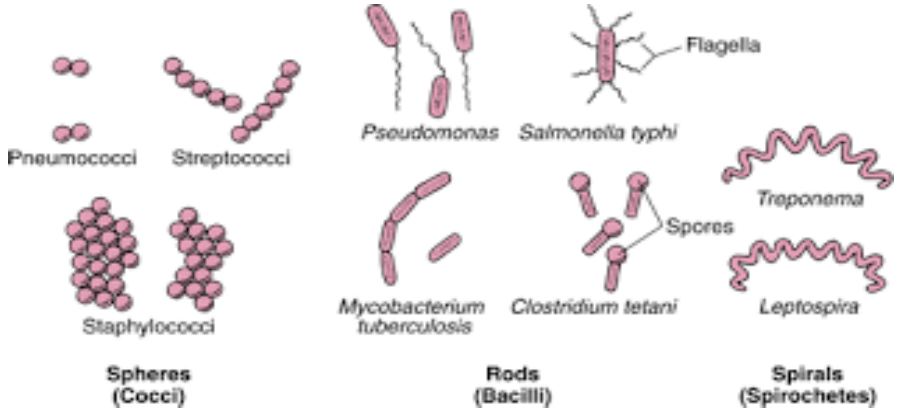
Lecture 1: Bacterial cell structures and their function
-Shape and size

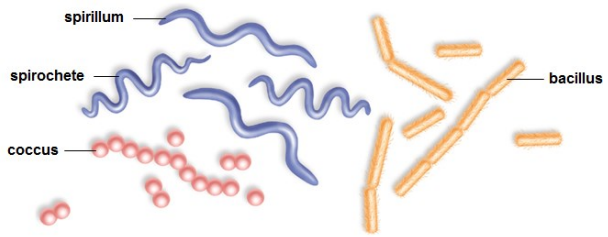
البكتريا تختلف في الاشكال والاحجام. اغلب البكتريا تكون بشكل عصوي

1- Bacilli
2- Cocci
3- Vibrios (curved rods or 'bananas') helical
4- Some rods twist into spiral shapes and are called spirilla.
5- Spirochetes, which are tightly coiled bacteria.
6- Filamentous bacteria

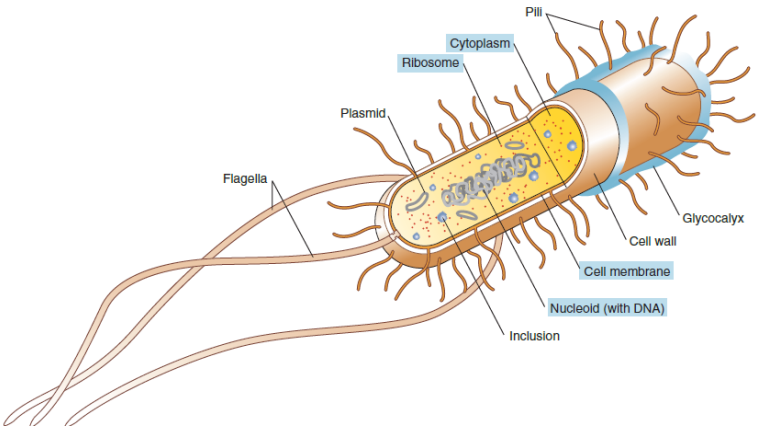
بعض البكتريا تتجمع خلاياها مع بعضها لتنتج اشكال اخرى فمثلا خليتان عصويتان مع بعضهما يكونان شكل حلزوني والخلايا الكروية تتجمع مع بعضها فمثلا المكورات السبحية تكون بشكل سلسلة واخرى تكون بشكل عنقودي وتسمى بالمكورات العنقودية.

بعض البكتريا تملك اشكال اخرى فمثلا بكتريا Spirochetes وهي بكتريا ملتفة تمتلك زوائد على شكل انابيب او سيقان, والبكتريا الخيطية وتكون على اشكال طويلة وقد تكون خلاياها على شكل سلسلة. وتمتلك الخلايا البكترية احجام مختلفة ايضا تترواح بين 0,2-700 مايكروميتر. مع حجم طبيعي يترواح بين 1-5 ميكروميتر.





تتألف الخلايا البكتريا من تراكيب خلوية داخلية واخرى خارجية.



Intracellular components:

- Cell wall.
- Cell membrane.
- Cytoplasm.
- Ribosome.
- Chromosome
- Plasmids
- Inclusion bodies.

بعض الخلايا البكترية تتصف بقدرتها على انتاج تراكيب خارجية مثل:

- Capsule.
- Fimbriae.
- Flagella.
- Pilli.
- Endospores.

The adhesion activity is supported by glycocalyx, pili and fimbriae.

ان عملية التصاق البكتريا بانسجة المضيف تتم عن طريق

Glycocalyx, pili and fimbriae.

Glycocalyx:

هو عبارة عن مواد جيلاتنية لزجة تحيط بالخلية من الخارج ويتكون من متعدد السكريات او متعدد الببتايد او الاثنان معا. في حالة اتصال هذا التركيب بقوة الى سطح الخلية يسمى بالكبسولة اما اذا كان الاتصال هش Loosely attached فيسمى Slime layer .

هذه التراكيب تفرز في داخل الخلية ثم تدفع الى سطح الخلية, وتتصف هذه التراكيب بقرتها على حماية الخلايا البكتيريا ومساعدة الاخيرة على حدوث الامراض.

Capsule:

عبارة عن طبقة جيلاتينية تغطي الخلايا البكتيرية وتتكون من متعدد الببتيد

The capsule of *Bacillus anthracis* is composed of polyglutamic acid).

Function

1-تعد عامل ضراوة مهم Virulence factors حيث تقي البكتريا من عملية البلعمة.
2- تساعد البكتريا في عملية الالتصاق وبالتالي بداية الاستعمار لتكوين المرض.
3- تشخيص البكتريا عن طريق استخدام مستضدات ضد متعدد السكريات للمحفظة.
4- متعدد السكريات للمحفظة يستخدم في تكوين اللقاح للعديد من الامراض.
5- تمنع جفاف الخلايا البكتيرية في حالات drying .
6-تقي الخلايا البكتيرية من العاثيات البكتيرية Bacteriophages .

Fimbriae

عبارة عن تراكيب خيطية تتكون من وحدات من البروتين تسمى fimbrin وهي عموما توجد على سطح البكتريا السالبة فقط.

Pili

تشبه الاهداب ولكن تكون اطول وعددها اقل فاما واحد او اعداد قليلة جدا تكون موجودة على سطح الخلية.

Function

1-تساعد على تبادل المادة الوراثية بين الخلايا البكتيرية بعملية تتدعى بالاقتران conjugation.
2- تساعد ايضا بعلمية الالتصاق لانسجة المضيف وبالتالي حدوث الغزو والاصابة.
3-تمثل مستقبلات للعاثيات.
4-تفيد في عملية تكوين الBiofilm

Flagella and Motility

تراكيب خيطية تستعمل في الحركة عن طريق دوران البكتريا ومن ثم دفع او سحب البكتريا خلال الوسط السائل وتمتد من الغشاء البلازمي الى الخارج عبر الجدار الخلوي. هذه التراكيب اسطوانية قوية يبلغ قطرها حوالي 20 نانوميتر ويصل طولها الى حوالي 15-20 ميكروميتر. الاسواط تبلغ من الدقة بحيث لا يمكن مشاهدتها الا با ستخدام صبغات خاصة تستعمل فيها مواد تزيد من سمك السوط.

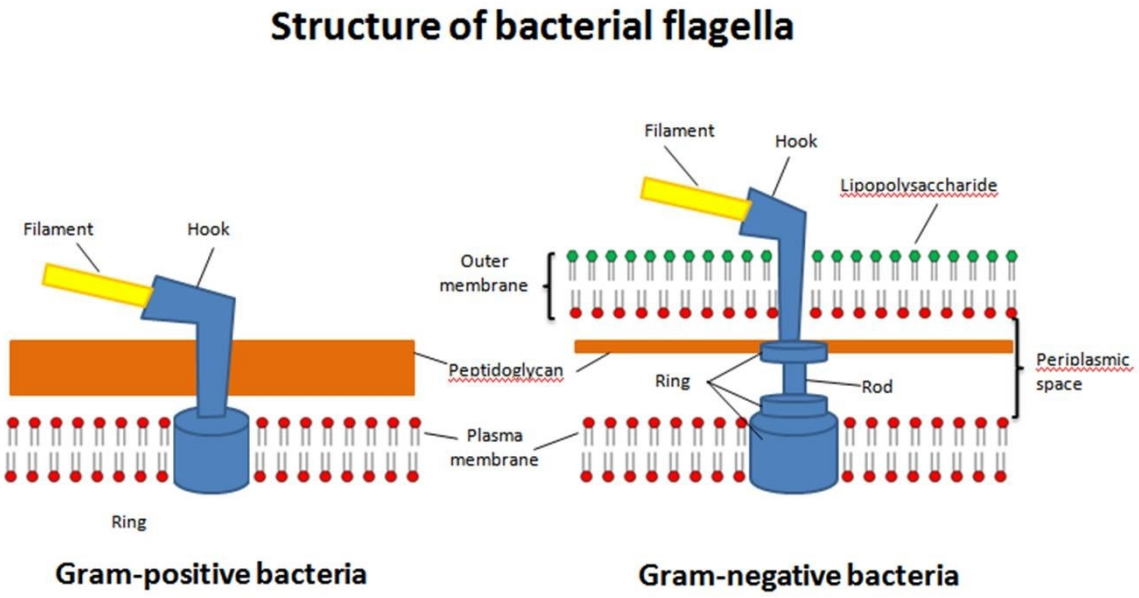
Structure of flagella

تراكيب خيطية طويلة تتكون من الخيوط والكلاب basal body and hook and filaments

الخيوط تتالف من بروتين يدعى فلاجيلين (flagellin)

الكلاب يتالف من بروتين مفرد يربط الخيوط الى الجسم القاعدي.

الجسم القاعدي يحتوي قضيب وعدة حلقات في البكتريا السالبة لصبغة كرام بينما يحتوي زوج داخلي واحد من الحلقات البكتريا الموجبة لصبغة كرام.



Types of Flagella distribution

Monotrichous flagella:

خلية بكتيرية تمتلك سوط واحد في احدى نهايتها

Amphitrichous flagella:

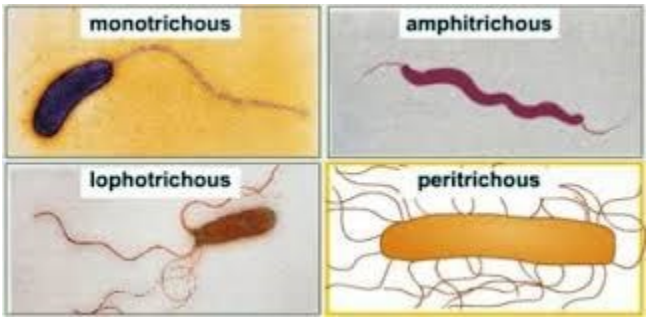
خلية بكتيرية تمتلك سوط واحد كلتا نهايتها

Peritrichous flagella:

خلية بكتيرية تملك اسواط تغطي كل سطح جسمها

Lophotrichous flagella:

خلية بكتيرية تملك اسواط في نهاية واحدة او في كلتا النهايتين



تساعد الاسواط في حركة البكتريا والانجذاب الكيمياوي Chemotaxis

Chemotaxis

يقصد به حركة البكتريا باتجاه او بعيدا عن المحفزات الكيميائية.

انواع الحركة في الخلايا البكتيرية:

- Active motility e.g *Pseudomonas* spp.
- Darting motility e.g *Vibrio cholera.*
- Tumbling motility e.g *Listeria monocytogenes*.
- Corkscrew, extension flexion motility e.g Spirochetes.
  Non motile: most cocci, *Shigella*, *klebsiella*.

.

Bacterial endospore

تتواجد بعض الانواع البكتيرية على هيئة صورتين:

1-الخلية الخضرية vegetative cell لها القابلية على النمو وفيها جميع صفات الحياة ويمكن قتلها باستخدام العوامل الفيزياوية والكيمياوية.

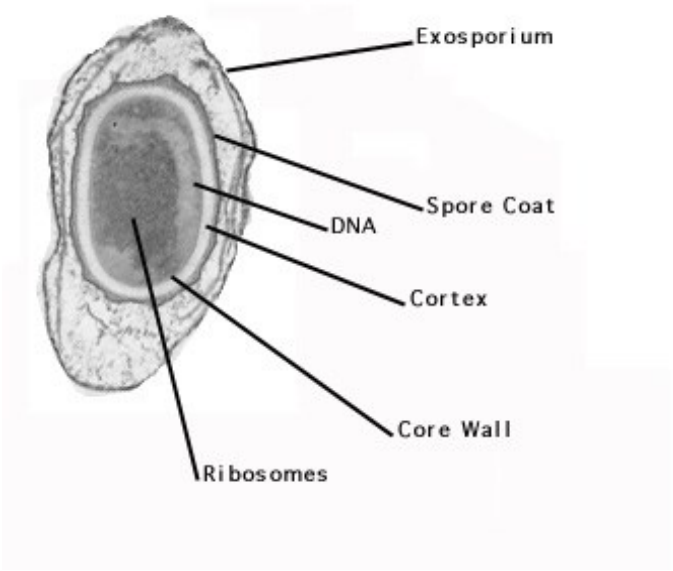
2- الابواغ الداخلية Endospore تراكيب غير قادرة على النمو تنتج من قبل بكتريا محددة مثل *Bacillus* spp. and *Clostridium* spp.

وتكون مقاومة لدرجات الحرارة العالية والاشعة فوق البنفسجية والمواد الكيمياوية والانزيمات الحالة. ويتحول الى الحالة الخضرية مرة اخرى في حال توفر الظروف المثالية.

ان الابواغ لايمكن تصبيغها بتقنيات التصبيغ الاعتيادية بسبب التركيب المعقد لها لذلك يتم تصبيغها بتقنيات خاصة. لكنها تظهر تحت عدسة المجهر الضوئي عند عدم تصبيغها بصبغة خاصة بشكل بقعة بيضاء لماعة في داخل جسم الخلية.

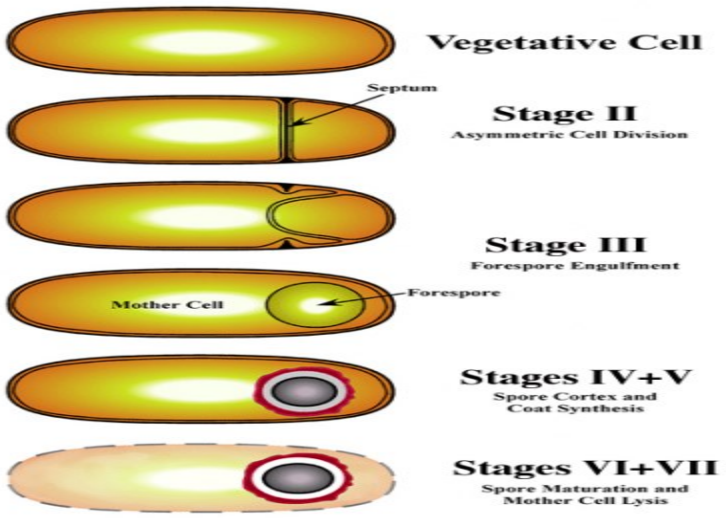
Endospore structure

1- التركيب الاول الغلاف الخارجي Exosporium يتالف من البروتين.
2- التركيب الثاني spore coat يقع تحت الغلاف الخارجي وهو غطاء من طبقات بروتينية سميكة. هذا الغلاف السميك هو غير نفاذ لاغلب المواد الكيمياوية وهو سبب مقاومة البوغ للمواد الكيمياوية ويحوي على الانزيمات الحاوية على عملية الانبات Germination.
3- التركيب الثالث القشرة Cortex وتقع اسفل ال coat وهي طبقة سميكة تتكون من ال peptidoglycan .
4- التركيب الرابع spore cell wall الجدار الخلوي للبوغ ويقع الى الداخل من القشرة ويتكون من ال peptidoglycan.
5- التركيب الاخير core يكون موجود في حالة جافة جدا ويحتوي اللب على التراكيب الخلوية الطبيعية مثل الرايبوسومات والمادة النووية وكمية كبيرة من dipicolinic acid وترتبط مع الكالسيوم وهذه المادة هي سبب المقاومة للظروف القاسية.



كيف تتم عملية تكوين السبورات sporogenesis or sporulation

عند تعرض الخلية الخضرية للظروف غير الملائمة كقلة الغذاء في الوسط او الحرارة العالية تبدا الخلية بتكوين البوغ الداخلي الذي يبدء اولا بترسب بعض المواد حول الحامض النووي وتتوال باقي الخطوات كما في الشكل التالي:



Cytoplasm

عبارة عن مادة جيلاتينية يحيط بمحتويات الخلية. تشتمل مكونات السايتوبلازم على البروتينات بما فيها الانزيمات والفيتامينات والايونات والاحماض النووية والاحماض الامينية والكربوهايدرات ومشتقاتها والاحماض الشحمية ومشتقاتها

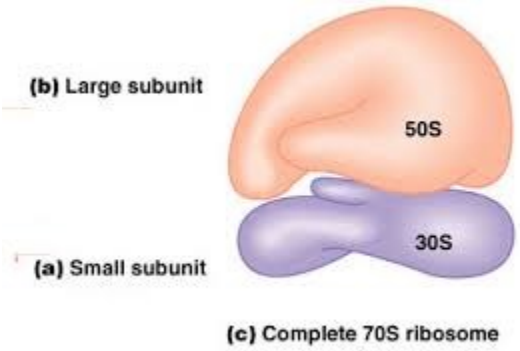
Ribosomes

مراكز تصنيع البروتينات حيث تحتوي الخلية البكتيرية على الالاف من الرايبوسومات في السايتوبلازم حيث تمنحه الشكل الحبيبي.

