به نام خدا

سرای دانشجو

دانلود برترین جزوات و فیلم های دانشجویی

بامادرارتباط باشید

Website:	www.sarayedaneshjo.com
Email:	info.sarayedaneshjo@gmail.com

دانش اگر در ثریا هم باشد مردانی از سرزمین پارس بدان دست خواهند یافت. رسول اکرم (ص)

جزوه باکتری شناسی

دکتر سلیمانپور

(جلسه اول – کلیات باکتری)

سرای دانشجو
SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

باکتری ها بخش کوچکی از میکروب ها هستند.

میکروب ها: الف) باکتری ها ب) ویروس ها ج) قارچ ها د) انگل ها

تاریخچه:

میکروب شناسی از یک اختراع بسیار ساده توسط انتوان لیون هوک شروع شد که یک میکروسکوپ خیلی ساده متشکل از چند عدسی ایجاد کرد و توانست موجوداتی را با این میکروسکوپ ببیند که بعد ها اسم آن ها را animalcules گذاشت. بعدها دانشمندان دیگری مانند رابرت هوک کار او را تکمیل کردند و چندین عدسی را به هم متصل کرده و میکروسکوپ های ترکیبی ایجاد کردند و توانستند باکتری ها را با بزرگنمایی بیشتر ببینند.

میکروسکوپ های آن زمان تا دویست برابر بزرگ می کردند اما میکروسکوپ های معمولی امروزه تا ۱۰۰۰ برابر بزرگنمایی دارند.

نظریه سلولی: مایتاس شیلدن (گیاه شناس) و تئودور شوان (جانور شناس) بیان کردند ک پیکر همه موجودات زنده از واحد های حیاتی به نام سلول تشکیل شده است. ویرشو پدیده بیوژنز را به این نظریه اضافه کرد ک طبق آن تمام سلول های زنده از سلول های قبلی منشا می گیرد.

علم میکروب شناسی در سال ۱۶۷۰ شکل گرفت و بعد از آن افرادی با بیان نظریه هایی به این علم کمک کردند.

شروع علم میکروب شناسی در روند تکامل علم تاثیر مهمی داشت زیرا دنیای میکروسکوپی بر ایجاد بیماری تاثیر گذار است و شناخت آن برای بقای نسل اهمیت دارد.

اولین فردی که نظریه ای ارائه داد فردی بود به نام John Needham که نظریه ابیوژنزیز را مطرح کرد (**تولید خودبخودی**).

گوشت ⟵ گوشت الوده ⟵ اجسامی از این گوشت بوجود می اید که موجب الودگی اند.

فرانسس کوردی نظریه ابیوژنزیز را رد کرد. با گذاشتن یک پارچه تمیز روی گوشت مشاهده کرد دیگر گوشت آلوده نشدند و موجوداتی از آن بوجود نیامد. **اسپالانزی** در رد نظریه ابیوژنزیز، ابگوشتی را یک ساعت جوشاند سپس درب آن را به خوبی بست و مشاهده کرد هیچگونه میکروبی بوجود نمی آید. این دو نظر برای همه دانشمندان قابل قبول نبود. چرا که معتقد بودند برای تولید خودبخودی، میکروب به هوا نیاز دارد.

پاستور با یک نظریه علمی این نظریه ابیوژنزیز را رد کرد: او در یک ظرف با دهانه باریک آبگوشت ریخت و بدون اینکه دستی به آن بزند آن را کنار گذاشت و در کنار این ظرف، ظرف دیگری را درست کرد که دو انحنا داشت (لوله گردن قویی) و داخل ان نیز آبگوشت ریخت و مشاهده کرد که ظرف اول آلوده شد و ظرف دوم آلوده نشده و علت آن هم این بود که باکتری ها در دو انحنای ظرف گیر میکردند و به ابگوشت نمی رسیدند و نظریه ابیوژنزیز را رد کرد.

لویی پاستور با نظریه ی علمی خود اثبات کرد که عامل فساد ماده ی غذایی یک عامل خارجی است که از فضای بیرون وارد شده است و یک عامل درونی نیست.

مهمترین شخص در رد نظریه ی ابیوژنزیز لویی پاستور بود.

از جمله دیگر کارهای پاستور: الف) واکسن هاری ب) واکسن سیاه زخم ج) تخمیر الکل د) واکسن وبا مرغی

دوران طلایی میکروب شناسی مربوط به پاستور و روبرت کخ بود.

شروع دوران طلایی میکروب شناسی با رد نظریه ی خود به خودی انجام گرفت.

فلیپ سملوایز: برای جلوگیری از فوت زنان به علت تب زایمان, دست ها و وسایل را قبل جراحی ضدعفونی کرد.

ادوارد جنر: شناسایی واریولاسیون (واکسیناسیون) - واکسینه کردن در برابر آبله گاوی

جوزف لیستر: استفاده از اسپری فنل در اتاق های جراحی و شست و شوی دستهای جراح با فنل باعث کاهش عفونت بعد جراحی میشود - ارائه کننده اولین فن اوری کشت خالص

سرای دانشجو SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

رابرت کخ: فن اوری جداسازی کشت های خالص را تکمیل کرد و با ابداع شیوه های رنگ امیزی باکتری ها سبب تسهیل مشاهدات میکروسکوپی شد. - باسیل سیاه زخم را جداسازی کرده و عوامل بیماری سل و وبا را شناسایی نمود.

نظریه کخ (Koch postulate): اگر ما یک عفونتی را در بدن یک جاندار مثل انسان داشته باشیم که عامل عفونت باکتری ها باشند ما میتوانیم از آن عفونت برداشت کرده و بر روی محیط کشت مصنوعی،کشت بدهیم و باکتری ها در محیط کشت رشد میکنند و اگر از این باکتری هایی که رشد کردند دوباره در بدن یک جانور آزمایشگاهی ببریم آن حیوان طبعا دچار عفونت شده و از بین می رود و اگر از بدن حیوان ازمایشگاهی عفونت را برداشته و کشت بدهیم آن عامل اولیه باکتریایی را می توان جداسازی کرد.

کخ از جلبک های دریایی ماده ای به نام **اگار** را ساخت و به آن موادی را اضافه کرد و محیط کشت مناسبی را فراهم کرد و باکتری ها را روی آن کشت داد.

نقایص فرضیه کخ:

یک سری از باکتری ها قابلیت کشت در حیوان ازمایشگاهی را ندارند و فقط در انسان ایجاد بیماری می کنند (نایسریا گنوره عامل سوزاک قابلیت کشت در بدن موش را ندارد.)

بعضی باکتری ها اصلا قابلیت کشت ندارند (مایکوباکتریوم لپره ⟵ عامل جزام، ترپونما پالیدیوم ⟵ عامل سفیلیس) (باکتری های درون سلولی اجباری مثل کلامیدیا و ریکتزیا برای رشد حتما باید داخل سلول باشند مثل ویروس ها)

فلور نرمال در بدن ما ناقض قضیه کخ است زیرا در بدن وجود دارد اما عامل بیماری نیست (فلور نرمال در روده ویتامین B۱۲ می سازد و از تکثیر سایر باکتری ها بخاطر رقابت تغذیه ای جلوگیری می کند و در دهان هم حضور دارد.)

بعضی از باکتری ها به واسطه خودشان ایجاد بیماری نمی کنند بلکه بواسطه توکسین خود ایجاد بیماری میکنند.در این موارد از نمونه خون فرد نمیتوان باکتری کشت داد.

اندازه میکروب ها از کوچک به بزرگ: ویروس ⟵ باکتری ⟵ قارچ ⟵ انگل

بسیاری از ویروس هایی ک سبب بیماری در انسان میشوند ۱۰-۳۰۰ نانومتر اندازه دارند.

مقیاس اندازه گیری ویروس ها نانومتر است.

پاکس ویروس ها از سایر ویروس ها بزرگ ترند.

میکروسکوپ ها:

میکروسکوپ نوری:

الف)بخش مکانیکی: پایه میکروسکوپ، دسته، پیچ های تنظیم، صفحه، صفحه گردان، لوله میکروسکوپ

ب)بخش نوری: منبع نور،کندانسور، عدسی های چشمی و شیئی

عدسی های میکروسکوپ نوری:

الف) **چشمی**= ۱۰-۱۵ برابر بزرگ می کند

ب) **شیئی**= ۴، ۱۰ (low power)، ۴۰ (high power) ,۱۰۰(ایمرسیون) یا عدسی روغنی

توان تفکیک: کوچکترین فاصله قابل تشخیص بین دو نقطه واقع بر یک سطح

بزرگنمایی: حاصل ضرب بزرگنمایی عدسی شیئی در بزرگنمایی عدسی چشمی

علت استفاده از روغن: در واقع برای بزرگنمایی های بیشتر احتیاج به نور بیشتری داریم و این روغن ضریب شکستی نزدیک به شیشه دارد. ما حد فاصل عدسی شیئی و نمونه را پر از روغن میکنیم و در نتیجه نور بیشتری به عدسی شیئی وارد می شود. به همین خاطر به عدسی ۱۰۰ عدسی ایمرسیون یا روغنی می گویند.

سرای دانشجو
SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

انواع میکروسکوپ های نوری:

۱-میکروسکوپ نوری زمینه روشن یا Bright field

۲-میکروسکوپ نوری زمینه تاریک یا Dark field

۳-میکروسکوپ نوری Phase contrast

۴-میکروسکوپ نوری Fluorescent

منبع نور سه مورد اول نور مرئی می باشد و منبع نور میکروسکوپ فلورسنت اشعه ی UV می باشد.

انواع مختلف میکروسکوپ های نوری تفاوتی در بزرگ نمایی ندارند بلکه از نظر نحوه ی عملکرد متفاوت اند.

Bright field microscope (میکروسکوپ زمینه روشن):

برای مشاهده یکسری ارگانیسم های سطح باکتری ها ، قارچ ها و انگل ها (چه زنده و چه مرده) مورد استفاده قرار میگیرد. نمیتوان برای دیدن اجسامی که ضخامت انها کمتر از ۰/۲μm است استفاده کرد مثل اسپیروکت ها و **ویروس ها**

Dark field microscope (میکروسکوپ زمینه تاریک):

از این میکروسکوپ برای دیدن ارگانیسم های زنده و رنگ نشده استفاده میشود که بیشتر در مورد اسپیروکت ها کاربرد دارد. در این میکروسکوپ بجای کندانسور معمولی از یک کندانسور زمینه تاریک استفاده میشود که این کندانسور به جای اینکه نور را مستقیما به شی بتاباند, نور از اطراف صفحه ای تیره به جسم تاباند می شود (پس نور مستقیما ب جسم تابیده نمی شود) که ما در واقع در این میکروسکوپ بازتاب نور از نمونه را در زمینه تاریک میبینیم. از این میکروسکوپ برای دیدن باکتری های نازک یا باکتری هایی که دارای ساختمان اسپیرال هستند استفاده میشود مثل اسپیروکت ها

در میکروسکوپ های معمولی برای اینکه جسم را ببینیم باید یک کنتراست ایجاد کنیم و رنگ آمیزی انجام دهیم که باکتری ها در اثر رنگ آمیزی می میرند.

گاها ما نیاز داریم اختلاف باکتری مرده از زنده را تشخیص دهیم و همچنین برای دیدن حرکت باکتری باید آن را بطور زنده مشاهده کنیم و رنگ امیزی نکنیم و در این صورت به سراغ میکروسکوپ های دیگری مثل زمینه تاریک می رویم.

در روش hanging drop یا روش قطره معلق می توانیم حرکت بعضی از باکتری ها را ببینیم.

در میکروسکوپ زمینه روشن نور مستقیما به نمونه تابیده می شود و پس از عبور از نمونه به عدسی شیئی و سپس به عدسی چشمی می رسد.

در میکروسکوپ زمینه تاریک نور مستقیما به نمونه نمی تابد و پس از انحراف در اثر برخورد با نمونه به عدسی شیئی و سپس عدسی چشمی می رسد.

در میکروسکوپ زمینه روشن جسم مورد نظر را به صورت تیره در زمینه ای روشن می بینیم ولی در زمینه تاریک جسم مورد نظر را به صورت روشن در زمینه ای تاریک می بینیم.

اگر جسمی در زیر میکروسکوپ زمینه روشن نباشد و به آن نگاه کنیم زمینه ای روشن می بینیم ولی در زمینه تاریک یک زمینه ی تاریک می بینیم.

Phase contrast (میکروسکوپ فازکنتراست):

برای دیدن باکتری های زنده بکار میرود و قدرت تفکیک و بزرگنمایی شبیه میکروسکوپ نوری است و سیستم عملکردی ان متفاوت است و میکروسکوپ پیچیده ای است و بصورت روتین استفاده نمیشود و سیستم پراکنش نور آن متفاوت است. نور را وارد جسم میکند و جسم که در نواحی مختلف قطر متفاوتی دارد نور بصورت in-phase و out-phase از جسم خارج میشود و این اختلاف فاز توسط یه سیستم کامپیوتری به تصویر تبدیل میشود. در این میکروسکوپ از اختلاف شکست نور از روی سلول با اختلاف شکست نور از محیط اطراف سلول یک کنتراست ایجاد میشود و جزئیات بیشتری مطالعه می شود.

سرای دانشجو
SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

در میکروسکوپ فازکنتراست اسپور ها و اجسام هسته ای قابل مشاهده است.

Fluorescent (میکروسکوپ فلوروسنت)

در این میکروسکوپ منبع نوری متفاوت است و منبع اشعه فرابنفش است. اساس کارایی این میکروسکوپ تکنیک ایمونوفلوئورسانس و واکنش بین انتی ژن و انتی بادی است. تابش نور فرابنفش به برخی رنگ ها که قابلیت فلوئورسانس دارند باعث ساطع شدن طول موج مرئی از آن رنگ می شود و نوع باکتری مورد مطالعه بستگی دارد به رنگ نور فلوئورسنت که زرد یا سبز یا نارنجی درخشان دیده شود. از این میکروسکوپ بیشتر برای دیدن باکتری های رنگ شده و مرده استفاده میشود و روش کار به این صورت است که ابتدا قسمت Fc انتی بادی (ته انتی بادی) را با ماده فلوئورسنت مثل فلوئورسان ایزوتیوسیانات همراه کرده و سپس انتی بادی را بر روی باکتری قرار می دهند و انتی بادی از قسمتFab (سر انتی بادی) به انتی ژن های سطحی میچسبد سپس لام را زیر میکروسکوپ قرار می دهیم و با تابش نور UV به ان ماده فلوئورسنت از خود نور مرئی ساطع می کند.

اساس کار میکروسکوپ فلورسنت استفاده از رنگ هایی است که در حضور نور UV بازتابش مرئی دارند. به طوری که رنگ های مورد نظر به آنتی بادی می چسبند و آنتی بادی به باکتری مورد نظر می چسبد و زیر میکروسکوپ فلورسنت با بازتابش نور مرئی دیده می شود و در نتیجه به وجود باکتری پی می بریم.

میکروسکوپ الکترونی

قدرت تفکیک و بزرگنمایی نسبت به میکروسکوپ نوری بسیار بالاتر است.

دارای دو نوع :

۱- عمق جسم را میبینیم(TEM)

Transmission Electron Microscope:TEM(قدرت تفکیک= 0.2 nm - بزرگنمایی=۲۰۰۰۰۰×)

۲- سطح جسم را میبینیم(SEM)

Scaning Electron Microscope:SEM (قدرت تفکیک= 20nm - بزرگنمایی=۱۰۰۰۰×)

منبع الکترون ما لامپ تنگستن است و به جای نور ، الکترون داریم و الکترونی که از تنگستن جدا می شود و در ستونی از خلا به سمت نمونه می رود و یا مثل TEM از نمونه عبور می کند و یا مثل SEM به نمونه برخورد می کند و از سطح نمونه پراکنش می کند.

بزرگنمایی میکروسکوپ TEM ۲۰۰ برابر حداکثر بزرگنمایی میکروسکوپ نوری است.

الکترون های عبوری از نمونه در میکروسکوپ TEM به علت اختلاف ضخامت قسمت های مختلف نمونه دچار اختلاف فاز می شوند و این اختلاف فازها در صفحه میکروسکوپ نمایش داده می شود.

کار با میکروسکوپ الکترونی دشوار است و مراحل آماده سازی نمونه در این نوع میکروسکوپ پیچیده تر است و نیاز به تهیه ی برش های نازک تری است که برای این منظور از وسیله ی اولترامیکروتوم استفاده می شود.

مراحل اماده سازی برای مشاهده نمونه با TEM: فیکس شدن توسط گلوتار الدهید یا فرمالدئید, آبگیری'برش با اولترامیکروتوم, رنگ امیزی و در نهایت سوار کردن برش ها

میکروسکوپ الکترونی با ولتاژ بالا HVEM: قابلیت مشاهده نمونه های زنده و معرفی ساختمان سلول,اندامک ها و اجزای سلولی را دارد.

اولین بار فردی به نام لینه میکرو ارگانیسم ها را به سه دسته طبقه بندی کرد:

۱- پروکاریوت ها= باکتری ها + ارکی ها

۲- یوکاریوت ها= قارچ ها + جلبک ها + کپک ها + تک یاخته ها

۳- ویروس ها، ویرویید ها و پریون ها

سرای دانشجو SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

اختلاف های پروکاریوت ها و یوکاریوت ها:

۱- اندازه ۲- غشای هسته ۳- تعداد کروموزوم ها ۴- اندامک ها

اصلی ترین تفاوت پروکاریوت ها و یوکاریوت ها, **غشای هسته** است. باکتری ها هسته دارند اما هسته انها غشا ندارد(هسته ی سازمان نیافته) و به آن **نوکلئوئید** گفته میشود. با پیشرفت علم ، اصلی ترین اختلاف این دو گروه **میتوز** معرفی شده است.

دسته ی خاصی از باکتری ها هسته ی غشادار دارند اما اصلی ترین تفاوت یوکاریوت ها و پروکاریوت ها همچنان در وجود غشای هسته است.

نوکلئوئید محل قرارگیری کروموزوم سلول های پروکاریوتی است.

تعداد کروموزوم: باکتری ها تک کروموزومی اند اما یوکاریوت ها بیش از دو کروموزوم دارند. البته بعضی از باکتری ها دو تا سه کروموزوم دارند .مثلا **ویبریوکلرا** (عامل وبا) دو کروموزوم دارد و **بروسلا** (عامل تب مالت) نیز دو کروموزوم دارد.

معمولا کروموزوم یوکاریوت ها خطی و کروموزوم پروکاریوت ها حلقوی است.

اندامک های غشادار: در پروکاریوت ها وجود ندارند مثل پراکسی زوم، لیزوزوم، شبکه اندوپلاسمی، گلژی ، میتوکندری و کلروفیل **ریبوزوم** و **تاژک** در یوکاریوت ها و پروکاریوت ها وجود دارد اما ساختار متفاوتی دارد.

اندازه سلول های پروکاریوتی از ۱-۱۰μm است اما یوکاریوت ها از۱۰-۱۰۰μm است.

اغلب باکتری ها زندگی ازاد دارند و برخی مانند کلامیدیا و ریکتزیاها انگل های اجباری درون سلولی اند.

