**بنام خدا**

**نام درس: کنترل خطرات بیولوژیک، شیمیایی و فیزیکی**

**مدرس: منصوره هوشیار**

**دانشکده فنی دخترانه والعصر**

**گروه**: **صنایع غذایی**

**جلسه : 1تا 6**

علم میکروبیولوژی:

میکروبیولوژی مطالعه انواع میکروب هاست و گروه بزرگ و گونه گونی از زیاگان ذره بینی که بصورت تک سلولی یا توده ای از سلولها (کلنی) زندگی میکننداین علم شامل ویروس ها نیز میگردد که ذره بینی بوده وساختار سلولی ندارند. بنابراین سلول میکروبی متمایزاز سلول جانوری و گیاهی است زیرا سلولهای اخیر غالبا قادر به زندگی مستقل در طبیعت نبوده تنها بصورت بخشی از زیاگان چند سلولی بسر میبرند. یک سلول میکروبی عمدتا قادر به انجام فرایندهای رشد تولید مثل وتولید انرژی بصورت مستقل از سایر سلول ها از همان نوع یا نوع دیگر میباشند درکل علم میکروبیولوژی علم شناخت موجودات زنده ریز که با چشم غیر مسلح قابل دیدن نیستند مانند ویروس ها ،باکتری ها، قارچ ها، کپک ها، جلبک ها . میکروبیولوژی به عنوان یکی از مهمترین رشته های علوم زیستی به دو دلیل مورد مطالعه قرار میگیرد:

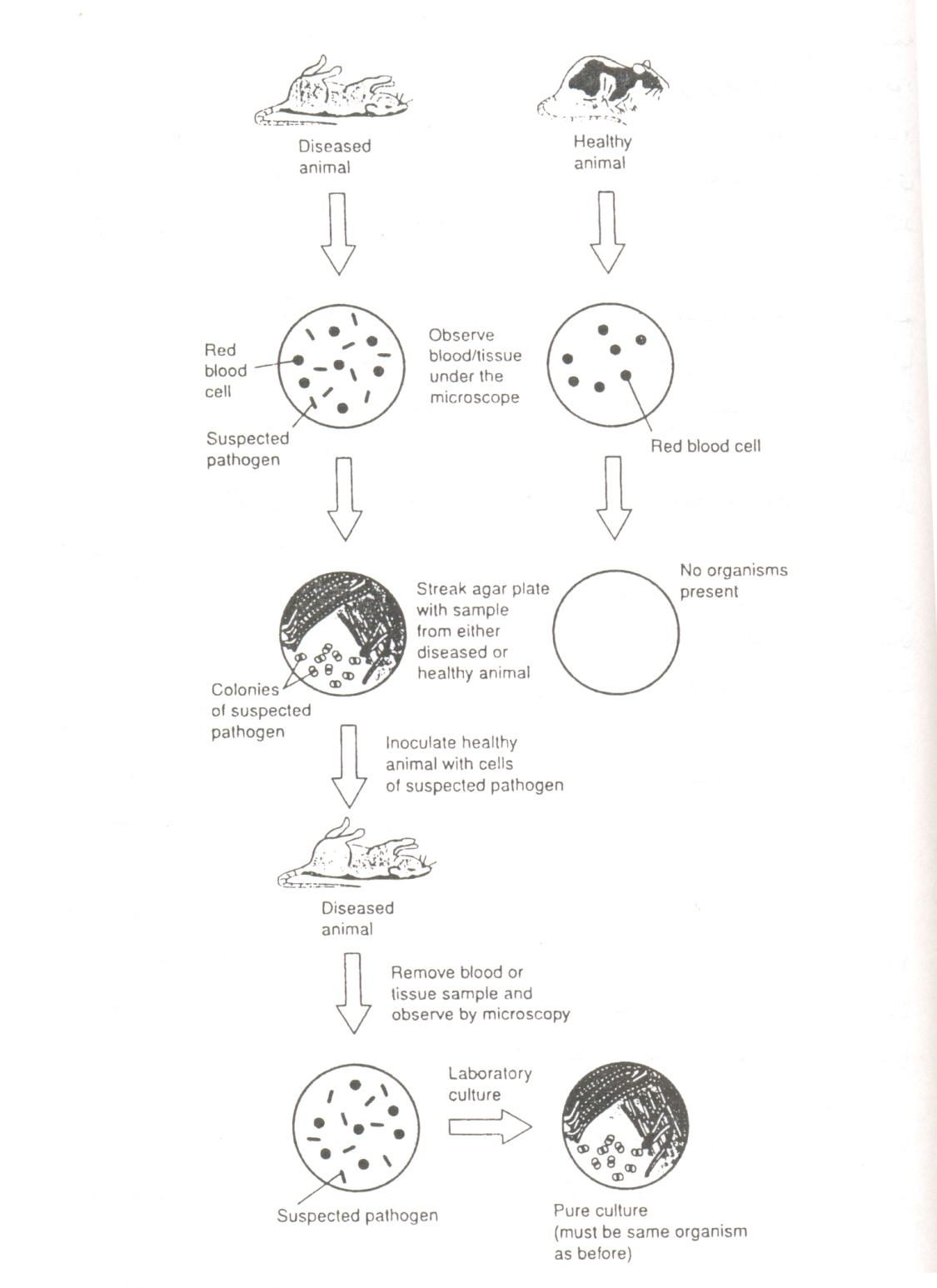
1.**بعنوان یک علم زیست شناسی پایه(**fundamental**)**: میکروبیولوژی ابزار پژوهشی فوق العاده ای جهت درک ماهیت و اهمیت فرایندهای زندگی فراهم میسازد. فهم و درک اصلی و اساسی ما از مطالعه فرایندهای شیمیایی و فیزیکی حیات از بکار گرفتن میکروارگانیسم ها بدست میاید که درباره پایه های میکروبیولوژی بحث میکندکه شامل Immunology (مقاومت بدن در برابر میکروب ها) Eppidemiology (همه گیر شناسی) Etiology (عامل مولد بیماری).

2**. بعنوان علم زیست شناسی کاربردی(**Appliaed**)**: میکروبیولوژی با بسیاری مسائل علمی مهم در پزشکی و کشاورزی و صنعت سروکار دارد . در برخی از بیماریهای مهم انسان و جانوران و گیاهان بوسیله میکروارگانیسم ها رخ میدهد. میکروارگانیسم ها نقش عمده ای در حاصلخیزی خاک ایفا میکند. بسیاری از فرایندهای صنعتی مهم پایه میکروبیولوژی دارند و این امر به پیدایش و توسعه رشته جدیدی بنام بیوتکنولوژی منجر شده است. میکروارگانیسم ها در بیماریزایی و کشاورزی صنایع غذایی انرژی و محیط اهمیت ویژه دارند. کشف میکروبها با اختراع میکروسکوپ ارتباط داشت نخستین کسی که میکروبها را با جزئیات کامل مشاهده کرد تاجر اهل هلند بود.

**Origin of life:** فردبه نام fergas گفت که یک سری موجودات ریز هستندکه ایجادبیماری میکنند که ما آنها را نمیبینیم در زمان ارسطو نظریه منشائ حیات مطرح شد یعنی هر موجود زنده ای از موجود غیر زنده بوجود آمده است.

پاستور نظریه تولید خودبخودی ( spantaneus generation)که هر موجود زنده از موجود زنده مشابه خود به وجود آمده است را ارائه کرد :هرگاه غذایی را مدتی نگه داریم فاسد میشود و انواع باکتری ها در ان رشد میکند بعضی اعتقاد داشتند که این میکروبها بطور خودبخودی از مواد بی جان بوجود امده اند . پاستور نشان داد که این ساختارهای زنده در هوا وجود دارند او اینکار را با عبور هوا از پنبه نشان داد. و از گرما برای از بین بردن الودگی ها استفاده کرد که امروزه این روش را سترون کردن ( sterilization ) می نامند صنایع غذایی مدیون پاستور است زیرا اصول او در صنایع کنسرو سازی و نگهداری از غذاها بکار میرود . پاستور همچنین واکسن بیماری سیاه زخم وبای پرندگان و هاری را کشف کرد.اولین کسی بود که واکسیناسیون را بوجود آورد.

**کخ و نظریه عامل مولدبیماری**: با مطالعه کخ روی *Bacillus anthracis* این نظریه را اثبات کرد. اصول چهارگانه کخ عبارتند از:میکروب باید همواره در جانوران مبتلا به بیماری وجود داشته باشد بر خلاف افراد سالم. میکروب را باید در کشت خالص دور از بدن جانور کشت داد. چنین کشتی با تلقیح در جانوران حساس بایستی علائم بیماری ویژه را فراهم اورد . میکروب را بایستی از جانور بیمار بتوان جدا کردو در شرایط ازمایشگاه کشت داد که باید مشابه میکروب های جدا شده اول باشد.

**نرمال فلور(Normal flora):** میکروب های زنده که در بدن هر جانوری وجود دارد اما بی ضرر است. راههای انتقال بیماری 1- مستقیم که نه از طریق تنفس و نه از طریق غذا منتقل میشود فقط از طریق مقاربتی و تزریق خون فرد مبتلا میشود مانند سوزاک Neasseria gonorra 2- غیر مستقیم: آقای لیستر با مطالعه بر روی مواد ضد عفونی و Streptococcus عامل تب زایمان متوجه شد که این باکتری از طریق هوا و غذا میتواند منتقل شود.(شکل 1) 

شکل.1-اصول کخ برای اثبات اینکه میکروارگانیسم عامل یک بیماری خاص است.

