = \frac{100 \times 100}{\text{مساحة الحقل في المليمتر المربع الواحد}}$$

حيث تمثل الـ 100 الأولى عدد المليمترات المربعة في السنتمتر المربع الواحد .

وتمثل الـ 100 الثانية مقلوب حجم الكمية 0,01 سم3 للسائل المنشور .

ومن مساوئ هذه الطريقة أنها تعد كذلك الخلايا الحية والميتة ولا تنفع في العينات التي فيها عدد قليل من خلايا البكتريا

2- العد الالكتروني لخلايا البكتريا – Electronic cell counter :

يستخدم هذا الجهاز أصلاً لعد الخلايا الحمراء في المستشفيات ولكنه وجد مفيداً في عد خلايا الجراثيم أيضاً

المحاضرة العاشرة

لدقته وسرعته ففي هذه الطريقة يمرر معلق بكتريا من شق ضيق قطره (10 – 30) مايكروميتر وعند مرور خلية بكتريا من الشق فأن المقاومة تزداد مباشرة وتظهر بشكل نبضة في جهاز العد الالكتروني وعلى عدد الخلايا التي تمر تحسب عدد النبضات آلياً في حجم معين من معلق البكتريا وتعد هذه الطريقة سريعة لكنها تحتاج إلى جهاز الكتروني وكذلك فأن العد تشمل الخلايا الميتة والحية .

3- طريقة الأطباق المصبوبة – Plate count method :

هي أحدى الطرق الأكثر استخداماً لعد البكتريا حيث تعمل عدة تخافيف لمعلق البكتريا وذلك باستخدام الماء المقطر والمعقم في التخفيف ثم ينقل إما 1 مل أو 0,1 مل من المحلول المخفف إلى أطباق بتري المعقمة ثم تضاف إليها أوساط غذائية معينة مثل الاكار المغذي (Nutrient agar) وتوضع في الحاضنة وبعد 24 ساعة يمكن عد المستعمرات التي تظهر على الوسط الغذائي ويفضل أن يكون أعداد المستعمرات بين (30 – 300) مستعمرة للطبق الواحد . ويحسب أعداد البكتريا في المليلتر الواحد من العينة الأصلية وذلك بضرب عدد المستعمرات في الطبق × مقلوب التخفيف المستخدم مع الوسط الغذائي .

طريقة الأطباق المصبوبة لعد البكتريا في العينات

وتعتبر هذه الطريقة دقيقة لأن أي خلية بكتيرية يمكن أن تكون مستعمرة وكذلك يمكن بواسطتها تمييز البكتريا المختلفة المكونة للمستعمرات بأشكال وأحجام وألوان مختلفة بحيث يمكن عد البكتريا المختلفة . ومن مساوئ هذه الطريقة أن البكتريا التي تتأثر بحرارة الوسط الغذائي عند الصب لايمكنها أن تنمو وتستغرق طريقة العد وقتاً طويلاً .

4- العد الأحتمالي أو التفريقي :

تحضر في هذه الطريقة ثلاث مجاميع من أنابيب الوسط السائلة (وكل مجموعة تحوي خمسة أنابيب) حيث تلقح كل أنبوبة منها بـ 1مل أو 0,01 مل من ثلاثة تخافيف مختلفة من العينة الأصلية مثلاً (10^{2} – 10^{3} – 10^{4}) ثم تحضن الأنابيب بدرجة الحرارة المناسبة وبعد التحضين يحسب عدد الأنابيب التي ظهر فيها نمو وتعتبر موجبة وتقارن بجدول إحصائي خاص لاستخراج العدد التقريبي .

5- العد بالمرشح الغشائي – Membrane fitter count :

وهي طريقة عد مفيدة جداً وتعد تحويراً لطريقة الأطباق المصبوبة وتعتمد على تجديد حجم معين من السائل الذي يحتوي على جراثيم من خلال مرشح معلوم الفتحات بحيث لا تمر البكتريا من خلاله ولكن

المحاضرة العاشرة

تعبر جزئيات السائل فقط ، وهذه الطريقة مفيدة في تقدير عدد البكتريا في كمية كبيرة من العينة والتي تحتوي على أعداد قليلة من الخلايا البكتيرية الحية. وبعد الترشيح يؤخذ الغشاء الحاوي على البكتريا ويوضع على وسط غذائي في طبق بتري مثل الآكار المغذي ويوضع بالحاضنة بدرجة 37م° لمدة 24 ساعة وبعدها نلاحظ نمو مستعمرات البكتريا على سطح الغشاء في الطبق .

6- طريقة قياس العكارة – Turbidimetric method :

أن محلول الخلايا البكتيرية يكون عكراً لأن كل خلية بكتيرية تشتت الضوء فكلما زاد عدد الخلايا في المحلول أزداد وتشتت الضوء وثم تزداد العكارة .

ولقياس درجة العكارة تستخدم جهاز قياس الألوان Colorimeter أو جهاز قياس الطيف الضوئي (المطياف الضوئي) Spectrophotometer وعند العمل بالجهاز تستخدم أنبوبة بها نفس الوسط الغذائي المستخدم في تنمية البكتريا وتستخدم طول الموجة 420 نانوميتر في حالة الوسط الشفاف أو طول موجي 600 نانوميتر في حالة الوسط الداكن .

ومن مساوئ هذه الطريقة أنها غير حساسة في المزارع النامية في بيئات داكنة اللون وكذلك تسجل قراءات خاطئة في حالة وجود مواد عالقة غير البكتريا في المحلول وأيضاً لاتفرق بين الخلايا الحية والميتة .

7- طريقة قياس المحتوى من النيتروجين – Nitrogen content determination :

يعد عنصر النيتروجين جزءاً مهماً من البروتين . وأن البروتين يعد مكوناً أساسياً لمحتويات الخلية البكتيرية ، لذا يمكن قياس عدد البكتريا من خلال قياس كمية النيتروجين البكتيري حيث أن محتوى الخلية البكتيرية هي بنسبة 14 – 16% على أساس الوزن الجاف . ولقياس النمو بهذه الطريقة يجب جمع محصول الخلايا البكتيرية وثم غسلها من الوسط ثم بعد ذلك تقدير كمية النيتروجين بأحد الطرق الكيميائية.

ومن عيوب هذه الطريقة أنها لا تستخدم إلا في وجود تركيز عالٍ من خلايا البكتيريا في الوسط الزرعي لا تستخدم هذه الطريقة في البحوث فقط .

8- طريقة قياس الوزن الجاف للخلايا – Determination of the dry weight of cells :

تعد هذه الطريقة من أكثر الوسائل المباشرة لتقدير كتلة الخلايا البكتيرية ولكنها تستخدم فقط مع النمو الكثيف للخلايا ويجب غسل الخلايا جيداً من المواد العالقة التي تزيد الوزن . فضلاً عن ذلك فأن غالباً لايعطي كل الوزن الجاف دليلاً على وجود المواد الحية في الخلايا .

وأن هذه الطريقة تستخدم مع أغلب أنواع البكتريا لقياس كتلة النمو وتستخدم في البحوث فقط .