مورفولوژی کلنی باکتری: کلنی به مجموعه ای از میکرو ارگانیسم ها گفته میشود که از یک سلول ناشی شده اند و انواعی دارد:کلنی های چین دارو چسبنده، مضرس یا کنگره ای (یرسینیا پستیس و کورینه باکتریوم دیفتیریه)، کلنی های لغزنده با لبه های صاف و نرم یا صفحات منتشر کننده (پرتئوس و لگاریس یا اشریشیاکلی).

غالبا خصوصیات آنتی ژنیک باکتری با قوام و ظاهر کلنی ارتباط دارند:

صاف= باکتری های تازه جداشده از میزبان (باکتری های تیم وحشی)

مخاطی= دارای نمای بلغمی, عسلی و درهم و مشخص کننده ارگانیسم های کپسول دار

خشن= فاقد پروتئین سطحی یا اتتی ژن کپسولی و غیر بیماریزا (سویه های موتان)

طبقه بندی باکتری ها (Classification of Bacteria)

۱-Phenotypic ۲-Genotypic

قلمرو(Kingdom) ⟵ شاخه(Division) ⟵ رده (Class) ⟵ راسته (Order) ⟵ خانواده (Family) ⟵

جنس(Genus) ⟵ گونه (Species)

سویه ی باکتری ها در طبقه بندی آن ها قرار نمی گیرد و پایین ترین حد طبقه بندی، گونه است.

قلمرو: پروکاریوت

شاخه: گرم مثبت و گرم منفی

خانواده: وجود یک سری صفات فنوتیپی(ظاهری) مشترک. مثل خانواده انترو باکتریاسه (عامل عفونت های روده ای)

جنس: اگر علاوه بر صفات مشترک فنوتیپی، در توالی DNA (توالی 16SrRNA) مشترک بود مثل اشریشیا (توالی16SrRNAیک توالی دست نخورده ی ریبوزومی است).

گونه: اگر علاوه بر صفات مشترک فنوتیپی و توالی 16SrRNA، در یک سری صفات خاص مشترک بودند مانند coli

نکته: در طبقه بندی باکتری ها معمولا خانواده و جنس و گونه گفته می شود.

سویه یا Strain: هر مرتبه که یک باکتری در یک محیط کشت، کشت داده شود یک سویه ی جدید می باشد.

سرای دانشجو SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

بیوتایپ: مجموعه ای از سویه های باکتری ک دارای صفات مشترک بیوشیمیایی میباشند.

سروتایپ: مجموعه ای از سویه های باکتری ک دارای صفات مشترک سرولوژی میباشند.

فاژتیپینگ: گاهی برای شناسایی برخی سویه ها از تفاوت در حساسیت دربرابر باکتریوفاژ استفاده می شود.

در یوکاریوت ها هستند ولی در پروکاریوت ها نیستند. مانند:

Microtubules, Intermediate Filament, Microfilaments

طبقه بندی فنوتیپیک

بر اساس معیارهای ظاهری باکتری ها تشخیص را انجام میدهیم.

۱- کروی شکل (Coccus)
۲-میله ای شکل (Bacillus)
۳-میله ای و خمیده (Vibrio)
۴-تخم مرغی شکل که بین موارد ۱ و۲ است (Coccobacillus)
۵-دوکی شکل (Fusiform)
۶-فنری یا مارپیچی (Spiral)

Numerical taxonomy (طبقه بندی عددی)

این طبقه بندی بیشتر بر مبنای بیوشیمیایی می باشد. باکتری ها توسط یک سری از صفات از یکدیگر متمایز شده و در کیتی میگذارند که وقتی یک نمونه مجهول باکتری را به تمام خانه ها اضافه می کنیم به دلیل معرف هایی که وجود دارد، آن باکتری تغییراتی می کند که اگر ان تغییرات ایجاد شوند ۱ و اگر ایجاد نشود عدد صفر را قرار میدهیم. اینگونه کدی درست میشود که وقتی آن کد را به کامپیوتر میدهند، کامپیوتر جنس و گونه را مشخص میکند (روشی بسیار پرکاربرد ولی گران قیمت است) در این طبقه بندی، باکتری هایی که بیش از ۸۰٪ شباهت دارند در یک گروه قرار می گیرند.

Analytical classification (طبقه بندی آنالیتیک)

این طبقه بندی بر اساس صفات ماکرومولکولی است. این طبقه بندی بر اساس اسید های چرب, لیپیدها ،کربوهیدرات ها و پروتئین ها می باشد. از جمله روش های مورد استفاده برای ارزیابی پروتئین ها:

MALDI TOF, SDS PAGE

طبقه بندی ژنوتیپی:

مهم ترین و قابل اطمینان ترین روش طبقه بندی باکتری ها می باشد و معیار های متفاوتی دارد مثلا میزان پیوند های بین نوکلوتید های GوC یا روش RFLP که توالی ژنی و اشتراک انها را بررسی می کنند و همچنین روشPCR

Namenclature (نام گذاری):

قواعد:

۱- حرف اول جنس بزرگ و حرف اول گونه کوچک نوشته شود.

۲-تمام اسم باید به صورت ایتالیک نوشته شود.

Escherichia coli ⟶ *E.coli*
Helicobacter pylori ⟶ *H.pylori*

نویسنده و تایپ: سعید جلیلی **ویرایش: مریم خراسانچی**

سرای دانشجو SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

جزوه باکتری شناسی

دکتر سلیمان پور

(جلسه دوم – کلیات باکتری)

سرای دانشجو
SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

رنگ آمیزی گرم(Gram Staining):

روش خیلی متداول و ساده در آزمایشگاه های میکروب شناسی است. در این روش رنگ آمیزی باکتری ها بر اساس یک اختلاف مهم ساختاری در دیواره خود به ۲ دسته تقسیم می شوند:

۱- گرم مثبت ها: دارای دیواره ضخیم- متشکل از چندین لایه پپتیدگلیکان (بیشتر از ۴۰ لایه)

۲-گرم منفی ها: دارای لایه پپتیدگلیکان نازک (۲تا۳لایه)- دارای غشا خارجی

مراحل رنگ آمیزی گرم به منظور طبقه بندی باکتری ها براساس ویژگی های رنگ آمیزی گرم

۱-Clinical Samples←Artificial Medium←Pure Culture

۲ -استفاده از رنگ **کریستال ویوله** (Crystal Violet) (بنفش رنگ) به مدت ۳۰ ثانیه، سپس شستشو. در این مرحله مشاهده می کنیم کلیه باکتری ها بنفش رنگ شده اند.

۳- استفاده از محلول **لوگول** (Lugol's Solution) که متشکل از درصد بالایی ید است($\frac{I_2}{KI}$ 3%) (قهوه ای کم رنگ).این رنگ اطراف رنگ قبلی را پوشانده و باعث ایجاد یک کمپلکس بزرگتر می شود، این عمل باعث تثبیت رنگ قبلی می گردد. یعنی لوگول به عنوان فیکس کننده یا Mordant است و باعث میشود رنگ از دیواره خارج نشود و درواقع نقش رنگ آمیزی ندارد. در این مرحله همچنان تمامی باکتری ها بنفش رنگ هستند.

۴-شستشو لام با استفاده از **الکل استن** (Alcohol-Acetone Mixture): این ماده غشا خارجی باکتری هایی که در ادامه گرم منفی نامیده میشود را از بین میبرد در نتیجه باکتری های گرم منفی رنگ بنفش خود را در این مرحله از دست می دهند. اما هم چنان باکتری های بدون دیواره که درادامه گرم مثبت نامیده میشوند و دارای دیواره ضخیم هستندبنفش رنگ باقی میمانند. در نهایت در پایان این مرحله باکتری های گرم مثبت بنفش رنگ و باکتری های گرم منفی بی رنگ هستند.

۵-استفاده از محلول **Safranine** یا **Fusohin**(**فوشین**): به مدت ۳۰ ثانیه (این محلول قرمز کم رنگ یا صورتی است) این محلول نیز مانند محلول اولیه همه باکتری ها را به رنگ خود در می آورد اما چون رنگ قرمز کم رنگ روی رنگ بنفش تاثیری ندارد در پایان این مرحله خواهیم داشت: باکتری های گرم مثبت به رنگ بنفش و باکتری های گرم منفی صورتی رنگ دیده می شوند.

در نتیجه...

باکتری های گرم مثبت به رنگ بنفش وبتکتری های گرم منفی به رنگ صورتی دیده میشوند.

Gram-positive bacteria→blue or purple

Gram-Negative bacteria→red or pink

Gram-variable bacteria→mixture of blue & pink

سرای دانشجو SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

نکات:

۱- روش رنگ آمیزی گرم توسط فردی به نام Hans Christian Gram(1880) ابداع شد که براساس دیواره ی سلولی باکتری هاست.

۲- با این رنگ آمیزی ۲ویژگی باکتری معلوم میشود: ۱- ساختار وشکل باکتری(shape) ۲-رنگ (color) ودرنتیجه نوع دیواره (گرم مثبت یا منفی)

↗Gram +(کوکسی یا باسیل)

Bacteria

↘ Gram - (کوکسی یا باسیل)

۳-یک سری از باکتری ها با رنگ آمیزی گرم قابل رنگ آمیزی نیستند و رنگ آمیزی گرم برای این دسته ارزشی ندارد.

Bacteria that resist gram staining

مثال۱:مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (عامل سل انسانی)، این باکتری دیواره بسیار متفاوت و مستحکم و غنی از لیپید دارد در نتیجه در این رنگ آمیزی رنگ نمی گیرد.

مثال۲: مایکو پلاسماها: که جز نادر باکتری هایی هستند که دیواره ندارند در نتیجه در این روش رنگ نمی گیرند.

۴- رنگ آمیزی گرم وتشخیص گرم مثبت ومنفی بودن برای تشخیص آنتی بیوتیک بسیار مهم است.

۵- بعضی معتقد اند تقسیم بندی دیواره شامل گرم مثبت ،گرم منفی و مایکو باکتریوم است.

معرفی چند واژه:

- Pathogen: Invasive Agent , Virulent Agent به واسطه ی داشتن یک سری خصوصیات میکرو ارگانیسم توانایی تهاجم به بافت واندام را دارد وفرد را دچار بیماری میکند(قدرت ایجاد بیماری)
- Virulence:شدت بیماری
- Virulence و Pathogene → برابر میگیرند(تنها در معنای لغتی باهم تفاوت دارند)
- Opportunistic Pathogene: در زمانی که سیستم ایمنی ضعیف باشد مثلا بیمار دچار ایدز یا پیوند عضو ایجاد بیماری میکند اما در زمانی که سیستم ایمنی نورمال باشد بیماری ایجاد نمیکند ،یعنی وجود آن ها در بدن لزما به معنای ایجاد بیماری نیست (non-pathogenic in immunocompetent & life-threatening infection in immuno copromised patients)

اجزای باکتری ها:

۱-**Essential Structures** (اجزای ضروری): محتوای ژنتیکی- سیتوپلاسم- غشا سیتوپلاسمی یا غشای پلاسمایی-دیواره

۲-**Particular Structures** (اجزای غیرضروری): کپسول- پیلی- اسپور- Flagella (تاژک)

سرای دانشجو SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

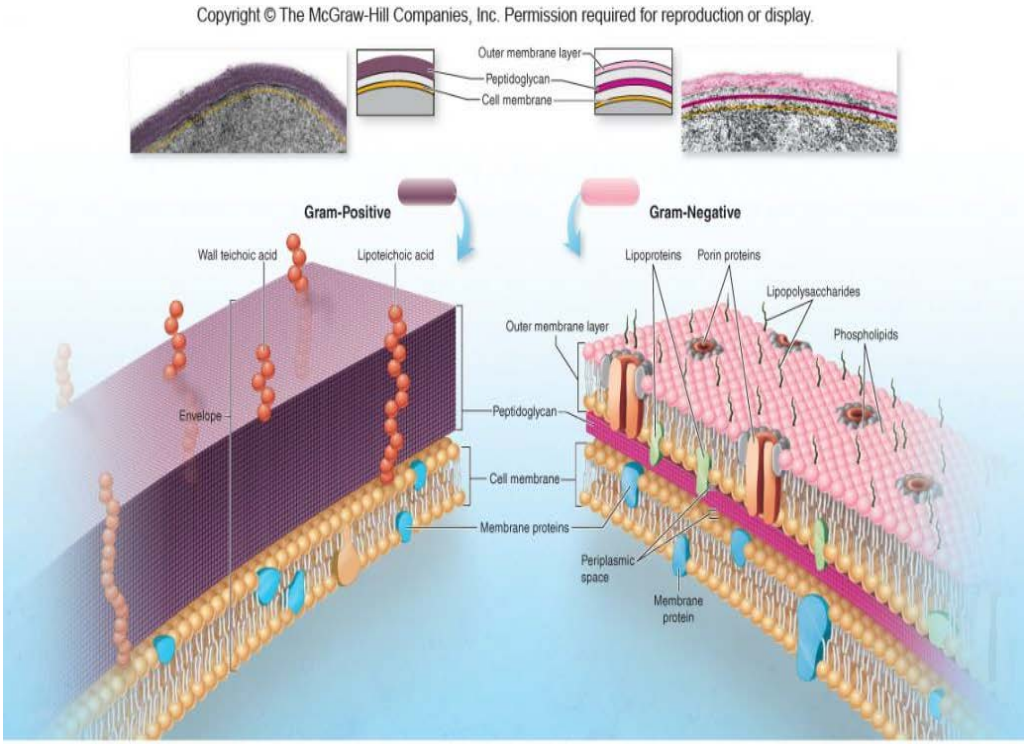
غشا سیتوپلاسمی: غشا سه لایه متشکل از پروتیین،کربوهیدرات و فسفولیپید. پروتئین ها ۷۰ درصد از حجم غشا سیتوپلاسمی را شامل می شوند.

اجزای سیتوپلاسم:کروموزوم (درفضای نوکلئوئید)-پلاسمید-ریبوزوم-گرانول تغذیه ای و....

نکته: چه در باکتری های گرم مثبت چه گرم منفی و چه باکتری هایی که دیواره ندارند یا ساختار دیوارشان تفاوت دارد، غشلی سلولی وجود دارد.

نکته: تفاوت مهم غشا پروکاریوت و یوکاریوت ها: در غشا یوکاریوت ها ترکیبات استرولی داریم (مانند کلسترول) اما در غشا پروکاریوت ها ترکیبات استرولی نداریم (استثنا: مایکو پلاسماها در غشا خود ترکیباتی شبیه کلسترول دارند)

نکته مهم: مهم ترین ماده ای که از طریق انتشار تسهیل شده وارد باکتری می شود: گلیسرول



اعمال غشا سیتوپلاسمی در باکتری ها:

۱- نفوذ پذیری انتخاب(Selective Permeability & Transport)

۲- انتقال الکترون (نقشی که غشا میتوکندری در یوکاریوت ها دارد) که وظیفه ی تولید انرژی را دارد. Electron Transport and Oxidative Phosphorylation)

۳- ترشح اگزوآنزیم ها و توکسین ها (مکانیسم بیماری زایی بسیاری از باکتری ها اینگونه است) Excretion Of Exoenzymes And Toxin)

۴-نقش های سنتزی(Biosynthetic Function): در سنتز بسیاری از بخش های باکتری نقش دارند.

سرای دانشجو
SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

*شماره ی ۲یک دلیل برای اثبات فرضیه ای است که میگوید منشاء میتوکندری از باکتری است.(زیرا درغشای میتئوکندری مانند غشای باکتری زنجیره ی انتقال الکترون انجام میشود.)

ورود مواد به باکتری:

۱-از طریق کانال: مثال: موادی مانند آب از طریق کانال هایی به نام Aqpz

۲- انتشار:

- **ساده Simple Diffusion**: بدون صرف انرژی انجام می شود- از محیط پر تراکم به کم تراکم. مثال:اکسیژن، دی اکسید کربن، آب

- **تسهیل شده Facilitated Diffusion**: بدون صرف انرژی- در جهت شیب غلظت- تفاوت با انتشار ساده: بر خلاف انتشار ساده که مواد از عرض غشا عبور می کنند در انتشار تسهیل شده مواد مانند **گلیسرول** توسط ناقلین پروتیینی به نام پرومئاز جا به جا می شوند.

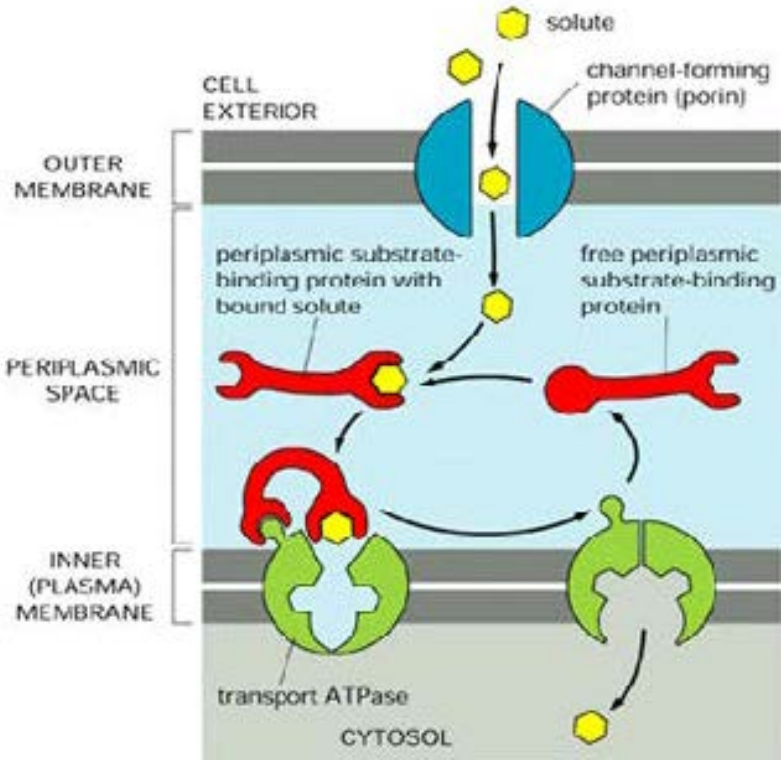
۳-انتقال فعال Active Transport: این نوع انتقال برخلاف جهت شیب غلظت انجام شده و با صرف انرژی همراه است. این انتقال خود شامل سه روش اولیه، ثانویه و PTS است.