میکروسکوپ و انواع ان:

همانطور که گفته شد اغاز علم میکروبشناسی با اختراع میکروسکوپ در 1677 توسط لوون هوک بود.میکروسکوپها را به دو دسته نوری و الکترونی تقسیم میکنند.

**میکروسکوپ نوری** Optical microscope)): منبع نور بصورت نور مرئی یاپرتوهای ماورائ بنفش است انواع میکروسکوپ نوری متداول عبارتنداز: زمینه روشن، زمینه تاریک، فلوئورسا نس و فاز متضاد. میکروسکوپ نوری به دو شکل ساده (یک عدسی) مرکب(دو عدسی)وجود دارد.امروزه از نوع میکروسکوپ های مرکب بیشتر استفاده میشودکه از عدسی های چشمی و شیئ تشکیل شده است. اجزای میکروسکوپ نوری شامل: یکی از سه نوع عدسی چشمی که دارا ی قدرت x8, x10,x12/5 میباشد ممکن است مورد استفاده قرار گیرد عدسی های شیئ که مهمترین بخش میکروسکوپ میباشد دارای 4 نوع و با بزرگنمایی x4 , x10 ,x40 , 100xمیباشد. و به ترتیب به نامهای عدسی بسیار ضعیف، عدسی کم قدرت، عدسی پر قدرت و عدسی روغنی نامیده میشود. این عدسی ها از طریق صفحه گردان تغییرمکان داده و بر روی صفحه نگهدارنده لام قرار میگیرند عدسی های چشمی در بالای لوله میکروسکوپ و شیئ در پایین آن قرار دارند. عدسی چشمی پرتوهای نورانی که از عدسی شیئ به توسط یک منشور عبور داده شده اند را دریافت میکند. لوله ای که عدسی ها به ان به ان متصلند توسط دو پیچ تنظیم کننده حساس و تنظیم کننده غیر حساس با بدنه میکروسکوپ اتصال میابد بوسیله پیچهای تنظیم گر میتوان فاصله عدسی شیئ را نسبت به جسم مورد ازمایش تغییر داد.

**پایه** (Base): در واقع پایه اسکلت اصلی میکروسکوپ محسوب میشودمنبع نوری اغلب در بخش پایه قرارگرفته است .

**صفحه نگهدارنده لام یا سکوی میکروسکوپ** ( stage):این صفحه محل قرارگیری لام مورد بررسی است و در مرکز آن سوراخی وجود دارد که اجازه عبور پرتوهای نورانی از منبع نور به سمت عدسی هارا میدهد این صفحه درزیر عدسی های شیئ قرارگرفته و به بدنه میکروسکوپ متصل است . پیچهایی بنام پیچهای ماکرومتری و میکرومتری صفحه مذکور را به سمت بالا و پایین حرکت میدهد.

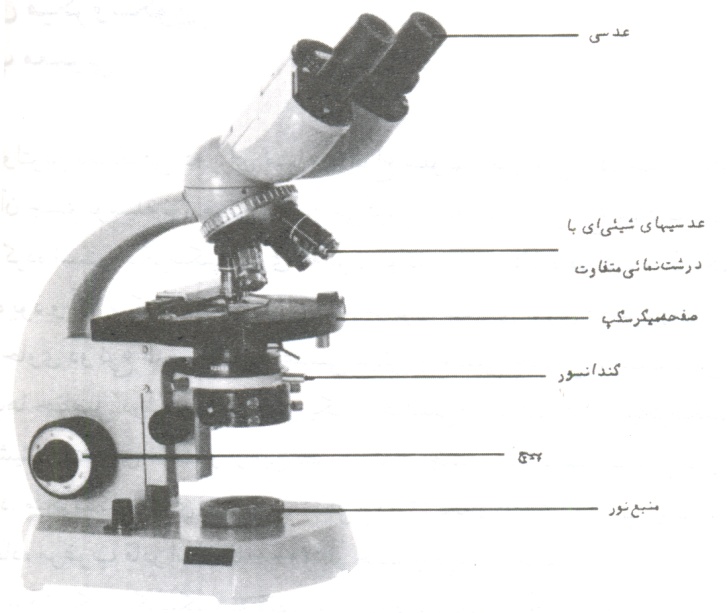
**کندانسور**( condeansor) : درزیر سکوی میکروسکوپ قرار دارد و از چند عدسی تشکیل شده است و عمل ان جمع کردن نور و ارسال ان به داخل عدسی شیئ است . که توسط یک پیچ بطرف بالا و پایین حرکت میکند. غالبا همراه کندانسور یک دیافراگم وجوددارد که عمل ان کنترل مقدار نور ی است که از کندانسور عبور میکند ودارای شاتری است که بادکمه بازو بسته میشود.

**منبع نور**: منبع نور اکثرا یک لامپ الکتریکی است که ممکن است در جلومیکروسکوپ قرار گیرد. پرتوهای نور پس از برخورد با اینه ای که در زیر کندانسور، به درون کندانسور فرستاده میشود. ممکن است منبع نور بطور مستقیم در زیر کندانسور قرارمیگیرد. که دراین حالت نیازی بوجود اینه نمیباشد

**بزرگنمایی میکروسکوپ:**

بزرگنمایی میکروسکوپ : Magnificationبزرگنمایی یا درشت نمایی میکروسکوپ عبارت است ازحاصل ضرب قدرت دو عدسی چشمی و شیئ که با هم مورد استفاده قرار میگیرند. مثلا اگر عدسی چشمی x10 با عدسی روغنی با قدرت x100همراه باشد بزرگنمایی با میکروسکوپ x1000 خواهد بود که بیانگر حاصل ضرب توانایی دو عدسی 10 .100 میباشد.

**توان تفکیک یا قدرت تشخیص**( resolving power ): براساس قدرت تشخیص حداقل فاصله بین دو نقطه است که توسط میکروسکوپ بوضوح و جدا از یکدیگر مشاهده گردند. RF معادل نصف طول موج لامبدا میباشد طول موج نور مریئ 0.7 تا 0.4 میکرون میباشد. بنابراین قطر کوچکترین جسمی که توسط میکروسکپ نوری قابل روئت است برابر 0.2 میکرون میباشد. از سویی قدرت تفکیک عدسی به عاملی بنام ضریب شکست نور بستگی دارد . ضریب شکست هوا کمتراز شیشه است لذا پرتوهای نورانی به هنگام عبوراز شیشه لام به هوا منحرف شده ودچار شکستگی میشوند. این مسئله باعث هدررفتن پرتوهای نورانی شده و عدد روزنه ای را کاهش میدهد در عدسی x100 با استفاده از روغن ایمرسیون ضریب شکست نورکاهش یافته و بنابراین از اتلاف نور در اثر انعکاس و شکست در هوا جلوگیری میشود و در نتیجه نور بیشتری وارد عدسی میگردد. (شکل2)



شکل2-ساختمان میکروسکوپ نوری

موجودات زنده به دو گروه پروکاریوت(Procaryot) و یوکاریوت(Euocaryot) طبقه بندی میشود.

پروکاریوتها به دو گروه سیانوباکترها وباکتری ها تقسیم میشود. باکتری ها به Archeobocteria و Eubacteria تقسیم میشود. ارکیاها اغلب بی هوازی اند وقادر به زندگی در مجاورت هوا نیستند.بسیاری از انها در شرایط غیر عادی زندگی میکنند مثل چشمه های اب گرم و ابهای بسیار شور و ابهاو خاکهای اسیدی و بازی و برخی متان زا هستند و تولید متان بخشی از متابولیسم انرژی انهاست.

یوکاریوت ها به Animal و Plant و protista تقسیم میشود. Protistaبه سه گروه fungi و protozoa و Alga تقسیم میشود.

**ساختمان سلولی پروکاریوت ها:**

سلول پروکاریوتی در هر سطحی نسبت به سلول یوکاریوتی ساده تر است بجزاینکه پوشش سلولی درپروکاریوت ها پیچیده تر است . ساختمان سلولهای پروکاریوتی بایستی دارای خصوصیات زیر باشد:

-محتویات درون سلول را در بر گرفته وانرا از محیط خارج جدا میکند

- اطلاعات ژنتیکی را ذخیره و همانندسازی نماید

- اجزای سلولی را سنتز نماید

- ترکیبات پر انرژی را تولید ذخیره و به مصرف برساند.

