بسمه تعالی

میکروب شناسی – جلسه چهارم　　مدرس : دکتر موسوی جاهد

گروه جزوه : مریم راشدی ، پگاه رسولی ، گلرخ فرنام ، مرضیه تحسینی

فیزیولوژی رشد

در هر تقسیم حیاتی رشد را میتوان افزایش منظم و متناسب همه اجزای شیمیایی تعریف کرد . در ارگانیسم های تک سلولی مانند باکتریها رشد منجر به افزایش تعداد اعضایی میشود که یک کشت یا جمعیت میکروبی را می سازند .

مراحل رشد باکتری

چهار مرحله متفاوت در رشد باکتری دیده میشود که در هر کدام سرعت رشد میکروب متفاوت است :

1- مرحله وقفه (سکون) = فاز تاخیری (Lag Phase) ← سرعت رشد صفر است

2- مرحله رشد لگاریتمی = فاز تصاعدی (Eaponential Phase) ← تعداد باکتری ها در فواصل زمانی منظم دوبرابر میشود پس سرعت رشد ماکزیمم است .

3- مرحله رشد ثابت = فاز رکود (Stationary Phase) ← تعداد باکتری ها ثابت و سرعت رشد صفر است .

4- مرحله مرگ (Death Phase) ← میزان رشد منفی است و تعداد باکتری های مرده از زنده بیشتر است .

1- مرحله وقفه (سکون) : این مرحله همیشه در جمعیت باکتریایی دیده نمی شود و تنها زمانی مشاهده میشود که از تلقیحی که از یک محیط کهنه گرفته شده استفاده کنیم . مرحله وقفه اصولا به علت استفاده از تلقیحی که از یک محیط کشت کهنه گرفته شده که در آن جمعیت باکتریایی در مرحله رشد ثابت و یا در مرحله مرگ هستند و یا بوسیله انتقال سلول ها به محیطی با ساختمان شیمیایی متفاوت بوجود می آید . اگر سلول ها از محیط کشتی که در مرحله رشد لگاریتمی باشد برداشته شده باشند و به محیط کشت تازه با همان ترکیب شیمیایی منتقل شوند ، رشد لگاریتمی به همان نسبت اولیه ثابت می ماند . وضعیت سکون به این علت است که بعد از متوقف شدن رشد ، ساختمان شیمیایی سلول ها تغییر میکند . مخصوصا از میزان ریبوزوم ها در جمعیت سلولی کاسته میشود . بنابراین برای اینکه Proسازی دوباره آغاز شود ، بایستی بر میزان ریبوزوم ها افزوده گردد . علاوه بر این ، اندازه سلول ها در مرحله ی سکون از اندازه آنها در مرحله رشد لگاریتمی کوچکتر است .

2- مرحله رشد لگاریتمی (تصاعدی) : در این مرحله ، سلولها تقریبا زنده و دارای اندازه ثابت اند . در نتیجه وزن سلولها و تعداد آنها به صورت موازی اضافه می شود در این حال افزایش تعداد باکتری ها بصورت نمایی است و تعداد باکتری ها در فواصل زمانی منظم دوبرابر میشود . نظر به اینکه با ترسیم در مقیاس لگاریتمی منحنی بصورت خط راست در می آید آنرا مرحله لگاریتمی رشد مینامند . باکتریها در این مرحله از رشد نسبت به مواد ضد عفونی کننده و آنتی بیوتیک ها حساس ترند و توسط آنها آسیب میبینند .

3- مرحله رشد ثابت : در این مرحله میزان رشد باکتری به تدریج در اثر اضافه شدن محصولات متابولیکی سمی و کم شدن مواد غذایی رو به نقصان می گذارد . مدت این مرحله تحت تاثیر فاکتورهای موثر بر رشد می باشد . فاکتور هایی که بر سرعت رشد تاثیر می گذارند ، عبارتند از : طبیعت و غلظت محیط کشت – درجه حرارت و pH محیط کشت

4- مرحله مرگ : مرحله رشد ثابت منجر به مرحله مرگ می گردد و در طی آن از جمعیت میکروبی کاسته می شود . سرعت و شکل این کاهش به حساسیت باکتری نسبت به مواد زائد حاصل از متابولیسم بستگی دارد . در جمعیت باکتری ها ، مرگ و میر یک فرد اغلب همراه با تجزیه آن فرد نیست . بنابراین در شرایطی که اکثر سلولها در این مرحله از بین رفته اند ، وزن کل سلولها ممکن است برای مدتی ثابت بماند و یا مقدار خیلی کمی از آن کاسته شود .

نکته : باکتریهای اتولیتیک با تولید آنزیمهایی موجب تجزیه سلولهای خود میگردند . در این حالت وزن و شمارش سلولهای زنده ، هر دو تواما کاهش پیدا میکنند .

نکته : شاخه مرگ در نمودار رشد باکتریها هیچ گاه به صفر نمی رسد . چون در جمعیت میکروبی ، همواره تعداد کمی باکتری موتان (جهش یافته) وجود دارد .