Passive Transport: بدون صرف انرژی مثل انتشار ساده وتسهیل شده

Active Transport: انتقال فعال باصرف انرژی

انتقال فعال اولیه (ABC transport or ATP-binding cassette)

این روش بیشتر در گرم منفی ها مطرح است به خاطر وجود غشا خارجی در این دسته از باکتری، در این روش انتقال مواد(مانند آهن)توسط کانالی به نام پورین (Channel Fornning Protein)از غشا خارجی عبور کرده و وارد فضای بین غشا داخلی و خارجی (Periplasmic Place) می شوند. در این فضا پروتیین هایی به اسم(Periplasmic Substrate Binding Pro) مواد را تحویل میگیرند و این مواد را به پرمئازهایی که در عرض غشا داخلی هستند تحویل می دهند تا با مصرف ATP این ماده به فضای داخلی باکتری وارد شود.(انرژی صرف انتقال یک ماده)



https://telegram.me/sarayedaneshjo

انتقال فعال ثانویه (Ion Coupled Transport)

نقل و انتقال یون ها با این روش انجام می گیرد که خود شامل ۳ روش است:

۱-Uni Port (انتقال یک یون به داخل سلول)←بیشتر باکتری های گرم مثبت

۲-Anti Port (انتقال هم زمان یک یون به داخل و دیگری به خارج سلول)

۳-Symport (انتقال هم زمان دو یون به داخل سلول یاخارج سلول)

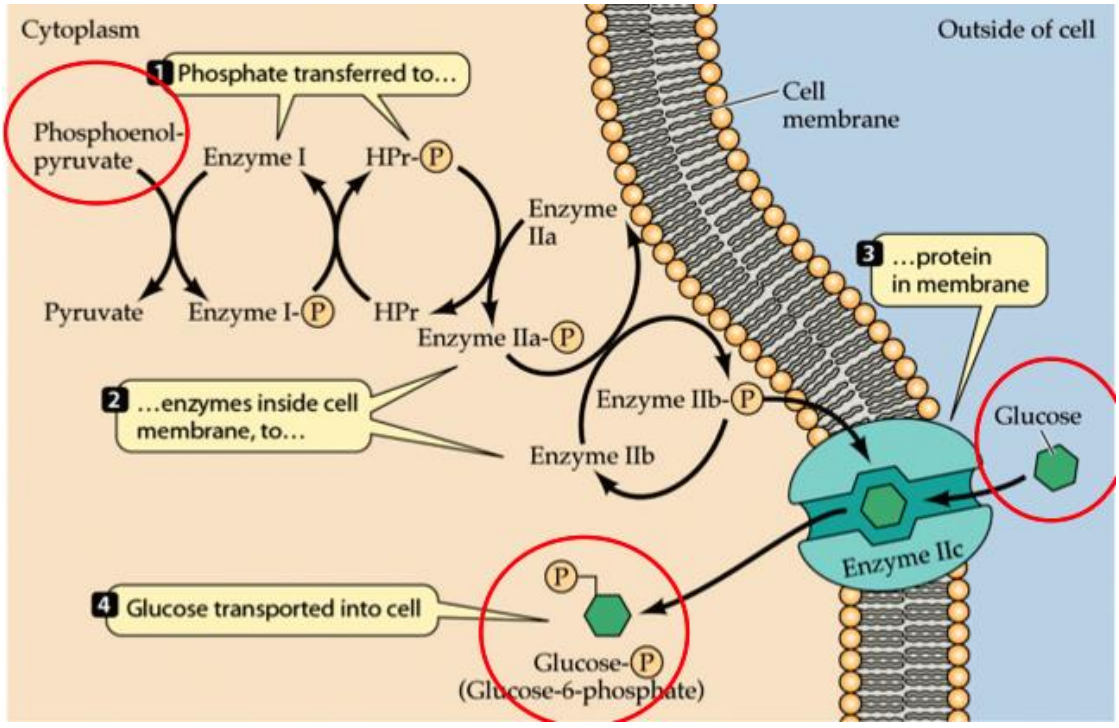
*۲و۳←cotransport

نکته: در۲روش انتقال فعال فوق، برای هر انتقال ATP۲ مصرف می شود،یکی برای ورود ماده و دیگری برای فسفریله کردن آن تا خارج نگردد.

سیستم PTS (Group Translocation)

این روش در بی هوازی های اجباری یا بی هوازی های اختیاری بیشتر دیده می شود و کمتر در هوازی های اجباری دیده می شود.(به طور کلی هم در باکتری های گرم منفی هم گرم مثبت دیده میشود.)در این روش باکتری ATP۱ ذخیره می کند و تنها با مصرف ATP۱ به درون سلول ماده انتقال داده می شود.(انرژیsave میشود)این سیستم باعث می شود برداشت قند ها مانند گلوکوز، مانوز و مالتوز توسط باکتری بیشتر شود.

در این روش فسفوانول پیرووات(PEP) -به عنوان منبع انرژی- تبدیل به پیرووات می شود و فسفات خود را به آنزیمی به نام آنزیم شماره۱ (Enzyme1) می دهد، سپس این فسفات به ترتیب به Hpr (Histidin Pro) و Enzyme2aو Enzyme2b و در نهایت Enzyme2c منتقل گشته تا درآخرین مرحله آنزیم 2c که در عرض غشا سیتوپلاسمی قرار گرفته و خاصیت پرمئازی دارد بعنوان یک کانال غشایی همزمان با فسفریله کردن قند آن را به داخل سلول بیاورد.



سرای دانشجو
SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

نکته: آنزیم شماره ۱ و هیستیدین پروتیئن و آنزیم شماره 2a و2b همگی محلول در سیتوپلاسم هستند و تنها آنزیم شماره 2c که خاصیت پرمئازی دارد در عرض غشا باکتری وجود دارد.

نکته:این سیستم جزو انتقال فعال نیست اما ATP مصرف میکند.

نکته: به طور خلاصه در این سیستم دو نوع پروتئین داریم:

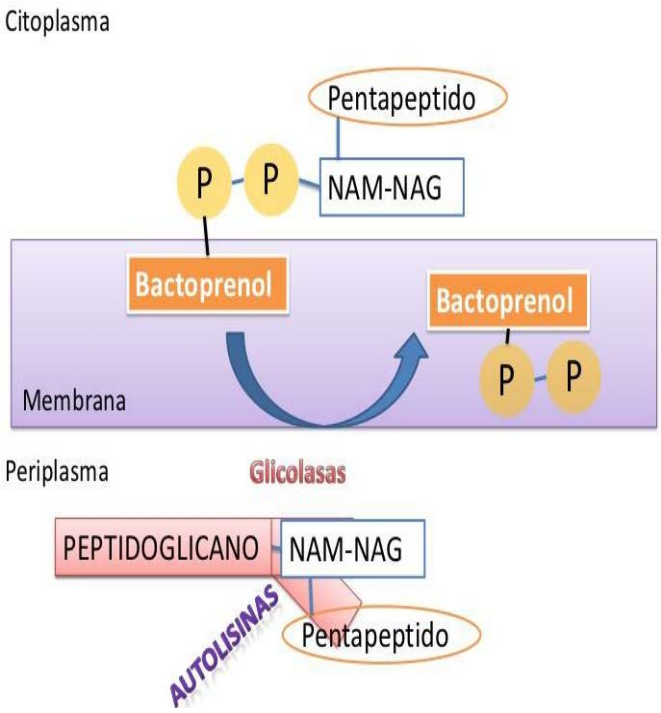
۱-عمومی: برای همه ی قند ها ثابت-شامل H protein & enzyme1

۲-اختصاصی:برای قند های مختلف متفاوت-شامل enzyme2(a-b-c)

انتقال پروتئین ها و توکسین ها به خارج از سلول:

۷ نوع سیستم ترشحی در باکتری ها داریم. (سیستم اخر مربوط به مایکو باکتریوم توبرکلوزیس)بعضی از این ۷ سیستم مانند کانال عمل می کنند و خیلی راحت ماده به خارج از سلول ترشح پیدا می کند یعنی وابسته به sec(نیاز به سیگنال پپتید) ، بعضی هم مانند سرنگ عمل می کنند و باعث اتصال باکتری و میزبان می شوند و سپس از طریق کانال تولید شده بین سلول باکتری و میزبان مواد به داخل سلول میزبان انتقال پیدا می کنند.یعنی غیر وابسته به sec

نقش بیوسنتزی (Biosynthetic Function)



دو پروتئین موجود در غشای سلول:

۱- **C55 (Bactoprenol)**: لیپیدی است در عرض غشا سلول های باکتریایی که **نقش انتقال دهنده** را دارند، C55پیش سازهای پپتیدگلیکان و کپسول ...را (که به وسیله ی خود باکتری ساخته میشود) به خارج سلول انتقال می دهد.

۲- **PBPs (Penicillin Binding Pros)**: این پروتئین نقشی در ساختن دیواره سلولی دارد.۵ نوع PBPsداریم.

PBP_1-PBP_2-PBP_3: انجام Transpeptidation & Transglycosilation که دو مرحله از ساخت دیواره ی سلولی باکتری است.

$PBP_{4, 5}$: انجام Carboxypeptidase که نقش در سنتز دیواره دارد.

نکته: پنی سیلین را باید قبل از شروع بیماری و یا در اوایل بروز علایم تزریق کرد و اگر در اواسط و یا اواخر بیماری تزریق شود تنها می تواند نقش حفاظتی داشته باشد نه درمانی.چرا؟ **عملکرد پنی سیلین به این گونه است: به PBPsها می چسبد و مانع از ایجاد پل عرضی در دیواره باکتری ها میشود و در نتیجه دیواره سست می شود** و باکتری از بین می رود. حال اگر دیر اقدام کنیم برای تزریق پنی سیلین دیواره سلولی باکتری ساخته شده و پنی سیلین نقش کمتری را ایفا می کند.

سرای دانشجو
SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

Sefsulidin :انتی بیوتیک ازبین برنده یPBP_1

Meeillinam & Meticillin :انتی بیوتیک ازبین برنده ی PBP_2

Aztreonam :انتی بیوتیک از بین برنده یPBP_3

آنتی بیوتیک های فوق در واقع مانع ساخت دیواره ی سلولی باکتری می شوند.

نقش انتقال الکترون (فسفریلاسیون اکسیداتیو):

- مثل عابر بانک، کارت اعتباری ($NADH$ & $FADH_2$) را به پول نقد (ATP) تبدیل میکند وبه ما انرژی می دهد . (به ازای هر NADH، ۳ یا به طور دقیق تر ۲/۵ وبه ازای هر$FADH_2$ ، ۲یا به طور دقیق تر ۱/۵ ATP تولید میشود.)
- به آن Protein motive force یاPMF هم گفته میشود .
- اختلاف بار ایجاد شده در۲ سمت غشا باکتری (بیرون مثبت به علت وجود پروتئین وداخل باکتری منفی به علت وجود الکترون) مانند باطری عمل می کند و در نهایت الکترون به گیرنده نهایی الکترون که در باکتری های مختلف متفاوت است (اکسیژن، مواد آلی یا معدنی) انتقال پیدا می کند و پروتون ها توسط FoF1ATPase ها تولید ATP می کنند.

نکات اضافه شده از کتاب

نکته: از عمده ترین خصوصیات مورد استفاده در طبقه بندی می توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱-داشتن برخی از پیگمان ها و یا آنزیم های خارج سلولی

۲-استفاده از مسیر های متابولیک خاص

۳-خصوصیات ژنتیکی

۴-ویژگی های رنگ آمیزی(مانند رنگ آمیزی گرم)

نکته: آسیب های مکانیکی به دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت، تخریب دیواره سلولی توسط لیزوزیم یا حرارت و به خصوص ترشح آنزیم های اتولیتیک توسط باکتری، منجر به تغییر باکتری از گرم مثبت به گرم منفی می گردد در این موارد باکتری در رنگ آمیزی گرم حالت متغیر پیدا می کند. استافیلوکوکوس اورئوس، کلستریدیوم پرفرینجنس، کورینه باکتریوم دیفتریه و بعضی از انواع باسیلوس ها قادر به ترشح این آنزیم های اتولیتیک و تغییر رنگ آمیزی گرم می باشد.

نکته: در سیتوپلاسم سلول های پروکاریوتی اندامک های محدود به غشا مانند میتوکندری،کلروپلاست و... وجود ندارد. آنزیم های ناقل الکترون در این سلول ها در چین خوردگی های غشا سلولی قرار دارند.

نکته: مواد ذخیره ای در باکتری ها به صورت اجسام غیر محلول در سیتوپلاسم انباشته شده اند که گرانول نام دارند.

نویسنده وتایپ: سارا معلمی **ویرایش: مریم خراسانچی**

سرای دانشجو SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

جزوه باکتری شناسی

دکتر سلیمانپور

(جلسه سوم – کلیات باکتری)

سرای دانشجو
SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

از مهمترین روش های شناسایی باکتریها: رنگ امیزی گرم

علت تقسیم بندی باکتریها به دو شاخه گرم مثبت و منفی:تفاوت در دیواره سلولی انها

نقش های غشای سیتوپلاسمی باکتریها:

_نفوذ پذیری انتخابی

_زنجیره انتقال الکترون

_ترشح توکسین ها:

در بحث آنتی بیوتیک ها پدیده ای به نام Selective toxicity یا سمیت انتخابی وجود دارد؛ یعنی برخلاف سایر مواد عفونت زا مانند وایتکس، اختصاصی عمل می کنند یعنی تنها به بخش هایی از باکتری میروند که در سایر سلول های یوکاریوتی وجود ندارد.

مراحل ساخت واکسن یا دارو به ترتیب شامل موارد زیر است:

الف) In silico :یعنی برخورد دارو یا واکسن با سلول های انسانی را در کامپیوتر کاملا مدل سازی میکنند.

ب) Preclinical: بعد از کسب استاندارد در مورد الف ، آن را تولید و سپس به یک حیوان مانند موش تزریق میکنیم.

ج) Clinical trials : بعد از کسب استاندارد و صرف بودجه زیاد ، آن را به بخش های انسانی وارد میکنند که شامل فاز های مختلف است:

۱) Phase 1 : امتحان دارو بر روی انسان که اگر عوارض بد مانند مرگ یا سکته نداشت یا به طور کلی Side effect نداشت آن را به فاز بعد وارد میکنند.

۲) Phase 2 : که شامل دو مرحله A و B است.

۳) Phase 3

۴) Phase 4 :که همان Marketing یا ورود به بازار برای مصرف است. ممکن یک واکسن مانند ب.س.ژ مدت ها در این فاز باشد و بعد متوجه شوند که خیلی کاربردی نیست.

_ نقش بیوسنتزی غشا که دارای دو مورد در ساختار خود است که درساخت دیواره سلولی نقش دارند:

الف) باکتوپرونول: موجود در غشا که با نام های دیگری مانند آندوکاپرنول یا C55 نیز شناخته میشود و نقش آن حمل کننده است یعنی یک سری پیش ساز ها را از درون به بیرون سلول جهت ساخت دیواره یا کپسول حمل می کند.

*چرخه (یک فسفاته) فعال,(دوفسفاته) غیرفعال

ب) PBPs (Penicillin Binding Proteins)

خاستگاه: غشای سیتوپلاسمی باکتریها

دو کار مهم این مولکول ها، ترانس پپتیداسیون و دیگری ترانس گلیکوزاسیون است و کار دیگری به اسم کربوکسی پپتیداز نیز انجام می دهند.

۵ نوع دارد:

الف) PBP 1,2,3: ترنس پپتیداسیون و ترنس گلیکوزاسیون

ب) PBP 4,5: کربوکسی پپتیداز

آننی بیوتیک پنی سلین و بسیاری از دیگر آنتی بیوتیک ها برای عملکرد صحیح لازم است به PBP ها اتصال یابند؛ مانند:

Sefsulidin >> PBP 1
Carbopenem >> PBP1, 2
Mecillonam, Methicillin >> PBP2
Azetronam >> PBP 3

سرای دانشجو
SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

دیواره سلولی:

جز مشترک دیواره گرم مثبت ها و گرم منفی ها: پپتیدوگلیکان که قطر در گرم مثبت ها زیاد و در گرم منفی ها کم می باشد.

جای بسیار مناسبی برای Selective toxicity است چون سلول های ما فاقد دیواره هستند.

در بین این پپتیدوگلیکان هرنوع باکتری (گرم مثبت یا منفی) یک سری اجزای اختصاصی وجود دارد که اگر درگرم مثبت باشد، درگرم منفی نیست و برعکس؛ که شامل:

- **گرم مثبت ها**:(تیکوئیک اسید) که نقش بسیار مهمی در بیماری زایی دارد وتنها جز اختصاصی دیواره علاوه بر پپتیدوگلیکان است و به دو صورت دیده می شود:
  ۱) متصل به غشای سیتوپلاسمی
  ۲) متصل به پپتیدوگلیکان
- **گرم منفی ها:**

۱) غشای خارجی
۲) Brauns Lipoprotein
۳) فسفولیپید(PL)
۴) لیپو پلی ساکارید(LPS): همانطور که تیکوئیک اسید نقش مهمی در بیماری زایی گرم مثبت ها دارد،این ماده نقش مهمی در بیماری زایی گرم منفی ها دارد حتی قوی تر از گرم مثبت ها به طوری که با تب نیز همراه است.
۵) فضای پری پلاسمیک و اتصالات بایر

*دقت شود غشای خارجی جزوی از دیواره است.

پپتیدوگلیکان:

حالت توری مانند دارد (مِش لایک) و شامل سه قسمت است:

۱) اسکلت پلی ساکاریدی
۲) زنجیره تراپپتیدی
۳) پل عرضی

**حالت توری مانند باعث می شود نقل و انتقال مواد از طریق آن به راحتی صورت گیرد.

اسکلت پلی ساکاریدی:

شالوده اصلی دیواره باکتریها که دارای دو مولکول قندی NAM (ان استیل مورامیک اسید)و NAG (ان استیل گلوکز آمین)که به صورت یکی در میان با پیوند بتا ۱به۴ به هم متصل شده اند.

زنجیره ترا پپتیدی:

در ابتدا به صورت پنتا پپتید است که بعد یک جز خود را از دست می دهد.

این زنجیره از ۵ آمینو اسید که در موقعیت اول اسید آمینه ال- آلانین (L-Ala)، موقعیت دوم دی- گلوتامیک اسید(D-Glu)، موقعیت سوم در گرم مثبت ها ال-لیزین(L-LYS)،در گرم منفی ها دی آمینو پیملیک اسید(DAP)، موقعیت چهارم و پنجم دارای دو اسید آمینه یکسان به نام دی-آلانین (D-Ala) تشکیل شده است.

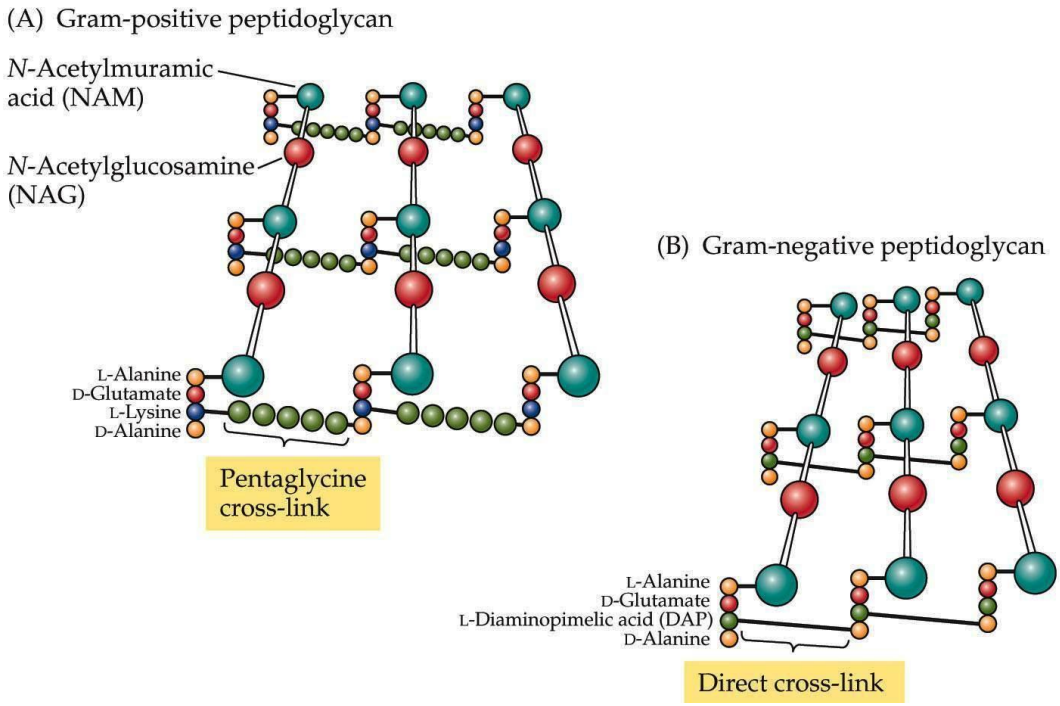
درجریان ساخت بخش سوم یا پل عرضی یک اسید آمینه (D_Alanine) از پنتا پپتید اولیه جدا می شود و یک ترا پپتید باقی می ماند. این عمل به وسیله PBP ها تحت فعالیت کربوکسی پپتیدازی صورت می گیرد.