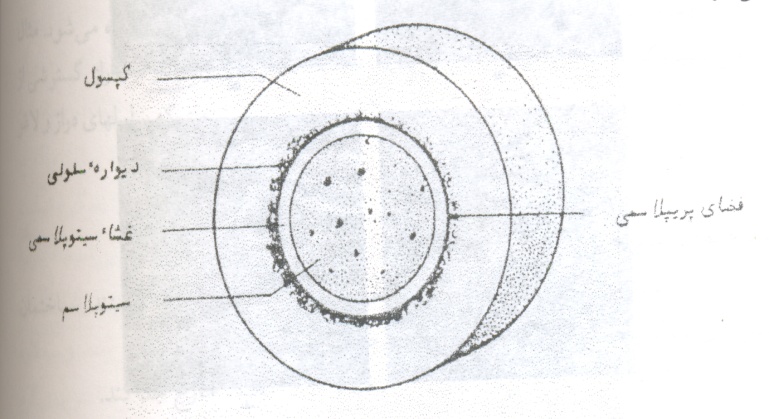
- علاوه بر صفات فوق برخی از باکتری ها دارای حرکت سلولی بوسیله فلاژلا و انتقال اطلاعات ژنتیکی بوسیله پیلای و ذخیره انرژی و واحدهای سازنده مواد هستند.

**شبه هسته Nucleoid**:

شبه هسته پروکاریوتی معدل هسته یوکاریوت است که DNA در ان وجود داردو حاوی یک کروموزوم خطی یا حلقوی است میتواندآنرا به عنوان یک کروموزوم در نظر گرفته و بوسیله متلاشی ساختن ملایم و سانتریفیوژ کردن شبه هسته را جدا کرد.که شامل RNA , RNA , DNAپلیمراز است.

**ساختمانهای سیتوپلاسمی**: سلول های پروکاریوتی فاقد پلاستید های خودکار مانند میتوکندری و کلروپلاست ها هستند. انزیمهای انتقال الکترون این سلولها در غشائ سیتوپلاسمی جای دارند. رنگدانه های فتوسنتزی ( باکتریوکلروفیل )در باکتریهای فتوسنتز کننده در ساختمانهای خاص غشایی قرار دارندکه ممکن است بصورت وزیکل های گرد یا لایه ای یا ورق مانند در زیر غشای سلولی دیده شود. 50٪ پروتئن های سلول در سیتوپلاسم قرار دارند و انزیم های متابولیسمی راه های گلیکولیز و پنتوزفسفات و چرخه گلی اکسالات و چرخه کربس و کاتالاز و دهیدروژناز استراز ها و پروتئاز ها در سیتوپلاسم وجود دارد.

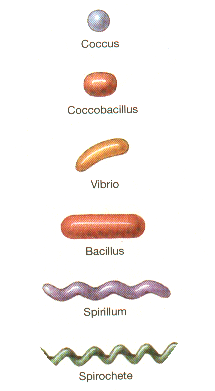
**پوشش سلولی Cell envelop:** اکثر باکتری ها دارای دو نوع ساختار بنام دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی میباشند که سیتوپلاسم را احاطه میکند برخی از آنها ساختار سومی بنام کپسول دارند . لایه هایی که سلولهای پروکاریوتی را احاطه میکند در مجموع پوشش سلولی نامیده میشود. ساختمان و تشکیلات پوشش سلولی در باکتری گرم مثبت و گرم منفی متفاوت است. در واقع این تفاوت موجب تقسیم باکتریها به دو گروه شده است. بسیاری از G+و G- و ارکئوباکتر ها دارای یک لایه شبکه ای دوبعدی بلوری پروتئنی ( لایه s) بعنوان خارجی ترین قسمت از پوشش سلولی هستند این لایه سلول را در برابر انزیم های تخریب کننده دیواره و تهاجم محفظت میکند ودر حفظ شکل سلول و چسبیدن سلول به سطح اپیدرمی میزبان دخالت دارد. (شکل 3)



شکل3-شکل لایه های سطحی اطراف سیتوپلاسم

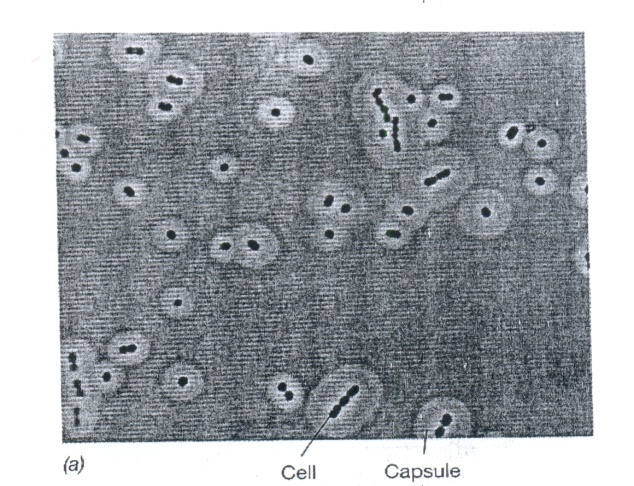
**روش های رنگ امیزی**: به منظور مشاهده بهتر سلول ها بویژه سلولهای کاملا شفاف و غالبا متحرک انها را کشته وسپس رنگ میکنند و در زیر میکروسکوپ مشاهده میکنند. از روی واکنش رنگ امیزی میتوان میکروبها را به دو دسته تقسیم کرد. انواع رنگ ها را میتوان بر اساس تمایل انها نسبت به اجزای سلولی به دو گروه اصلی تقسیم کرد 1- رنگ های مثبت که تمایل قوی نسبت به یک یا چند جز سلول داشته و میتواند قسمت هایی از سلول را رنگ نماید 2- رنگ های منفی که قادر به نفوذ در پوشش سلولی نمیباشدو با فراهم کردن تباین تیره ای در زمینه سبب دیده شدن میکروبها میگردد که برای نشان دادن ساختارهای سطحی سلول زنده بکار میرود. در رنگ امیزی ساده از یک نوع ررنگ استفاده میشود مثل ابی متیلن که باکتری به رنگ ابی در میاید . رنگ های بازی اصولا با DNAو RNA سلول ترکیب میشود رنگ های اسیدی مثل سافرانین و فوشین و قرمز کنگو ترکیبهای سلول و اصولا پروتئن های بازی را رنگ مینماید .سودان سیاه برای رنگ کردن قطرات چربی در باکتریها بکار میرود.

**رنگ های افتراقی**: بر حسب توانایی جذب رنگ و حفظ ان میتوان باکتری ها را به دوگروه تقسیم کرد متداولترین این روش رنگ امیزی گرم میباشد پزشک دانمارکی Hans christian gram در 1884 برای متمایز کردن باکتری ها ی مولد ذات الریه از هسته سلولهای الوده پستانداران میزبان این روش را ابداع کرد . گرم مثبت به رنگ بنفش و گرم منفی به رنگ قرمز در میاید. علت این واکنش گرم به ساختمان شیمیایی دیواره سلولی مربوط میشود دیواره سلولی گرم مثبت هامتفاوت از گرم منفی هاست . در گرم منفی ها دیواره سلولی لیپید بیشتری داشته و مقدار کمپلکس مورئین ان کم است و ضخامت شان کمتراز گرم مثبت هاست . الکل غلیظ دیواره سلولی گرم منفی ها را حل کرده و یا تغییر ساختمان میدهد در نتیجه فراکمپلکس کریستال ویوله – ید را از سلول میسر میسازد در حقیقت این اختلاف به تراوا بودن بیشتر گرم منفی ها نسبت به الکل است. رنگ امیزی افتراقی دیگر روش مقاوم اسید ( Acid fast) میباشد که مختص باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوسیس یا باکتری سل است. برای رنگ امیزی ساختارهای ویژه سلولی نظیر فاژ – اسپور –و مواد هسته از این نوع رنگ امیزی استفاده میشود.

شکل باکتری ها: باکتری ها دارای سه شکل کروی ( Coccus) میله ای (Rod ) مارپیچی ( Spirillum) میباشند.

**کپسول یا لایه لعابی : گلیکوکالیکس**

بسیاری از پرکاریوت ها در سطح خود مواد لزج و چسبناکی ترشح میکنند و براحتی میتوان انرا بکمک رنگ امیزی منفی نشان داد ابتدا باکتری ها را روی لام ثابت میکنند و بارنگ مرکب چین انرا رنگ میکنند مرکب چین در کپسول نفوذ پیدا نمیکند بلکه زمینه دید را تاریک میسازد در نتیجه مواد کپسولی بصورت لایه روشنی در زمینه تاریک به چشم میخورد . کلنی باکتری های سازنده کپسول بر روی محیط های جامد غالبا مرطوب درخشان و لزج دیده میشود کپسول فقط بوسیله گونه های خاصی از باکتری ها تولید میشود و تولید ان به شرایط ابتدایی محیط بستگی دارد ترکیب شیمیایی کپسول متغییر است در برخی پلی ساکاریدی ودر سایرین پلی پپتیدی مرکب از یک یا دو نوع امینواسید نوع غیر طبیعی D است. کپسول لایه محافظتی در برابر شرایط خاص محیط برای باکتری ها ایجاد مینماید کپسول باکتری مولد ذات الریه انتروکوکوس نمونیا *Streptococcus. Pnemoniae* بیش از سایر باکتریها مطالعه شده است کپسول باکتریها غالبا عامل چسبندگی بوده و برای ایجاد پوسیدگی دندان ضروت دارد. *Str. Mutans* عامل اصلی پوسیدگی دندان برای تولید پوسیدگی بصورت توده های انبوه روی سطح دندان انباشته میشود وبرای این اثصال به کپسول مرکب از گلوکان و فروکتان احتیاج دارد این دو ماده اختصاصا از ساکاروز ساخته میشود واز قندهای دیگر تولید نمیشود. کپسول گاهی خاصیت انتی ژنی دارد هرگاه باکتری کپسول دار با انتی سرم کپسول مخلوط کرده ودر زیر میکروسکوپ مطالعه شود کپسول متورم شده و به وضوح دیده میشود.(ازمایش Quellung ).