تتركب الرايبوسومات من وحدتين كل وحدة تتكون من متعد الببتيد وجزيئات من RNA تسمى ribosomal RNA (rRNA). في بدائية النواة تحتوي على رايبوسومات تسمى 70S ribosome وتتكون من وحدة صغيرة 30S والاخرى كبيرة 50S .

ال30S تحتوي على متعدد الببتيد وجزيئة واحدة من rRNA بينما الكبيرة تمتلك متعدد الببتيد وجزيئتان من ال

rRNA



Chromatin/Chromosomes

الكروموسومات عبارة عن خيوط من DNA تتصل مع البروتين بينما الكروماتينات هي عبارة عن DNA مع البروتينات وتسمى الhistone . تحتوي على المادة الوراثية والخصائص المميزة لكل كائن وتقع بالنواة. الكروماتينات عبارو عن خيوط طويلة ورقيقة وغير ملتفة توجد بشكل مفرد داخل النوية بينما الكروموسومات اكثر تعقيدا واكثر سمكا وتكون بشكل ملتف وعلى هيئة ازواج ترى بشكل واضح خلال انقسام الخلية.

Plasmid

عبارة عن تراكيب وراثية موجودة في البكتريا وهذه عبارة عن جزيئات من DNA مزدوجة الشريط على شكل دوائر تتكاثر وتتضاعف بصورة مستقلة عن شريط ال DNA وتحتوي صفات مستقلة ايضا وهي غير مرتبطة بالغشاء الخلوي كما هي الحالة في الكروموسوم.

تنتقل البلازميدات من بكتريا الى اخرى بسهولة وتنقل معها الصفات التي تشفر لها ومن اهم تلك الصفات مقاومة المضادات الحياتية والمقاومة للمعادن الثقيلة.

Mesosomes

وهي عبارة عن انبعاجات في الغشاء البلازمي وهذه الانبعاجات تكون بشكل حويصلات vesicles او تكون tubes او صفائح lamellae وهي متواجدة في كل من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام.

هناك نوعان من ال Mesosomes

Septal Mesosomes and Lateral Mesosomes

يعتقد ان الميزوسوم يقابل الميتوكندريا قي الخلايا حقيقية النواة لانها غنية بالانزيمات الخاصة بالسلسلة التنفسية.

Inclusion bodies:

هي عبارة عن تراكيب غير طبيعية توجد في النواة او السايتوبلازم تكون قابلة للتصبيغ بالصبغات الاعتيادية ويمكن رؤويتها تحت المجهر الضوئي وتتكون في الغالب من البروتين ويصاحب وجودها حدوث الامراض وخاصة الامراض الفايروسية كالحصبة rabies .

Poly-β-hydroxybutyric acid (PHB)

من تلك التراكيب الشائعة هو Poly-β- hydroxybutyric acid (PHB)- وهو عبارة عن دهن يتكون من - β hydroxbutyric acid units وان الوحدة الواحدة من (PHB) ترتبط مع بعضها لتالف البوليمير polymers والاخير يتجمع داخل حويصلات ويمكن رؤيتها تحت المجهر الضوئي والالكتروني وفائدتها هو خزن الكاربون والطاقة.

شكل اخر للخزن هو الكلايكوجين glycogen ومتعدد سكري من جزيئات الكلكوز وايضا مخزن للكاربون والطاقة.

Polyphosphate

العديد من الكائنات المجهرية تتجمع فيها تركيب فوسفاتية لا عضوية على شكل حبيبات متعدد الفوسفات polyphosphate وهذه الحبيبات ممكن ان تتحلل وتستخدم كمصدر للفوسفات للاحماض النووية وبناء الدهن المفسفر phospholipid biosynthesis وقد يستخدم لتصنيع الطاقة ATP .

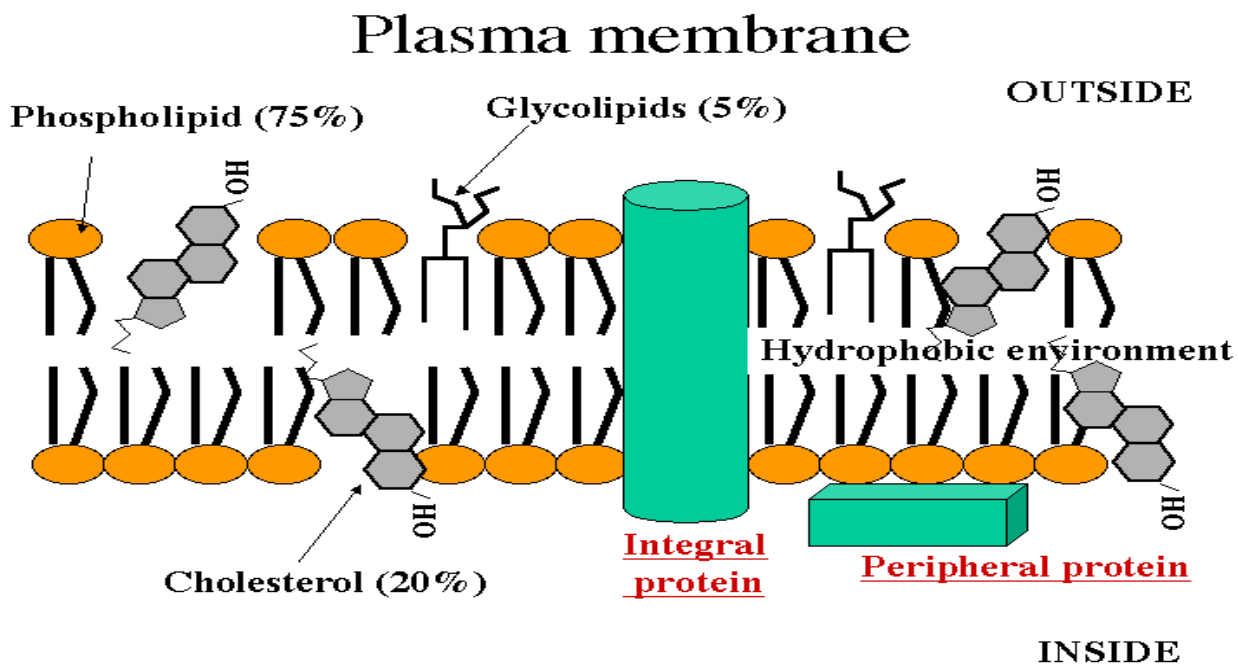
Sulfur

البكتريا السالبة لصبغة كرام تقوم بعمليات الاكسدة والاختزال لمركبات الكبريت مثل كبرتيد الهيدروجين وان اكسدة الكبريت في الغالب تتم خلال تفاعلات تخليق الطاقة Chemolithotrophic او تثبيت ثاني اوكسيد الكاربون Autotrophy.
ويتجمع عنصر الكبريت على حويصلات تكون موجودة peripalsmic ترى تحت المجهر الضوئي ويبقى لفترة طويلة كمصدر للكبريت المختزل. وعندما يكون مصدر الاخير شارف على الانتهاء فان الكبريت المختزل الحبيبات يتاكسد ليتحول الى كبريتات.

The plasma membrane الغشاء البلازمي

يكون الغشاء السايتوبلازمي بسمك 8 نانوميتر ويكون محيطا بالسايتوبلازم احاطة تامة.
يتالف الغشاءالسايتوبلازمي طبقتين من الدهون المفسفرةبنسبة60% والبروتينات بنسبة 40%. تتالف الدهون المفسفرة من جزئيين كارهة للماء(hydrophobic part (fatty acids وطرف اخر محبة للماء(hydrophilic part (glycerol .

ويكون النهايات الكارهة للماء متقابلة مع بعضها لتكون النهايات المحبة للماء مواجهة للسائل الماء او المحيط الذي تتواجد فيه البكتريا. تساعد هذه الخاصية على تكوين الغشاء بشكل ثنائي الطبقة.



Function of cytoplasmic membrane:

1- لكونه غشاء او حاجز اختياري النفوذية Selectively permeable فانه يحدد مرور المواد من خلاله بواسطة حجم الثقوب وطبيعته الكارهة للماء.
2- موقع لخزن الطاقة.
3- نظرا لوجود integral protein والتي تسمح للنقل الفعال للعديد من الايونات والسكريات والاحماض الامينية من خلال الغشاء.
4- تعمل البروتينات المحيطة Peripheral proteins كمستقبلات وانزيمات للتفاعلات الايضية.
5- يعد موقع مهما لعمليات نقل الالكترون والفسفرة التاكسدية بسبب وجود السايتوكرومات وانزيمات dehydrogenases الخاصة بالسلسلة التنفسية.
6- موقع لتصنيع مكونات الجدار الخلوي peptidoglycan, lipids and proteins .
7- موقع ارتباط الكروموسوم بسبب وجود الميزوسومات Mesosomes .

المواد المحطمة للغشاء السايتوبلازمي

-المنظفات الحاوية على مواد محبة للدهون والماء تحطم الغشاء السايتوبلازمي.
-المضادات الحياتية مثل polymyxin B and Gramicidin
-المواد الكيمياوية مثل الكحول ومركبات الامونيوم الرباعية.

Lecture 2:Bacterial cell structures and their function

Bacterial cell walls

يمكن التمييز بين البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام من خلال استجابة الجدار الخلوي لصبغة كرام ويتواجد في كلا النوعين ويقع الى الخارج من الغشاء السايتوبلازمي ويكون محاطا بالغشاء الخارجي بالبكتريا السالبة وتكون وظيفته مايلي:

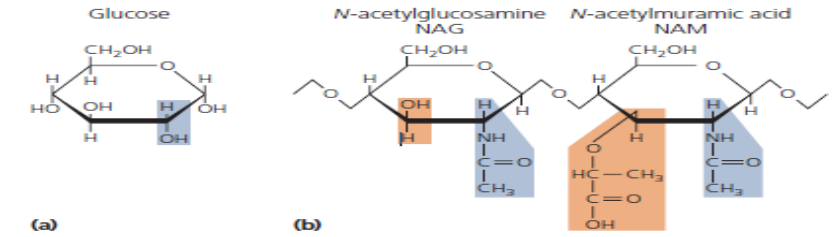
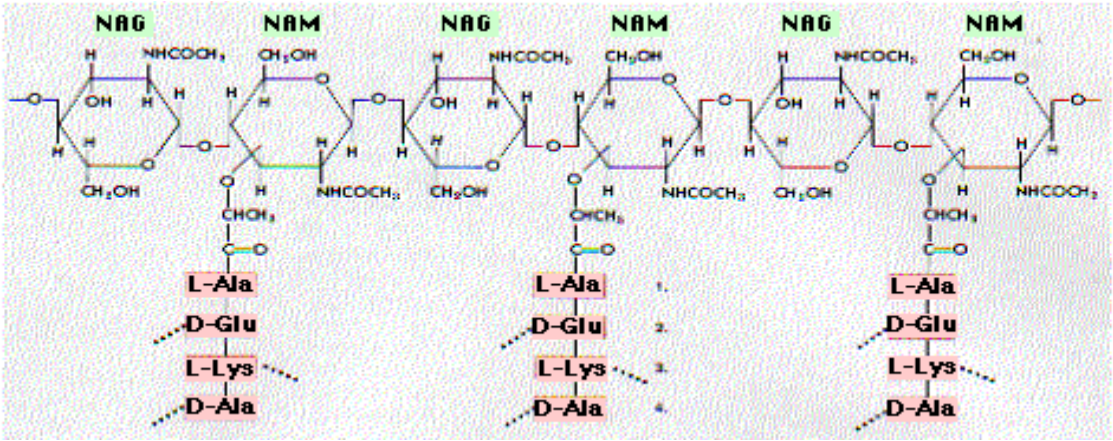


Figure 3.13 Comparison of the structures of glucose, NAG, and NAM. (a) Glucose. **(b)** *N*-acetylglucosamine (NAG) and *N*-acetylmuramic acid (NAM) molecules linked as in peptidoglycan. Blue shading indicates the differences between glucose and the other two sugars. Orange boxes highlight the difference between NAG and NAM.

1- يمنح الخلية الشكل والصلابة لوجود peptidoglycan
2- يحمي الخلية من الضغط الازموزي.
3- يساعد الخلية في الالتصاق لانسجة المضيف.
4- يعمل كحاجز يحمي محتويات الخلية من البيئة الخارجية.
5- له اهمية في كونه المحدد لاصطباغ الخلايا بصبغة كرام حيث ان الخلايا الفاقدة للجدار تعد سالبة لصبغة كرام.
6- موقع الفعالية لعدد من المضادات الحياتية.

المواد المحطمة للجدار
اللايسوزايم lysozyme
المضادات الحياتية مثل ال penicillin
انزيمات التحلل الذاتي التي تنتجها بعض الانواع البكتيرية Autolysis enzymes
لا يصطبغ الجدار الخلوي باي من الصبغات لذلك لايمكن رؤيته بواسطة المجهر الضوئي.
يتالف الجدار الخلوي في البكتريا من **peptidoglycan** او **Murein** او **Mucopeptide** وهو عبارة عن متعدد سكري من ثلاثة اجزاء:

1-العمود الفقري Backbone
يتالف من نوعين من السكريات المرتبطة مع بعضها بشكل متبادل ونظامي وتدعى N- acetylglucosamine (NAG) and N-acetylmuramic acid (NAM) والتي تكون مشابه في التركيب لجزيئة سكر الكلكوز.
2- سلسلة جانبية من رباعي الببتيد Tetrapeptide ترتبط الى (NAM).
3- جسور عرضية ببتيدية Peptide cross bridge وهي عبارة عن سلاسل قصيرة من احماض امينية تعمل على ربط وحدات ال peptidoglycan مع بعضها.



Chains of NAG and NAM attached to other chains by Tetrapeptide cross bridges

الجدار الخلوي للبكتريا السالبة معقد من الناحية الكيميائية ويتالف على الاقل من طبقتين بينما **الجدار الخلوي للبكتريا الموجبة** اكثر سمكا ويتالف مبدئيا من نوع واحد من الجزيئات. ويشكل ال peptidoglycan 50% -90% من الوزن الجاف للخلية حيث لاوجود للدهن ولكن يحتوي على (teichoic acid and/or teichuronic acid) والتي ترتبط باواصر تساهمية لل peptidoglycan وتكون هذه الاحماض مشحونه بالشحنة السالبة والتي تشحن البكتريا بتلك الشحنة.

تعد هذه الاحماض بوليمرات ذائبة في الماء تتكون من الكليسيرول او الريبتول Glycerol or ribitol ترتبط عن طريق مجموعة الفوسفات
هناك نوعان من ال teichoic acid
احماض wall teichoic acid وهي التي ترتبط peptidoglycan
احماض lipoteichoic acid وهي التي ترتبط الى الغشاء البلازمي.

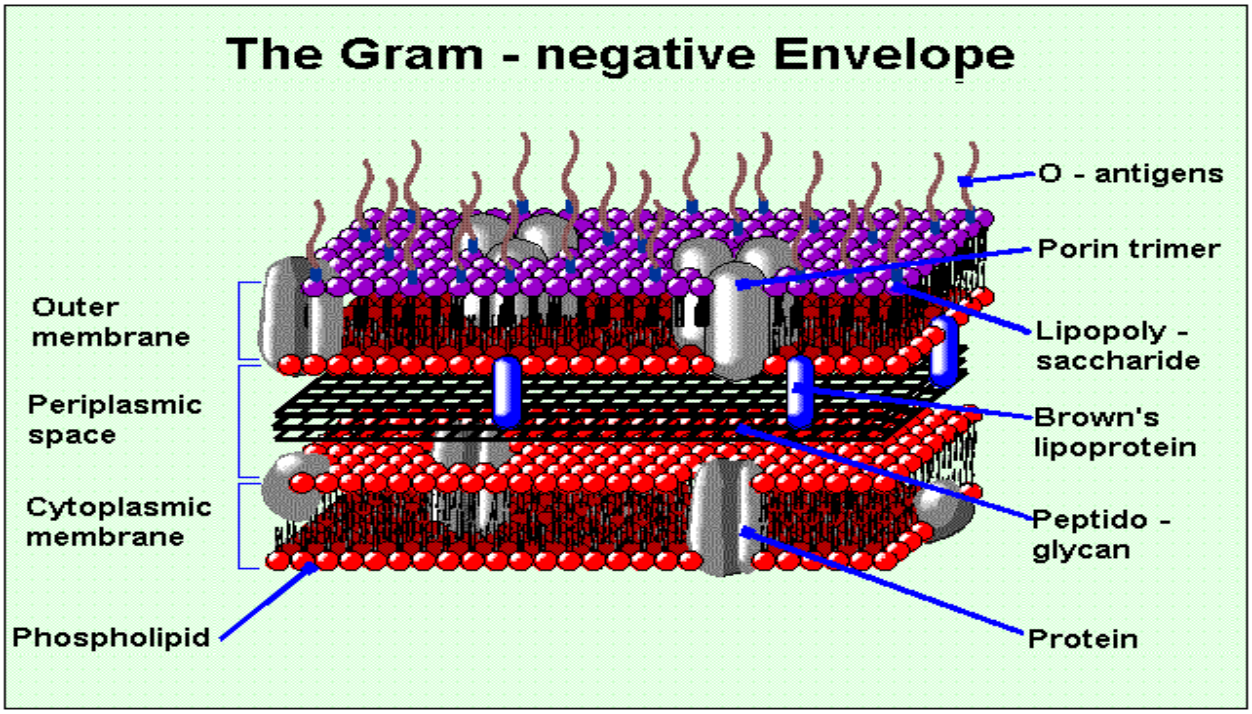
Function of teichoic acid

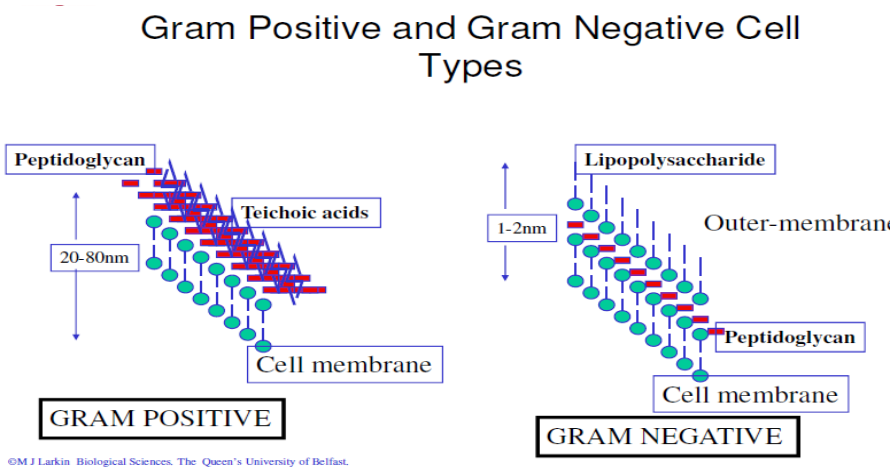
-تزود الخلية بالصلابة عن طريق السماح لايونات المغنسيوم والصوديوم بالمرور خلال الجدار الخلوي.
-يساعد هذا الحامض في تنظيم نمو الخلية عن طريق تحديد قابلية الانزيمات الحالة في تكسير اصرة β(1-4) bond between the N-acetyl glucosamine and the N-acetylmuramic acid.
- ان الجدار الخلوي السميك يودي للاحتفاظ بصبغة الكريستال البنفسجي المستعملة بصبغة كرام وبالتالي تصطبغ البكتريا الموجبة باللون البنفسجي.