در اکثر گرم مثبت ها (L_Ala, D_Glu, L_Lys, D_Ala) و....

در گرم منفی ها به جای DAP, (L_Lys) وجود دارد

دی آمینو پیلمیک اسید: DAP (از ترکیبات حدواسط در مسیر سنتز لیزین است.)

سرای دانشجو
SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo



پل عرضی:

اتصال آمینو اسید شماره ۴ یک زنجیره (D-ALA) با آمینو اسید موقعیت سوم زنجیره دیگر که در گرم مثبت هاL_Lys و در گرم منفی هاDAP است که این عمل توسط PBP ها صورت میگیرد.

در باکتری های گرم مثبت پل عرضی از ۵ تا گلایسین (پنتا گلایسین) تشکیل شده است ولی در گرم منفی دو آمینو اسید مستقیم به هم متصل می شوند و اسید آمینه ای در این بین نیست.

درگرم مثبت ها دیواره سلولی تا حدود 40 لایه و در گرم منفی ها در حدود ۲و۳ و یا ۴لایه است

حال در مورد **نحوه ساخت پپتیدوگلیکان** صحبت می کنیم.

این فرایند از NAG شروع می شود. NAG در سلول حمل کننده ای به نام UDP به خود می گیرد و به UDP-NAG تبدیل می شود.این ماده تحت اثر آنزیم پیروات ترانسفراز یک گروه پیروات از فسفو انول پیروات می گیرد و به UDP-NAG پیروات تبدیل می شود. این ماده در ادامه احیا می شود و به UDP-NAG لاکتات تبدیل می شود. به ترکیب NAG لاکتات ،NAM می گویند.(پس دقت شود این NAG به علت دریافت گروه پیروات با NAG که در ساختار است، متفاوت است.)

در ادامه ۳ اسید آمینه موقعیت ۱تا۳ (دربالا گفته شده) توسط ترانسفراز های اختصاصی در حضور Mg^{2+}، به UDP-NAM متصل می شوند و در اینجا UDP-NAM با تری پپتید تشکیل می شود.

در مرحله بعد ابتدا L-Ala تحت اثر آنزیم راسماز(نوعی ترانسفراز) به D-ALA تبدیل میشود. سپس دو مولکول D-Ala در کنار یکدیگر به دی-آلانیل،دی-آلانین تبدیل میشوند و این توسط آنزیم آلانین سنتتاز به ساختار قبلی اضافه می شود. پس در اینجا UDP-NAM پنتاپپتید داریم.

این مراحل در سیتوپلاسم رخ می دهد ولی مکان نهایی این مواد در خارج سیتوپلاسم است. پس نیاز به ناقلی به نام باکتوپرونول دارد.

باکتوپرونول UDP را خارج می کند و خود به جای آن قرار می گیرد. پس ترکیبی که ایجاد شده است Bactoprenol-NAM پنتاپپتید است. درادامه NAG (که توسط UDP حمل می شود و سپس از آن جدا می شود) به این ترکیب اضافه می شود و ترکیب Bactoprenol-NAM-NAG پنتاپپتید ایجاد می شود.

سرای دانشجو
SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

باکتوپرونول این ماده را از سیتوپلاسم به دیواره انتقال می دهد. در دیواره سلولی دو اتفاق میافتد:

۱) ترانس گلیکوزاسیون: دراین فرایند پیش ساز تولید شده جدید به پیش ساز های قبلی متصل می شود.

۲) ترانس پپتیداسیون : ایجاد پل عرضی

حال با شناخت این مسیر، میتوان آنتی بیوتیک های متناسب با آن را تجویز کرد.

۱) فسفو مایسین: تخریب پیروات ترانسفراز

۲) سیکلوسرین: تخریب آلانین راسماز

۳) باسیتراسین: تخریب باکتوپرونول

*امروزه خیلی از این ۳ ماده استفاده نمی شود.

آنتی بیوتیک هایی که بیشتر استفاده می شود شامل موارد زیر است:

۱) ونکومایسین: مانع ازاتصال پیش ساز های جدید به قبلی

۲) پنی سیلین و سفالوسپورین: مانع از تشکیل پل عرضی

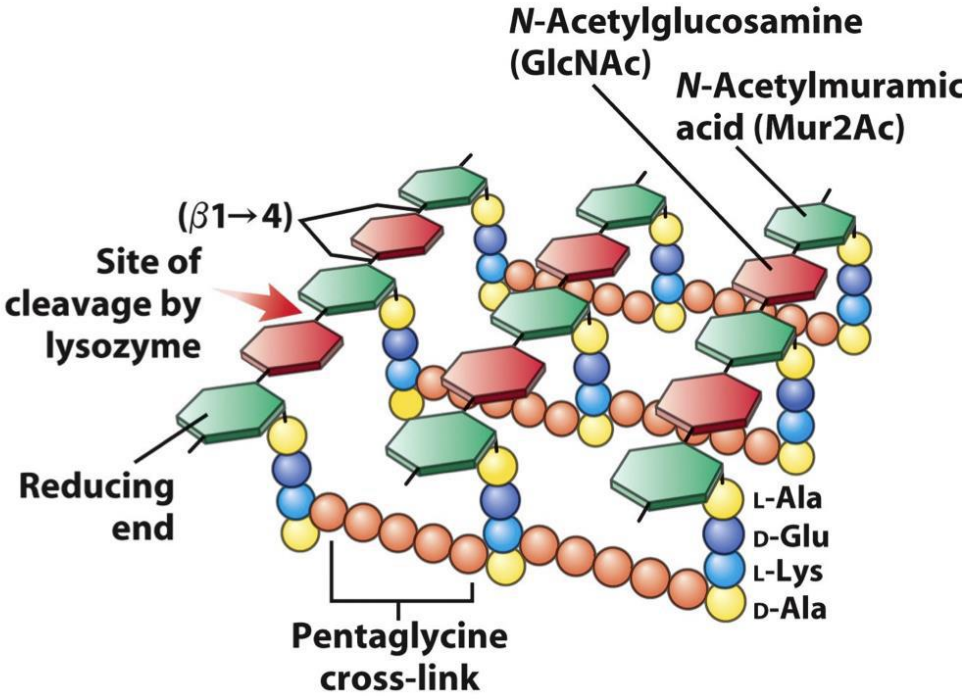
*پس دقت شود اثر پنی سیلین در ابتدای بیماری و قبل از تشکیل دیواره است.(البته برای جلوگیری ازتشدید عفونت میتوان بعد ازمراحل ابتدایی تجویز کرد.)

*NAG در سیستم سلولی باکتری برخلاف NAM وجود دارد برای همین آن را می سازد.

پنی سلین و آنتی بیوتیک های هم خانواده آن با اثر برPBPs ساخت پل عرضی را متوقف می کنند در نتیجه دیواره سست می شود و در نهایت با اثر آنزیمهای اتولیزین(Autolysine) دیواره فرو می پاشد.

*تک تک اجزای ساختاری پپتیدوگلیکان در سیتوپلاسم ساخته شده و توسط باکتوپرونول(C55) انتقال می یابند و سپس توسط فرایند ترانس گلیکوزاسیون (PBP 1&2&3) به اسکلت قبلی متصل میگردد.

*در زنجیره پنتا پپتیدی دوD_Ala به هم متصل هستند که یکی از آنها جدا میشود (آنکه در انتهای زنجیره قرار گرفته) و ساختار تترا پپتید شرکت کننده در ساختمان پپتیدوگلیکان باقی می ماند



https://telegram.me/sarayedaneshjo

ساختارهای اختصاصی:

تیکویک اسید:

_فقط در باکتری های گرم مثبت دیده می شود.

_ جنس آن در بعضی باکتری ها ریبیتول فسفات، در بعضی باکتری ها گلیسرول فسفات و در بعضی باکتری ها هردو است.

_بسیار انتی ژنیک است: یعنی به شدت سیستم ایمنی بدن را تحریک می کند به عنوان یک انتی ژن و در بیماری زایی نقش دارد.

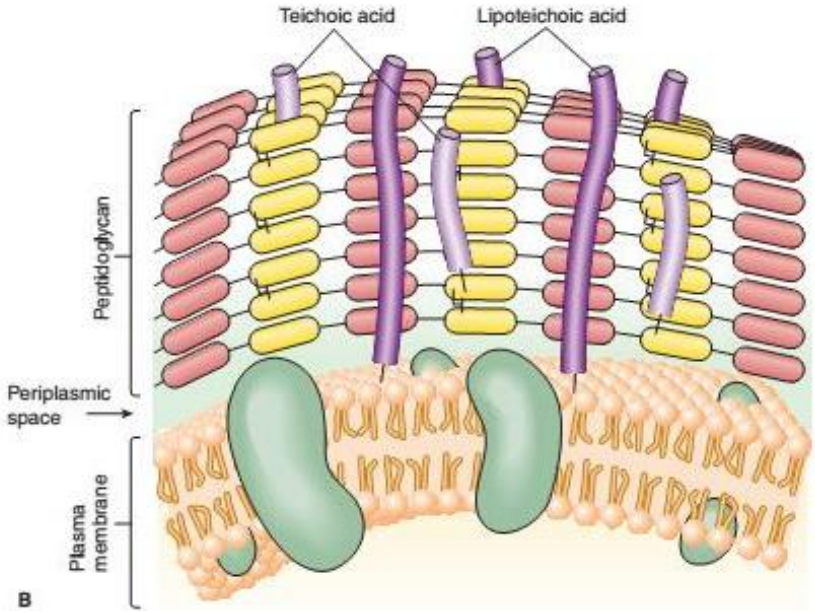
_**دو نوع دارد** : LTA (لیپو تیکوییک اسید) و WTA (وال تیکوییک اسید)

LTA: اسید تیکوئیک به غشای سیتوپلاسمی می چسبد، در همه ی باکتری های گرم مثبت دیده می شود، معمولا گلیسرول فسفات سازنده ی آن است، ایمنوژنیسیته بالاتری نسبت به WTA دارد.

WTA: اسید تیکوئیک به دیواره سلولی متصل است، معمولا جنس آن ریبیتول فسفات است و در بعضی از باکتری های گرم مثبت دیده میشود.

_حمل کننده ی واحد های تیکوییک اسید وپیش ساز های آن: باکتوپرونول (C55)

LPS نسبت به TA سمیت بیشتر و نقش مهمتری در بیماری زایی باکتری دارد و می گویند این دو کاملا شبیه هم هستند به جز اینکه TA کشنده نیست ولی LPS می تواند کشنده باشد.



کارهای تیکوئیک اسید:

۱) نقش گیرنده دارد: باکتری به کمک آن به سطح سلول میزبان متصل می شود.

باکتریوفاژ: ویروسی که سلول میزبانش باکتری است . نقش مهمی در انتقال ژن از جمله ژن مقاومت به انتی بیوتیک دارد ، یکی از رسپتور های باکتریوفاژ تیکوییک اسید است .پس تیکوییک اسید محل اتصال فاژها است: رسپتور های سطح سلولی است .

۲) تیکوییک اسید منیزیم را می گیرد و انتقال می دهد . همچنین چسبنده است و باعث زنده ماندن باکتری در شرایط سخت می شود

۳) اولین فاکتور های موثر در بیماری زایی باکتری ها : فاکتور های چسبنده مثل TA در گرم مثبت ها به هم چسبندگی باکتری ها به هم سبب می شود .

۴) در شایستگی بعضی باکتری ها نقش دارد .

۵) باعث مقاومت باکتری ها نسبت به لیزوزیم می شود .

لیزوزیم روی پیوند NAM و NAG که از نوع بتا ۱←۴ است اثر می کند و ان ها را می شکند که در نهایت باعث فروپاشی دیواره باکتری ها می شود .

سرای دانشجو
SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

ساختار دیواره ی باکتری های گرم منفی: در بالای غشای سیتوپلاسمی داخلی فضایی پری پلاسمیک وجود دارد که شامل دو یا سه لایه پپتیدوگلیکان است ودیواره سلولی در آن قرار میگیرد و روی آن غشای خارجی را داریم که همانند غشای داخلی دارای نفوذ پذیری انتخابی است در نتیجه اصلا هر ماده ای نمیتواند وارد یا خارج شود. همین مورد علت آن است که بعضی باکتری ها به شدت به آنتی بیوتیک مقاومند مانند Pseudomonas که حتی توانایی رشد بر روی صابون را نیز دارد.

_اولین و مهمترین ساختار اختصاصی باکتری های گرم منفی LPS می باشد که اصلی ترین نقش را در بیماری زایی باکتری های گرم منفی دارد.

یکی دیگر از ساختار های اختصاصی گرم منفی ها لیپو پروتئیین براون است. کار این ماده اتصال غشای خارجی به پپتیدوگلیکان یا همان دیواره سلولی است.

LPS: لیپو پلی ساکارید که به آن اندوتوکسین نیز میگویند زیرا برخلاف اگزوتوکسین که سم ترشحی است، در ساختار خود دیواره باکتری وجود دارد.

نتیجه: اندوتوکسین لزوما به LPS و به بخش Lipid A آن اطلاق می شود پس در باکتری های گرم مثبت اندوتوکسین نداریم.

LPS از سه قسمت ساخته می شود (از داخل به خارج):

۱) لیپید A ۲) Core یا هسته (دارای دو بخش داخلی و خارجی) ۳) آنتی ژن O

انتی ژن O : بیش از ۴۰ قند تکرار شده

هسته : دارای پلی ساکارید های خاص تر و اختصاصی تر

لیپید A : نقش بسیار زیادی در بیماری زایی دارد و اصلی ترین جز سمی در باکتری های گرم منفی است.

اگزوتوکسین : سم هایی که از باکتری خارج می شوند .

_ بعضی باکتری ها قطعاتی از LPS را به صورت وزیکول هایی به خارج می فرستند که خودش به طور مستقل باعث ایجاد بیماری می شود و گاهی انقدر خاصیت ایمنوژنیسیته و انتی ژنیسیته بالایی دارد که موجب شوک اندوتوکسیک می شود .

_ در واکسن سازی می توانیم به جای ان که باکتری ضعیف شده را تزریق کینم فقط ان قسمت که باعث بیماری میشود را جدا کنیم (مثل LPS گرم منفی ها) که خودش باعث ایجاد ایمنی مناسب می شود .

عملکرد های LPS : توکسیک , کشتن موش و خوک و انسان (ازطریق ایجاد شوک)

می تواند باعث ایجاد Septicemia شود که در نهایت به مرگ می انجامد (اختلاف اصلی TA و LPS)

مقاومت گرمایی زیادی دارد و به سختی از بین می رود .

پیروژن است : یعنی تب ایجاد می کند .

میتواند باعث فشار خون پایین (Hypotension) , ضربان سریع قلب (Tachycardia) , افزایش تعداد گلبول های سفید خون (Leukocytosis) و افزایش ضربان تنفس (Tachypnea)، Multiple Organ Failure یا از دست رفتن بعضی از ارگان های بدن شود .

عملکرد انتی ژن O : از سری ترکیبات پلی ساکاریدی است که سیستم ایمنی بدن به ان واکنش نشان می دهد و منجر به افزایش پاسخ ایمنی انتی بادی می شود , می تواند باکتریوفاژ رسپتور باشد یا باعث مقاومت پیشرفته به فاگوسیتوز شود و همچنین می تواند موجب چسبیدن باکتری به سلول میزبان شود .

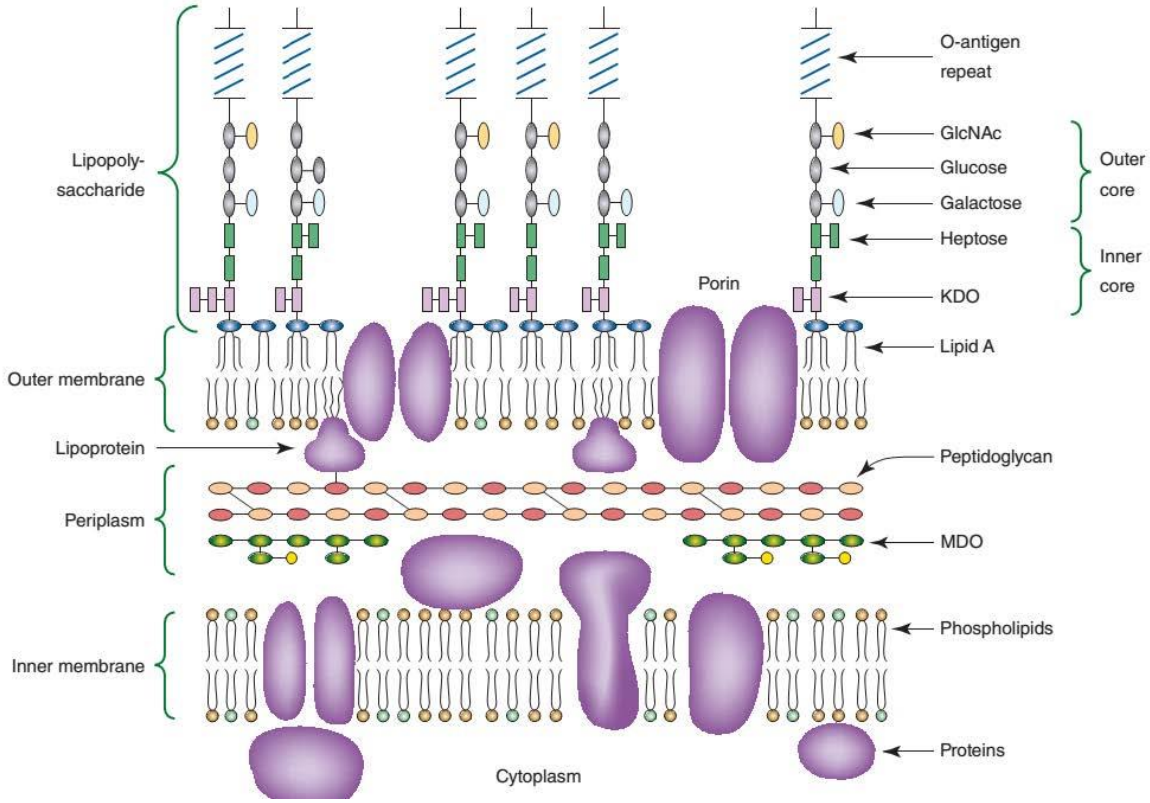
بعضی باکتری برای جلوگیری از مبارزه با سیستم ایمنی، بخش آنتی ژن O خودرا از ابتدا ندارند.