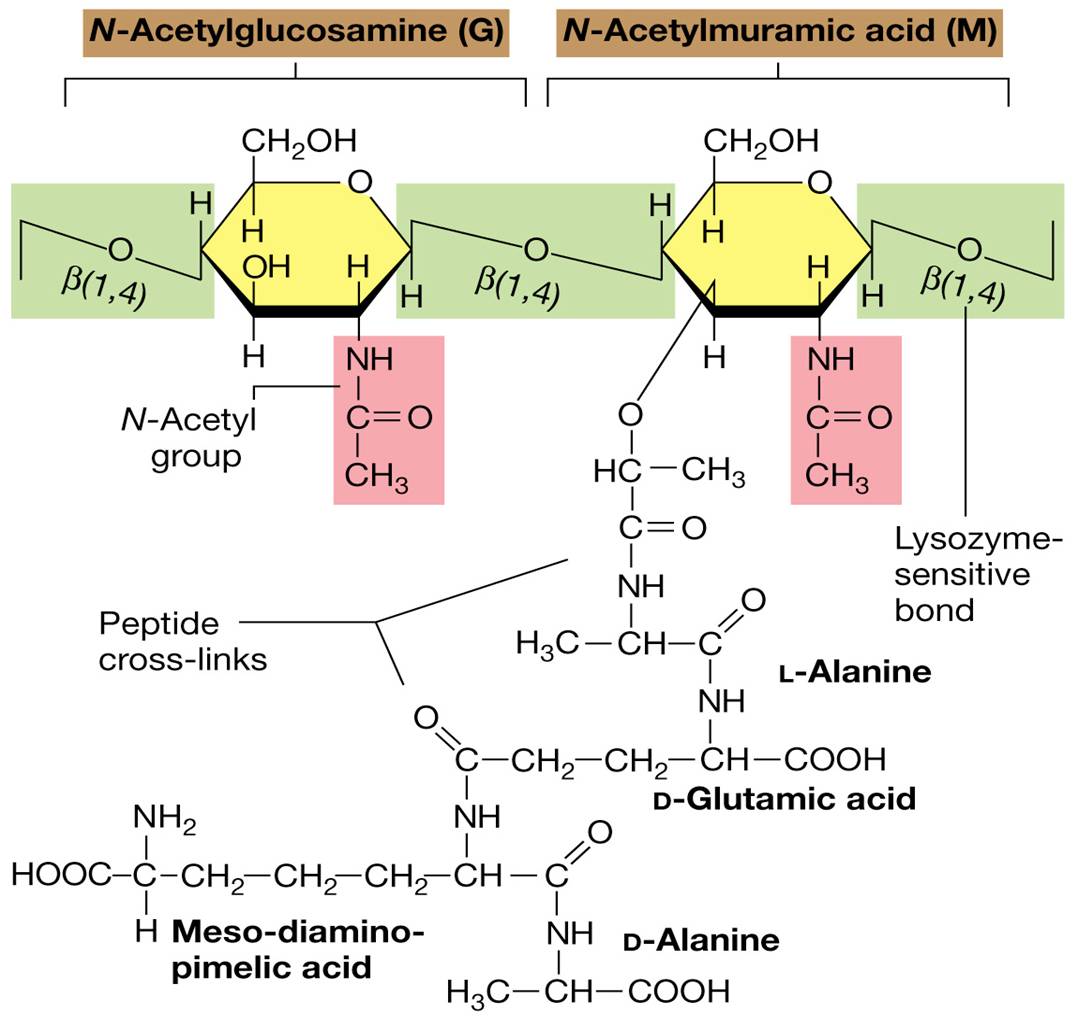


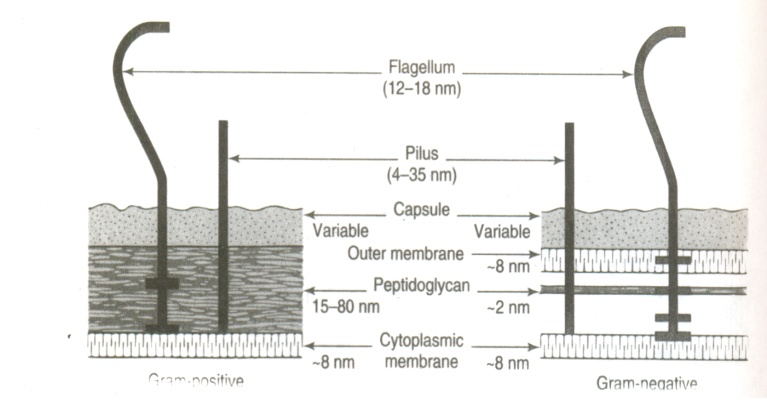
شکل4-کپسول باکتری Acinetobacter

**دیواره سلولی پروکاریوتها:** پپتیدوگلیکان و مولکولهای منسوب به **آن** لایه بین کپسول وغشای سیتوپلاسمی را رویهم رفته دیواره سلولی cell wall نامند این دیواره در گرم مثبت ها عمدتا از پپتیدوگلیکان و اسید تیکوئک ودر گرم منفی از پپتیدوگلیکان و لیپوپروتئین و فسفو لیپید و لیپوپلی ساکارید ساخته شده است . دیواره سلولی در باکتریها چند نقش ایفا میکند به باکتریها شکل میدهد ودارای شاخص انتی ژنی است لایه لیپوپلی ساکاریدی دیواره سلولی تراوایی غیرانتخابی است ولی لایه غشای خارجی گرم منفی عبور مولکولهای نسبتا درشت را به تاخیر میاندازد یا متوقف میکند . دیواره سلولی محل اتکای برای بیوسنتزترکیبهای دیواره محسوب میشود ودر تقسیم سلولی نقش دارد .بدون دیواره سلول متلاشی میشود در گرم مثبتها این دیواره از دو بخش پپتیدوگلیکان ( موکوپپتید یا موریئن ) واسید تیکوئیک ساخته شده است.

**پپتیدوگلیکان:**

این بخش پلیمر پیچیده ای است مرکب از سه قسمت **الف.** داربست که از استیل گلوکز امین و ان استیل مورامیک اسید که بطور یک در میان قرار میگیرد و با پیوند 4-1 گلیکوزیدی بیکدیگر پیوند میشود این دو قنداز نظر شیمیایی از گلوکز ساخته میشود این اسکلت در همه باکتری ها یکسان است . **ب-** مجموعه ای از زنجیره های جانبی مرکب از چهار امینواسید یعنی زنجیره تتراپپتیدی مشابه است که به ان استیل مورامیک اسید پیوند یافته است. **ج-** علاوه بر ان یکسری پل های عرضی یا پیوند تقاطعی پپتیدی بین لایه ها وجود دارد.لایه های پپتید.گلیکان با پل های عرضی بهم متصل میشوند و یک مولکول غول پیکر را بوجود می اورد که اسکلت محکمی را را دو طرف غشای سیتوپلاسمی میسازد. زنجیره جانبی و پل تقاطعی بر حسب گونه باکتری ها متفاوت است در گرم منفی ها پل تقاطعی و پپتیدی مستقیم بین گروه امینی دی امینوپایمیلیک اسید(DAP ) یک زنجیره جانبی با گروه کربوکسیل د-الانین انتهای زنجیره جانبی دیگر بوجود میاید. زنجیره جانبی همه گونه ها صفت مشترک مهمی دارند. امینواسید ان در گرم مثبت ها بترتیب ال – الانین و د-گلوتامین و ال-لایزین و د-الانین در گرم منفی ها در وضع سه بجای لایزین دی امینوپایملیک اسید قرار میگیرد DAP ماده ای منحصر به دیواره سلولی پروکاریوت ها ست این ماده پیش ماده لیزین در بیوسنتز لیزین در متابولیسم است.



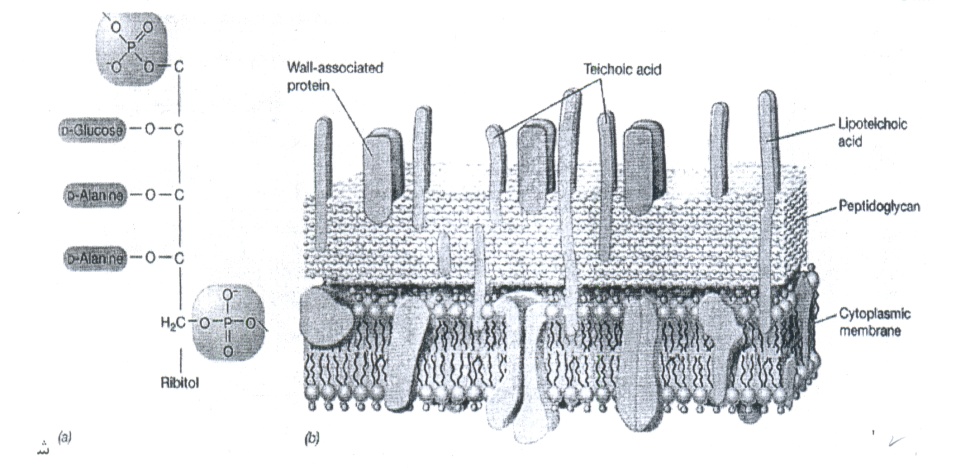


شکل6-مقایسه ساختمان پوشش سلولی باکتری گرم +و -

**پوشش سلولی گرم مثبت ها:** پوشش سلولی گرم مثبت ها نسبتا ساده بوده و از دو تا سه لایه تشکیل شده است . غشا سیتوپلاسمی یک لایه پپتیدوگلیکان ضخیم و در بعضی باکتری ها یک لایه بنام کپسول یا یک لایه s در خارج دارند.