Gram negative bacteria cell wall

تحتوي البكتريا السالبة لصبغة كرام جدار معقد التركيب بالمقارنة مع البكتريا الموجبة. يرتبط الغشاء البلازمي الذي يحيط بالسايتوبلازم بطبقة نحيفة thin من ال peptidoglycan بسمك حوال 10 نانوميتر وقد تكون طبقة واحدة او اثنان بنسبة 5-10% من مادة الجدار الخلوي ولهذا فان صبغة الكريستال البنفسجي تفقد عند عملية القصر بالايثانول خلال التصبيغ بصبغة كرام.

طبقة ال peptidoglycan ترتبط الى lipoprotein unit (والتي تقوم بتثبيت الغشاء الخارجي بغرسه في طبقة الببتيدوكلايكان) والاخيرة ترتبط لل outer membrane والذي بدوره يتالف من طبقتين داخلية وتتالف من دهون مفسفرة phospholipids وبروتينات وطبقة خارجية وتتالف من عديد السكريات الشحمي **lipopolysaccharide** **(LPS)**.





	Gram-positive cell wall	Gram-negative cell wall
Peptidoglycan	90% of cell wall, 20nm thick 2 tetrapeptides of adjacent chains of NAM, NAG are linked by peptide bridges (which contain 5 Glycine)	Thinner 2 tetrapeptides of NAM, NAG are directly linked between D-Alanine and DAG within 2 tetrapeptides
Teichoic acid	10% of cell wall Polyribitol/polyglycerol phosphate linked to peptidoglycan	None
Lipoteichoic acid	Lipid linked teichoic acid	None
Periplasmic space	Small or none	Contains enzymes for transport, degradation and synthesis
Outer membrane	None	Phospholipids with saturated fatty acids. Embedded porins, lipoproteins, transport proteins
Lipopolysaccharide	None	Lipid A (endotoxin), core polysaccharide, O antigen

Function of outer membrane

-ويمثل الحاجز النفاذي الرئيسي قي الخلايا السالبة لصبغة كرام
وكذلك يحمي البكتريا ويمكنها في العيش في البيئة القاسية
-يحمي البكتريا من المعالجة بالمضادات الحياتية حيث يمنع مرور البنسلين **الى** طبقة الببتيدوكلايكان.
تدعى الفسحة الفراغ مابين الغشاء الخارجي والداخلي بال peripalsmic space وتحتوي هذه الفسحة على الماء والمغذيات ومواد تفرز من الخلية نفسها مثل الانزيمات الهاضمة digestive enzymes وبروتينات النقل .

توجد نوع من البروتينات تسمى prions وهي عبارة عن جزيئات على شكل قنوات تتخلل كلتا الطبقتين والتي تسمح بمرور الايونات الصغيرة وجزيئات المواد الاخرى كسكر الكلكوز والسكريات الاخرى.

ال lipopolysaccharide يتالف من

-الدهن Lipid A (A)

-اللب core polysaccharides

-السلسلة الجانبية O- Side chain

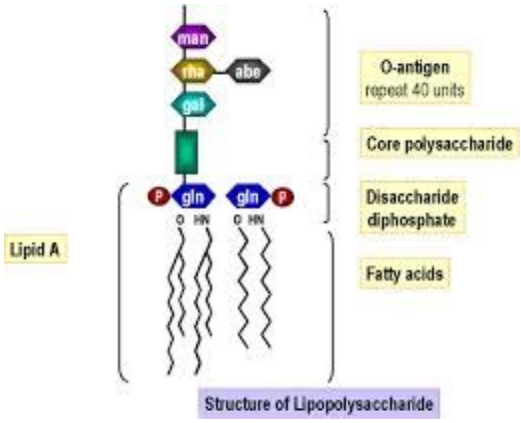
يتكون Lipid A من جزيئتين من وحدات سكر (glucosamine sugar) ترتبط الى hydroxyl fatty acid ومجموعة فوسفات ويعد هذا الدهن كنوع من السموم الداخلية والذي تكون سميته في مجرى الدم او القناة الهضمية للمضيف.

بقايا ال اللبيد A تكون مطمورى في داخل الغشاء بينما باقي المكونات تكون نافذة على سطح الخلية.

خلايا البكتيرية السالبة الميتة عند تفكك الغشاء الخارجي تطلق lipid A والاخير يمكن ان يساعد على تكوين الحمى والالتهابات وتوسع الاوعية الدموية وتخثر الدم في الانسان.

اللب core polysaccharides وهو عبارة عن متعدد سكريات اغلبها تملك تركيب استثنائي مرتبط مع الدهن A .

السلسة الجانبية O antigen وهو عبارة عن سلسلة متعدد السكريات short polysaccharides chain وهو الجزء الذي ترتبط به الاجسام المضادة Antibodies .



Function of lipopolysaccharides

يعد ال lipopolysaccharides مشحون بالشحنة السالبة لوجود مجموعة الفوسفات وبالتالي فان الجدار الخلوي يشحن بالشحنة السالبة ايضا.

نستطيع تشخيص السلالات البكتيرية من خلال التفاعلات المناعية لان التراكيب الكيميائية لل lipopolysaccharide تكون مميزة لكل سلالة بكتيرية .

The chemical structure of the outer membrane is often unique to specific bacterial strains (*i.e.*, sub-species) and is responsible for many of the antigenic properties of these strains [10].

The mechanism of Gram staining:الية التصبيغ بصبغة كرام

ان الاختلاف بين خلايا البكتريا الموجبة والسلبة لصبغة كرام يعزى الى اختلاف تركيب الجدار الخلوي حيث ان:

-طبقة الببتيدوكلايكان ذاتها لا تصطبغ بل تعمل كحاجز نفاذي يمنع من فقدان الكريستال البنفسجي crystal violate.

- خلال عملية التصبيغ تصطبغ اولا بالبنفسج البلوري ومن ثم تعامل بالمثبت الايودين.

- عندما تجري عملية القصر decolourization باستخدام الايثانول اذ ان الاخير يعمل كمذيب عضوي يعمل على اذابة كمية كافية من الدهون وبوجود الطبقة النحيفة للببتيدوكلايكان فتزداد حجم الثقوب porosity اكثر وبذلك تزيل الكحول المعقد crystal violet –iodine complex من جدران البكتريا السالبة لصبغة كرام.

- عند استخدام الصبغة البديلة السفرانين safranin فان البكتريا السالبة تصطبغ بها لانها فقدت الصبغة في مرحلة القصر.

-India Ink لتصبيغ الكبسولة

-Acridine Orange صبغة تستخدم للاحماض النووية في كلا النوعين من البكتريا الحية والميتة.

Acid Fast Cell Wall خاصة Mycobacteria and Nocardid تحتوي على الجدار الخلوي في البكتريا الموجبة ولكن يحتوي ايضا طبقة من الشمع waxy layer تتكون من glycolipids واحماض شحمية mycolic acids ولذلك لا تصطبغ بصبغة كرام ويمكن ان تقصر هذه الصبغة بمزيج من الحامض والكحول acid-alcohol ولذلك سميت acid fast

النقل عبر الغشاءالسايتوبلامي:

تحتاج الخلايا الى اخذ من البيئة وطرح المواد السامة الى البيئة يساعد في هذه الالية كون الغشاء البلازمي اختياري النفوذية حيث يسمح لبعض المواد بالدخول من خلاله.

الخلايا تقوم بطرق نقل متنوعة لتسهيل حركة المواد والجزيئات المختلفة عبر الغشاء البلازمي كالتالي:

هناك طريقتين رئسيتين لحدوث النقل البسيط passive والفعال Active النقل البسيط لايحتاج لصرف الطاقة ATP المخزونة بينما في النقل الفعال يحتاج لصرف الطاقة المخزونة سواءا بطريقة مباشرة او غير مباشرة.

الطرق السلبية (الطرق التي لا تحتاج الى بذل اي طاقة)

1- الانتشار البسيط Passive diffusion .
2- الانتشار الميسر Facilitated diffusion .
3- التنافذ Osmosis .

وفي كل الطرق انفة الذكر يتم جريان المواد او الجزيئات من المنطقة ذات التركيز العالي الى المنطقة ذات التركيز الواطيء. اي لا تجري الا بوجود مدرج التركيز gradient concentration(معناه اختلاف التركيز الكيميائي لمادة ما على طرفي الغشاء) على طرفي الغشاء ويتوقف جريان او انتشار المواد في حالة تساوي التركيزيين على طرفي الغشاء.

الانتشار البسيط او السلبي Passive diffusion

وهو عملية حركة المواد من المناطق ذات التركيز العالي الى المناطق ذات التركيز الواطئ بدون اي عامل مساعد او اي صرف للطاقة.

يتحدد معدل سرعة الانتشار البسيط بما ياتي:

1- وجود مدرج التركيز
2- نفاذية الغشاء البلازمي للمادة الخلوية.

حيث تزداد سرعة العملية بزيادة فرق التركيز على طرفي الغشاء البلازمي وبزيادة نفاذية الغشاء للمادة.

المواد الكيميائية الصغيرة او الدهون الذائبة يمكنها فقط المرور من خلال مركبات الغلاف الدهنية مثلا الاوكسجين وثاني اوكسيد الكاربون والدهون بينما البروتينات وسكر الكلكوز لايمكنها العبور بهذه الطريقة.

- الانتشار الميسرFacilitated diffusion

سمي بهذا الاسم لوجود البروتينات integral protein واتي نكون على هيئة قنوات لتسهيل النقل عبر الغشاء وايضا لا تحتاج الخلية للطاقة هنا ولكن فرق الجهد على طرفي الغشاء يجهز الخلية بالطاقة اللازمة وبالتالي فان المواد التي لاتستطيع

العبور بالطريقة الاولى سوف تعبر بهذه الطريقة والتي تملك الحجم المناسب. انواع من البروتينات وتسمى permeases والتي تمون مشحونة كهربائيا وتملك موقع ارتباط لمواد محددة.

التنافذ Osmosis

عملية انتقال الماء خلال الغشاء تسمى بالتنافذ وان نفاذية الغشاء تسمح للماء بالمرور .

وسوف ينتقل الماء من جانب الغلاف الذي يحوي تركيز عالي من الماء (المذيب solvent) ذات التركيز الواطيء من المذاب (solute) الى الجانب الذي يكون فيه تركيز الماء واطيء وتركيز المذاب عالي واتنافذ يستمر الى ان يحدث التوازن في التركيز على طرفي الغشاء .

تكون حاجة الخلية الى هذه الطريقة من النقل في حالة المواد (solute) التي لا تستطيع ان تنفذ من خلال الغشاء البلازمي فيمر الماء لمساواة التركيز على طرفي الغشاء.

في حالة كون التركيز للمادة المذابة خارج الخلية مساو لتركيزها داخل الخلية فهي حالة isotonic وهنا سيمر الماء عبر الغشاء الخلوي بصورة متساوية من والى الخلية.
في حالة كون تركيز المادة المذابة خارج الخلية اكثر من داخل الخلية فذلك يعد Hypertonic وهنا سوف ينتقل الماء الى خارج الخلية لمساواة التركيز.
والعكس صحيح وهو Hypotonic .

عمليات النقل التي تحتاج الى طاقة:

وهذه الميكانيكيات تحتاج الى صرف طاقة خلوية لذلك سميت بالعمليات الفعالة Active processes وهي:

1- النقل الفعال Active Transport
2- النقل الجماعي Group Transport

النقل الفعال Active Transport

تستخدم الخلايا في هذه العملية الى الطاقة لغرض نقل المواد ضد مدرج التركيز اي من التركيز الواطيء الى التركيز العالي عبر الغشاء البلازمي.

يشبه النقل الميسر لوجود بروتينات permeases والتي تقوم بالارتباط لمواد محددة وبذلك تنتقل الى داخل الخلية.

ومن صفات هذه العملية ما ياتي:

1- يجري انتقال المواد التركيز الواطيء الى التركيز العالي.
2- تحتاج الى صرف طاقة.
3- المادة المنقولة لايتم تحويرها كيمياويا.

ان عملية النقل الفعال لا تعتمد مباشرة على الطاقة المتوفرة في ال ATP بل على حالة من الطاقة الكامنة في غشاء الخلية وتحت ظروف معينة تنتقل ايونات H^+ الى خارج الخلية فيصبح داخل الخلية قاعدي بينما خارج الخلية حامضي وذلك يصبح السطح الخارجي للغشاء اكثر ايجابي والسطح الداخلي اكثر سلبية للكهرباء فهناك فرق في الجهد على طرفي الغشاء مما يسبب

جهد كهربائي وهي الطاقة الكامنة في الغشاء. وقد تستعمل هذه الطاقة بتخليق ATP من ADP والفوسفات وبمساعدة انزيم عكسي يسمى ATP-ase .

النقل الجماعي Group translocation

يجري في هذه العملية انتقال المادة عبر الغشاء الخلوي بعد ان يتم تحويرها كيميائيا اثناء مرورها بواسطة اضافة مجموعة فوسفات اليها. وهذه الطريقة تكون موجودة فقط في بدائية النواة.

المواد التي تنتقل بهذه الطريقة هي الكاربوهيدرات والاحماض الدهنية .

المثال المعروف عن هذا النوع من النقل هو عملية فسفرة الكلكوز في بكتريا *E. coli* بواسطة نظام ال phosphotransferase system اي نقل مجموعة الفوسفات الى السكر عن طريق مجموعة من الانزيمات يطلق عليها منظومة نقل الفوسفات ويسمى السكر بـglucose 6-phosphate . تتالف هذه المنظومة من ثلاثة خطوات :

1- يقوم الانزيم السايتوبلازمي الاول بنقل مجموعة الفوسفات من فوسفواينول بايروفيت الى بروتين سايتوبالزمي اخر هو HPr.
2- حيث ان الاخير بنقل الفوسفات الى انزيمات متخصصة تسمى الانزيم الثالث والاخيرة مع انزيمات اخرى تسمى الانزيمات الثانية تنقل الفوسفات الى السكر وهو خارج الخلية.
3- يتم نقل السكر المفسفر الى داخل الخلية ويدخل في تفاعلات البناء.

Lecture 3

متطلبات النمو والتغذية Nutrition and growth requirements

-الكائنات المجهرية اما تكون ضوئية التغذية phototrophs او كيمياوية التغذية chemotrophs

-تحتاج جميع الكائنات الحية المجهرية الى الكلكوز والتي تستطيع تصنيع غذائها بوجود الكاربون كمصدر كاربوني وهناك مجموعة من البكتريا غير قادرة على تصنيع غذائها وتعتمد على مجموعة ذاتية التغذية في الغذاء للحصول على الكاربون وغيرها من المركبات وتسمى Heterotrophs .

-تحتاج جميع الكائنات الحية المجهرية الى النتروجين وهناك انواع من البكتريا القادرة على استغلال النتروجين الجوي وبعضها يستهلك المركبات النتروجينية غير العضوية في حين ان بعضها يحتاج الى النتروجين الموجود في المركبات العضوئية.

- تحتاج الكائنات المجهرية الى الكبريت والفوسفور ولو بتراكيز قليلة حيث تستطيع بعض انواع البكتريا استغلال الكبريت العضوي او اللاعضوي او عنصر الكبريت تبعا لنوعها في حين تستغل الفوسفور على اشكل املاح حامض الفوسفوريك.

وتسمى هذه العناصر بالمغذيات الكبيرة Macronutrients or Macroelements والتي تحتاجها الخلايا بكميات كبيرة وهي

C, O, H, N, S and P

وكذلك K^{+}, Ca^{+2}, Mg^{+2}, Fe^{+2} and Fe^{+3}

K^{+} عامل مساعد لعدد من الانزيمات بعضها يدخل في بناء البروتينات

Ca^{+2} يدخل في تركيب الابواغ المقاومة للحرارة

Mg^{+2} عامل مساعد لعدد من الانزيمات والتي تعمل على تثبيت الرايبوسومات والاغلفة الخلوية.