اگر LPS انتی ژن O نداشته باشد LOS (لیپو الیگو ساکارید) نامیده میشود.

این باکتری ها سایر اجزا یعنی Core و لیپید A را دارند ،در نتیجه آن بخش از Core خارجی که شامل قند استیل لاکتوز آمین است، در راس قرار میگیرد.این قند شبیه یکسری از ساختار های داخلی بدن است. توانایی دیگری که این باکتری ها

سرای دانشجو SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

دارند این است هنگامی که این قند در راس قرار گرفت، میتوانند اسید سیالیک را از بعضی از بخش های بدن بگیرند در نتیجه LOS قابلیت سیالیله شدن با اسید سیالیک را دارد و از آنجایی که اسید سیالیک شبیه به بافت های بدن انسان است منجر به فرار باکتری از سیستم ایمنی میزبان می شود که به این پدید تقلید آنتی ژنی (Antigenic Mimicry) و یا Antigenic Masking می گویند.



مثال این باکتری ها:

۱) Neisseria Gonorrhoeae: عامل سوزاک

۲) Neisseria Meningitides: عامل مننژیت

۳) هموفیلوس آنفولانزا: یکی از عوامل آنفولانزا

* این باکتری ها از ابتدا فاقد انتی ژن O بوده اند نه اینکه داشته باشند بعد از دست بدهند .

LPS: پلی ساکارید های بلند ← کلنی های هیدروفیل (Smooth)

LOS: الیگو ساکاریدهای کوتاه ← کلنی های هیدروفوب (Rough)

_Core منجر به اتصال لیپید A به انتی ژن O می شود.

Core: خارجی و داخلی

در بخش داخلی دو قسمت داریم:

۱) KDO (مختص گرم منفی ها و از فاکتور های تشخیص گرم منفی ها)یا کتو دوکسی اوکتانات

۲) Heptose

Lipid A: مهمترین و وسیع ترین بخش LPS

ساختار: از یکسری واحد های سازنده دی ساکارید هگزوزی (دی ساکارید گلوکوز امین فسفاته) با دو گروه فسفات تشکیل شده است و دارای اسید های چربی از جنس بتا هیدروکسی مریستیک اسید است.

_فسفات ها در لیپید A نقش بسیار مهمی در بیماری زایی است .

*عامل اصلی سمیت باکتری گرم منفی: LPS

*عامل اصلی سمیت LPS: Lipid A

*عامل اصلی سمیت Lipid A : گروه فسفات

به ورود باکتری به داخل خون باکترینمی یا سپتیسمی می گویند.

نویسنده و تایپ: رضا فرزانه

ویرایش: مریم خراسانچی

سرای دانشجو
SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

جزوه باکتری شناسی

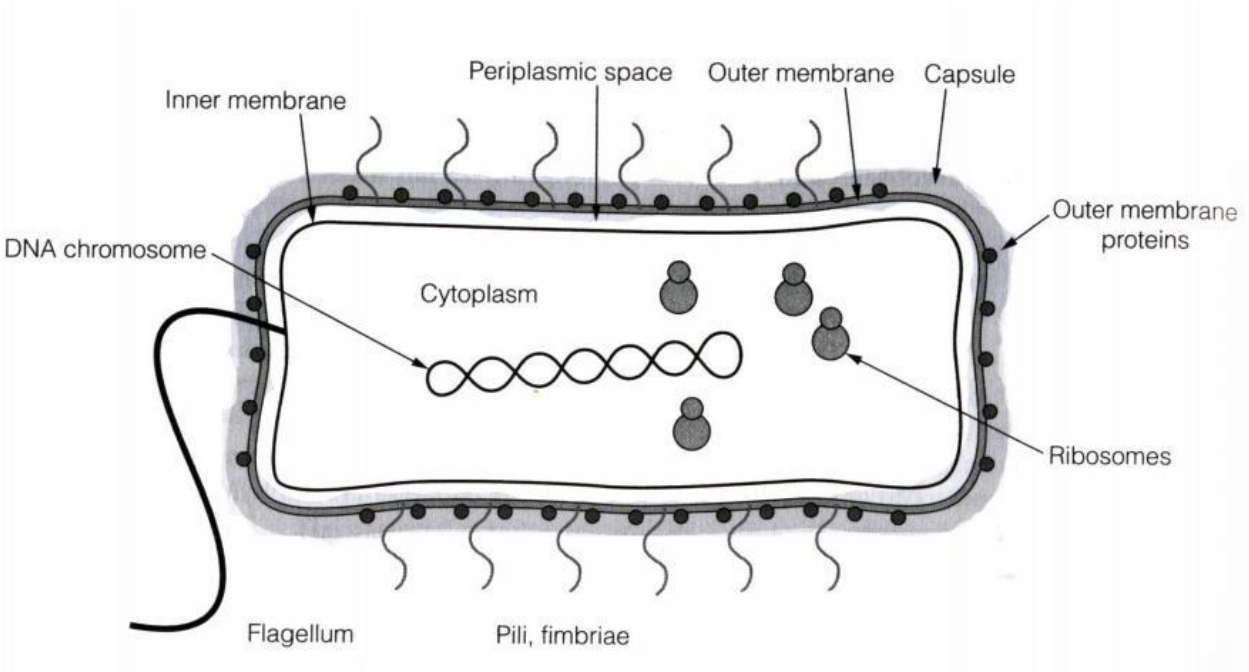
دکتر سلیمانپور

(جلسه چهارم – کلیات باکتری)

سرای دانشجو
SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

گفته شد که برای مقابله با باکتری ها آنتی بیوتیک تولید می شود و پس از بررسی ها و فاز های متعدد در بازار و مارکت عرضه می شود و این که آنتی بیوتیک ها بر روی سلول های باکتری اثر دارند و نه سلول های بدن؛ اما این امر تا زمانی صادق است که دوز و غلظت آنتی بیوتیک در یک حد معین و نرمال باشد؛ سوء مصرف و مصرف بیش از اندازه ی آن، سبب تاثیر منفی بر سلول های یوکاریوتیک یا همان سلول های بدن ما می شود. بنابراین در محیط های آزمایشگاهی علاوه بر آزمودن دوز موثر آنتی بیوتیک بر روی باکتری ها، تاثیر آن ها چه از لحاظ شیمیایی و چه از لحاظ غلظت، بر سلول های یوکاریوتیک هم مورد بررسی قرار می گیرند.

بررسی دیگر اجزاء باکتری: Other Parts Of Bacteria:



بررسی اجزایی از باکتری که بر روی سطح آن قرار دارند و به نوعی اجزایی غیر ضروری نامیده می شوند. یعنی اگر نباشند، مشکلی برای باکتری ایجاد نمی شود و ممکن است برخی باکتری ها آن اجزاء را داشته باشند و برخی دیگر از باکتری ها فاقد آن اجزاء باشند. مانند: کپسول(Capsule & Glycocalyx) ، تاژک(Flagella)، مژک(Pili)، و اسپور یا اندوسپور(Endospores)

البته باید با این نکته توجه داشت که اسپور یا اندوسپور یک جزء نیست و یک حالت در برخی باکتری ها است که معمولا در پاسخ به استرس و تنش های محیطی رخ می دهد.

کپسول Capsule & Glycocalyx

لایه ای در خارج باکتری است که در برخی از آن ها وجود دارد و عملکرد های مهمی را برای باکتری انجام می دهد. در مجموع به انواع و اقسام کپسول که در ادامه گفته خواهد شد، واژه ی گلیکوکالیکس (Glycocalyx)، هم گفته می شود. البته در رفرانس های مختلف، ممکن است مبنای متفاوتی از مفهوم این دو واژه وجود داشته باشد، ولی در کلام کلی تر از Glycocalyx استفاده می شود.

سرای دانشجو
SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

در دوره ای بنا شد تا بجای دو واژه ی گفته شده، از واژه ی Exopolysaccharid استفاده شود ولی در نمونه هایی استفاده از این اصطلاح نقض می شود، زیرا باکتری هایی هستند که جنس کپسول آن ها پلی ساکاریدی نیست و نمی توان از این لفظ استفاده کرد. جنس کپسول این نمونه های نقض، پلی پپتیدی می باشد؛ مانند: *Bacillus anthracis* که عامل بیماری سیاه زخم است و کپسول پلی دی گلوتامیک اسیدی دارد. دیگر مثال نقض باکتری *Yersinia pestis* است که عامل بیماری طاعون می باشد و کپسول پلی پپتیدی یا همان پروتئینی دارد. باکتری *Bacillus luciferensis* نیز که در بیماری زایی نقشی ندارد کپسول پروتئینی دارد. بنا بر این مثال ها، واژه ی Exopolysaccharid خیلی جامع نیست و استفاده از Glycocalyx جامع تر است، هر چند هر سه یک مفهوم را ارائه می دهند و در جایگاه های متفاوت کاربرد دارند.

عملکرد کپسول در این باکتری ها با باکتری های دارای کپسول پلی ساکاریدی هیچ فرقی ندارد و فقط جنس کپسول در آن ها متفاوت است.

انواع Glycocalyx

۱- Capsule : متراکم و قطر زیاد
۲- MicroCapsule : متراکم و قطر کم (البته تراکم کمتر از Capsule)
۳- (Biofilm)Slime layer : بدون توجه به قطر و نا متراکم

Slime layer در باکتری های مطرح در دندان پزشکی و عفونت های دهان و دندان اهمیت زیاد دارد که با عملکرد خود لایه ای را فراهم می کند که باکتری به استفاده از مواد قندی موجود در دهان بپردازد و تولید اسید کند و با عمل تخریبی در نهایت سبب از بین رفتن مینا شود. این عملکرد و مکانیسم آن در مبحث استرپتوکوک بررسی می شود.

Capsule معمولا یک لایه ی متراکم است که نفوذ رنگ به آن کار آسانی نیست و با روش های رنگ آمیزی معمولی قابل مشاهده نخواهد بود؛ به همین دلیل از رنگ آمیزی های Negative Staining استفاده می شود.

Negative Staining **رنگ آمیزی مرکب چین،Nigrosin ، India Ink**

رنگ آمیزی نگاتیو یا منفی بدان معناست که همه ی محیط و اجزاء رنگ آمیزی شود به جز همان بخشی که می خواهیم قابل مشاهده گردد؛ مانند کپسول. برای این کار از همان جوهر های معمولی مورد استفاده در روان نویس ها و خود نویس ها استفاده می شود. هم زمینه رنگ آمیزی می شود و هم خود باکتری؛ فقط به سبب خصوصیت کپسول، رنگ نمی پذیرد و متمایز می شود.

MicroCapsule و Biofilm هر دو تراکم کمتری از کپسول دارند و رنگ تا حدودی در آن ها نفوذ می کند و از Negative Staining در مشاهده کردن کپسول استفاده می شود.

راه ساده برای مشاهده ی Biofilm و MicroCapsule استفاده از میکروسکوپ الکترونی است.

رنگ آمیزی دیگری نیز به نام Welch Staining وجود دارد که در جلسات باکتری عملی به آن پرداخته خواهد شد.

سرای دانشجو SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

عملکرد Glycocalyx **Function**

۱- Antiphagocytosis : اولین عملکرد، جلوگیری از بلعیده شدن توسط سلول های بیگانه خوار (Phagocytes) می باشد. که عملکرد آنتی فاگوسیتوزی کپسول است و به نوعی سپری در مقابل سیستم دفاعی بدن محسوب می شود و مکانیسم آن از سه روش موثر است.

الف) با افزایش حجم مانع از بلعیده شدن توسط سلول های بیگانه خوار می شود.

ب) کپسول بار الکتریکی منفی دارد و برهم کنش این بار با بار منفی Phagocyte ها سبب دفع آن ها از یکدیگر می شود.

ج) پوشاندن آنتی ژن ها و جلوگیری از شناسایی شدن توسط سلول بیگانه خوار

۲- Attachment : کپسول یکی از عواملی است که باعث می شود باکتری بر روی سطح سلول میزبان بچسبد.

۳- Resistance(to dehydration and antibiotics) : با وجود یک لایه ی محافظ(کپسول) نفوذ آنتی بیوتیک ها به درون باکتری کمتر شده و باعث مقاومت باکتری می شود.

دیگر عملکرد مقاومتی کپسول، جلوگیری از دهیدراتاسیون است و نمی گذارد باکتری آب خود را از دست بدهد.

* وقتی یک نوع باکتری، کپسول دار باشد، کولونی آن نیز دارای شکل و ساختار متفاوت است و مشابه کولونی باکتری های بدون کپسول نیست. کولونی آن ها چسبناک یا نکوئیدی است مانند کولونی *Bacillus anthracis* که هنگام برداشتن، کش می آید و از نشانه های کولونی های کپسول دار می باشد.

واکنش کوئلانگ **Quellung**

Reaction

یک واکنش بیوشیمیایی است که آنتی بادی علیه کپسول تولید می شود، و هنگام اتصال به کپسول باعث تورم آن می شود به حدی که به توان آن را مشاهده کرد.

فلاژل (تاژک) **Flagella**

باکتری به سبب داشتن فلاژل به محیط پاسخ می دهد و حرکت می کند. البته کارایی های دیگری نیز برای آن وجود دارد ولی مهمترین کاری که باکتری انجام می دهد به واسطه ی فلاژل انجام می دهد، حرکت کردن است. این جزء ممکن است هم در باکتری های گرم مثبت دیده شود و هم در گرم منفی ها وجود داشته باشد. فلاژل بیشتر در باسیل ها وجود دارد و به ندرت در کوکسی ها هم مشاهده می شود.

فلاژل، پایه ی پروتئینی دارد و از واحد های پروتئینی به نام Flagelin که اکثرا تک واحدی است و همه ی واحد های آن شبیه هم هستند، ساخته می شود. البته باکتری های *Caulo bacterium* هم هستند که ۲ نوع Felagelin دارند. عملکرد اصلی آن ترانس داکسیون حسی است، یعنی پاسخ به محیط

Chemotaxis :Fuction

سرای دانشجو SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

پاسخ به اکسیژن(Aerotaxis) پاسخ به نور(Phototaxis) پاسخ به الکترون (electron acceptor taxis)

فلاژل با حرکت برخلاف جهت عقربه های ساعت به جلو حرکت می کند؛ همچنین با حرکت در جهت عقربه های ساعت، باکتری به سمت عقب حرکت می کند. پس به واسطه ی فلاژل، باکتری به محیط پاسخ می دهد؛ یا از چیزی دور یا به آن نزدیک می شود.

نحوه قرارگیری فلاژل:

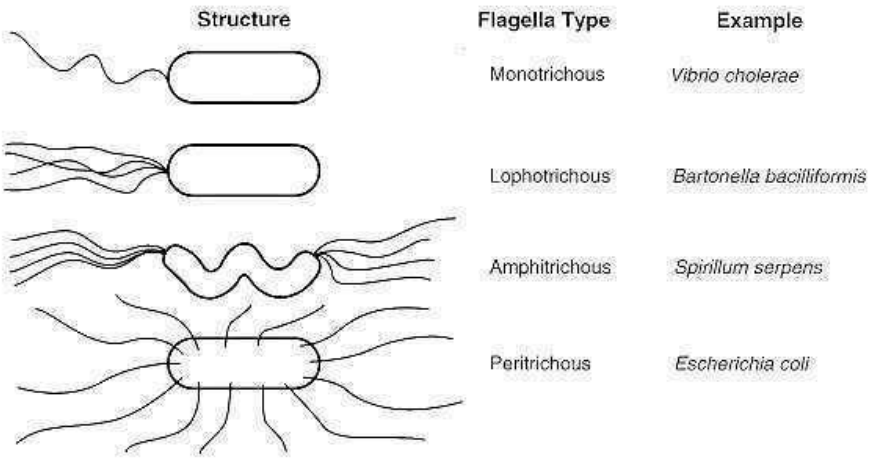
در باکتری ها انواع مختلفی دارد.

Monotrichous: برخی باکتری ها فقط یک فلاژل در یک انتهای باکتری دارند.مانند: *Vibrio cholerae* عامل بیماری وبا

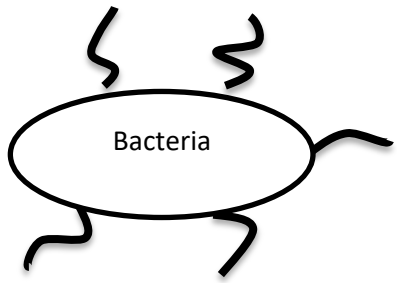
Lophotrichous: باکتری هایی که یک دسته فلاژل در یک انتها دارند.مانند: *Bartonella bacilliformis*

Amphitrichous: باکتری هایی که دو دسته فلاژل در دو انتهای خود دارند.مانند: *Spirillum serpens*

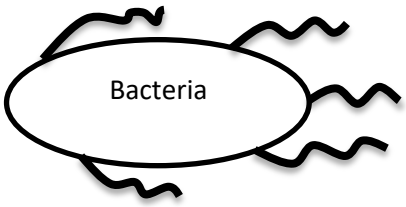
Peritrichous: باکتری هایی که فلاژل رد تمام سطح آن ها مشاهده می شود. مانند: *Enterobacteriaceae* و *Escherichia coli*



فرقی نمی کند باکتری ها در چه حالتی آرایش یافته اند، مهم اینست که معمولا در همه ی باکتری های دارای فلاژل، فلاژل یا فلاژل ها برای حرکت به یک سمت، هماهنگ عمل می کنند و به یک سمت جمع می شوند و در آن سمت حرکت می کنند و به نظمی ندارند. که سبب باکتری به جلو یا متعاقبا به عقب می شود.