**اجزای اختصاصی دیواره سلولی گرم مثبت ها**:در این دیواره مقدارزیادی اسید تیکوئیک یا تیکورونیک وجود دارد ودارا ی مولکولهای پلی ساکاریدی هستند . اسید تیکوئیک : این پلی ساکارید اسیدی مولکولهای محلول در اب دارای ریبیتول یا گلیسرول متصل بهم از طریق فسفات دی استر میباشد دو نوع اسید تیکوئیک وجود دارد . اسید تیکوئیک دیواره که بطور کووالان به پپتیدوگلیکان پیوند میشود و اسید تیکوئیک غشا که بطو کووالان به گلیکولیپید غشا پیوند میشود برخی گرم مثبت ها اسید تیکوئیک دیواره ندارند ولی همه گونه ها دارای اسید تیکوئیک غشا است واحدهای تکراری اسید تیکوئیک میتواند گلیسرول یا ریبیتول باشد .این اسید یون Mg را مهار میکند و این یون را برای سلول فراهم میکند و در کار طبیعی پوشش سلولی مشارکت دارد. (شکل6)

**پلی ساکاریدها:** در اثر هیدرولیز دیواره گرم مثبت ها قندهای خنثی نظیر مانوز ـ ارابینوزـ گالاکتوزـ رامنوز ـ گلوکز امید تولید مینماید که قند ها به شکل واحد های کوچک پلی ساکاریدی در دیواره سلولی قرار دارند..(شکل6)



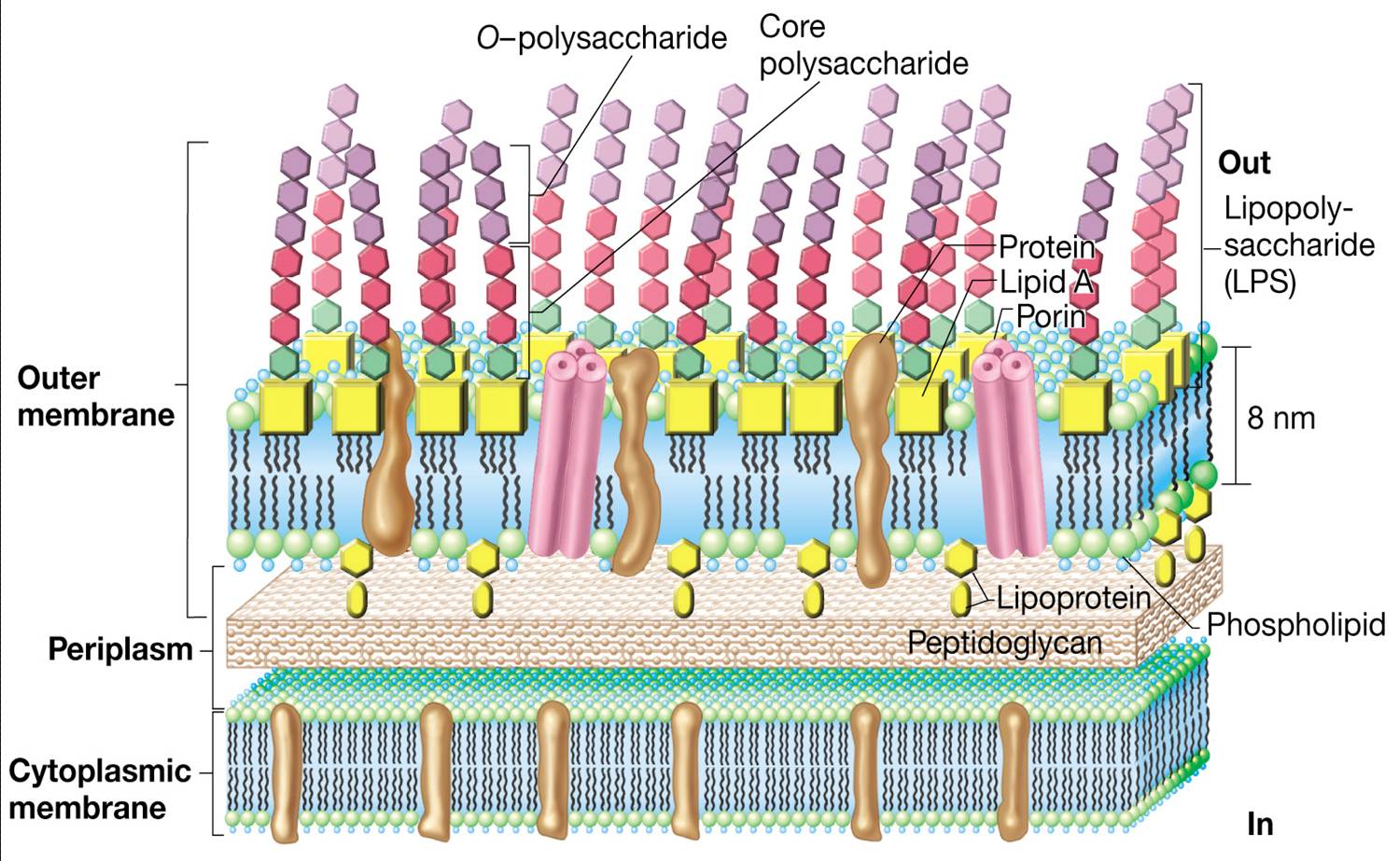
شکل7-ساختمان کلی دیواره باکتری گرم مثبت

**اجزای اختصاصی دیواره سلولی گرم منفی ها:** دیواره سلولی گرم منفی ها سه بخش دارد که بیرون بخش پپتیدوگلیکان قرار میگیرد عبارتنداز لایه لیپوپروتئینی و لایه فسفولیپیدی ( غشای خارجی) و لایه لیپوپلی ساکاریدی.

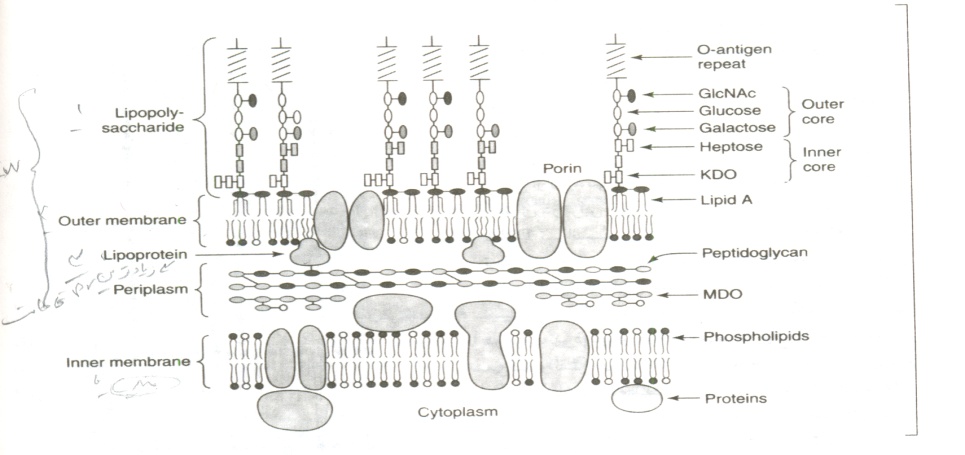
*لایه لیپوپروتئینی* : مولکول های لیپوپروتئین با لایه های غشای خارجی و پپتیدوگلیکان پیوند تقاطعی حاصل میکند بخش پروتئنی دارای 15 امینو اسید است که اخرین آن یعنی لایزین، با عامل آمین با پیوند پپتیدی به کربوکسیل DAP زنجیره جانبی تترادپپتیدی پپتیدوگلیکان متصل میشود . لیپو پروتئین فراوان ترین پروتئین سلول های گرم منفی است و نقش ان تثبیت و پایدار ساختن غشای خارجی و وصل کردن ان به پپتیدوگلیکان است.

*غشای خارجی* : بخش فسفولیپیدی یا غشای خارجی از دو لایه فسفو لیپید ترکیب یافته که دران فسفولیپیدها ی تیغه های خارجی بوسیله لیپو پلی ساکارید اشغال شده است غشای خارجی مانند غشای سیتوپلاسمی ( غشای داخلی) به حالت موزائیک سیال و محتوی یک سری پروتئن محصور در زمینه فسفولیپیدی است. غشای خارجی از خارج شدن ونشت پروتئن پری پلاسمی جلوگیری میکند و باکتریها (روده ای ها) را از اثر نمکهای صفراوی هیدرولیتیک محیط میزبان حفاظت میکند وجود منافذ پروتئین در غشا خارجی انرا نسبت به مواد محلول کوچک تراوا میسازد و مولکولهای درشت برخی انتی بیوتیک ها به کندی در ان نفوذ میکند.( علت مقاومت گرم منفی ها به انتی بیوتیکها) برخلاف غشای سیتوپلاسمی غشای خارجی نسبت به مولکولهای کوچک نسبتا تراوایی دارد و انتقال از طریق کانالهای پروتئینی بنام پورین که اختصاصی و غیر اختصاصی عمل میکنند عبور مینماید.