زمان تولید (Generation Time = GT) : زمان متوسط مورد نیاز برای دوبرابر شدن تعداد باکتری ها

GT از یک نوع باکتری به باکتری دیگر متفاوت است . مثلا در E.Coli حدود 20 دقیقه (سریع رشد) و در باسیل سل حدود 20 ساعت (کند رشد) میباشد .

- تلقیح : یک موجود زنده را وارد یک محیط میکنیم و زیاد میشود .
- تزریق : ماده شیمیایی را وارد بدن میکنیم که زیاد نمی شود .

تولید مثل باکتری ها

باکتری ها معمولا به روش تقسیم دو تایی (Binary Fission) تکثیر پیدا می کنند . نتیجه این تقسیم دو سلول مساوی از یک سلول اولیه می باشد . هنگام تقسیم ، در ناحیه وسط سلول ، فرورفتگی ایجاد میشود که به تدریج عمیق تر میشود و توام با آن ، دیواره و غشا در بین دو سلول سنتز می شود و دیواره عرضی به نام سپتوم ایجاد می گردد . ضمن تشکیل شدن سپتوم ، کروموزوم باکتری هم همانند سازی کرده و دو سلول جدید (سلولهای دختر) که کامل و مشابه سلول اولیه هستند ، از سلول اولیه (سلول مادر) ایجاد می شوند . سپتوم از جهت خارج به داخل شکاف بر میدارد و دو سلول باکتری را از هم جدا میکند .

نیازهای باکتری برای رشد

موادی مثل aa ، بازهای ازته و ویتامین ها موادی اند که باکتریها به آنها نیاز دارند ، ولی خود قادر به سنتز آنها نیست . به این مواد فاکتور رشد (Groth Factor) گفته می شود .

اکثر باکتریهای مهم از نظر پزشکی برای رشد به C ، N ، P ، نمکهای معدنی ، آب و ... احتیاج دارند . باکتری ها از نظر نیاز به مواد گازی (مانند O_2 و CO_2) و دما و pH متفاوتند و می توانند از انواع منابع C و N و انرژی استفاده کنند .

شناخت نیازمندیهای رشد در انتخاب محیط کشت های مختلف در میکروب شناسی تشخیصی و درک آزمایشات تعیین هویت باکتریها مهم است .

نیاز به N و C : باکتری ها بر حسب نوع ترکیباتی که بعنوان منبع C استفاده می کنند به دو گروه اصلی طبقه بندی می شوند :

1- اتوتروف (Autotroph) : اتوتروف ها از CO_2 به عنوان تنها منبع C استفاده می کنند و خود ترکیبات آلی مورد نیاز خویش را سنتز می کنند . این باکتری ها می توانند N را از NH_3 ، نیترات ها و نیتریت ها بدست آورند . باکتری های اتوتروف از نظر پزشکی دارای اهمیت نیستند ، اما می توانند در کشاورزی حائز اهمیت باشند . مانند نیتروباکتر

2- هتروتروف (Hetrotroph) : این باکتری ها به ترکیبات آماده آلی بعنوان منبع C نیازمندند . مثلا گلوکز ، منبع C آلی بسیاری از میکروارگانیسم ها بوده و برای فعالیت های تخمیری و تنفسی بسیاری از آنها مورد استفاده قرار می گیرد . اغلب باکتری های مهم پزشکی ، هتروتروف اند .

نیاز به S : گوگرد ترکیبی است که در پروتئین های باکتری ها ، در آنزیم های آنها، در ساختار aa و در کوآنزیم های باکتری ها مورد نیاز است . به هر حال برخی باکتری ها می توانند سولفور را به سولفات اکسید کنند . یعنی می توانند از اشکال ساده آن استفاده کنند .

نیاز به P : فسفر در ساختار اسیدنوکلئیک ، ATP ، چربی ها و کوآنزیم ها مورد نیاز است . اکثر باکتری ها P را بصورت فسفات استفاده می کنند .

عناصر معدنی : یون های کلسیم ، منیزیم ، آهن ، سدیم ، کلر و پتاسیم برای عمل آنزیم ها لازم اند . به میزان کمتر یون های منگنز ، مس و روی و کبالت مورد استفاده قرار می گیرند .

شرایط محیطی برای رشد باکتری ها

CO_2 : باکتری ها برای رشد خود به CO_2 نیاز دارند . مقادیر مناسب CO_2 یا در هوا وجود دارد و یا خود ارگانیسم ها CO_2 لازم را در خلال متابولیسم خود تولید می کنند . تعداد معدودی از باکتری ها به CO_2 اضافی نیاز دارند که به آنها کاپنوفیل (Capnophill) گفته می شود . مانند مننگوکوک (یکی از عوامل مننژیت باکتریایی)

O_2 : باکتری ها بر حسب نیاز به O_2 به چهار دسته طبقه بندی می شوند :

1- هوازی اجباری : فقط در حضور O_2 رشد می کنند . مانند سودوموناس ایروژینوزا

2- میکروایروفیل : در مجاورت غلظت کم O_2 رشد می کنند . مانند کمپیلوباکترژژونی (C.Jejoni)