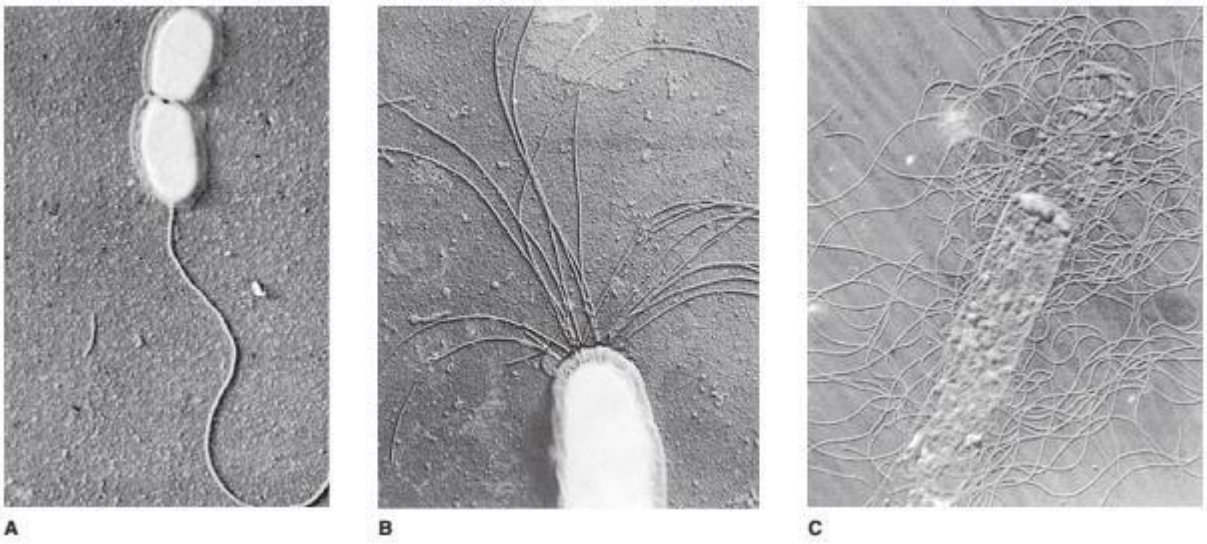


هنگام سکون



هنگام حرکت

https://telegram.me/sarayedaneshjo



Vibrio metchnikovii *spirillium serpens* *Proteus vulgaris*

پمپ پروتونی PMF(Proton Motive Force)

حال سوال آنست که باکتری انرژی لازم برای حرکت دادن فلاژل را چگونه به دست می آورد. معمولا روش کسب انرژی فلاژل مشابه چیزی است که در چرخه ی انتقال الکترون رخ می دهد و از Proton motive force یا پمپ پروتونی استفاده می شود.

در برخی باکتری ها که معمولا باکتری های آلکالوفیل(قلیادوست) هستند، مانند *Vibrio cholera* بجای وجود پمپ پروتونی، پمپ سدیمی (Sodium ion gradient) و بجای H^+، در آن ها Na^+ عملکرد دارد.

یکی از ویژگی های مهمی که در دسته بندی و متمایز کردن باکتری ها وجود دارد، حرکت کردن و حرکت نکردن است. یعنی فلاژل داشتن و نداشتن آن.

روش تشخیص متحرک یا غیرمتحرک بودن باکتری ها:

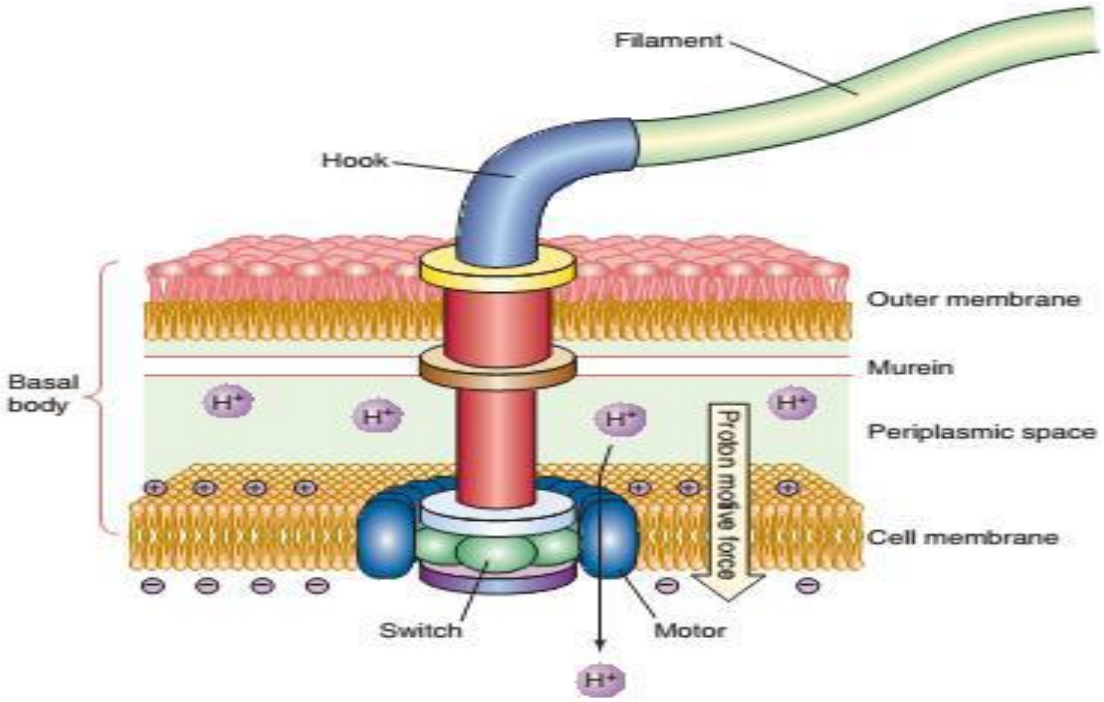
اگر یک محیط ژل مانند و نیمه جامد که سفت و غلیظ نباشد، داشته باشیم و باکتری را به طرزی عمود به کمک وسیله ای به نام آرنس که یک میله است، برداریم و مستقیم درون محیط نیمه جامد قرار دهیم و میله را خارج کنیم، بعد از چند روز و رشد کردن باکتری ها، ممکن است دو حالت رخ دهد. یک لوله کاملا کدر شده و نشان از حرکت باکتری از نقاط اولیه به نقاط جدید است و حالت دیگر که باکتری ها در اطراف همان نقطه ای که آرنس را وارد کردیم رشد کرده و حرکت نکرده است. مسلّم است که باکتری کوجود در لوله ی کدر شده متحرک بوده و فلاژل داشته است و دیگری فاقد آن بوده است. معمولا از محیطی به نام SIM برای تعیین حرکت باکتری ها استفاده می شود.

در روشی دیگر هم به نام Hanging Drop یا قطره آویزان یا معلّق، از میکروسکوپ استفاده می شود. لام هایی مخصوص دارد که فرورفته است و قطره برداشت شده از محیط کشت در آن قرار می گیرد و بعد قرار گیری لامل برروی آن، می توان زیر میکروسکوپ مشاهده کرد و در صورت وجود باکتری که متحرک باشد، کاملا حرکات باکتری در عدسی های بالا قابل مشاهده است. البته این روش برای همه انواع باکتری پاسخ گو نیست.

سرای دانشجو SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

ساختار فلاژل Flagella structure

از سه قسمت تشکیل شده است. در پایینی ترین بخش که در غشای سیتوپلاسمی قراردارد یک موتور که برای حرکت است وجود دارد. یک بخش بین غشای سیتوپلاسمی و غشای خارجی قرار دارد که به آن Basal body یا جسم پایه می گویند و یک قسمت به نام Hook یا قلّاب در ادامه ی آن قراردارد و یک قسمت فیلامان Filament که اصل همان فلاژل است و مشاهده می شود. فلاژل از یک سری حلقه ها تشکیل شده است. تفاوت فلاژل باکتری های گرم مثبت و گرم منفی در آن است که غشای خارجی در باکتری گرم مثبت وجود ندارد. پس در باکتری های گرم مثبت ۲ حلقه و در گرم منفی ها ۴ حلقه وجود دارد. پپتیدوگلیکان موجود در گرم مثبت ها بسیار قطور است و نیازی به حلقه ی موجود در پپتیدوگلیکان موجود در ساختار فلاژل باکتری های گرم منفی نیست. در گرم مثبت ها فقط حلقه ی S و M وجود دارد؛ در گرم منفی ها حلقه های LوS,M,P وجود دارد.



موتور (پمپ پروتونی) نیرو را از طریق دسته به فیلامان انتقال می دهد.(مشابه آنچه در زنجیره انتقال الکترون F0-F1رخ می دهد.) Murein همان پپتیدوگلیکان است که در توضیحات شکل وجود دارد.

رنگ آمیزی خاص فلاژل، Tonic acid تانیک اسید نام دارد و فقط باعث افزایش قطر فلاژل می شود و با افزایش قطر می توان آن را رنگ آمیزی کرد.

پیلی Pili(Fimbriae)

بخش دیگری از اجزای Optional باکتری هاست یعنی ممکن است باشد یا نباشد. معمولا Pili و Fimbriae با یک معنا در نظر گرفته می شوند.اما عملا معنای متفاوتی دارند.Fimbriae مژک هایی هستند که وظیفه اتصال و چسبیدن را برعهده دارند ولی Pili همان Sex Pillusمژک های هستند که در ارتباط جنسی باکتری ها نقش دارند که هم یوغی یا Conjugation نام دارد. (انتقال محتوای ژنتیکی از یک باکتری به باکتری دیگر Conjugation نام دارد.) ممکن است صد ها تا دویست تا Fimbriae اطراف باکتری وجود داشته باشد اما هر باکتری فقط ۱ تا ۴ Pili دارد. Sex Pillus بلند است اما

سرای دانشجو SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

Fimbriae ها کوتاه هستند. ممکن است باکتری ای Fimbriae داشته باشد ولی Pili نداشته باشد. مژک ها از واحد های پروتئینی به نام Pilin تشکیل شده است و معمولا Pili در گرم منفی ها وجود دارد. کار آن ها Colonization استقرار باکتری و اتصال باکتری به سلول میزبان است که به آن ها مولکول های Adhesion می گویند.

بعضی مواقع در برخی باکتری ها فعالیت Evasin توسط Pili ها رخ می دهد. یعنی فرآیندی که باعث فرار باکتری از سیستم دفاعی میزبان می شود به عنوان مثال در نایسریا گنوره *Neisseria Gonorrhoeae*

گاهی هم Pili نقش Invasive با تهاجمی دارد مثل *Barnotella*

دربسیاری از موارد Pili در جذب DNA خارجی نقش دارد که هم یوغی یا Conjugation نام دارد. همچنین باکتری می تواند حرکات ریزی توسط Pili ها داشته باشد که به آن حرکت Twiching می گویند.

نوعی حرکت وجود دارد به نام حرکت (در بطری باز کن) که حرکت مارپیچی است و حاصل فعالیت فلاژل می باشد

انواع حرکت های باکتری:

۱-Tumblingیا غلتیدن ۲-Swarming یا خزیدن که این دو به همراه حرکت در بطری باز کن مربوط فعالیت فلاژل هستند و ۳- Twiching که حرکت کوچک مربوط به Pili هاست.

اسپور یا اندوسپور Spores or Endospores

حالتی است که در بعضی باکتری ها در مواقع استرس و تنش محیطی ایجاد می شود از جمله فقر غذایی محیط و... مثل باسیلوس انتراسیس *Bacillus anthracis* یا کلستروديوم بوتولینوم *Clostridium botulinum* که تضعیف شده ی آن برای بوتاکس استفاده می شود.

اکثر کلستروديوم ها دارای فرم خاصی از زندگی به نام اسپورینگ هستند که این فرم خاص زندگی، پاسخی است که باکتری به شرایط ناامن محیط می دهد. یعنی باکتری وارد فازی می شود که بتواند از آن شرایط ناامن جان سالم به در ببرد.

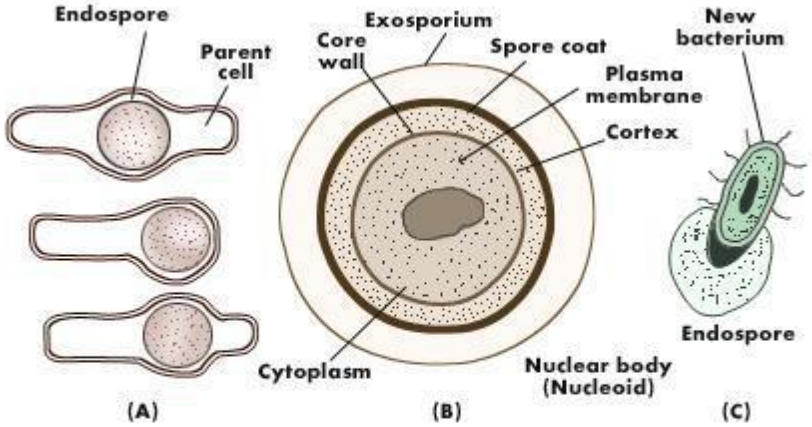
اسپورینگ(Sporing) : نوع خاصی از مقاومت باکتری اسن که پاسخ به استرس هایی مانند دمای بالا، خشکی، سرما و یخ زدگی، تشعشعات، محیط اسیدی، مواد ضدعفونی کننده و... . اسپورینگ می تواند بامتری را بسیار مقاوم کند مثلا کلستروديوم بوتولینوم در حالت اسپور می تواند به مدت ۵ تا ۸ ساعت در آب جوش دوام آورد. به سبب مقاوم بودن این باکتری ها مقدار آن ها در اطراف ما نیز بیسار است. اسپور فرم تکثیری باکتری نیست و به گونه ای نیست که باکتری بتواند چندین اسپور دیگر تولید کند.

باکتری ای که وارد فرم اسپوری شده می تواند دوباره از آن حالت خارج شود. در صورت تبدیل فرم یک باکتری به حالت اسپوری می گوییم Sporolation رخ داده و اگر یک باکتری از فرم اسپوری خارج شود و به حالت اولیه برگردد، Vegetation گفته می شود. ساختار اسپور، ساختار بسیار متفاوتی با فرم عادی باکتری است و اسپور از لایه های متفاوتی ایجاد می شود که این لایه ها ذخیره ژنتیکی باکتری را نکه می دارند و از ساختار باکتری محافظت می کنند و تغییراتی را ایجاد می کنند تا باکتری از بین نرود.

سرای دانشجو SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

برای تبدیل به فرم اسپوری باید شرایط خاصی حاکم باشد؛ باید سیگنال های ژنتیکی وجود داشته باشد، فقر فسفات، کربن، نیتروژن موجود در محیط و ... از عوامل تحریک Sporolation هستند. همچنین باکتری باید در چرخه سکون یا Stationary باشد.

ساختار باکتری در فرم اسپوری : باکتری در فرم اسپوری هسته ای دارد که و همه ی رویداد های درون اپور در آن رخ می دهد هر چند در گستره ی بسیار کمتر نسبت به فرم عادی باکتری. ماده ژنتیکی وجود دارد، همانند سازی،رونویسی،ترجمه انجام می شود، ولی در گستره ی بسیار کم. فعالیت های متابولیسمی انجام می شوند اما نه مانند کربس و... ؛ 3PG یا همان تری فسفوگلیسرید تولید می شود.

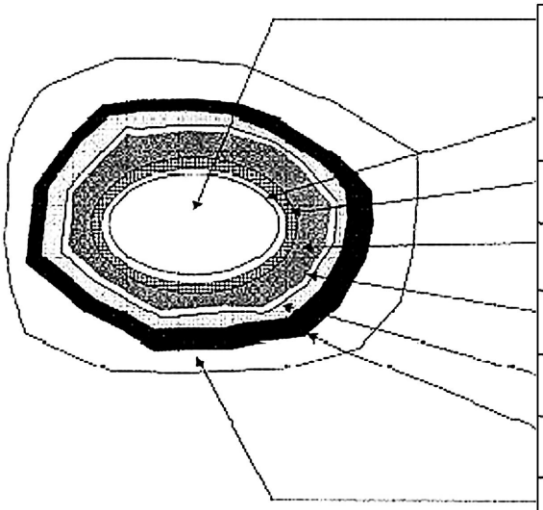


Endospore formation. A, Endospores according to their position in parent cells. B, An edospore in cross-section. C, Germination of endospore

دور هسته توسط لایه ای به نام Spore wall پوشیده شده و از جنس پپتیدوگیکان می باشد، و توسط بخش دیگری به نام Cortex پوشیده می شود که از بین رفتن آن برای خارج شدن از حالت اسپوری و بازگشت به فرم Vegetative حائز اهمیت است. سپس لایه به نام Coat وجود دارد و پس از آن لایه ای که به آن Exosporium مه در خارج باکتری ایجاد می شود.

اسپور بر اساس جایگاه قرارگیری Core فرم های متفاوتی دارد، در مرکز قرار داشته باشد Central ممکن است در انتها قرار داشته باشد Terminal یا ممکن است تزدیک انتها قرار داشته باشد که به آن Sub terminal می گویند.

سرای دانشجو
SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo



Core	DNA, RNA, Proteins, SASPs, DPA, Ca^{2+}
Inner membrane	Lipid/Protein
Germ cell wall	Peptidoglycan
Cortex	Modified peptidoglycan
Outer membrane	Lipid/Protein
Inner spore coats	Proteins
Outer spore coats	Proteins
Exosporium	Proteins

در Core اسپور،DNA,RNA،پروتئین و گروهی از اسید های پایدار کوچک وجود دارند که به آن ها SASB گفته می شود که به مقاومت اسپور کمک می کند، چه از لحاظ ضربات فیزیکی و چه گرما و ... . Spore wall از جنس پتیدوگلیکان طبیعی است، ولی Cortex از جنس پپتیدوگلیکان غیرطبیعی است و Coat و لایه Exosporium در لایه های خارجی تر قرار دارند.

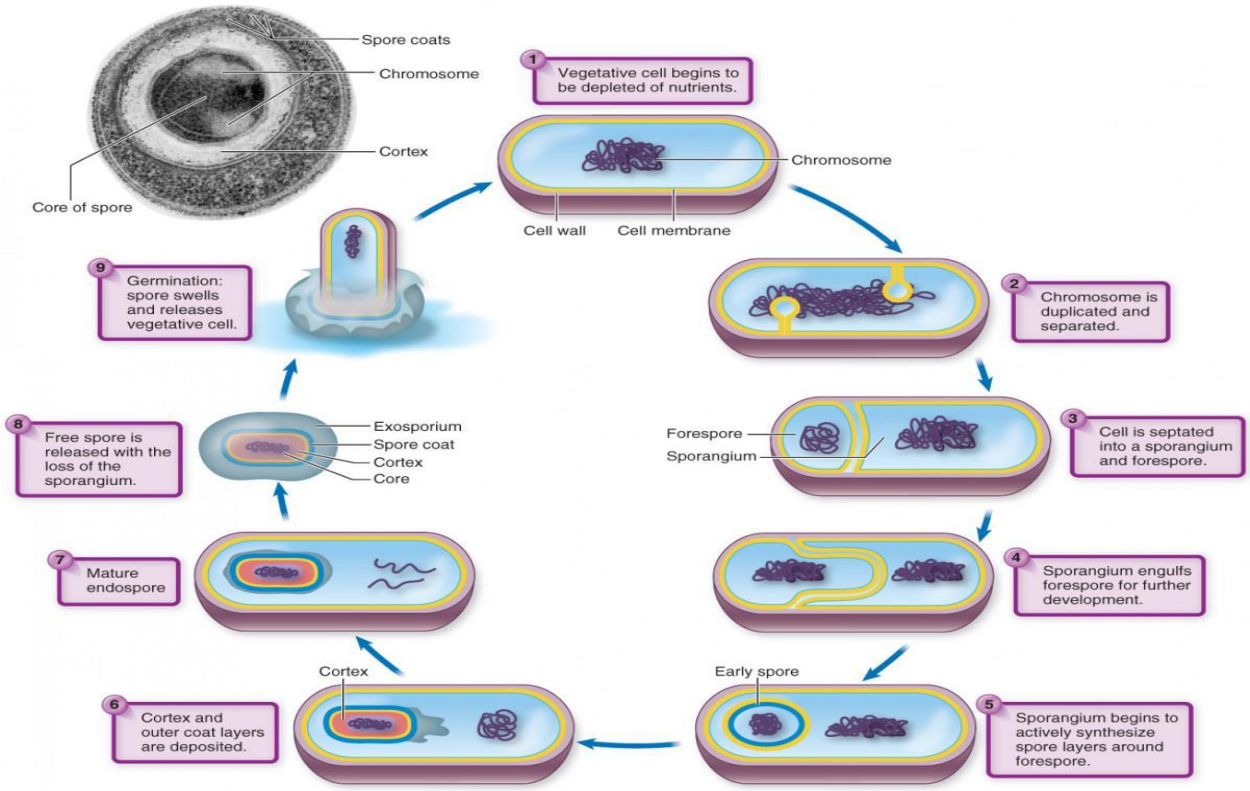
همانطور که در تصویر صفحه ی بعد مشاهده می کنید، چرخه ی تبدیل فرم های Spore و Vegetative به هم به نمایش درآمده است.