Fe^{+2} and Fe^{+3} يدخل في بناء السايتكرومات ومساعد لعدد من الانزيمات والبروتينات الحاملة للالكترونات.

المغذيات الصغرى او الدقيقة Micronutrients or Trace elements

Mn, Zn, Co, Mo, Ni

تلك المغذيات التي تحتاجها جميع الخلايا ولكن بكميات قليلة جدا:

Mn^{+2} مساعد للانزيمات التي تحفز نقل مجموعة الفوسفات.

Zn^{+2} يدخل ضمن تركيب الموقع الفعال لبعض الانزيمات .

Co^{+2} يدخل ضمن مكونات فيتامين B12

Mo^{+2} ايون المولبيدينوم تحتاجه الخلية البكتيرية في عملية تثبيت النتروجين.

يؤلف الكاربون 50% و الاوكسجين 20% والنتروجين 14% و الهيروجين 8% من الوزن الجاف للخلية البكتيرية. وهذه العناصر الرئيسية في تركيب مصادر الغذاء وهي الكاربوهيدرات والبروتينات والدهون.

تحتاج الكائنات الى الماء اذ بوجوده تنطلق الفعاليات الحيوية لذلك استغل كعامل محدد للنمو.

ماهي الفوائد الرئيسية للماء؟

النتروجين لتخليق الاحماض الامينية والقواعد النتروجينية وبعض الكربوهيدرات والدهون.

الفوسفور الاحماض النووية والدهون المفسفرة وبعض النيوكليوتيدات (ATP)

الكبريت في تركيب بعض الاحماض الامينية (cysteine and methionine) والبايوتين والفيتامينات مثل B1.

اضافة الى ما تقدم فان بعض البكتريا تحتاج الى مغذيات خاصة بها فمثلا:

Bacillus anthracis تحتاج الى الثايمين في الوسط

Brucella تحتاج الى النايسين

Clostridium تحتاج الى الرايبوفلافين

عوامل النمو والفيتامينات Growth factors and Vitamins

ان كل مركب عضوي يتطلبه النمو هو عامل نمو ويقصد بها تلك المركبات التي تفتقد الاحياء المجهرية القابلية على تخليقها لذلك يجب اضافتها الى الوسط الزرعي كي يحصل النمو.

Three Major Classes of Growth Factors

-الاحماض الامينية لبناء البروتينات.

-Purines and Pyrimidines لبناء الاحماض النووية.

-الفيتامينات عبارة جزيئات عضوية صغيرة تدخل في بناء كل او جزء من مساعدات الانزيمات enzymes cofactors ويبقى جزء قليل يستخدم في النمو.

Auxotrophic or Auxoheterotrophic

معناها ان الكائن بفقد القدرة او الذي لا توجد لديه القدرة على تكوين الفيتامين او عامل النمو.

Prototrophic or Auxoautotrophic

الكائن الذي له القدرة على تخليق عامل النمو او الفيتامين وتعد شكل من اشكال التغذية الذاتية.

تصنيف البكتريا حسب احتياجاتها الغذائية:

Classification of Bacteria Based on Nutritional Requirement

حسب مصدر الكربون

Autotrophic **ذاتية التغذية**

Heterotrophic **متغايرة التغذية**

حسب مصدر الطاقة

Phototrophic ضوئية التغذية

chemotrophic كيميائية التغذية

(Fermentation and respiration)

حسب مصدر الالكترون

Lithotrophic معدنية التغذية

Organotrophic عضوية التغذية

Nutrition	Energy source	Carbone source	e.g
Photolithotrophic	light	Co_2	Eukaryotic algae and cyanobacteria
Photoorganotrophic	light	organic	purple , green bacteria
Chemolithotrophic	inorganic compounds H_2, NH_3, NO_2, H_2S	CO2	*Nitrosomonas, Nitrobacter, Thiobacillus*
Chemoorganotrophic	organic compounds as sources of energy, hydrogen, electrons, and carbon	carbon	Pathogenic bacteria

Lecture 4

الاوساط الزرعية The culture media

توجد الكائنات الحية المجهرية على شكل مجتمعات معقدة ولذلك لدراسة خصائص هذه الكائنات يجب ان نحصل على مزراع نقية.

ولغرض الحصول على مزارع نقية يجب ان نستخدم الاوساط الزرعية:

بصورة عامة تنقسم الاوساط الزرعية الى :

الصناعية:synthetic وسط معروف جميع مكوناته كما ونوعا.

الطبيعية:natural غير معروف مكوناته كما ونوعا.

شبه الصناعية: semi synthetic وسط معروف مكوناته كما ونوعا عدا مادة واحدة.

شبه الطبيعية:semi natural وسط غير معروف مكوناته كما ونوعا عدا مادة واحدة معروفة كما ونوعا.

الاوساط الصناعية:

وتقسم الى السائلة والصلبة حيث كان الاستخدام شائعا للاوساط السائلة ويسمى بالنقيع مثل نقيع الشعير(broth). وبهذه الطريقة لايمكن دراسة خواص المزارع البكتيرية لذلك استخدم الوسط الصلب بدلا عن الوسط السائل واستخدم الجيلاتين في البداية ولكن لقدرة الكثير من البكتريا على افراز انزيم الجيلاتنيز الذي يحلل الجيلاتنيز ويحوله الى وسط سائل وثانيا انصهار الجيلاتين في درجة حرارة واطئة نسبيا هذه العوامل ادت الى استخدام الاكار بدلا عن الجيلاتين.

ما هو الاكار

Agar

- Complex polysaccharide
- Used as solidifying agent for culture media in Petri plates, slants, and deeps
- Generally not metabolized by microbes
- Liquefies at 100°C
- Solidifies ~40°C

تصنيف الاوساط الزرعية استنادا على الوظيفة والخصائص:

- **Simple media**

ويسمى ايضا وسط اساسي يستخدم عموما في الاختبارات الروتينية في المختبر ومنها Nutrient broth مصنوعا من خلاصة اللحم extract of meat وفول الصويا soy bean.

- **Enriched media**

وسط زرعي اغنائي يتالف من nutrient medium مضافا له عوامل نمو مثل الدم ويستخدم لانماء بكتريا تحتاج عناصر غذائية محددة.

-**Enrichment media**

تستخدم لغرض عزل نوع بكتيري واحد من نموذج يحتوي على الالاف الانواع البكتيرية حيث يحفز نمو البكتريا المرغوب فيها ويثبط نمو الانواع الاخرى الغير مرغوب فيها. مثال وسط Tetrathionate broth

اي بعبارة اخرى يشجع نمو الكائن حتى وان كان يتواجد بكميات قليلة جدا في النموذج وليس بالضرورة تثبيط نمو الكائنات الاخرى مثل الاوساط الانتقائية.

كمثال نفترض ان نموذج تربة يحوي بكتريا محللة للفينول وبطبيع الحال يوجد ايضا الالاف من الانواع البكتيرية الاخرى فنقوم بتلقيح هذ النموذج بوسط يحوي الفينول وبعد الحضن ننقل ملليلتر واحد الى فلاسك يحوي وسط الفينول ونكرر العملية مرة اخرى وبالتالي فان البكتريا القادرة على الاستفادة من الفينول في النمو سوف تتمكن من النمو.

- **Selective media**

الاوساط الاختيارية تحتوي على مواد تقوم بتحفيز نمو بكتريا معينة بينما تثبط نمو بكتريا اخرى مثل EMB (Eosin Methylene Blue).

يحتوي على صبغات تثبط نمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام ويحفز نمو البكتريا السالبة لصبغة كرام.

Brilliant Green Agar يحتوي على الصبغة الخضراء التي تثبط البكتريا الموجبة ويستخدم لعزل البكتريا السالبة كالسلمونيلا

- **Indicator media**

اوساط زرعية تحوي مواد كيمائية يتغير لونها الى لون معين نتيجة لنمو نوع بكتيري محدد مثل وسط Wilson Blair media والذي يستخدم للكشف عن وجود بكتريا *Salmonella typhi* لاحتواء الوسط على الكبريت Sulphite

- **Differential media**

اوساط زرعية تحتوي على اضافات تتحيح رؤية الاختلافات في الايض المايكروبي بين الانواع البكتيرية القريبة من بعضها حيث ان كل الانواع تنمو بشكل متساوي على هذه الاوساط , نتيجة لوجود صبغات او مواد كيميائية محددة كل بكتريا سوف تنتج تغييرات معينة يتسنى من خلالها تشخيص البكتريا.

Eg., MacConkey (MCK) agar, Eosin Methylene Blue (EMB) و Blood Agar Plates (TSA with 5% sheep blood)

وسط اكار الدم يستخدم لتفريق البكتريا التي تحلل كريات الدم الحمراء.

- Composite media

اوساط تستخدم لتشخيص العزلات البكتيرية ومثال عليها وسط Triple Sugar Iron

- **Transport media**

اوساط تستخدم لحفظ البكتريا ولكن ليس لتضاعفها مثلا وسط Stuart's transport media

ما معنى المصطلحات الاتية:

Culture Medium- Sterile- Inoculum -Culture

مكونات الاوساط الزرعية العامة: Constituents of Media

الاكار

الببتون (Peptone) عبارة عن بروتينات مهضومة بشكل جزئي.

الخمائر yeast

خلاصة اللحم meat extract

ملح الطعامNaCl

كيف يتم حفظ البكتريا؟

بالتجميد العميق Deep-freezing (-50 °C to -95 °C)

التجفيد Lyophilization (freeze-drying) التجميد على (-54 °C to -72 °C) ثم بعد ذلك التجفيف باستخدام ال vacuum .

لماذا نقوم بانماء البكتريا:

1-لغرض تشخيص وعزل مسببات الامراض وباتالي يتسنى معالجة ومنع انتشار المرض.

2-دراسة خصائص البكتريا.

3-المساعدة في تحضير اللقاحات vaccines المعينة.

4-الاستفادة من البكتريا في مجالات الصناعة والزراعة.

5-ايضا استعمالها في مجالات الهندسة الوراثية.

Lecture 5

النمو البكتيرى Bacterial growth

يقصد به زيادة في كل مكونات الخلية وبالنهاية تضاعف الخلية البكتيرية والذي يؤدي الى زيادة التجمعات البكتيرية . ويتضمن زيادة في حجم الخلية وزيادة في عدد الخلايا ويؤدي ذلك الى تكوين المستعمرات اي ان المستعمرة الواحدة قد جاءت من عدد كبير من الخلايا البكتيرية.

1- المزرعة الراكدة Batch culture
2- المزرعة المستمرة Continuous culture

في الشكل الاول تمر الخلايا البكتيرية بالاطوار الاربعة للنمو ثم تموت البكتريا وذلك لنفاذ المغذيات في الوسط الزرعي وتغير الاس الهيروجيني وايضا لتراكم الفضلات وهذا انظام يسمى بانظام المغلق او نظام الوجبة.

اما بالنظام المفتوح فان كل الخلايا البكترية لا يسمح لها بان تموت من خلال اضافة جزء جديد وحديث من الوسط الزرعي وسحب الفضلات ومراقبة الاس الهيدروجيني هذا النظام يسمى بالنظام المفتوح .

اطوار النمو Phases of growth

تمر اغلب الكائنات الحية المجهرية باربعة اطوار خلال فترة نموها وهي:

1- طور التطبع Lag phase
2- الطور اللوغارتمي Log phase
3- طور الثبات Stationary phase
4- طور الموت Decline or death phase

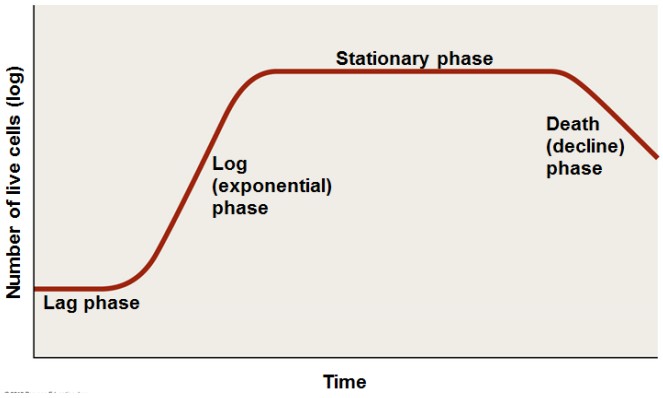
الطور الاول Lag phase وهي الفترة المحصورة بين التلقيح الى بداية ظهور النمو وخلال هذا الطور يكون الاتي:

البكتريا تتعرف على الوسط الزرعي الجديد وتعمل على التاقلم حيث تبدا بالتوقف عن انتاج الانزيمات غير الضرورية وتنتج انزيمات جديدة للاستفادة منها في تحليل مكونات الوسط الجديد حيث تكون نشطة في هذا المجال ويستمر الوسط من ساعة واحد الى عدة ايام. في هذا الطور منحني النمو سوف يكون موازيا للمحور السيني.

الطور الثاني Log phase في هذا الوسط سوف تقوم الخلية بالاستفادة من مكونات الوسط وتنقسم باقصى سرعة مستفيدة من الظروف المثالية في الوسط من المغذيات ودرجة الحرارة والاس الهيدروجيني والرطوبة الخ. في هذا الطور يكون الكائن حساس جدا للمضادات الحياتية والعوامل المضادة للمايكروبات. سوف يرتفع منحني النمو بشكل سريع.

الطور الثالث Stationary phase سوف يكون عدد الخلايا النامية مساويا لعدد الخلايا الميتة ولذلك سمي بطور الثبات اي ان عدد الخلايا ثابت او مستقر plateau حيث يكون الكائن في مواجهة الظروف البيئية غير المثالية مثل نقص المغذيات والماء والاوكسجين وتغير الpH وكذلك عدم وجود مكان اضافة الى تراكم الفضلات. يكون منحني النمو موازيا للمحور السيني.

الطور الاخير Decline or death phase طور الموت اذا بقت الظروف على حالها فان الخلايا البكتيرية سوف تموت وتلجا الخلايا الى اساليب معينة لتبقى على قيد الحياة سوف يهبط منحني النمو بسرعة.



ان دراسة منحني النمو تمكننا في فهم كيفية نمو الكائن المجهري تحت مختلف الظروف وكذلك نمو الكائن الممرض في اجسامنا ودراسة تاثيرات العوامل الكيميائية المختلفة وظروف الضغط الازموزي وكذلك الحرارة على النمو البكتيري.

زمن الجيل وكيفية حسابه Generation time and its calculation

يقصد بزمن الجيل هو الزمن اللازم للخلايا البكترية لكي تنمو وتنقسم ويعتمد على الانواع البكترية نفسها الظروف البيئية. زمن الجيل غالبا يختلف بين البكتريا وغالبا ما يتروح بين ثلاثون دقيقة وبين ثلاثة ساعات. فمثلا بكتريا ال*Escherichia coli* تملك زمن جيل عشرون دقيقة لتنقسم تحت الظروف المثالية.

كيفية حساب زمن الجيل

لحساب زمن الجيل نستخدم المعادلة التالية

العدد النهائي= العدد الاصلي* 2^n

حيث ان n تعني عدد الانقسامات

$N_t = N_o \times 2^n$

where N_t is the final cell number

N_o is the original cell number

n is the number of generation

$$Generation\ time = \frac{final\ time}{division\ number}$$

$$\text{the number of division} = \frac{the\ final\ time}{generation\ time}$$

ماهو العدد الكلي للخلايا النامية اذا علمت ان العدد الاصلي 100 خلية وعدد الانقسامات 3؟

العدد الكلي= 100×2^3

العدد الكلي= 800 خلية بكتيرية

احسب العدد الكلي للخلايا النامية خلال ثلاث ساعات اذا علمت ان العدد الاصلي 100 خلية وزمن الجيل هو 15 دقيقة؟

180=60*3

$$\text{the number of division} = \frac{the\ final\ time}{generation\ time}$$

$$\text{the number of divison} = \frac{180}{15}$$

العدد الكلي= 100×2^{12}

$= 100 \times 2^5 \times 2^5 \times 2^2$

$= 100 \times 4096$

=409600 خلية

Table 6.1 An Example of Exponential Growth

Time[a]	Division Number	2^n	Population ($N_o \times 2^n$)	$\log_{10} N_t$
0	0	$2^0 = 1$	1	0.000
20	1	$2^1 = 2$	2	0.301
40	2	$2^2 = 4$	4	0.602
60	3	$2^3 = 8$	8	0.903
80	4	$2^4 = 16$	16	1.204
100	5	$2^5 = 32$	32	1.505
120	6	$2^6 = 64$	64	1.806

Lecture 6

طرق عد البكتريا Enumeration of bacteria

يقاس النمو بواسطة التغيير بعدد الخلايا المايكروبية خلال الوقت. يمكن حساب جميع الخلايا البكتيرية (الحية والميتة) the total number of cells تحت المجهر بينما العد بالاطباق يمكننا من حساب العدد الحي للخلايا البكتيرية.

يتم قياس النمو البكتيري بعدة طرق:

Direct methods:

- Serial dilution and viable plate counts (pour plate and spread plate methods).
- Most probable number.
- Membrane filtration.
- Microscopic counts.
- Electronic counters.

Indirect Methods:

- Turbidity.
- Metabolic activity.
- Biomass determination: dry weight; essential cell component.