3- بی هوازی اجباری : فقط در غیاب O_2 رشد می کنند . مانند کلستریدیوم تتانی (C.tetani) ← عامل کزاز

3- بی هوازی اختیاری : در حضور یا غیاب O_2 می توانند رشد کنند . اکثر باکتری ها از این دسته اند . مانند E.Coli

دما

1- سرما دوست (سایکروفیل) ← دمای پایین ($^{\circ}C$ 20-15)

2- ملایم دوست (مزوفیل) ← دمای متوسط ($^{\circ}C$ 37-20)

3- گرما دوست (ترموفیل) ← دمای بالا ($^{\circ}C$ 60-50)

استثناها :1- لیستریا مونوسیتوژنز (L.Monocitogenes) : عامل لیستریوز ← در $^{\circ}C$ 4+ رشد می کند .

2- کمپیلو باکتروژژونی (C.Jejoni) ← در $^{\circ}C$ 2+ می تواند رشد کند .

نکته : پاتوژن ها (باکتری های بیماری زا) به دمای بدن عادت دارند .

pH

pH بهینه (Optimum pH) برای میکروارگانیسم ها بین 8-6 ← نوتروفیل

استثناها : 1- لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (L.Acidophilus) pH=4 ← اسیدوفیل : این باکتری در واژن زن بالغ وجود دارد و قند موجود در واژن را به اسید تبدیل می کند 2- ویبریوکلره (V.Cholerae) ← عامل وبا : pH=8.5 ← آلکالوفیل

غلظت املاح و فشار اسمزی

1- هالوفیل : ارگانیسم هایی که به غلظت های نمکی بالا نیاز دارند . مانند میکروارگانیسم های دریایی

2- اسموفیل : میکروارگانیسم هایی که به فشارهای اسمزی بالا نیاز دارند ← میکروارگانیسم هایی که با رشد در محلول های قندی سازش پیدا کرده اند . ولی اکثر میکروارگانیسم ها ترجیح میدهند که فشار اسمزی محیط و خودشان یکسان باشد .

* اکثر باکتری های پاتوژن ، هتروتروف – مزوفیل – نوتروفیل – بی هوازی اختیاری هستند .

اکسیژن برای بی هوازی ها سمّی است ، زیرا :

1- O_2 میتواند تبدیل به H_2O_2 (پراکسید هیدروژن) شود که این ماده سمی است و بر روی DNA اثر میکند و آنرا میشکند در نتیجه بعنوان ماده ضد میکروبی و ضدعفونی استفاده می شود .

2- O_2 اگر در مجاورت یون آهن قرار گیرد (در آنزیم ها) ، تبدیل به یون سوپراکسید می شود که یک یون سمّی است و باعث تخریب و تجزیه DNA می شود .

اگر باکتری آنزیم کاتالاز داشته باشد ، می تواند H_2O_2 را تجزیه کرده و H_2O ایجاد کند .

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{کاتالاز}} H_2O$$

اگر باکتری آنزیم سوپراکسید دیسموتاز داشته باشد ، می تواند سوپراکسید را نیز به H_2O_2 تجزیه کند .

$$O_2 \xrightarrow{\text{آنزیم سوپراکسید دیسموتاز}} H_2O$$

به این شکل ، ترکیبات سمّی تبدیل به ترکیبی بی خطر می شوند .

محیط های کشت باکتریایی

محیط کشت باکتریایی ممکن است مایع باشد (Broth) . اگر به این محیط کشت آگار اضافه شود ، محیط کشت جامد می شود .

آگار (Agar) : ترکیبی پلی ساکاریدی است که از جلبک قرمز دریایی بوجود می آید . برای تهیه محیط کشت جامد ، از این ماده به میزان لازم به محیط کشت اضافه می گردد .

محیط کشت نیمه جامد (Semisolid) : میزان آگار کمتر از محیط کشت جامد می باشد .

طبقه بندی محیط های آزمایشگاهی

1- محیط کشت ساده (Basic Medium) : حاوی پپتون (پلی پپتید و آمینو اسید) – عصاره گوشت (نمکهای معدنی و ویتامینها) مانند نوترینت آگار (Nutrient Agar)

2- محیط کشت غنی شده (Enriched Medium) : اگر ترکیبی غنی (مقوی) به محیط کشت Basic اضافه کنیم ، به محیط کشت قوی جهت رشد باکتریها تبدیل می شود . مانند Blood Agar (BA) که خون به آن اضافه شده است

3- محیط کشت انتخابی (Selective Medium) : برای تسهیل رشد برخی از باکتری ها ساخته شده و در عین حال مانع رشد سایر باکتریها می شود . مانند محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک ها

4- محیط کشت افتراقی (Differential Medium) : محیطی است که باعث می شود کلنی های انواع خاصی از میکروارگانیسم ها ظاهر متمایزی داشته باشند . مثلا کلنی E.Coli بر روی محیط EMB (آگار حاوی رنگهای ائوزین و متیلن بلو) به رنگ جلای فلزی خاصی در می آید . به منظور تشخیص باکتری های روده ای از این محیط ها استفاده می شود .