تبدیل فرم Vegetative به فرم اسپوری چند مرحله دارد. قبل از ایجاد فقر فسفات و کربن و نیتروژن و تولید سیگنال های الکتریکی و قرار داشتن باکتری در فاز سکون یا Stationary ، کروموزوم باکتری به صورت Duplicate تقسیم می شود و دو قسمت می ش.د. بخش کوچک تر در یک سمت و بخش بزرکتر در سمت دیگر باکتری قرار می گیرند، بخش بزرگ Sporangium نام دارد و بخش کوچکتر Forespore نام دارد.سپس یک دیواره یا سپتوم بین آن ها تشکیل می شود و فضا داخل را به دو بخش تقسیم می کند که بخش کوچکی در Forespore و بخش دیگر در Sporangium قرار می گیرد، سپس Sporangium شروع به بلعیدن یا Involve کردن بخش کوچکتر می کند.

شروع مرحله ی Spore همان بلعیده شدن توسط بخش بزرگتر است. باکتری در این مرحله Early Spore گفته می شود که بعد از مدتی کم کم بزرگ تر می شود و از دورن سلول جوانه می زند و بیرون می آید. بخش های مهم کروموزوم را دارد و دیواره های خاصی اطرافش را پوشانده است. برای اینکه Vegetation اتفاق بیفتد و باکتری از فرم اسپوری خارج شود، باید دوباره شرایط خاصی ایجاد شود از جمله تامین کمبود های باکتری مانند آب و املاح و الکترولیت ها و ... .سپس باید سایشی در سطح اسپور به وجود بیاید تا دو رسپتور D آگنوزین و L آلانین بیرون آیند. حال اگر آلانین و آگنوزین در محیط وجود داشته باشند، اتصال لیگاند با رسپتور سبب می شود جریانی شکل گیرد که طی آن به ترتیب لایه های Coat و Cortex و Spore Wall از هم جدا شوند، آب و الکترولیت به داخل باکتری وارد شود و باکتری از فرم اسپوری خارج شود و به فرم Vegetative تبدیل شود و فعالیت هایش را دوباره آغاز کند و متابولیسم اصلی خود را مجددا شروع کند.

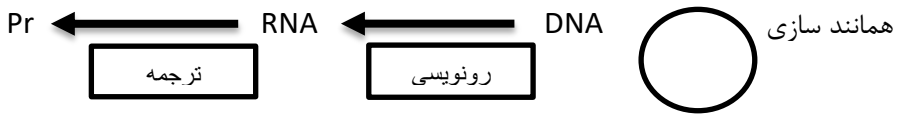
سرای دانشجو
SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



نکته: باکتری های دارای چرخه Sporolation فلاژل ندارند.

نکته: Central Dogma سنترال داکما در باکتری ها هم وجود دارد یعنی زمانی که ژن یک پروتئین وجود داشته باشد، تولید آن پروتئین دشواری خاصی نخواهد داشت.



نکته: ژن هایی که در قسمت کوچکتر از باکتری حذف می شوند، حاوی اطلاعات حیاتی برای بقای باکتری نبوده و باکتری آن ها را دوباره می سازد.

سئوال: علت جوشاندن کنسرو ها چیست علی رغم آن که می دانیم باکتری های اسپور دار مانند کلستروديوم ۵تا۸ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه دوام می آورند؟

عاملی که بیماری بوتولیسم را ایجاد می کند اسپور نیست بلکه سم پروتئینی آن می باشد که برخلاف اسپور نسبت به حرارت مقاوم نیست و بعد از جوشاندن از بین می رود؛ به سبب از بین رفتن این پروتئین ها، گازی هم تولید می شود که سبب تورم کنسرو می شود.

سرای دانشجو
SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

اجزای سلول باکتری در گرم مثبت و گرم منفی:

Components of Bacterial Cells

Structure	Composition	Distribution[a]		
		Gram-Negative Cell	Gram-Positive Cell	Mollicutes (Mycoplasmas)
Envelope				
Capsule (slime layer)	Polysaccharide or polypeptide	+ or −	+ or −	−
Wall		+	+	−
Outer membrane	Proteins, phospholipids, and lipopolysaccharide	+	−	−
Peptidoglycan layer	Murein (+ teichoate in Gram-positive cells)	+	+	−
Periplasm	Proteins and oligosaccharides in solution	+	−	−
Cell membrane	Proteins, phospholipids	+	+	+
Appendages				
Pili (fimbriae)	Protein (pilin)	+ or −	+ or −	−
Flagella	Proteins (flagellin plus others)	+ or −	+ or −	−
Core				
Cytosol	Polyribosomes, proteins, carbohydrates (glycogen)	+	+	+
Nucleoid	DNA with associated RNA and proteins	+	+	+
Plasmids	DNA	+ or −	+ or −	+ or −
Endospore				
All cell components plus dipicolinate and special envelope components		−	+ or −	−

[a] "+" indicates the structure is invariably present, "−" indicates it is invariably absent, and "+ or −" indicates that the structure is present is some species or strains and absent in others.

نویسنده: نیایش نقدی پور **ویرایش: بشری خراسانچی**

https://telegram.me/sarayedaneshjo

جزوه باکتری شناسی

دکتر سلیمانپور

(جلسه پنجم – کلیات باکتری)

سرای دانشجو
SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

چرخه ی رشد باکتری ها:

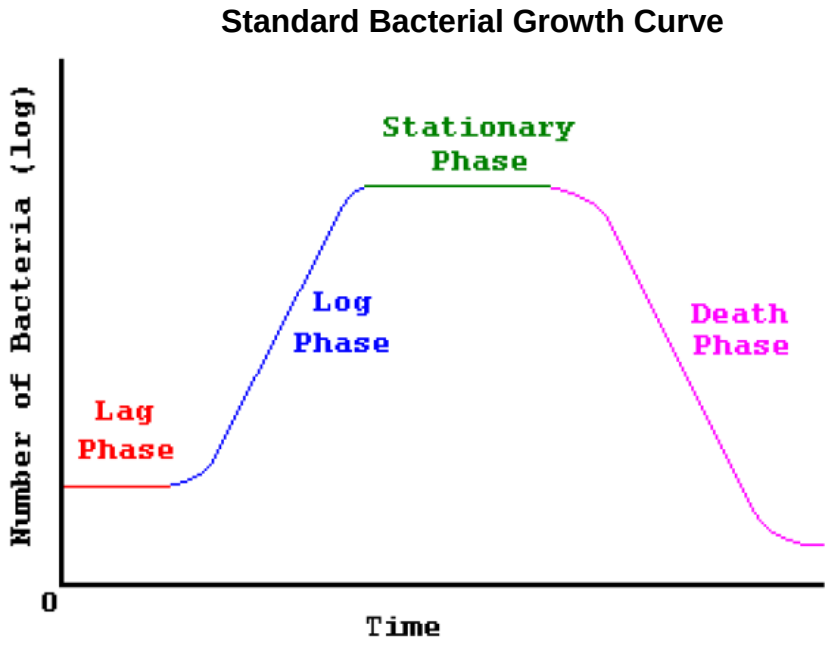
یک باکتری مثل E.Coli را وقتی کشت می دهیم، زمانی طول می کشد تا باکتری تکثیر شده و تقسیم دوتایی انجام دهد. به این زمان **Duplication Time**یا **Generating Time** می گویند. معمولا در باکتری هایی که امروز کشت می دهیم و فردا می توانیم کلونی هایشان را مشاهده کنیم، زمان مد نظر ۲۰ دقیقه است.

- اگر هیچ کنترلی بر رشد باکتری ها اعمال نشود و عملا فاز مرگ(Death Phase)وجود نداشته باشد ، بعد از ۴۸ ساعت ، 2^{144}باکتری خواهیم داشت که اگر وزن هر باکتری 10^{-12}gr باشد ، بعد از ۴۸ ساعت کلونی ای به وزن 2.2 $\times 10^{31}$gr خواهیم داشت که ۴۰۰۰برابر وزن کره ی زمین است. با مثال ذکر شده به این نتیجه می رسیم که حتما باید نظارت کنترلی روی رشد باکتری ها وجود داشته باشد .به همین دلیل رشد باکتری ها خود به خود محدود شونده(Self-Limiting) است و پس از مدتی تعدادی از باکتری ها می میرند.

نکته: در چرخه رشد زمانی وجود دارد که باکتری به صورت لگاریتمی رشد می کند و این زمان خود به خود محدود شونده(Self-Limiting) است و حتما بعد از ۳ تا ۵ ساعت متوقف شود(به دلیل این که مواد غذایی مورد نیاز باکتری تمام می شود.)

- اگر بخواهیم باکتری به رشدش ادامه دهد ،لازم است تا کنترل های دیگری اعمال شود .

چرخه ی رشد:چرخه ای است که رشد باکتری ها را براساس نمودار نشان می دهد و ۴ مرحله مهم دارد.



۱.مرحله Lag (فاز تاخیری)

۲.مرحلهLog(Exponential Phaseیا Log Phase)

۳.مرحله سکون(Stationary Phase)

۴.مرحله مرگ(Decline Phase یا Death Phase)

سرای دانشجو
SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

۱.**فاز Lag**: در این مرحله باکتری هنوز در حال آشنا شدن با محیط است(در حال Adjustشدن با محیط).باکتری در این **مرحله آنزیم های مورد نیازش را می سازد**. نکته ی مهم این است که باکتری در این مرحله اصلا **تقسیم نمی شود** .باکتری در بزرگترین اندازه ی خودش است . نمودار حد نمو(سرعت رشد) که در این فاز موازی با محور زمان است، صفر می باشد.

- ❖ *چون در مرحله Lag، باکتری در حال سازگار شدن با محیط است، اگر یک باکتری را از یک محیط برداریم و در محیط کشت مشابه قرار دهیم، باکتری رشدش را از همان مرحله ای که هست ادامه می دهد . اما اگر باکتری را روی محیط کشت غیرمشابه قرار دهیم دوباره برمی گردد و از فاز Lag مسیرش را ادامه می دهد زیرا فاز تاخیری(Lag Phase) مرحله ی سازگار شدن با محیط جدید است.*

۲.**فاز Log**: مرحله ی تکثیر و تقسیم دوتایی است .در این مرحله اصطلاحات Generation Time(Gt)و Duplication Time(Dt)کاربرد پیدا می کند .

Generation Time (G):
•G = T / 3.3 Log (Nt/N0)

- ❖ زمان تکثیر(Dt) در خیلی از باکتری ها با هم متفاوت است.این زمان برایE.Coli ، ۲۰ دقیقه است. و برای مثال در مایکو باکتریوم توبرکلوزیس ممکن است تا ۲۰ ساعت زمان ببرد.*(مایکوباکتریوم از باکتری هایی است که ممکن است ۲ ماه طول بکشد تا کلونی اش را در محیط کشت بتوان مشاهده کرد.)*

در بعضی از باکتری ها مثل Mycobacterium Leprae*(عامل جزام)* و ترپونما پالیدوم (عامل سیفلیس) زمان تکثیر ۳۰ روز است. بنابراین عملا کشتش امکان پذیر نیست و برای تشخیص این باکتری اصلا از کشت دادن استفاده نمی کنیم.

- ❖ در فاز Log باکتری جوان است و بهترین دوره برای این که باکتری را با آنتی بیوتیک از بین ببریم این مرحله است*(بیشترین تاثیر آنتی بیوتیک ها در دوره ی فاز لگاریتمی است)*. و در این دوره از زندگی، باکتری ها **توکسین** تولید می کنند *(نادر باکتری هایی هستند که توکسینشان بعد از مرگ رها می شود مانند: کورینه باکتریوم دیفتریه که باید بمیرد تا توکسینش آزاد شود.)*

باکتری در این فاز رشد متعادلی دارد و حد نمو(سرعت رشد) اش ثابت است .از نظر پلی مورفیسم(چندشکلی) و اندازه نیز در شرایط متعادل و یکسانی هستند یعنی در واقع پلی مورفیسم وجود ندارد (چون باکتری ها شبیه هم اند).

۳.**فازStationary**: همین که باکتری وارد این مرحله از زندگی می شود پلی مورفیسم باعث می شود که اندازه ی پروتئین ها متفاوت باشد.باکتری ها در این مرحلا از نظر اندازه متفاوتند و همانطور که اشاره شد در فاز سکون ،پلی مورفیسم دیده می شود و حد نمو باکتری ها در این مرحله صفر است.*(به دلیل موازی بودن نمودار با محور زمان).*

- ❖ در این فاز باکتری کپسول تولید می کند. همچنین اسپور در این مرحله تولید می شود .

در فاز سکون تعداد باکتری های زنده ثابت است(همان میزان که باکتری ها از بین می روند ،به همان میزان باکتری ایجاد می شود) ولی تعداد کل باکتری ها(زنده و غیرزنده) زیاد می شود .

این مرحله آنقدر ادامه می یابد تا مواد غذایی تمام شده و مواد زاید هم زیاد شود.اینجاست که باکتری وارد فاز مرگ(Death Phase) می شود.

سرای دانشجو
SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

۴.فاز Death: در این مرحله باکتری به صورت لگاریتمی و فزاینده از بین می رود.

در این مرحله باکتری ها شروع به مردن می کنند (سرعت رشد منفی-مرگ لگاریتمی)اما به صفر نمی رسند چون از بقایای باکتری های قبلی استفاده می کنند(به حد ثابتی می رسند).تعداد کمی از باکتری ها ممکن است تا سال ها یا ماه ها باقی بمانند.

*حد نمودار در مراحل تاخیری، سکون و مرگ به دلیل موازی بودن نمودار با محور زمان،صفر است.

*بعضی باکتری ها استثنا (کورینه باکتریوم دیفتریه)در این مرحله توکسین ایجاد می کنند.عامل دیفتری اگزوتوکسین را در این مرحله با از بین رفتن،ازاد می کند.

Table 4–2. Phases of the Microbial Growth Curve.

Phase	Growth Rate
Lag	Zero
Exponential	Constant
Maximum stationary	Zero
Decline	Negative (death)

باکتری ای را که از بافت مریض جدا کرده ایم ابتدا کشت می دهیم سپس کلونی ها رشد می کنند. این کلونی ها را برداشت می کنیم و مرحله بعدی تشخیص است .که به پزشک اعلام می شود که چه نوع آنتی بیوتیکی برای باکتری مورد نظر موثر است.

به این منظور باکتری را به صورت یکدست در محیط کشت، کشت می دهیم(کشت سفره ای) و بعد از دیسک های آنتی بیوتیکی روی این محیط استفاده می کنیم .بعد از ۴۸ ساعت که به آن مراجعه می کنیم مشاهده می شود که هاله های عدم رشد دور بعضی از کلونی های باکتریایی تشکیل شده است. این هاله ها نشان دهنده این است که باکتری مرده و آنتی بیوتیک موثر بوده است.سپس هاله ی عدم رشد را اندازه می گیریم ، این اندازه را با جدول استاندارد مقایسه می کنیم و به پزشک اعلام می کنیم که باکتری جداشده به چه آنتی بیوتیک هایی حساس و به چه آنتی بیوتیک هایی مقاوم است.

آنتی بیوگرام(*به این روش Disk Deffusion یا Kirby-Bauer می گویند*)

غلظتی از باکتری باید به کار برده شود که در همه جای جهان یکسان باشد بنابراین برای استاندارد سازی از لوله هایی به نام **نیم مک فارلن** استفاده می شود. در نیم مک فارلن کلرید باریم و اسید سولفوریک با نسبتی خاص با هم مخلوط می شوند که کدورتی ایجاد می کنند . حالا باید از باکتری به میزانی در لوله ی محیط کشت بریزیم که کدورتی معادل کدورت نیم مک فارلن ایجاد شود.سپس روی محیط سفره ای ،کشت می دهیم .

- *نکته مهم: دقت شود که باکتری باید در فاز لگاریتمی باشد چون باید بیشترین حساسیت را به آنتی بیوتیک داشته باشد.*

پس لازم می دانیم مقداری از باکتری ها را داخل محیط کشت ببریم، باکتری بعد از ۱-۳ ساعت وارد مرحله Log می شود و کدورت آن هم اندازه کدورت نیم مک فارلن می شود آن وقت باکتری را روی محیط کشت برده و آنتی بیوگرام انجام می دهیم.

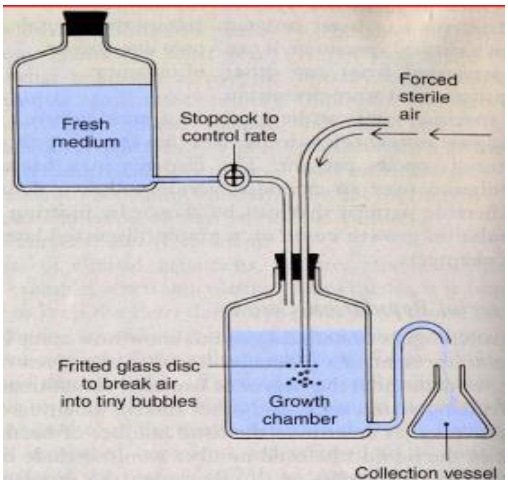
سرای دانشجو SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

اگر در محیط کشت انتی بیوگرام باکتری زیاد داشته باشیم ، مقاومت کاذب ایجاد می شود و بر عکس اگر تعداد باکتری ها کم باشد ، حساسیت کاذب ایجاد می شود.

بعضی از باکتری ها از روش تقسیم بندی دوتایی تکثیر نمی شوند: مایکو پلاسما توسط جوانه زدن(Budding)،

استرپتو مایسز ها Conidios Pore ها در سلول های نخینه مانند رشد می کنند.

بعضی اوقات انسان فرآورده هایی را از باکتری ها می سازد(مانند واکسن).بنابراین باید به طریقی از مرگ باکتری ها جلوگیری شود .برای این هدف از روش هایی به نام **Chemostat یا Turbidostat** استفاده می شود که به ما میزان مواد زاید و میزان مواد غذایی را نشان می دهد.(*ورودی مواد غذایی و خروجی مواد زاید را کنترل می کند و نمی گذارد که مواد زاید به قدری زیاد شود که باکتری بمیرد یا آنقدر مواد غذایی کم بشود که باکتری از بین برود*). در نتیجه تعادلی ایجاد می کند که باکتری دایما رشد می کند.(*بعضی اوقات هم سعی می کنیم باکتری را در فاز لگاریتمی نگه داریم).