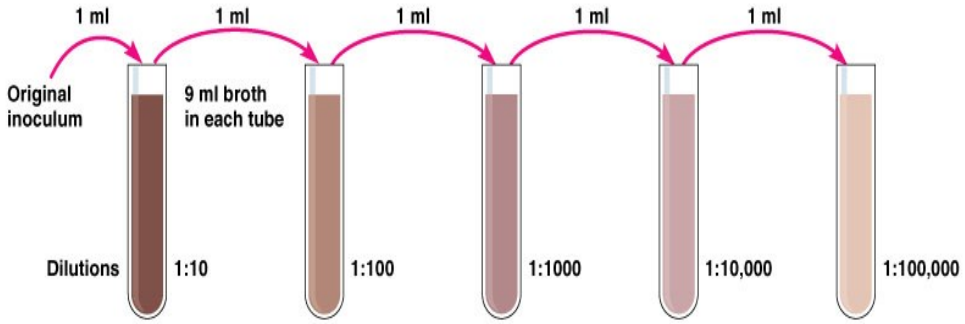
Genetic methods:

- Isolate DNA sequences of unculturable prokaryotes.
- Used to estimate the number of these microbes.

The plate count method

طريقة العد بالاطباق:

يخفف النموذج البكتيري باستعمال الماء المقطر او المحلول الملحي (تخافيف عشرية). بعد ذلك يتم تلقيح الاطباق الحاوية على اوساط زرعية (وتتم الزراعة بطريقتين الصب بالاطباق pour plate والنشر على الاطباق spread plate) بحجم معين من النموذج البكتبري بعد ذلك تحضن الاطباق بدرجة حرارة مناسبة. بعد انتهاء فترة الحضن نقوم بعد المستعمرات ويضرب بمعامل التخفيف. عموما الاطباق الحاوية على مستعمرات بين 30-300 تخضع للعد البكتيري والتي يعبر عنها عدد البكتريا بالمليللتر من النموذج. في هذه الطريقة يتم عد الخلايا البكتيرية ؟



طريقة الصب بالاطباق تتضمن وضع 1 or o.1 ml في اطباق بتري فارغة ثم يضاف وسط زرعي سائل محفوظ بدرجة حرارة 45 °C يخلط بهدوء ويترك ليتصلب ويحضن على درجة حرارية مناسبة. هذه الطريقة غير مناسبة للبكتريا الحساسة للحرارة العالية وتظهر المستعمرات تحت سطح الاكار.
في طريقة النشر على الاطباق ينشر o.1 ml على سطح الاطباق الحاوية على وسط زرعي صلب وتنشر باستخدام قضيب زجاجي معقم يسمى spreader . في هذه الطريقة المستعمرات سوف تظهر على السطح .

Most Probable Number

العد الاكثر احتمالا

غالبا ما تستخدم هذه الطريقة لتحديد اعداد البكتريا في عينات السوائل الملوثة وخصوصا الماء الملوث. تضاف عينات الماء الملوثة الى عدة انابيب اختبار حاوية على وسط مرق اللاكتوز مفرد ومضاعف التركيز.
اذا كانت بكتريا القولون موجودة في العينة فيمكن الاستدلال عليها من خلال تخمر سكر اللاكتوز وانتاجها للغاز. ويمكن مقارنة الانابيب الموجبة بجداول احصائية معينة ومن ثم يظهر لنا عدد البكتريا في العينة.

Filtration

الترشيح

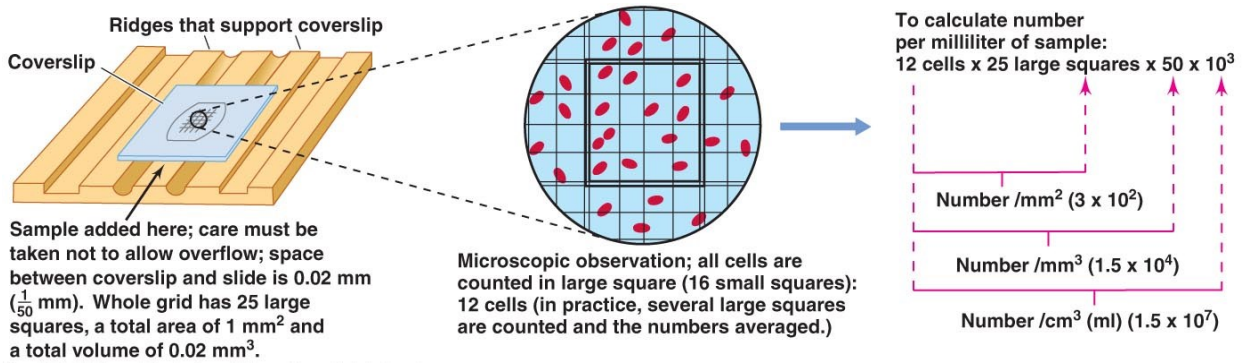
تستخدم طريقة الترشيح في عد البكتريا في النماذج التي يظن بانها نظيفة مثلا الماء المعقم. كميات كبيرة من الماء ترشح من خلال اوراق الترشيح **Filter papers** الحاوية ثقوب يكون قطرها اقل من قطر البكتريا ولذلك سوف تحتجز البكتريا على سطوح هذه الاوراق. بعد ذلك تنقل اوراق الترشيح هذه الى اطباق بتري وتحضن ثم تحسب المستعمرات النامية.

Direct microscopic count

العد المباشر تحت المجهر

يوجد سلايدات خاصة اعدت لهذا الغرض حيث توضع قطرة من المعلق البكتيري على السلايد ثم بعد ذلك تضاف صبغة لتسهيل رؤية البكتريا ثم يغطى بغطاء خاص بعد ذلك يحسب العدد البكتيري في مقطع واحد بعد ذلك يضرب بمعامل معين ليعطينا العدد الحقيقي للبكتريا.من فوائد هذه الطريقة اختصار الوقت ولكن يحسب العدد الحي والميت وكذلك صعوبة عد البكتريا المتحركة.

Petroff-Hausser counter



Fluorescent Dyes:

- Propidium Iodide – stains dead cells
- Syto-9 – stains both dead and live cells

Turbidity methods

قياس العكورة

ويمكن ايضا قياس النمو البكتيري فالبكتريا تتضاعف بالوسط الزرعي السائل وتحوله الى شكل ضبابي اذ يتسنى قياس العكورة من خلال وضع انبوب مملوء بالوسط في جهاز المطياف الضوئي spectrophotometer ثم يضرب بمعامل ليتم تحديد التركيز. هنا يقاس كمية الضوء التي تمر خلال النموذج . ايضا لايمكن التفريق بين البكتريا الميتة والحية.

The dry weigh

قياس الوزن الجاف

يعمل طرد مركزي للوسط الزرعي المنماة عليه الاحياء المجهرية لينتج حبيبات تسمى pellets نقوم بوزنها باستخدام الميزان الحساس. عدم التفريق بين البكتريا الميتة والحية.

Biochemical oxygen demand (BOD)

المتطلب الحيوي للاوكسجين

يمكن قياس استهلاك الاوكسجين للمزرعة البكتيرية اذ ان استهلاك الاوكسجين لمزرعة ما اكثر من مزرعة اخرى مع تساوي الفعاليات الاخرى يدل على ان الاحياء المجهرية موجود اكثر في المزرعة الاولى. وان الاختلاف بين المزرعتين في استهلاك الاوكسجين يسمى المتطلب الحيوي للاوكسجين ويستخدم للدلالة على وجود التلوث المايكروبي في عينات المياه.

Metabolic Activity

الفعاليات الايضية

ان النواتج الايضية التي تنتج بعد نمو الاحياء المجهرية في الاوساط الزرعية مثل الحوامض وثاني اوكسيد الكربون يمكن قياسها للاستدلال على اعداد هذه الاحياء ولكن هذه الطريقة مكلفة.

Lecture 7

Factors Affecting Bacterial Growth

العوامل التي تؤثر على النمو البكتيري:

السيطرة على الاحياء المجهرية تعني اولا خفض اعدادها وثانيا او شل نشاطها وثالثا او الحد من نموها ثم القضاء عليها او ازالتها كليا او جزيئا وتتم باستخدام ماياتي:

- Temperature
- Atmosphere – O_2 & CO_2
- H-ion concentration
- Moisture & drying
- Filtration
- Osmotic pressure
- Radiation

Chemical Agents in Control

- Phenolic
- Alcohols
- Heavy metals
- Halogens
- Detergents
- Aldehydes

ان الاهداف الرئيسية للسيطرة على الاحياء المجهرية هي:

1-منع انتشار الامراض والعدوى.

2-منع التلوث ونمو الاحياء المجهرية غير المرغوب بها.

وتهلك الاحياء المجهرية بالمؤثرات الفيزياوية عند حدوث اي الاضرار الاتية:

1-ضرر في جدار الخلية.

2-خلل في نفاذية الاغشية السايتوبلازمية.

3-خلل في التركيب الفيزياوي والكيمياوي للبروتين والحوامض النووية في الخلية.

4-خلل في النشاط الانزيمي الخلوي.

5-منع تصنيع البروتينات والحوامض النووية.

Temperature

تعد درجة الحرارة من اهم العوامل التي تؤثر في النمو سلبا او ايجابا ويستطيع اي كائن العيش بين مديات حرارة تتروا ح بين الحرارة الدنيا minimum والحرارة العليا maximum والحرارة المثلى optimum .

درجة الحرارة تحدد جزيئا معدل النمو وكميته النهائية وقد تؤثر ايضا على العمليات الايضية وعلى الشكل المظهري للخلايا. فكل نوع بكتيري ينمو على درجة مثالية من الحرارة (هي درجة الحرارة التي تسمح بحدوث اسرع نمو خلال فترة حضانة قصيرة نسبيا تتروا ح بين 12-24 ساعة الا انه ممكن الحصول على عدد كلي اكبر من الخلايا البكتيرية عندما يحتفظ بالمزرعة البكتيرية لفترة طويلة على درجة حرارة تقل عن الدرجة المثالية) .

وتنقسم البكتريا حسب تحملها لدرجات الحرارة الى:

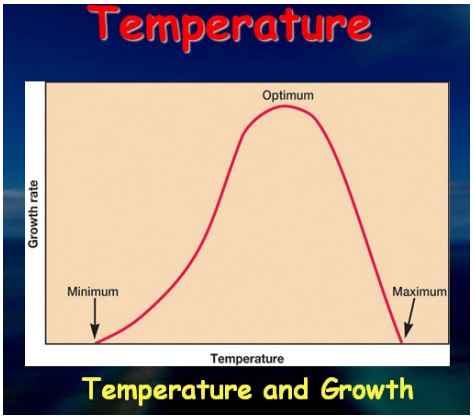
1-المحبة لدرجات الحرارة المعتدلة (Mesophilic) والتي تفضل النمو بين درجة حرارة 25 °C -40 °C ومن امثلتها معظم البكتريا المرضية.

2- المحبة لدرجات الحرارة المنخفضة (Psychrophilic) وتنمو جيدا تحت درجة حرارة 20 °C ومثال عليها بكتريا *Flavobacterium* spp .

3- البكتريا المحبة للحرارة العالية(Thermophilic) وتفضل النمو جيدا بين درجة حرارة 55 °C- 58 °C ومثال عليها بكتريا *Bacillus stearothermophilus*.

ان ارتفاع درجات الحرارة يؤدي الى تغيير طبيعة بروتين الخلايا وكذلك يؤدي الى اكسدة المكونات الكيمياوية للخلية مثل الحوامض الامينية والبروتينات الت تكون حساسة جدا لارتفاع درجات الحرارة.

ان انخفاض درجات الحرارة دون الحرارة المثلى يعمل على تثبيط الاعمال الايضية لخلايا الاحياء المجهرية وان استمرار انخفاض درجة الحرارة نحو الصفر المئوي فما دون يؤدي الى توقف النمو تماما وهنا تجدر الاشارة الى ان درجة الحرارة الواطئة لا تعد وسيلة للتعقيم لانها تقضي على مجموعة من الاحياء المجهرية ولكنها تعد وسيلة لوقف النشاط الايضي للاحياء المجهرية بسبب الجفاف الذي ينتج عن طريق تجمد المياه وعدم توفر الرطوبة اللازمة لحيوية ونشاط الاحياء المجهرية.



H-ion Concentration

ان حامضية او قاعدية وسط ما تؤثر بشكل كبير على النمو المايكروبي في ذلك الوسط. وان هذا التاثير ياتي بسبب ان ايونات الهيروجين والهايروكسيل ممكن ان تتداخل مع الهيروجين الموجود في البروتينات او الاحماض النووية.

ممكن تقسيم الكائنات المجهرية على اساس تحملها للحامضية او القاعدية الى:

1-الاحياء المحبة للحموضة العالية acidophilies حيث تنمو بشكل جيد بانخفاض الpH مثل Lactobacilli .

2-الاحياء المحبة للقاعدية العالية alkaliphilies حيث تنمو بشكل جيد بارتفاع ال pH مثل *Vibrio cholera* .

3-الاحياء المجهرية المتعادلة neutrophiles وتشمل طيف واسع من الاحياء المجهرية التي تعيش في بيئات من pH (6.5-7.5)

النواتج الحامضية تساعد في حفظ الاغذية بواسطة منع زيادة النمو المايكروبي كما هو معروف.

ان تاثيرات قيمة الpH البيئة على نمو البكتريا والتفاعلات الايضية الخلوية كثيرة ومتشعبة ولكن انه على درجات المنخفضة جدا او المرتفعة جدا من قيمة الpH قد يحدث فساد للبروتين الانزيمي نتيجة لتخثره تماما كما يحدث له عند ارتفاع درجة الحرارة. ويجب ان نعلم ان نشاط كل نظام انزيمي معين بالخلية له نطاق من قيم الpH يعمل في حدوده كما يكون لنشاطه درجة مثلى تقع في منتصف هذا النطاق وان اي انحراف عن هذه الدرجة المثلى يؤدي الى الابطاء من نشاط الانزيم وينعكس هذا على معدل النمو ويبطئه. وعلاوة على ذلك قد يختلف ايضا مجال الpH وكذلك الدرجة المثلى منه للانزيم الواحد تبعا لنوع الخلايا المحتوية عليه.

Oxygen

الكائنات الحية الدقيقة وبخاصة البكتريا قد تحتاج او لا تحتاج الى الاوكسجين لمواصلة حياتها ونموها ويمكن تصنيف البكتريا على اساس احتياجها للاوكسجين من عدمه الى مايلي:

1-بكتريا هوائية اجبارا (obligate aerobes) وهي الكائنات التي تحتاج في نموها الى وجود الاوكسجين بحيث لا تتمكن من عمل التخمر fermentation . مثلا بكتريا ***Pseudomonas aeruginosa***

2-بكتريا لا هوائية اجبارا (obligate anaerobes) وهي الكائنات التي لا تستطيع العيش بوجود الاوكسجين نظرا لعدم امتلاكها انزيمات تقوم ب detoxify الاوكسجين وتنمو جيدا بغياب الاوكسجين.

مثال بكتريا .*Clostridium* spp. and *Bacteroides* spp

3-بكتريا لا هوائية اختياريا (**Facultative anaerobe/aerobe**) **وهي البكتريا التي تستطيع العيش بوجود الاوكسجين او عدمه لانها تستطيع القيام بعمليتي التنفس والتخمر على حدا سواء.**

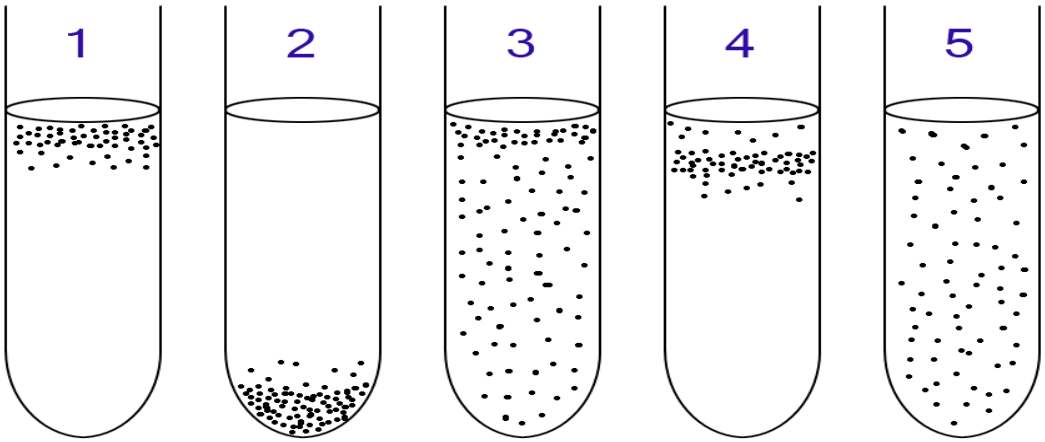
مثال بكتريا *Erwinia carotovora* and *Streptococcus cermoris*

4-محبة لكميات ضئيلة للاوكسجين (Microaerophilic) والتي تنمو بشكل افضل بوجود كميات قليلة من الاوكسجين وتقتل بالكميات العالية من الاوكسجين لانها لا تقوم بعملية التخمر او التنفس اللاهوائي.

مثال عليها بكتريا ال *Campylobacter* spp., *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp., *Streptococcus pyogenes*

5-الكتريا المتحملة للاوكسجين (**Aerotolerant anaerobe**) **هي الاحياء المجهرية اتي تعيش في الظروف اللاهوائية ولكن تستطيع تحمل الاوكسجين ان وجد في بيئتها.**
مثال *Clostridium perfringens*, *Treponema pallidum*

6- Capneic microbe وهي البكتريا التي تعيش هوائيا ولكن تنمو افضل بوجود 3-10 % CO2. مثال Lactic acid bacteria



Toxic Forms of Oxygen

عدة اشكال من الاوكسجين تتكون في الخلية كنتيجة لعملية التنفس

singlet oxygen (O_2), superoxide ion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radicals (OH•)

ولكن هذه الاشكال تتحلل لوجود انزيمات معينة .