*لیپوپلی ساکارید( L.P.S ):* این بخش دیواره سلولی گرم منفی ها از یک ترکیب پیچیده لیپیدی بنام لیپید A ساخته شده است این لیپید از واحدهای دی ساکاریدی مرکب از گلوکز امین فسفر دار ساخته شده که به ان چند اسید چرب زنجیره بلند متصل میشود . lpsدر حیوانات فوق العاده سمی است و انرا اندوتوکسین گرم منفی ها میشناسند این ترکیب به سطح سلول میچسبد و تنها با متلاشی کردن ان ازاد میگردد هنگامیکه lps به لیپید A و پلی ساکارید تجزیه میشود خاصیت سمی با لیپید A باقی میماند . باعث پایداری غشا و جلوگیری از اتصال آنتی بیوتیک میشود.

شکل 8

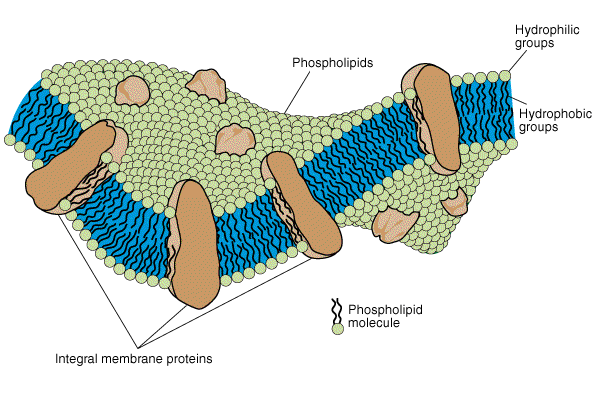
**فضای پری پلاسمیک** : فضای بین غشای خارجی و داخلی ( غشای سیتوپلاسمی ) را فضای پریپلاسمی مینامند این فضا دارای پپتیدوگلیکان ابدار ژله ای شده است عده زیادی از پروتئینها و الیگوساکاریدها در ان وجود دارد که به اسانی قابل انتشار در ژل هستند. پروتئینهای پری پلاسمی شامل پروئین های متصل شونده به مواد اختصاصی اند از جمله انزیم های هیدرولیتیک مانندالکالین فسفاتاز و5 نوکلئوتید از که مواد غیر قابل انتقال به مواد قابل انتقال میشکند واین ترکیبات در تنظیم فشار اسمزی سلول دخالت دارند.( شکل9)



شکل9-پوشش باکتری های گرم منفی و فضای پری پلاسمیک

**غشای سیتوپلاسمی:**

غشای سیتوپلاسمی باکتریها را غشای سلولی یا غشای داخلی مینامند این غشا از فسفولیپید و پروتئین تشکیل شده است عملکرد عمده غشای سیتوپلاسمی 1. نفوذپذیری انتخابی و انتقال مواد محلول 2. انتقال الکترون و فسفریلاسیون اکسیداتیو در گونه های هوازی 3. ترشح انزیم های هیدرولیز کننده 4. دارا بودن انزیم ها و مولکولهای حاملی که در سنتز DNA پلیمرهای دیواره سلولی و لیپیدهای غشا نقش دارند. 5. دارا بودن گیرنده ها و سایر پروتئین های کموتاکسی و سایر سیستم های تبدیل کننده پیامهای حسی است.



شکل10

انزیم های موثر بر دیواره سلولی :

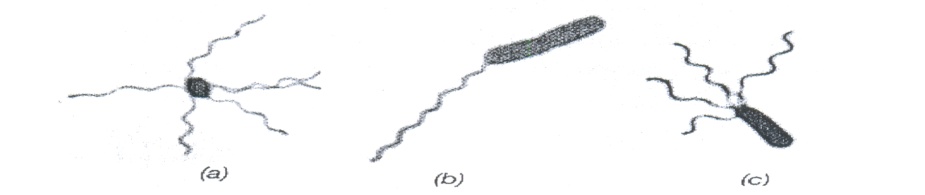
1-انزیم لیزوزیم پیوندبتا 4-1 گلیکوزیدی اسکلت پپتیدوگلیکانی را میشکند این انزیم در ترشحات بدن ( اشک بزاق ترشحات بینی ) و سفیده تخم مرغ یافت میشود گرم مثبت ها در اثر فشار اسمزی پایین تر از سلول تحت این انزیم متلاشی میشوند و پروتوپلاست ازاد میشود در گرم منفی غشای خارجی مانع رسیدن لیزوزیم به پپتیدوگلیکان میشود اما اگر سلول تحت تاثیر دی امین تترااستیک اسید ( EDTA)قرار گیرد وسپس لیزوزیم اثر داده شود دیواره سلول را از دست داده و به شکل اسفروبلاست در میاید .2- باکتریها اتولیزین های بسیاری ترشح میکنند این آنزیمها نقش مهمی در رشد سلولی و تقسیم آن بر عهده دارند.3- انزیم های هیدرولیتیک که پپتیدوگلیکان را تجزیه میکند ( گلیکوزیدازها امیدازها پپتیدازها) بعلاوه پس از مرگ باکتری ها در اتولیز انها شرکت مینمایندو پپتیدوگلیکان را تجزیه و متلاشی میکند.در صورتیکه پروتوپلاست واسفروبلاست بتواند رشد کنندو تقسیم شوند به انها اشکال L گویند.

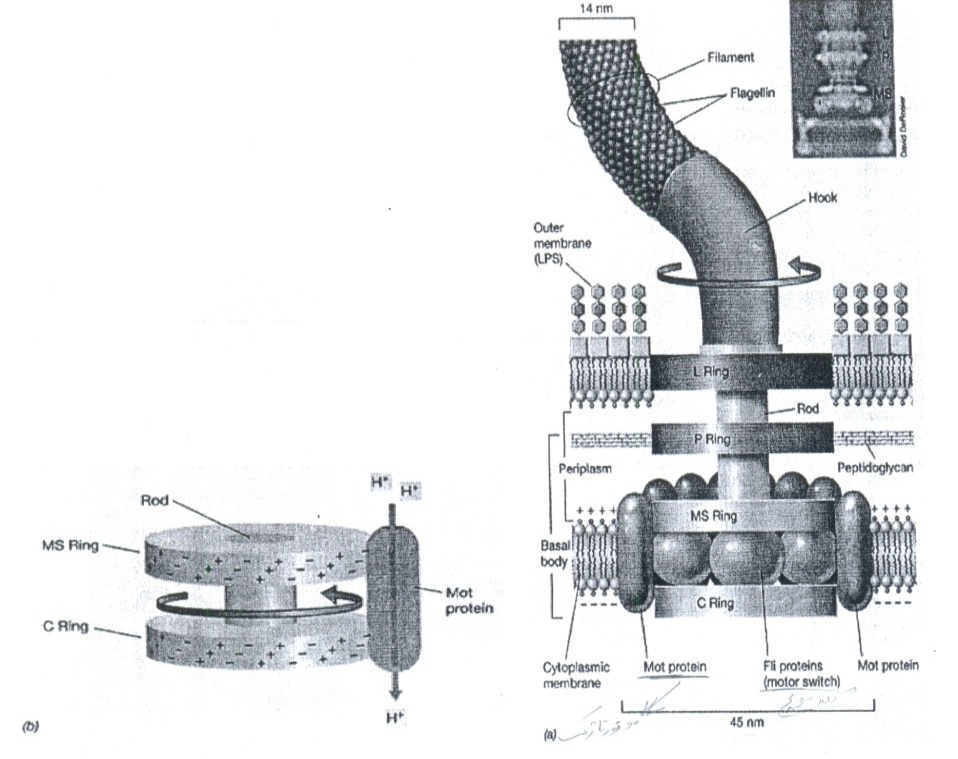
عوامل ضد باکتریایی موثر بر غشا:

دترجنت ها که دارا ی گروهای ابدوست و چربی دوستند غشای سیتوپلاسمی را متلاشی کرده و سلول را میکشد گروهی از انتی بیوتیک ها یعنی پلی مکسین هادارای ساختمان لیپیدی حلقوی دترجنت مانند است که بطور انتخابی به غشا باکتری ها صدمه میزند تعدادی از انتی بیوتیک ها عمل بیوسنتز ی غشارا مختل میسازد مانند نالیدیکسیک اسید و نووبیوسین سنتز DNA و T.A را متوقف میکند.