در یک چرخه رشد باکتری ها احتیاجاتی دارند که این احتیاجات در ۴ دسته مهم طبقه بندی می شوند.

۱. **دما(Temperature)**: بعضی از باکتری ها در یک دمای خاص رشد می کنند و در دمایی خاص اصلا رشد نمی کنند.

از نظر دما باکتری ها به ۳ دسته تقسیم می شوند:

1.Psychrophiles
2.Mesophiles
3.Thermophiles

سایکروفیل ها(*Psychrophiles*): بهترین دمای رشد (Optimal Growth Temp.) برای این دسته زیر ۲۰ درجه است.سایکروفیل ها در محیط سرد هم رشد می کنند(به این دسته از باکتری ها سرما دوست هم گفته می شود.)

- این ویژگی می تواند خصوصیت افتراقی باشد .برای مثال باکتری ها را داخل یخچال می گذاریم. بقیه باکتری ها می میرند قفط سایکروفیل ها زنده می مانند که به این روش غنی سازی با سرما(Cold Enrichment) می گویند.
  مثال: *Yersini Enterocolitica* و *Listeria Monocytogenes*
- کمتر عفونت در انسان ایجاد میکنند.۲باکتری مهم ۱ Yersinia Enterocolitical عفونت های روده ای ایجاد می کند.از خانواده طاعون, دوم۲ Listeria Monocytogenes باعث سقط جنین می شود.در ۴ درجه یخچال هم زنده میماند

مزوفیل ها(*Mesophiles*): باکتری هایی هستند که در دمای بین ۲۰ تا ۴۵ درجه رشد می کنند .

سرای دانشجو
SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

❖ بیشترین و مهم ترین باکتری های مطرح در پزشکی در دسته ی مزوفیل ها هستند و در چشمه های آبگرم سولفوری یافت میشود.

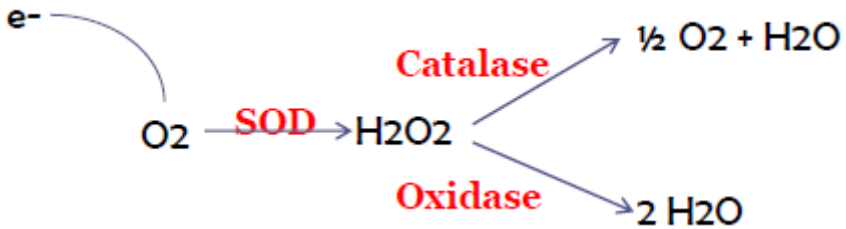
ترموفیل ها :این دسته از باکتری ها گرمادوست اند. بهترین دمای رشدشان ۴۵ تا ۶۰ درجه است (یعنی در دمای بالا رشد می کنند مانند*Stenothermophiles*که این باکتری ها حتی بیشتر از ۶۰درجه را هم دوست دارند .این باکتری ها در بعضی جا ها کاربرد دارند. مانند چشمه های آب گرم.همچنین آنزیم هایی دارند که به دما مقاوم است مثل استفو ترموفیل ساختار سوم این باکتری ها با دماهای بالا سازگاری دارد.

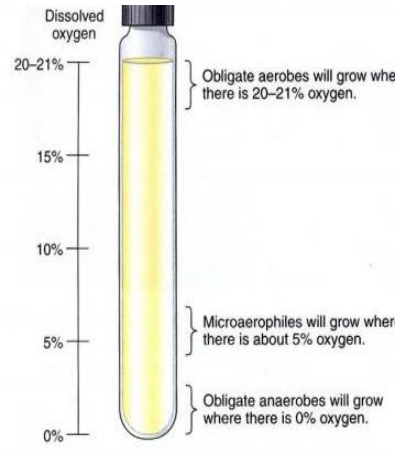
۲. **:اکسیژن** : یکی از مهم ترین خصوصیات باکتری ها استفاده از اکسیژن است.باکتری ها براساس استفاده از اکسیژن در ۴ دسته مهم طبقه بندی می شوند .

۱.باکتری ها ی هوازی مطلق(Aerobic): باکتری هایی هستند که می توانند از اکسیژن به عنوان گیرنده نهایی زنجیره انتقال الکترون استفاده کنند و در نهایت الکترونشان را به اکسیژن بدهند.اگر در نهایت الکترون به اکسیژن داده شود ، یون سوپراکسید تولید می شود که بسیار سمی است در نتیجه باکتری هایی که می توانند اکسیژن را به عنوان گیرنده نهایی الکترون قرار دهند ۳ تا آنزیم دارند تا به تدریج از سمیت یون سوپراکسید کم کنند تا به خودشان آسیب وارد نشود. یکی از این آنزیم ها SOD (سوپراکسید دیسموتاز) است .آنزیم SOD, سوپر اکسید را به آب اکسیژنه تبدیل می کند که این ماده هم سمی است و در نتیجه دو تا آنزیم دیگه که کاتالاز و اکسیداز هستند نیز وارد عمل می شوند و از سمیت اکسیژن کم می کنند و یا کاملا سمیتش را از بین می برند.

❖ در باکتری های هوازی وجود ۳ تا آنزیم الزامی است..

❖ معمولا باکتری های هوازی اجباری را اگر بخواهیم در یک لوله کشت مایع کشت دهیم ، در سطح رشد می کنند.





۲.باکتری های بی هوازی یا بی.هوازی مطلق : باکتری هایی که این ۳ آنزیم را ندارند قطعا نمی توانند اکسیژن را به عنوان گیرنده نهایی الکترون قرار دهند. بنابراین یا ترکیبات آلی و یا ترکیبات معدنی را به عنوان گیرنده ی نهایی الکترون قرار می دهند.

اگر ترکیبات آلی به عنوان گیرنده نهایی الکترون به کار روند = تخمیر
اگر ترکیبات معدنی به عنوان گیرنده نهایی الکترون به کار روند = تنفس بی هوازی

سرای دانشجو
SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

۳.**باکتری های هوازی بی هوازی اختیاری یا بی هوازی اختیاری** : دسته ای از باکتری ها هستند که هم در محیط هوازی و هم در محیط بی هوازی قادر به رشد اند.این دسته از باکتری ها ۳ آنزیم ذکر شده را دارند ولی تا زمانی که اکسیژن موجود است، ترجیحشان استفاده از اکسیژن و شرایط هوازی است.زمانی که اکسیژن نباشد مشکلی ندارند و هم توانایی استفاده از مواد معدنی و هم مواد آلی را دارند.اکثر باکتری های مطرح در پزشکی هم در دسته ی اختیاری ها هستند. امروزه عفونت های بی هوازی ها عفونت های بسیار مهمی هستند.برای مثال این باکتری ها می توانند باعث ایجاد آبسه شوند *(این باکتری ها معمولا در عفونت های دهان و دندان وجود دارند)*. این باکتری ها می توانند در شیار های لثه وجود داشته باشند و چون هوا وجود ندارد می توانند ایجاد عفونت کنند. همچنین در مایعات مفصلی و مایع مغزی نخاعی(CSF) و دیگر مایعات استریل بدن چون هوا وجود ندارد می توانند ایجاد مشکل کنند.

میکروآئروفیل:مثل هلیکوباکتر پیلوری(باکتری موجود در معده-۷۰ تا ۸۰ انسان ها دارند.در بعضی ها مشکلات گوارشی ایجاد میکند:ترش کردن.ریفلاکس معده.درد معده》 ممکن است زخم معده ایجاد شود. اکسیژن فقط ۲تا۵ درصد

اگر باکتری نیاز به دی اکسید کربن داشته باشد به آن کاپنوفیل می گوییم(دی اکسید کربن ۵ تا ۱۰ درصد) نزدیک به سطح رشد میکند.

- ❖ این باکتری ها روی پوست عفونت ایجاد نمی کنند چون هوا وجود دارد.
- ❖ درمان باکتری های بی هوازی نسبتا سخت است .
- ❖ کشت ادرار از نظر باکتری های بی هوازی نداریم.

۴.**میکروارووفیل ها(*Microaerophilic*)**: این باکتری ها به اکسیژن نیاز دارند ولی نه به میزان زیاد! و میزان زیاد اکسیژن، آن ها را از بین خواهد برد.(*۲ تا ۴ درصد اکسیژن نیاز دارند ولی بیشتر از این میزان باکتری را از بین می برد). این دسته از باکتری ها آنزیم ها را دارند اما به میزان کم.

دسته ی کوچکی از باکتری های میکروارووفیل وجود دارند که کمی از آنزیم ها را دارند اما در واقع بی هوازی مطلقند.به این دسته از باکتری ها Aero Tolerance می گویند. این باکتری ها برای مدت کمی می توانند اکسیژن را تحمل کنند.

۳. **PH**: به ۳ دسته تقسیم می شوند: (این قسمت در کلاس تدریس نشده)
   a. **اسدوفیل** :Ph مناسب :۶.۵ تا ۷ -->مثل لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس
   b. **نوتروفیل** : Ph مناسب :۷ تا ۸.۵ (مخصوصا ۷.۲) -->مثل باکتری های پاتوژن
   c. **آلکالوفیل**:Ph مناسب :۸.۴ تا ۹ -->مثل باکتری ویبریوکلرا]

برای کشت این باکتری ها از وسیله ای به نام Jar بی هوازی (Gas Pack) استفاده می شود. Jar بی هوازی ظرفی است که دری بسیار محکم دارد و محیط های کشت را داخل این ظرف قرار می دهند. بعد وسیله ای خاص به نام Gas Packرا داخل ظرف می کنند که اکسیژن محیط ظرف را جذب می کند و محیط، بی هوازی می شود و بدین ترتیب باکتری ها شروع به رشد می کنند.

دستگاه هایی به نامGas Mixerوجود دارند که به قسمت های خاصی از در ظرف متصل شده و اکسیژن و کربن دی اکسید را مکش می کنند و قابل تنظیم اند.

سرای دانشجو SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

*باکتری نسبتا بی هوازی نداریم.

معمولا می توانیم شرایطی را فراهم کنیم که باکتری ها بتوانند از مواد غذایی مورد نیازشان به صورت مصنوعی استفاده کرده و رشد کنند. این شرایط و محیط مصنوعی, **محیط کشت** نام دارد.محیط کشت انواع متعددی دارد و انواع مواد مغذی باکتری درون آن قرار می گیرد. این مواد شامل *نمک,آامونیوم کلراید, گلیسرول و .. است* که در واقع می توانند به رشد باکتری کمک کنند.

بعضی از باکتری ها مواد غذایی خاصی لازم دارند. برای مثال *هموفیلوس ها* که برای رشد نیاز به خون دارند. یا مثلا *مایکو باکتریوم توبرکلوزیس* که یک باکتری سخت رشد است و محیط کشت آن با محیط کشت ازمایشگاهی بسیار متفاوت است. محیط کشتی که برای *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* استفاده می شود، محیط کشتی خاص به نام زیل نلسون است که در این محیط ترکیبات دیگری وجود دارد. مثل سیب زمینی و تخم مرغ که این محیط را می سازند. بنابراین محیط کشت باکتری بر اساس جنس و گونه آن ممکن است متفاوت باشد.

یک سری از باکتری ها سخت رشد(Fastidious) هستند. مثل عامل *سوزاک(نایسریا گونوره آ)*و عامل *مننژیت(باکتری مننگوکوک) که باکتری هایی* سخت رشدند. این باکتری ها به *هر صورت و شکل* رشد نمی کنند. حتی باید شرایط ویژه ای هم برای این باکتری ها فراهم شود تا بتوانند رشد کنند. به همین دلیل یک سری محیط کشت خاص در آزمایشگاه درست می شود که برای هر کدام از این باکتری ها متفاوت است. مثلا در مورد *کلامیدیا*ها که باکتری های درون سلولی هستند *(یعنی نمی توانند در خارج از سلول فعالیت کنند)* و حتما باید از یک سیستم سلولی برای کشت و رشد آن ها استفاده کنیم .*(به راحتی در ازمایشگاه های* Routionقابل انجام نیست و باید از ابزارالات خاصی برای رشد و کشت آن ها استفاده شود.)

سیستم کشت کموستات: کموستات محفظه ای است که مواد غذایی و O2 و گازهای مورد نیاز به صورت ثابت وارد محیط کشت شده و متناسب با آن سوسپانسیون باکتری برداشت می شود . تعداد سلول ثابت باقی مانده و سرعت رشد با میزان جریان محیط کشت نسبت مستقیم دارد. بنابراین با کتری به طور دائم در فاز لگاریتمی قرار دارد

باکتری ها از نظر منبع انرژی و منبع کربن متفاوتند.ابتدا توصیف مختصری در مورد تخمیر میدهیم.

بعضی باکتری ها که اکسیژن در دسترس ندارند ،ممکن است از یک سری مسیر های متابولسیمی دیگر استفاده کنند که یکی از این مسیر ها تخمیر است. **تخمیر** مسیر خاصی است که در واقع خود از ۲ بخش تشکیل شده است.

۱. مسیر هایی که از گلیکولیز وارد تخمیر می شوند.
۲. مسیر هایی که از غیرگلیکولیز وارد تخمیر می شوند.

در مورد گلیکولیز ها Mixed Acid Fermentation که یک مسیر خاص متابولیسیمی است که در واقع در آن گلوکز از مسیر گلیکولیز به پیروات تبدیل می شود و سپس پیروات به استیل کوانزیم A شود و در نهایت استات و فومارات تولید میشود. چیزی که مهم است، تولید بیش از ۴ یا ۵ نوع اسید است که علت نام گذاری (Mixed Acid Fermentation) هم همین است.

*یکی از مهمترین خصایصی است که میتوانیم خانواده کلبسیلا (*Klebsiella*) را از خانواده انتروباکتریاسه (Enterobacteriaceae) جدا کنیم.

سرای دانشجو SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

همه باکتری های انتروباکتریاسه Mixed Acid Fermentation دارند به جز دسته کلبسیلا. (۴ تایی که گفته شد)

در Mixed Acid Fermentation اگر معرفی به نام Methyl Red(Mr) استفاده شود،به رنگ قرمز در می اید که نشان دهنده محیط اسیدی است و وجود Mixed Acid Fermentation اثبات می شود.

مسیر دوم تخمیر، مسیر بوتان دی ال است که نهایتا در این مسیر استوئین ساخته می شود. تست تعیین مسیر بوتان دی ال،با تست ورگی پروسکوئر (VP) متفاوت است که تولید استوئین را سنجش می کنیم.

- ❖ دسته ی کلبسیلا در خانواده انترو باکتریسه VP مثبت هستند .

دو مسیر تخمیری وجود دارد که از گلیکولیز می گذرد. گلوکز به پیروات تبدیل می شود و بعد وارد مسیر تخمیر می شود که در خانواده **انتروباکتریاسه** اهمیت دارد.

همه ی انتروباکتریاسه ها از Mixed Acid Fermentation استفاده می کنند و سنجش تولید اسید با تست MR انجام میشود ،به جز دسته **کلبسیلا**. برای این دسته از مسیر بوتان دی ال و سنجش تولید استوئین استفاده می شود که تست این مورد تست VP است.

- ❖ ***دسته کلبسیلا شامل: کلبسیلا, هافنیا, سراشیا, انتروباکتریا است***

مسیر های دیگری مثل **مسیر بوتریک اسید, مسیر پروپیونات, همولاکتیک فرمانتاسیون** به عنوان مسیر های گلیکوزی از تخمیر وجود دارد.

- ❖ تخمیر در بعضی باکتری ها باید از گلیکولیز عبور کند.

۵ مسیر گلیکولیز گفته شده تا اینجا شامل:

۱. Mixed Acid Fermentation
۲. بوتان دی ال
۳. بوتریک اسید
۴. پروپیونات
۵. همولاکتیک فرمانتاسیون

بعضی مسیر های تخمیری ربطی به گلیکولیز ندارند, که ۳ مسیر هستند:

۱. **مسیر هترولاکتیک فرمانتاسیون**: مسیر اصلی کسب انرژی از چرخه پنتوزفسفات است.در این مسیر نیز مانند Mixed Acid Fermentation اسید تولید می شود .در نتیجه تست MR آن مثبت است ولی به مراتب ضعیف تر از MR است که در Mixed Acid Fermentation بدست می آید.
۲. **مسیر استریک اوز**: زمانی که اسید های آمینه احیا و یا اکسید می شوند, در واقع در مسیر ترکیبات نیتروژن داری است مثل اسید های آمینه که میتوانند گیرنده نهایی الکترون قرار بگیرند و در نهایت ترکیباتی به وجود می آید مثل پوترسین و کاداورین که محصولات بدبویی هستند و بوی زننده ای دارند. *(کاملا مشخص است که مسیر متابولیسمی از این راه است!)*

سرای دانشجو
SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo

۳. **مسیر گلیکوکسیلات:** در این مسیر اسیدهای چرب به عنوان منبع انرژی استفاده می شوند.

از نظر منبع کربن و انرژی باکتری ها به ۴ دسته تقسیم میشوند:

۱) فتواتوتروف
۲) فتوهتروتروف
۳) کمواتوتروف
۴) کموهتروتروف ← اکثر باکتری های مطرح در پزشکی از این دسته هستند.

اگر منبع انرژی باکتری **نور** باشد از پسوند **فتو** برای آن استفاده می کنیم. از پسوند **اتو** برای ارگانیسم هایی استفاده می کنیم که **منبع کربن انها CO_2** (ترکیبات آلی) است.

اگر باکتری از **ترکیبات ارگانیک** به عنوان منبع کربن استفاده کند و از نور به عنوان منبع انرژی استفاده کند، به آن باکتری **فتوهتروتروف** می گوییم.

اگر باکتری از **واکنش های اکسیداسیون و احیا** به عنوان منبع انرژی استفاده کند ،از پسوند **کمو** استفاده میکنیم.

TABLE 7-1 Terms Relating to Energy and Carbon Sources

TERMS RELATING TO ENERGY SOURCE	TERMS RELATING TO CARBON SOURCE	
	Autotrophs (organisms that use CO_2 as a carbon source)	Heterotrophs (organisms that use organic compounds other than CO_2 as a carbon source)
Phototrophs (organisms that use light as an energy source)	**Photoautotrophs** (e.g., algae, plants, some photosynthetic, bacteria including cyanobacteria)	**Photoheterotrophs** (e.g., some photosynthetic bacteria)
Chemotrophs[a] (organisms that use chemicals as an energy source)	**Chemoautotrophs** (e.g., some bacteria)	**Chemoheterotrophs** (e.g., protozoa, fungi, animals, most bacteria)

[a]Chemotrophs can be divided into two categories: (1) chemolithotrophs (or simply lithotrophs) are organisms that use inorganic chemicals as an energy source, and (2) chemoorganotrophs (or simply organotrophs) are organisms that use organic chemicals as an energy source.

نویسنده: نگین اخوان رضایت **ویرایش: علی لبافچی**

سرای دانشجو SARAYEDANESHJO.COM
https://telegram.me/sarayedaneshjo