Superoxide dismutase, catalase, Peroxidase

ولذلك فان البكتريا التي لا تستطيع التخلص من اشكال الاوكسجين السامة فانها مجبرة للعيش في بيئة لا هوائية.

O_2^- ممكن التخلص منه بواسطة انزيم Superoxide dismutase بينما يتخلص من بيروكسيد الهيروجين بواسطة انزيم Catalase

Osmotic Pressure

يعرف على انه انتشار الماء خلال الغشاء الشبه نفاذ من المحلول الواطيء التركيز باتجاه المحلول العالي التركيز. ان وجود محلولين احدهما يملك تركيز ازموزي يختلف عن الاخر فان احدهما يسمى Hypertonic والذي يحوي تركيز عالي من المذاب solute اذ يعد الماء مذيب solvent بينما يسمى الاخر hypotonic والذي يحوي محلول واطيء من المذاب. واذا تساوى المحلولين بالتركيز الازموزي فيسميان isotonic .

فخلايا البكتريا في حالة hypotonic سوف يدخل الماء لها من محيطها الخارجي ويسبب الانتفاخ swelling ينتج عنه ضغط قد يؤدي الى انفجار الخلايا.اما في حالة hypertonic اذ يكون تركيز المحلول بالخارج اعلى من الخلية فان الماءسوف يخرج من الخلية الى الخارج مسبب انكماش الخلية Shrinkage . وهذا يساعد في حفظ بعض الاغذية.

Moisture & Drying

يعد الماء من المكونات الضرورية جدا لسايتوبلازم الخلايا البكتيرية وبالتالي فان الجفاف يؤدي الى موت الخلايا البكتيرية لعدم قدرة الاحياء المجهرية على القيام بالفعاليات الحيوية اللازمة لابقائها على قيد الحياة. ان مقاومة الاحياء المجهرية لعملية التجفيف تعتمد على :

1-نوع الاحياء المجهرية.

2-الوسط الذي يتم تجفيف الاحياء المجهرية فيه.

3-تكامل عملية التجفيف وفعاليتها.

4-العوامل الفيزياوية التي تتعرض لها عملية التجفيف.

فمثلا بعض البكتريا حساسة جدا لعملية التجفيف مثل ***Treponema pallidum*** بينما تقاوم بكتريا ***Staphylococcus*** ssp. لعدة اشهر ولكن سبورات البكتريا تقاوم التجفيف لعدة عقود.

اما الحرارة الرطبة فانها اكثر فاعلية من الحرارة الجافة فقد وجد ان الحرارة الرطبة 121 درجة مئوية كفيلة بالقضاء على سبورات انواع عديدة من البكتريا وقد يتطلب ذلك ساعتين عند استخدام الحرارة الجافة وبنفس الدرجة الحرارية.

Filtration

بعض المواد تتلف عند تعقيمها بالحرارة مثل المضادات الحياتية والانزيمات وبعض المواد الكيمياوية لذلك تستعمل الاغشية المرشحة والتي بسهولة تعيق مرور خلايا الاحياء المجهرية من خلالها.

Radiation

بصورة عامة فان تاثير الاشعاع ام يكون تاثيرا مباشرا او تاثيرا غير مباشر. ان التاثير المباشر يعد بمعزل عن عوامل المحيط الخارجي وتاثير الحرارة بينما يكون عن طريق توليد جذور حرة من الهيدروجين والهيدروكسيل اذ بمساعدة العوامل البيئية كالحرارة تسبب تخريبا لمكونات الخلية المايكروبية نتيجة لتكوين مركبات كيمياوية مختلفة لها دور في التفاعلات الكيمياوية.

Type of the radiation

انواع الاشعاع:

Ultraviolet, UV

1-الاشعة فوق البنفسجية

ويعد هذا النوع من الاشعة جزء من اشعة الطيف الشمس ولذلك تعد اشعة الشمس الى حد ما مصدر مضاد للاحياء المجهرية. وتستخدم مصابيح خاصة لاصدار الاشعة فوق البنفسجية لتعقيم غرف العمليات ومصانع تعبئة الادوية ويكون تاثيرها على الاحياء المجهرية من خلالها امتصاصها من قبل الحوامض النووية ومن ثم حصول الطفرات. تكون خطرة اذ ممكن تسببها بحروق للجلد والعيون.

2-الاشعة السينية X-rays

اشعة مميتة للاحياء المجهرية لكونها ذات طاقة عالية ولها خاصية النفاذية الى داخل انسجة الاحياء المجهرية الا ان استخدامها في السيطرة على الاحياء المجهرية غير عملي لكلفتها العالية ولقابليتها على الانتشار من مصادرها وبالتالي تقل كفائتها وعند تعرض جسم الانسان لها ولفترات طويلة قد تسبب الاصابات السرطانية.

3-اشعة كاما Gamma- rays

مصدرها النظائر المشعة مثل الكوبلت وهي ذات طاقة عالية وتستخدم في الابحاث العلمية. تشبه اشعة كاما اشعة اكس من حيث فعاليتها ونفاذيتها المميتة للكائنات الحية المجهرية ولكنها ذات موجات اقصر وطاقة اعلى. يكون تاثيرها على الاحياء المجهرية من خلال تاين بعض مكونات الخلايا كالDNA ومن ثم موت الخلايا.

Lecture 8

Microbial metabolism

كل الخلايا تحتاج كما هو معروف الى الطاقة لا ستمرارها بالحياة واغلب اشكال الطاقة هو الادينوسين ثلاثي الفوسفيت Adenosine tri phosphate (ATP) .

ماذا نقصد بالايض metabolism هو مجموع كل العمليات الكيمياوية التي تحدث داخل الخلية الحية اي عمليات الهدم Catabolism وعمليات البناء **Anabolism.**

Catabolism (Dissimilation)

ويقصد بها المسارات التي تؤدي الى تكسير المواد العضوية (carbohydrates, lipids, & proteins) ليتم انتاج طاقة تستخدم بالنمو والتكاثر وكذلك مواد البناء الصغيرة.

Anabolism (Assimilation)

وهي المسارات او العمليات التي يتم فيها استخدام الطاقة الناتجة ومواد البناء اساسية من عمليات الهدم لبناء التراكيب الخلوية (biosynthesis) وان عمليات الهدم والبناء يجريان في وقت واحد.

Basic Concepts of Metabolism

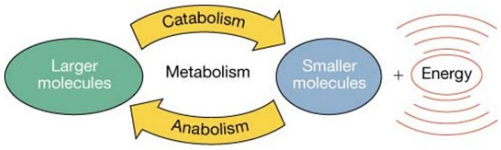
المفاهيم الاساسية للايض

- Glycolytic Pathways
- Fermentation
- Respiration
- Photosynthesis
- Chemolithotrophy
- The Nitrogen Cycle

ان تفاعلات الايض تحدث على خطوات تتضمن اعادة ترتيب الذرات لمواد البناء والتي تؤدي الى تكوين النتائج النهائية. وكل خطوة من هذه الخطوات تحتاج الى الانزيم الخاص بها.

كما اشير اعلاه فان عمليات الهدم تؤدي في النهاية الى تكوين طاقة كيميائية والتي تخزن ومن ثم تكسر لتطلق وبعدها تدخل في انجاز الوظائف الخلوية مثل عمليات البناء وعمليات النقل عبر الغشاء الخ.

Metabolism Relationships



سكر الكلكوز ممكن يتم تكسيره بمسار هدم مسيطر عليه بعدة انزيمات خلوية ويتم تحرير الطاقة الATPعن طريق تكسير الاصرة التساهمية.

ويتم تكسير سكر الكلكوز عن طريق ثلاثة مسارات الى ثاني اوكسيد الكربون والماء

Overall Formula: $C_6H_{12}O_6$ + ___ O2 → CO_2 + ___ H_2O

والتي هي

The three stages:

- Glycolysis (anaerobic) (in cytoplasm)
- Krebs cycle (aerobic) (in mitochondria in eukaryotic and the **cytosol in the prokaryotic)**
- Electron transport chain (with chemiosmosis) (aerobic)

ماذا يحدث اثناء الايض المايكروبي في البكتريا التي تتغذى عن طريق الامتصاص خلال الاغشية السايتوبلازمية:
اولا:افراز انزيمات خارجية (extracellular enzymes) والتي تكسر جزيئات الغذاء الكبيرة والصلبة.
ثانيا: تمتص المواد الغذائية اعلاه خلال الغشاء ليتم هضمها بالانزيمات الخلوية الداخلية intracellular enzymes.
ثالثا: هذه العملية تنتج ثاني اوكسيد الكربون والماء وبالتالي فان البكتريا تبدا بالتضاعف ةالانقسام عند وجود كميات كافية من الغذاء.

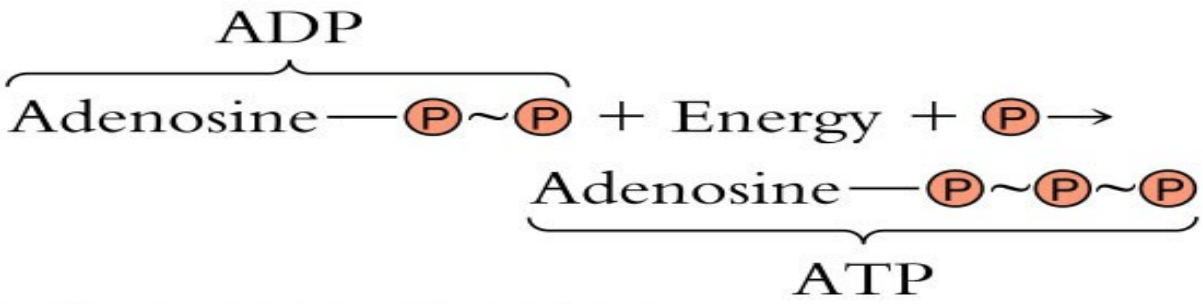
كيفية انتاج الطاقة ال ATP:

- يتم اضافة مجموعة الفوسفيت الى الادينوسين ثنائي الفوسفيت ADP لينتج ادينوسين ثلاثي الفوسفيت ATP وتسمى هذه العملية بالفسفرة phosphorylation والخلايا تنجز هذه العملية بطريقين:

Substrate level phosphorylation: is a type of metabolic reaction that results in the formation of (ATP) by the direct transfer of a high-energy PO_4^- to ADP.

فسفرة مواد الاساس

Oxidative phosphorylation: is the metabolic pathway in which the mitochondria in cells use their structure, enzymes, and energy released by the oxidation of nutrients to reform ATP.



الفسفرة التاكسدية

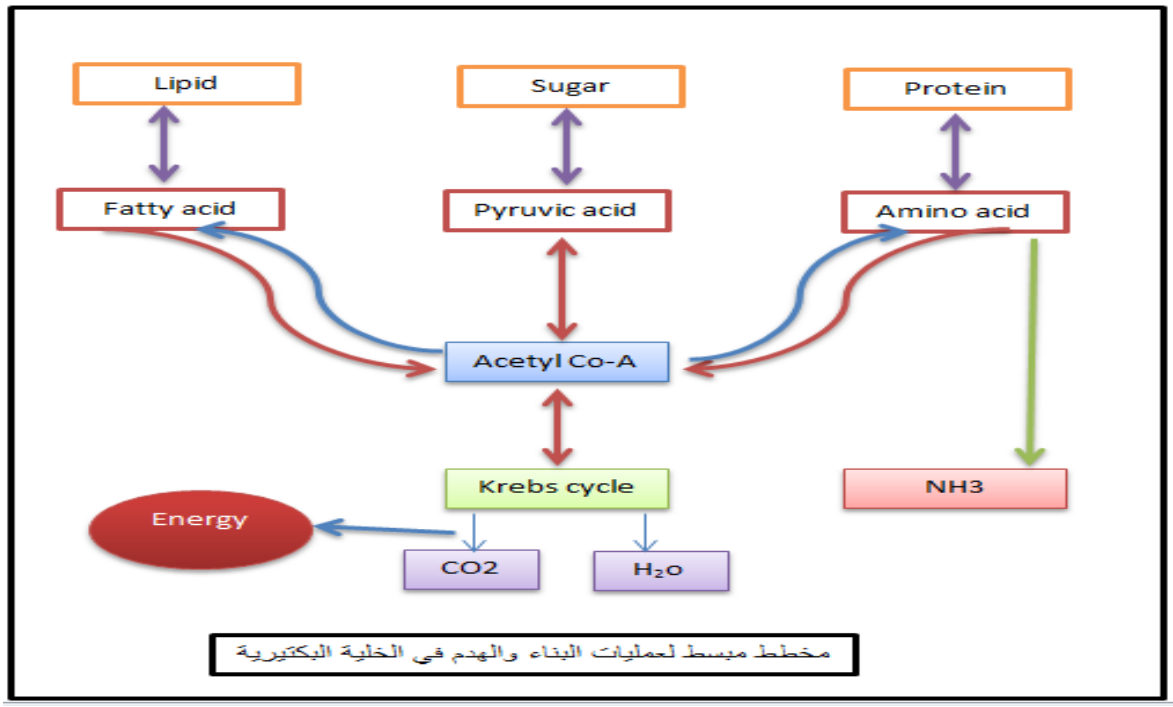
Energy released from the transfer of electrons (**oxidation**) of one compound to another (**reduction**) is used to generate ATP by chemiosmosis.

Chemiosmosis is the movement of ions across a selectively permeable membrane, down their electrochemical gradient. More specifically, it relates to the generation of ATP by the movement of hydrogen ions across a membrane during cellular respiration or photosynthesis.

لماذا نحتاج الكائنات الحية للطاقة؟

1- لكي تحافظ على تراكيبها الخلوية عن طريق البناء واصلاح التلف.
2- لتخليق جزيئات ومكونات خلوية جديدة كالاحماض النووية والسكريات المتعددة والانزيمات.
3- تحتاج الخلايا للطاقة لاتمام عمليات نقل المواد من والى المحيط (العمليات التي تحتاج للطاقة).
4- تحتاج الطاقة للنمو والانقسام والتضاعف.
5- للعمليات الحيوية مثل الحركة.

تفاعلات توليد الطاقة هي التنفس والتخمر والتركيب الضوئي بينما استهلاك الطاقة يكون في التخليق الحيوي ونقل المواد والمغذيات والحركة.



Lecture 9

Oxidation and Reduction

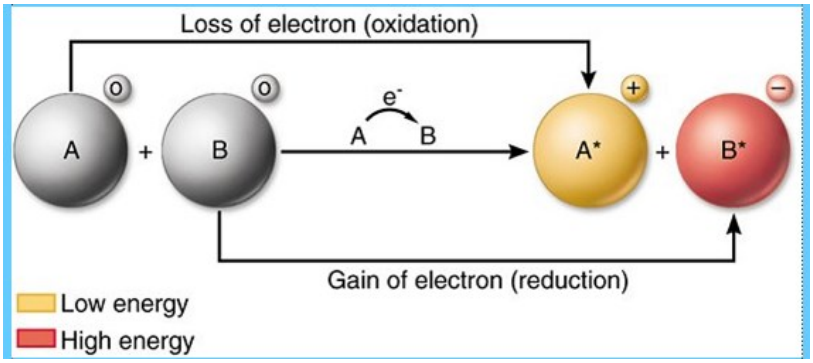
الاكسدة والاختزال:

وهي جزء انظمة انتاج الطاقة في الخلايا. فما كما هو معروف فان الاكسدة تعني فقدان الالكترونات اما الاختزال فانها اكتساب الالكترونات. وان عملية الاكسدة تؤدي الى تكوين طاقة عالية.

ان الذرة التي تكون اكثر ميلا لعملية الاختزال عندما تمر بتفاعلات كيميائية تكتسب من خلالها الكترونات اولا وثانيا يكون ارتباطها للذرات المشحونة بالشحنة السالبة قليل وهذا يحدث عند ارتباط الذرة للهيدروجين.

اما الذرة التي تكون اكثر ميلا لعملية الاكسدة فانها تمر بتفاعلات كيميائية تفقد خلالها الالكترونات وترتبط بقوة للذرات المشحونة بالشحنة السالبة وبالتالي فان هذا يحدث عند ارتباطها للاوكسجين.

ان عمليات الاكسدة والاختزال تحدث بصورة متزامنة وفيها يكون ان مادة ما تتعرض للاكسدة والاخرى تتعرض للاختزال. فالاولى تسمى مانحة للالكترونات the electron donor بينما تسمى الثانية مستقبل الالكترونات the electron acceptor.



ان الطرق الاولية التي تشمل هدم الكاربوهيدرات تشمل المسارات الايضية التالية:

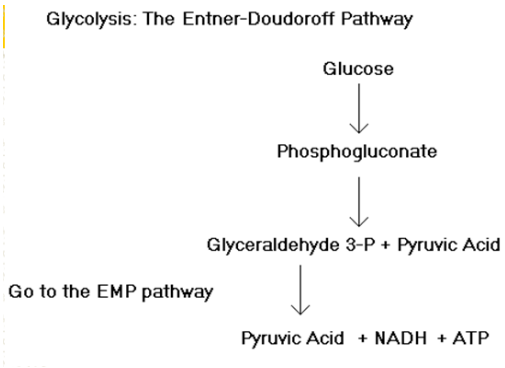
➢ Embden-Meyerhoff pathway (EMP) or Glycolysis

من المسارات المهمة التي تحدث في البكتريا وسوف يتم شرحه لاحقا. يتم تكسير سكر الكلكوز بواسطة هذا المسار لينتج البايروفيت ومن ثم يدخل في دورة كريبس لينتج طاقة وثاني اوكسيد الكربون. كلكوز ممكن ان يهدم بمسارات اخرى بديلة لينتج نواتج مختلفة تحتاجها الخلية.