حرکت میکروبی : تاژک

همه باکتری ها متحرک نیستند بسیاری از سلولها میتوانند با نیروی خود حرکت کنند حرکت سلولها را قادر میسازد تا به قسمتهای مختلف محیط اطراف دسترسی داشته باشند حرکت به سلول کمک میکند تا به منابع ومکانهای جدید راه یافته و زنده بمانند . دونوع اصلی از تحرک سلولی شامل شناوری ( swimming) و لغزشی (liding g )است. چگونگی حرکت سلول به مسیر هدایت شده به سمت محرک ویژه و یا دورشدن از ان محرک را پدیده taxes نامند. بسیاری از پرکاریوتها با شناورکردن حرکت میکنند. این عمل به علت ساختمانی بنام تاژک flagellum انجام میگیرد.عمل تاژک با چرخش به جلو بردن سلول یا کشیدن سلول به عقب از میان محیط مایع انجام میشود. در باکتری تاژه دار تاژه ها به غشای سیتوپلاسمی چسبیده و از دیواره سلولی بیرون میایند تاژک زوائد باریک ودرازی هستند که از یک انتها ازاد و از انتهای دیگر به سلول متصل هستند ارایش تاژکها در اطراف باکتریها سه نوع است : 1. Peritrichous ( تاژک در اطراف سلوی پراکنده ) 2. مونوتریکوس ( یک تاژک قطبی) . 3 Lophotrichous ( چندین تاژک قطبی ).( شکل11)



یک تاژک از چندین هزار مولکول پروتئینی بنام فلاژلین flagellin تشکیل شده است. از نظر شکلی تاژک دارای سه بخش است: 1.بخشی که بارنگ امیزی دیده میشود رشته (filament ) نام دارداین پروتئین را انتی ژنH نامند 2. بخش قلاب استین مانند ی که در دیواره سلولی وارد میشود و رشته را به پیکر پایه متصل میسازد. قلاب ( hook) مارپیچی است و دارای الیاف پروتئینی در هم بافته میباشد. 3. بخش پیکر پایه ( basal body ) یا جسم پایه که ترکیب شیمیایی نا شناخته دارد که در گرم مثبت ها از دو جفت حلقه تشکیل شده یکی در غشای سیتوپلاسمی و دیگری در لایه مورئین . در گرم منفی ها 4 حلقه میباشد که به ترتیب از پایین به بالا در غشای سیتوپلاسمی – فضای پری پلاسمی – لایه پپتیدوگلیکان و لایه فسفولیپیدی قرار گرفته است که به ترتیب l,p,s,m نامیده میشود .( شکل9)

شکل12-ساختمان و عمل تاژک باکتری گرم منفی

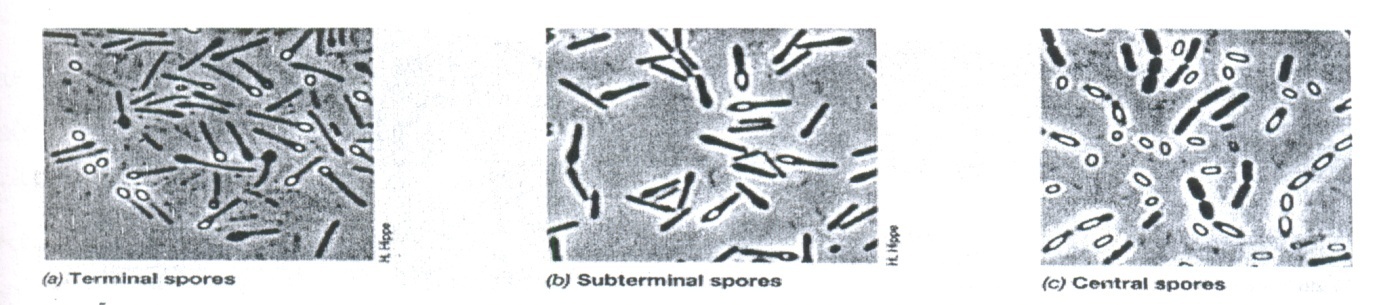
حرکت تاژه( flagellar movement) :

تاژک موتور کوچک چرخشی است که دارای دو جز اصلی موتور ( چرخان rotor وقسمت ثابت stator) هستند. rotorمیله مرکزی و حلقه هاست این ساختمان جسم پایه را تشکیل میدهد. قسمت ثابت موتور پروتئن های Mot است که جسم پایه را احاطه کرده و تولید نیروی گردنده چرخشی میکند. حرکت چرخشی تاژک توسط جسم پایه صورت میگیرد انرژی مورد نیاز برای چرخش از نیروی محرکه پروتون حاصل میشود حرکت پروتون از میان غشای سیتوپلاسمی توسط کمپلکس MOT سبب چرخش تاژک میشود. حدود 1000 پروتون در هر چرخش جابجا میشود جاذبه و کشش بین با – و + موجب میشود که جسم پایه همزمان با جریان پروتون در درون قسمت ثابت موتور بچرخد.

مژه ( pilli):

تعداد زیادی از گرم منفی ها دارای زوائد سخت سطحی هستند که مژه (موهای ( L یا فیمبریا نامیده میشود که ظریف تر از تاژک هستند و از زیر واحدهای پروتئنی پیلین ( PILLI) تشکیل شده اند. پروتئین هایی که در نوک مژه ها قرار دارند مسول ویژگی های اتصالی مژه هستند در باکتری ها دو نوع مژه 1. معمولی که در چسبیدن باکتریها ی همزیست و بیماریزا به سلول های میزبان نقش دارند. 2. مژه جنسی که در اتصال باکتری دهنده و گیرنده در روند ادغام باکتری نقش دارند. مژه نقش Ag دارد.

اندوسپور (Endospore ) :

گونه های خاصی از باکتریها (از قبیل باسیل های گرم مثبت هوازی اجباری و بی هوازی اجباری )در پاسخ به شرایط محیطی یک چرخه تکامل را طی میکنند ساختمانی بنام اندوسپور را در طی فرایند اسپورزایی ( sporulation ) تولید میکنند و سلولهای متمایزی هستند که به گرما مواد شیمیایی کشنده و تشعشع فوق العاده مقاوم هستند اندوسپور ساختمانی برای بقا در شرایط سخت است اسپور یک سلول در حال استراحت است. وقتی در شرایط تغذیه ای مطلوب قرار گیرد یک سلول زایا تولید میشود. باکتریهای تشکیل دهنده اسپور بیشتر در خاک هستند مانند باسیلوس و کلوستردیوم ها. (شکل10) 

شکل13- اندوسپور باکتری

تولید اسپور :فرایند تولید اسپور هنگامی اغاز میشود که شرایط تغذیه ای نا مطلوب شود و در اغاز این فرایند تخلیه منابع کربن و نیتروژن یا هر دو مهمترین عامل است که رشد متوقف و اسپور ایجاد میشود د راین فرایند تعداد زیادی ساختمانها و انزیم ها و متابولیت ها ی جدید تولید میشود و همزمان تعداد زیادی از اجزای باکتری فعال ناپدید میشود این یک فرایند تمایز واقعی را نشان میدهد.

خواص اسپور:

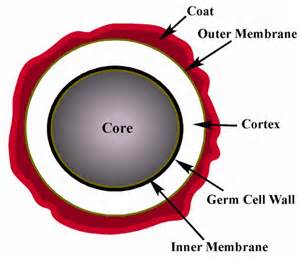
1.بخش مرکزی core: بخش مرکزی شامل پروتوپلاست اسپور است که دارای هسته کامل ( کروموزوم) همه اجزا دستگاه سازنده و سیستم مولد انرژی بر پایه گلیکولیز است ( چرخه شکستن قندهاست) مقاومت اسپور در برابر گرما به علت نبودن اب ازاد و زیاد بودن مقدار اسید دی پیکولونیک بصورت دی پیکولینات کلسیم است این ماده از طریق بیوسنتز لیزین ساخته میشود.

2.دیواره اسپور: درونی ترین لایه ای که غشای درونی اسپور را احاطه میکند که دارای پپتیدوگلیکان طبیعی بوده و بعداز تندش اسپور دیواره سلول رویشی یا باکتری فعال بعدی را تشکیل میدهد.

3.کورتکس cortex: ضخیم ترین لایه پوشش اسپور است ودارای پپتیدوگلیکان غیرطبیعی با پیوندهای تقاطعی(پل های عرضی) کمتر از پپتیدوگلیکان دیواره سلولی است که نسبت به لیزوزیم حساس است و اتولیز ان نقش اصلی در تندش اسپور را ایفا میکند

4.پوشش coat: دارای ترکیب پروتئنی کراتین مانند با پیوندهای دی سولفیدی فراوان است نا تراوا بودن این لایه موجب مقاوم بودن نسبی اسپور نسبت به مواد ضد میکروبی است.

5.پوسته خارجی Exosporium : یک غشای لیپوپروتئینی همراه با هیدرات کربن است.



شکل14.