➢ Entner-Doudoroff pathway (ED)

يوجد هذا المسار في الكائنات بدائية النواة مثل البكتريا وبعض الاحياء تفضل سلوك المسار(EMP) على بقية المسارات الاخرى. يوجد هذا المسار في الاجناس البكترية التالية *Pseudomonas, Rhizobium, Azotobacter, Agrobacterium, Escherichia coli*, .

يبدا هذا المسار بنفس تفاعلات مسار ال,Hexose Monophosphate Pathway وخاصة الخطوات الثلاثة الاولى ليكون glucose 6-phosphate and 6-phosphogluconate . ينقسم هذا المسار الى شقين الاول يؤدي الى انتاج البايروفيت والشق الاخر يدخل مسار EMP ويؤدي الى انتاج البايروفيت ايضا وفي هذا المسار تحصل البكتريا على سكريات خماسية تحتاجها لبناء القواعد النتروجينية.

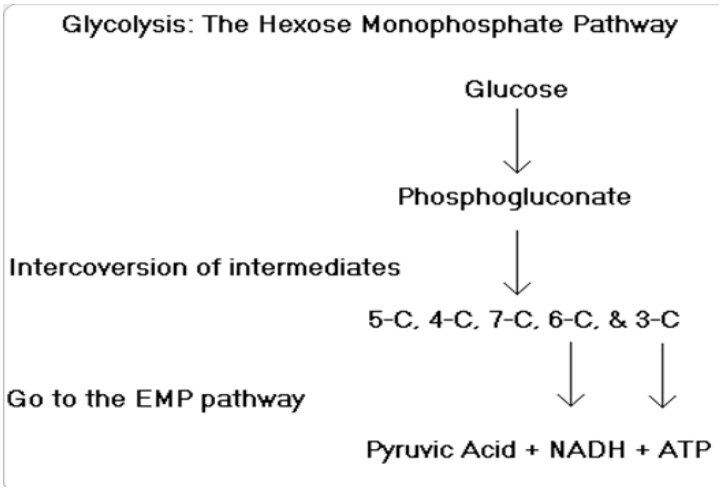


he best-characterized pathways for sugar catabolism in bacteria are the Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), the pentose phosphate (PP), and the Entner-Doudoroff (ED) pathways. These pathways are widespread in prokaryotes and are crucial for their physiology and nutrition. The overall schemes of the ED and EMP pathways are quite similar: 6-carbon sugars are primed by phosphorylation and subsequently cleaved by the aldolase enzyme into two 3-carbon intermediates (27). The two key enzymes distinctive to the ED pathway are (i) 6-phosphogluconate dehydratase (Edd) (EC 4.2.1.12), which catalyzes dehydration of 6-phosphogluconate to form 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate (KDPG), and (ii) KDPG aldolase (Eda) (EC 4.1.2.14), which cleaves KDPG to pyruvate and glyceraldehyde 3-phosphate, the latter being further catabolized through the EMP pathway and tricarboxylic acid (TCA) cycle (6).

➢ Hexose Monophosphate Pathway (HMP) or Pentose Phosphate Pathway

يعد مسار HMP من المسارات البديلة لمسار الEMP والذي يتاكسد glucose 6-phosphate لانتاج الPentos. ويكون هذا المسار مهم في الكبد وكريات الدم الحمراء والغدد الكظرية والانسجة الدهنية.يوجد في الحيوانات والنباتات بشكل خاص. يعمل هذا المسار مع مسار glycolysis ويوجد في بكتريا

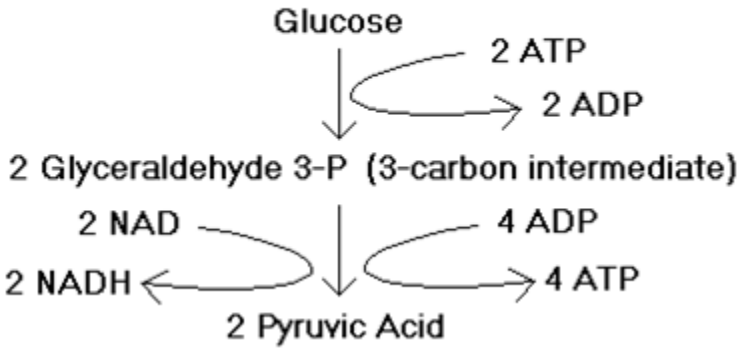
Bacillus subtilis, E. coli, Enterococcus faecalis



Embden-Meyerhoff pathway (EMP) or Glycolysis

وهو مسار شائع يوجد في cytosol البكتريا وباقي الخلايا الحية ويستعمل بوجود الاوكسجين Produces two pyruvates from one glucose او بغيابه Produces two lactates from one glucose وان الطاقة الناتجة من هذا المسار تستعمل لتشكيل مركبات عالية الطاقة ATP (adenosine triphosphate) and NADH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide).

Glycolysis: The Embden-Meyerhoff-Parnas pathway



بوجود الاوكسجين فان جزيئتان من البايروفيت سوف تتكون لتؤدي الى تشكيل الاستايل كو انزيم اي
(acetyl-CoA is produced from the pyruvate molecules created from glycolysis)

عندما يتشكل acetyl-CoA فان المسار سوف ينشطر الى مسارين هوائي والثاني لاهوائي ففي المسار الهوائي سوف يدخل في دورة كريبس في داخل المايتوكندريا وبالتالي فانه يتعرض للاكسدة ليتحول الى ثاني اوكسيد الكربون وفي نفس الوقت يختزل الNAD الى ال NADH. وبالتالي فان NADH يستخدم سلسلة نقل الالكترونات لتصنيع ATP كجزء من الفسفرة التاكسديةoxidative phosphorylation
اما في المسار اللاهوائي يؤدي الى تخمر البايروفيت

- **Glycosis:**

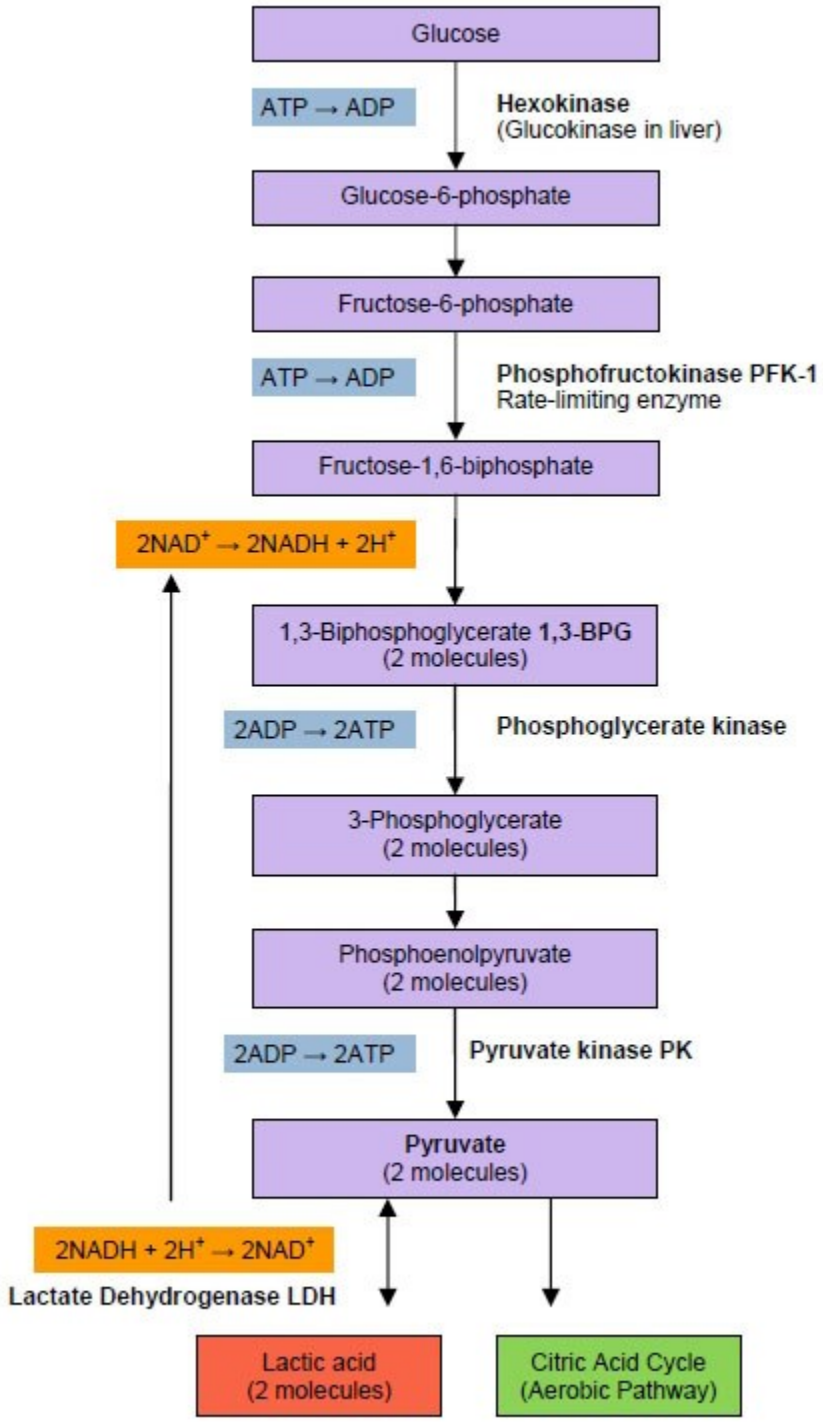
Glucose ----->2 Pyruvate + 2ATP + 2NADH

Outcome of glycolysis

Start with 1 molecule of glucose (6C)

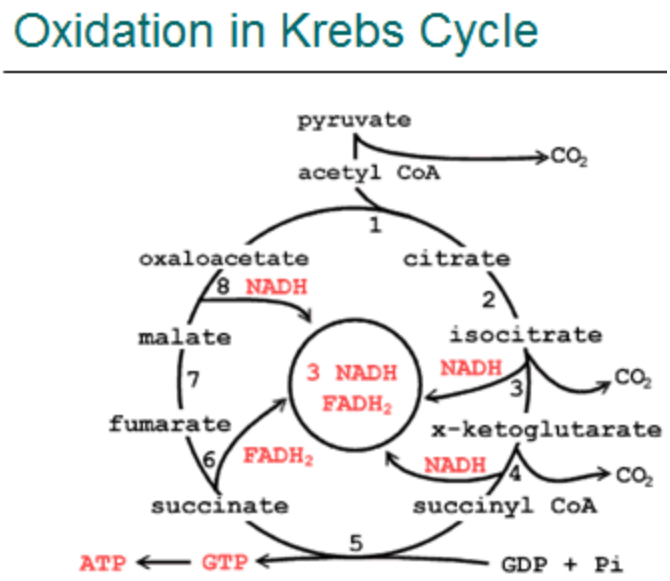
- The products are:
  - NET 2 molecules of ATP
  - 2 molecules of NADH
  - 2 molecules of pyruvic acid (3C)

- Organisms that are aerobic or facultative proceed into the Krebs cycle
- Anaerobes proceed to fermentation



http://biologyguide.net

Krebs cycle



Krebs Cycle Metabolites

- For every Acetyl-coA
  - 2 CO2
  - 3 NADH
  - 1 FADH2
  - 1 ATP (substrate level phosphorylation from GTP)
- Regenerates
  - CoA
  - Oxaloacetic acid

Lecture 10

ان تكسير السكريات (Catabolism) يتم بطرق مختلفة

- Aerobic respiration
- Anaerobic respiration
- Fermentation

Aerobic respiration

يحدث التنفس الهوائي في السايتوبلازم لمظم الخلايا ولا يحتاج للاوكسجين بينما التنفس اللاهوائي لا يحتاج للاوكسجين في التنفس الهوائي يتم انتاج طاقة كبيرة من اكسدة سكر الكلكوز بالمقارنة مع ما ينتج من طاقة اثناء التنفس اللاهوائي.

يبدأ التنفس الهوائي بعملية تدعى بال glycolysis في هذه العملية تتكسر الكاربوهيدرات مثل سكر الكلكوز وبعد فقدان بعض الالكترونات يتكون مركب يدعى البايروفيت. بعد ذلك اذا يتوفر الاوكسجين او في بعض الاحيان مستقبل الالكترونات البايرفيت يدخل في الجزء الاخر من التنفس الهوائي. عملية ال glycolysis سوف تنتج جزيئتان من ال ATP .

التنفس الخلوى cellular respiration عبارة عن فعاليات هوائية تتضمن ثلاث مراحل:

1. **Glycolysis** is the anaerobic stage and does not require oxygen.

2. The **Krebs cycle** or the citric acid cycle and **chemiosmosis** require the use of oxygen.

عندما لا يتوفر الاوكسجين في البيئة الخلية وقتها تتبع مسار الكلايكولايسس ما يسمى بالتخمر Fermentation

يتاكسد حامض البايروفيك بشكل كامل الى CO_2 ويكون المستقبل النهائي هو الاوكسجين

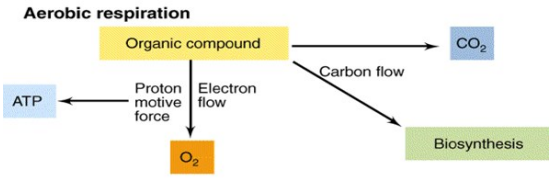
يتم اكسدة حامض البايروفك الى Acetyl CO A بوجود مجموعة انزيمات مستلمة لايونات الهيدروجين وعادة ما تنتشر هذه المستقبلات تحت الغشاء البلازمي وهي عادة اما اوكسجين او NADH ومن اهم المركبات العضوية الناقلة للالكترونات خلال تفاعلات الاكسدة هي:

Dehydrogenase, Flavoprotein, Cytochrome, NAD, NADH, FAD, FADH

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) → add electrons & hydrogen → NADH

Flavine adenine dinucleotide (FAD) → add electrons and hydrogen → $FADH_2$

المستقبل النهائي للالكترونات في سلسلة نقل الالكترونات هو جزيئة الاوكسجين.



Anaerobic respiration

ان المستقبل النهائي للالكترونات في سلسلة نقل الالكترونات هو ليس الاوكسجين وانما مركبات غير عضوية مثل **(eg nitrate, nitrite, sulfate)**

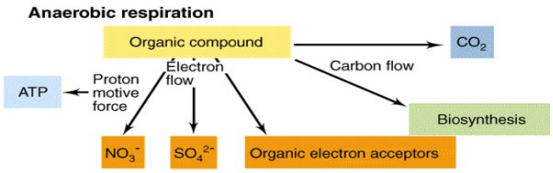
- Sulfate reducer: final electron acceptor is sodium sulfate (Na2 SO4)
- Methane reducer: final electron acceptor is CO2
- Nitrate reducer : final electron acceptor is sodium nitrate (NaNO3)

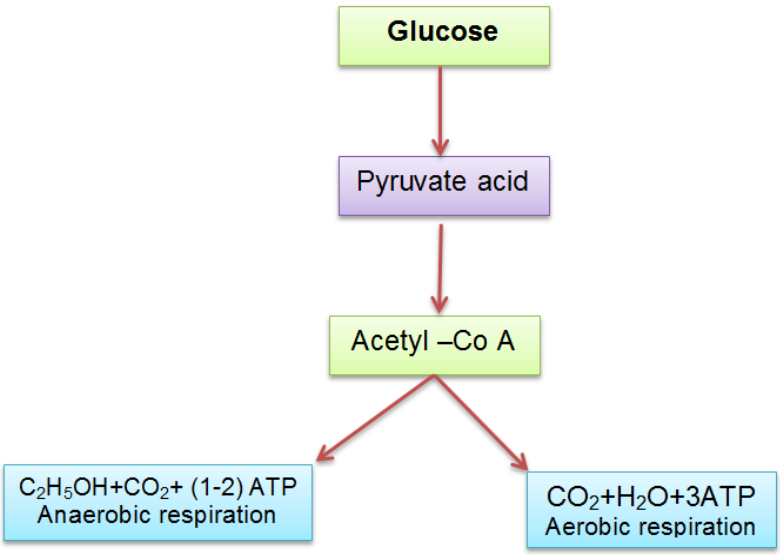
يتم انتاج طاقة قليلة بالمقارنة بالتنفس الهوائي حوالي 36 لكل جزيئة سكر الكلكوز لكون فقط دورة كريبس تحدث خلال التنفس اللاهوائي.

على الرغم من ان التخمر يحدث بغياب الاوكسجين الا انه ليس مشابه للتنفس اللاهوائي. يبدا التنفس اللاهوائي بنفس مسار التنفس الهوائي والتخمر اذ ان اول خطوة هي عملية الكلايكولايسس وايضا تنتهي بانتاج جزيئتين ATP من جزيئة سكر واحدة. في التنفس الهوائي سوف يتكون البايروفيت وبعد ذلك يدخل في مسار هو نفس مسار التنفس الهوائي.

بعد ذلك يتكون acetyl coenzyme A ليدخل في دورة كريبس ويجب ان يكون هناك مستقبل للالكترونات لغرض استمرار عمل سلسلة نقل الالكترونات the electron transport chain فاذا كان المستقبل النهائي هو الاوكسجين عندها يكون التنفس الهوائي. لكن في كا ئنات اخرى ممكن ان تستعمل مستقبلات نهائية مختلفة للالكترونات مثل

nitrate ions, sulfate ions, or even carbon dioxide.





Fermentation

في عملية التخمر البايروفيت المنتج من عملية ال glycolysis ينقلب الى العديد من النواتج النهائية وتختلف باختلاف الاجناس البكتيرية. حامض البايروفك الناتج من الكلايكولايسس يختزل في الكائنات المجهرية من خلال عمليات تخمر ثانوية لينتج احماض عضوية مختزلة او كحولات حيث يتاكسد ال NADH الى NAD ويتحرر جزء من الطاقة . لا يحتاج للاوكسجين ويمكن ان يتحرر غاز الهيدروجين او ثاني اوكسيد الكربون.

تعد مسارات التخمر من الطرق الحيوية لتشخيص البكتريا حسب النواتج النهائية للتخمر. وان نواتج التخمر تختلف باختلاف البكتريا ومن المسارات المهمة للتخمر هي:

المسار الاول يتخمر البايروفيت لينتج حامض اللاكتيك lactic acid ويكون في اغلب البكتريا مثل

Streptococcus cremoris, Lactobacillus acidophilus

المسار الثاني يتخمر فيه البايروفيت لينتج الايثانول وثاني اوكسيد الكربون مثال

Saccharomyces cerevesiae

المسار الثالث يتخمر فيه البايروفيت لينتج oxaloacetate وبعد ذلك ينتج propionic acid ومثال ذلك بكتريا

Propionibacterium

المسار الرابع يتخمر فيه البايروفيت لينتج Acetone, buteraldehyde, and butanol مثال البكتريا
Clostridium acetobutylicum

المسار الاخير يتخمر فيه البايروفيت لينتج acetic acid ومن ثم ينتج ethyl alcohol امثلة E.coli and some
Enterobacter

ان عملية التخمر تجري في غياب اي مستقبل خارجي للالكترونات علما ان المواد المتخمرة تكون غير متأكسدة او مختزلة بشكل تام وتكون قابلة للتحول الى مركبات وسطية مثل البايروفيت.

يمكن تقسيم عمليات التخمر في الاحياء المجهرية الى:

1- التخمر المتجانس Homofermentation
2- التخمر غير المتجانسHeterofermentation
3- التخمر المختلط mixed fermentation

في الحالة الاولى يتم تكوين حامض اللبنيك بشكل اساسي اما في التخمر غير المتجانس ينتج الكحول الاثيلي وثاني اوكسيد الكربون مع حامض اللبنيك والسبب في الاختلاف هو وجود انزيم الالدوليز في كائنات ذات التخمر المتجانس حيث يتم كسر السكريات السداسية الى مجموعتين مفسفرة ثلاثية الكاربون لكل منها.

بعض انواع البكتريا تقوم بعملية تخمر لمواد عضوية معينة يشترط وجود مواد عضوية اخرى في الوسط لاستخدامها كمستقبل للالكترونات ويسمى هذا النوع بالتخمر المختلط وهو شائع في بعض العصويات اللاهوائية مثل بكتريا ال clostridium .

يتم استهلاك البايروفيت في الكائنات المجهرية الهوائية واللاهوائية بطرق متعددة استنادا لنوع الكائن المجهري والظروف الهوائية والمركب المطلوب تكوينه في الخلية.

Fermentation Summary

- Anaerobic
- Cytoplasm
- Partial Oxidation
- Small amounts of ATP generated via substrate level phosphorylation
- Organic intermediaries as final electron acceptors
- End products
  - Acid: Lactic Acid, Acetic Acid, Butyric Acid, Acetone

- Alcohol: Ethanol, Isopropyl
- Gas : CO_2, H_2
- Contaminants

Photosynthesis

التخليق الضوئي

هو عملية تحويل الطاقة الضوئية الى طاقة كيميائية يستفاد منها في تثبيت غاز ثاني اوكسيد الكربون وتحويله الى مركبات كربونية عضوية وتعتبر هذه العملية اكثر اشكال تحولات الطاقة تعقيدا وتبدأ بامتصاص الضوء من قبل صبغات موجودة في اجهزة متخصصة تتبعها عملية تحويل الطاقة الضوئية الى طاقة كيميائية والتي يمكن استخدامها في عمليات البناء. ان اهم عامل مشترك في جميع عمليات التخليق الضوئي هو تكوين ATP وهذه العملية تعرف بعملية الفسفرة الضوئية photophosphorylation وما يحدث هنا هو سلسلة نقل للالكترونات المتحررة خلال التفاعلات الضوئية الكيميائية عند بدأ العملية في الصبغات والاجهزة المتصلة بها حيث تتكون ATP خلال عبور الالكترونات في هذه السلسلة ان بعض الالكترونات المتحررة يمكن ان يستخدم ايضا في اختزال nicotinamide adenine dinucleotide phosphate .

تحدث هذه العملية في النباتات العليا وفي الاحياء حقيقية النواة الواطئة مثل الطحالب واليوغلينات والدايتومات كذلك تحدث في بدائية النواة مثل الطحالب الزرقاء المخضرة cyanobacteria وبكتريا الكبريت الخضراء Green sulfur bacteria وبكتريا الكبريت البنفسجية Purple sulfur bacteria .

تتالف هذه العملية من نوعين من التفاعلات اولهما عادة تجري في الضوء ويطلق عليها التفاعلات الضوئية

Light-dependent Reactions وفيها تتحول الطاقة الضوئية الى طاقة كيميائية بشكل ATP و NADPH . اما النوع الاخر فهي تفاعلات الظلام Light-independent Reactions وفيها تستعمل الطاقة الكيميائية هذه في عمليات اختزال CO_2 الى المركبات العضوية.

في تفاعلات الضوء يمتص الضوء صبغات البناء الضوئي photosynthetic pigments يدعى بالكلورفيل chlorophyll molecules موجود في مركز تفاعل متخصص تدعى بالبلاستيدات. تستعمل طاقة الضوء لstrip الالكترونات من مانح الالكترونات (مانح الالكترونات ياتي من اختزال الحالة المتاكسدة). الالكترونات shuttled خلال سلسلة من نواقل الالكترونات من الحالة العالية للطاقة الى الواطئة الطاقة وخلال هذه العملية سوف تتكون الطاقة ال ATP . في مسار نقل الالكترونات المغلق ترجع الالكترونات الى سلسلة نقل الالكترونات بينما في المسار المفتوح تستخدم الالكترونات في عملية اختزال NDA or NADP to NADH or NADHP .

اما في تفاعلات الظلام فان ال ATP و NADH , NADHP المتكون من تفاعلات الضوء يستخدم لاختزال CO2 الى مركبات الكربون العضوية مثل الكلكوز والسكريات الاخرى.

تصنف الاحياء المجهرية التي لها القدرة على التخليق الضوئي حسب معطي الالكترونات (القوة الاختزالية) الى مجموعتين رئيسيتين:

المجموعة الاولى Oxygenic photosynthesis

وهذه تستخدم الماء كمعطي للالكترونات التي تستعمل لاختزال غاز CO_2 وتحويله الى مركبات عضوية وانتاج NADPH ATP وخلال هذه العملية يتحرر الاوكسجين الجزيئي وكالاتي:

$$nH2O + nCO2 \rightarrow (CH2O)n + nO2$$

تنتمي الى هذه المجموعة النباتات العليا والسيانو بكتريا والطحالب وان جميع هذه البكتريا هوائية المعيشة لان عليها ان تتحمل الاوكسجين المتحرر في التخليق الضوئي.

المجموعة الثانية An oxygenic photosynthesis

ان العديد من افراد هذه المجموعة يعيش بصورة لا هوائية مجبرة ويستخدم مركبات اخرى غير الماء كمعطي للالكترونات و لا يحرر الاوكسجين. فمثلا بكتريا الكبريت الخضراء Green sulfur bacteria (e.g. *Chlorobium*) تستخدم غاز كبريتيد الهيدروجين كمعطي للالكترونات وكالاتي:

$$2H2S + CO2 \rightarrow (CH2O) + H2O + 2S$$

وهذه البكتريا تولد معدن الكبريت بدل غاز الاوكسجين نتيجة للتفاعل. بعض انواع البكتريا مثل بكتريا الكبريت البنفسجية Purple sulfur bacteria (e.g. *Chromatium*) تستخدم المركبات العضوية كمعطي للالكترونات مثل اللاكتيت وكالاتي:

$$2lactate + CO2 \rightarrow (CH2O) + 2H2O + 2pyruvate$$

في الطحالب حقيقية النواة وعندما تكون شدة الضوء قليلة وغير كافية يكون غاز الهيدروجين هو المادة المختزلة وكالاتي:

$$H2 + CO2 \rightarrow (CH2O) + H2O$$

تمتلك هذه الطحالب انزيم الهيدروجينيز الذي ينشط غاز الهيدروجين ليدخل التفاعل.

ان النتيجة الموحدة لطرق الحصول على الطاقة وتوفرها في ال ATP يؤدي ايضا الى توحيد اهم حصيلة في عمليات البناء وهي تكوين البروتين والاحماض النووية وقد توجد بعض التراكيب الاخرى التي تختلف بين مجموعة واخرى من من الاحياء ولكن المادة الاهم والاساسية هي واحدة وطرق تخليقها لا تختلف كثيرا عن مجاميع الاحياء المجهرية ان الاختلاف في طرق

تخليق التراكيب الاخرى ينتج عن اختلاف التركيب الكيمياوي لهذه التراكيب ويعتبر ذلك التركيب الكيمياوي خاص بالنسبة للمجموعة الواحدة ويمكن تفريق مجاميع الاحياء المجهرية بالنسبة لهذه الاختلافات.

العمليات الحيوية البنائية في الخلية تلبي احتياجات الخلية فيما يتناسب والقدرة على بناء وتكوين تلك المواد مثلا:

اولا بناء الحوامض الامينية تجري في مسارات ايضية اساسية مثلا

1- مجموعة الكلوتاميت تتكون من اختزال الجذر الاميني للمركب α-ketoglitamate .
2- مجموعة الاسبريت تتكون من نقل الجذر الاميني من oxaloacetate لتكوين الاسبرجين Aspergine .
3- مجموعة البايروفيت خلال تحلل السكر السداسي وعند نقل جذر اميني اليها يتكون الالنين وليوسين وايزوليوسين فالينisoleucine valine .
4- مجموعة السيرين serine تتكون من 3-phosphoglycerate الى بعض مشتقاتها مثل السيرين وكلايسين والسستين.
5- مجموعة الهستدين تتكون من phosphoribosyl pyro phosphate (PRPP) .
6- مجموعة الاروماتك تتكون من الshickmic acid كمركبات مشتقة منه مثل التايروسين والتربتوفان وفنيل النين.

ثانيا تتضمن هذه العملية في الخلايا الحيوانية خاصة:

1- Purine nucleotide وتكون على سلسلة من سكر الرايبوز الفوسفاتي المتكونة من PRPP مع وجود الكلايسين والكاربون والنتروجين.

Pyrimidine nucleotide تتكون من سلسلة مركبات وسطية تبدأ من الكاربوميل فوسفيت carbomal phosphate وبوجود السكر الرايبوزالفوسفاتي

Lecture 11

Enzymes

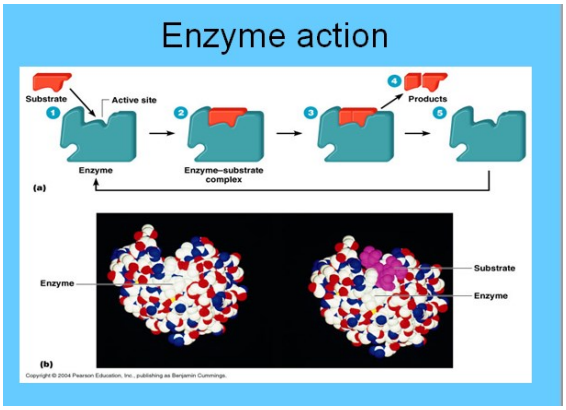
الانزيمات

عبارة عن محفزات بايولوجية والتي تزيد معدل سرعة التفاعلات الكيميائية من خلال خفض طاقة التنشيط.

الانزيمات لاتغير من مسار التفاعل بقدر ما تنشط من التفاعل ويعد الانزيم الموقع الفيزيائي للارتباط بمادة خاصة تسمى المادة الاساسsubstrate .

المادة الاساس :هي تلك المادة التي يعمل عليها الانزيم حيث يتداخل الانزيم مع مادته الاساس ليكون معقد يدعى معقد الانزيم – المادة الاساس (enzyme-substrate complex) وهذا الاخير يؤدي الى تكوين نواتج التفاعل.

•



مكونات الانزيمات Enzymes consist

تتالف اغلب الانزيمات من جزئيين

- Apoenzyme

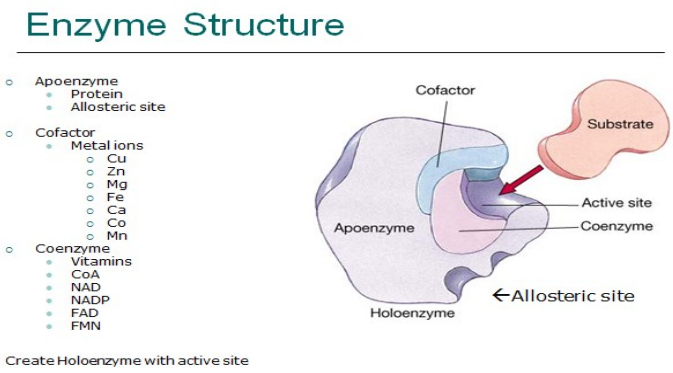
وهو الجزء البروتيني من الانزيم

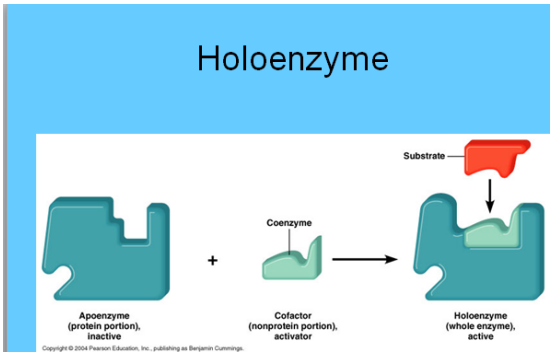
- Cofactors

وهو الجزء غير البروتيني من الانزيم وغالبا ما يكون معدني metallic او عضويcoenzyme وظيفته المساعدة على جعل الجزء البروتيني فعال ومن بين metallic cofactors الحديد والمغنسيوم والنحاسcopper , اما الجزء العضوي فيتكون من الجزيئات العضوية (nicotinamide adenine dinucleotide) NAD+ ,

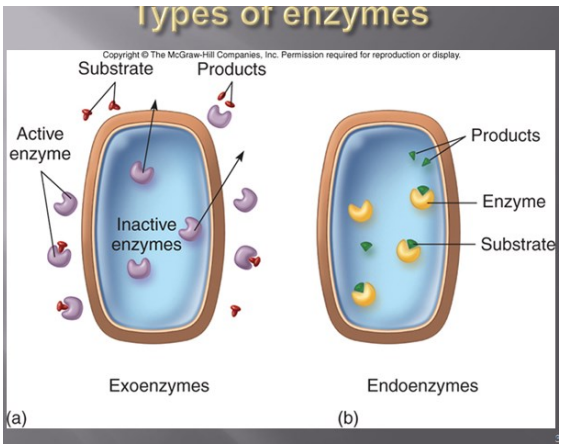
FAD (flavin adenine dinucleotide) وكذلك يتكون الفيتامينات والجزيئين يكونان مصدران للالكترونات

وعند تلاقي الجزء البروتينيApoenzyme والجزء الغير بروتينيcofactor يسمىHoloenzyme .





الانزيمات اما تكون خارجية exoenzymes او داخلية endoenzymes الخارجية تنتج داخل الخلية ولكن عملها يكون خارج الخليةextracellular function والتي تقوم بتحليل جيئات الغذاء الكبيرة او جزيئات المواد الكيمياوية الضارة ومثالها انزيمات cellulose, amylase, penicillinase في حين تبقى الانزيمات داخل الخلية ومعظم الانزيمات تكون داخلية synthetases, phosphorylases



تقسم الانزيمات البكترية الى:

1- Hydrolyses

تقوم هذه الانزيمات بتحفيز كسر الاصرة بين ذرات الكاربون وانتروجين او بين الكبريت والاوكسجين لترتبط جزيئة ماء ومن امثلتها

esterases, glucosidases, proteases, amilases, nucleases

2-Transferases

تكمن وظيفته بتحفيز انتقال جذور حرة معينة او مجاميع كيميائية من جزيئة الى اخرى مثال عيها

Transglucosidases, transacylases و transaminases).

3. Oxidative- reductive enzymes

والتي تحفز عمليات الاكسدة والاختزال

oxidases, dehydrogenases, peroxidases, catalases).

4. **Isomerases**

وظيفتها اعادة ترتيب الذرات داخل الجزيئة الواحدة.

Isocitrate epimerase, erythrose-4-phosphate isomerase

5. Lyases

وظيفته ازالة مجموعة كيميائية من الجزيئات بدون اضافة ماء

Pyruvate decarboxylase, isocitrate lyase

6. Lygases

يساعد على ربط جزئيتين معا وغالبا ما يحتاج الى الطاقة من ATP

Tryptophan—tRNA ligase, lysine—tRNA ligase

Constitutive enzymes

وهي الانزيمات التي تنتج بصورة دائمية وبكميات متساوية بغض النظر عن وجود المادة الاساس ومثالها الانزيمات المتواجدة في عملية ايض الكلكوزglucose metabolism

Regulated enzymes

ليست متواجدة بصورة دائمة وانتاجها اما ان يحث او يكبح استجابة للتغيرات في تركيز المادة الاساس.
ومثالها الانزيمات المتواجدة في دورة كربس.