6.زایایی Germination: فرایند زایایی شامل سه مرحله است فعال شدن و اغازین و رشد خارجی یا فراتر

a. مرحله فعال شدن: تعدادزیادی از اندوسپور ها بلافاصله پس از تشکیل قادر به زایای نیستند اما پس از چند روز استراحت در یک محیط غنی از مواد مغذی با اسیب دیدن یک یا چند پوشش اسپور زایا میشوند از بین عواملی که قادرند حالت استراحت اسپور را خاتمه دهند از گرما- خراشیدگی پوشش اسپور- اسیدی بودن محیط و ترکیبات حاوی گروه های سولفیدریل ازاد میتوان نام برد.

b. مرحله اغازین : پس از فعال شدن در صورتی که شرایط محیطی مطلوب باشد زایایی اغاز میشود گونه های مختلف دارای گیرنده هایی هستند که عوامل موثر متفاوت مانند ال- الانین یا ادنوزین را بعنوان علامت غنی بودن محیط تشخیص میدهند. اتصال عامل موثر با گیرنده به سرعت روند اتولیز پپتیدوگلیکان کورتکس را فعال میسازد اب جذب میشود کلسیم دی پیکولینات رها میشود و تعدادی از اجزای اسپور بوسیله انزیم های هیدرولیز کننده تخریب میشوند.

c.مرحله رشد خارجی: تخریب کورتکس و لایه های خارجی منجر به خروج یک سلول فعال جدید از اسپور میشود که از پروتوپلاست و دیواره احاطه کننده ان تشکیل شده است سپس یک دوره بیوسنتز فعال بنام مرحله رشد خارجی شروع وبا تقسیم باکتری خاتمه میابد. این مرحله به تامین تمام مواد مغذی ضروری برای رشد نیاز دارد.

اگزوسپور: باکتریهای اکسید کننده متان نظیر Methylosinus اگزوسپور تولید میکند این اسپور در خارج سلول رویشی در اثر جوانه زدن در یک انتها سلول بوجود میاید و مقاوم خشکی و گرما بوده و بر خلاف اندوسپور فاقد دی پیکولینات کلسیم است .

کنیدیوسپور و اسپورانژیوسپور:

گروه بزرگی از باکتری ها بنام اکتینومیست ها هایف های منشعبی تشکیل میدهندکه از نوک ان در اثر دیواره بندی اسپور بصورت تک تک یا زنجیری ساخته میشوند اگر اسپور ها در کیسه مسدود شود انرا اسپورانژیوم می نامند و در صورت ازاد بودن کنیدیوسپور یا کندی گویند که در برابر خشکی مقاومند اما نسبت به گرما مقاوم نیستند.

**Taxonomy:**

علم طبقه بندی را تاگسونومی گویند. معیارهای طبقه بندی باکتری هاشامل 1. Morphological 2 . Staining 3 . growth 4. 5 Nutrition . بیوشیمیایی میکروبها 6. ژنتیک میکروبها 7.ریبوزوم 8. ایمونولوژی 9. فاژ ها 10. فیزیولوژی

مورفولوژی : شکل ظاهر – اندازه – توانایی تولید اسپور – تولید فاژ- تولید مژه – تاژک – دیواره سلولی – تولید کپسول معیار طبقه بندی بین جنس ها و گونه های باکتری است.

Staining : انواع رنگ امیزی و نوع واکنش گرم و واکنش Acid fast

الگوی رشد: چه دمایی برای رشد باکتری نیاز است ( temp) و pH مناسب رشد و هوازی یا بی هوازی بودن باکتری و colonymorphology به چه صورت است؟

الگوی تغذیه: از چه موادی بعنوان منبع اصلی انرژی استفاده میکندو روش استفاده از قند اکسید است یا تخمیر .

ژنتیک: مهمترین معیار طبقه بندی ژنتیک میکروب است چرا میکروب میتواند پس از تخمیر قند را مصرف میکند ؟ چون انزیم های تخمیر قند را دارد که از روی mRNA ساخته شده است این شامل ژنتیک مولکولی است.

خصوصیت ریبوزوم: rRNA ریبوزومی جزیی از سلول است که در روند تکامل کمترین تغییر در ان ایجاد شده rRNA مشابه میتواند جد مشترک داشته باشد اساس طبقه بندی برگی ( Bergy) است.

خصوصیات ایمونولوژیک یا سرولوژیک تعیین میکند که انتی ژن سطحی در ویروس یا باکتری بهم شبیه است یا نه؟

فاژتایپینگ phagetyping)) : باکتری ها را بر اساس فاژهایی که انها را الوده میکند ( (infactمیکند طبقه بندی میکنند فاژ لامبدا که میزبان ان E.coli K88

فیزیولوژی میکروارگانیسم : نوع بیوسنتز پروتیئن و پاسخ باکتری به استرس محیطی و راههایی که برای بیوسنتز ماکرومولکولها استفاده میکند.

راهنمای عملی سیستماتیک باکتریولوژی برگی ( Bergy s Manual) در 4جلد در 1984 چاپ شد که بر اساس ویژگی دیواره سلولی به 4 گروه یوباکترهای گرم منفی که دیواره سلولی دارندو باکتری های گرم مثبت که دیواره سلولی دارند یوباکترها ی فاقد دیواره سلولی وارکئو باکتریها تقسیم بندی نمود.

**کشت میکروارگانیسم ها:**

کشت میکروارگانیسم ها یک روند رشد و تکثیر ارگانیسم ها باتهیه شرایط محیطی مناسب میباشد میکروارگانیسم های در حال رشد تکثیر میشوند و به عناصری که در ساختمان شیمیاییشان وجود دارد نیاز دارند اورگانیسم ها برای تولید ماکرومولکولها و حفظ شیب غلظت شیمیایی ضروری در دو طرف غشا خود نیاز به انرژی متابولیک دارند. عواملی که باید طی رشد کنترل شوند عبارتنداز : مواد مغذی، pH و حرارت ،هوا ،غلظت نمک هاو قدرت یونی محیط کشت. نیاز های باکتری ها برای رشد موادی مانند کربن هیدروژن نیتروژن فسفر و گوگرد است. منابع انرژی متابولیک شامل تخمیر( fermentation) تنفس( Respiration) فتوسنتز( photosynthesis) است. یک ارگانیسم برای اینکه بتواند رشد کند به یکی از این مکانیسم ها نیاز دارد.

**تخمیر:** در تخمیر تولید ATP با انتقال الکترون همراه نیست مشخصه تخمیر فسفوریلاسیون سوبسترا میباشد که یک پیوند پیروفسفات از یک واسطه متابولیک فسفریله مستقیما به ADP اضافه میشود.واسطه متابولیسم فسفریله از تغییر آرایش اتم های مواد قابل تخمیر مانند گلوکز ولاکتوز یا آرژنین بوجود می آید.

**تنفس:** شامل احیای شیمیایی یک ماده اکسیدان(دریافت کننده الکترون) از طریق یکسری ناقلین الکترون در غشا، نیرو ی محرکه پروتون را در غشا باکتری ایجاد میکند ماده احیاکننده (دهنده الکترون)ممکن است آلی یا غیر آلی باشدبرای مثال اسید لاکتیک بعنوان یک ماده احیا کننده برای بعضی از ارگانیسم ها عمل میکندو گاز هیدروژن ، اکسیژن، دی اکسید کربن ، so4-2 و No3- به عنوان یک ماده اکسیدان عمل میکنند.

**فتوسنتز:** از این جهت مشابه تنفس است که احیای یک ماده اکسیدان از طریق ناقلین الکترون نیروی محرکه پروتون را تولید میکند. تفاوت این دو مواد احیا و اکسید کننده بوسیله انرژی نورانی که توسط رنگدانه ها موجود در غشا جذب میشود بصورت فتو شیمیایی ایجاد میشود. بنابراین فتوسنتز تا زمانی ادامه دارد که یک منبع انرژی نورانی وجود داشته باشد.

**تغذیه:** مواد موجود در محیط کشت باید تمام عناصر ضروری برای تولید زیستی ارگانیسم ها را داشته باشد احتیاجات غذایی در 4 دسته تقسیم بندی میشوند:

1-ماکرومولکولها : که به مقدار خیلی زیاد نیاز است مانند پروتئین و قند که در اثر انزیم دکربوکسیلاز به دی اکسید کربن تبدیل میشود و جذب باکتری میشود.

2- میکرومولکولها : به مقدار کم لازم هستند مانند آهن که بوسیله آنزیم سیتوکروم اکسیداز جذب میشود و پتاسیم وکلسیم که در اسپور زایی نقش دارد سدیم در انتقال مواد و پمپ یونی نقش دارد.

3- : Treace elementبه مقدار خیلی کم مورد نیاز سلول هستند مثل کبالت ، ویتامین B ، مولیبدم .

4- growth factor: : فاکتور هایی که برای باکتری های مشکل پسند (fastidus) لازم است این باکتری ها همه چیز را نمیتوانند بسازند باید بصورت آماده به محیط اضافه کنیم به این فاکتور ها growth factor میگویند مثل آمینو اسید ها ،بازهای آلی نیتروژن دار.

**نامگذاری براساس کربن**:

1-Autotroph به باکتری هایی میگویند که قادرند از انرژی فتوسنتز برای احیای دی اکسید کربن استفاده کنند

2-کمولیتوتروف: از سوبسترای غیر آلی مانند هیدروژن بعنوان احیا کننده و دی اکسید کربن بعنوان منبع کربن استفاده میکنند.

3-هتروتروف: به کربن آلی برای رشد نیاز دارندکه این کربن باید به شکلی باشد که برای میکروارگانیسم قابل جذب باشد مثلا گلوکز میتواند رشد تنفسی یاتخمیری تعدادی از ارگانیسم هارا تعیین نماید

میکروارگانیسم ها برای رشد احتیاجات غذایی و محیطی دارند. در محیط کشت ها این نیاز ها را فراهم میکنند. محیط کشت دارای شناساگر ها ست که نباید نقش غذایی داشته باشند. ژلاتین بعنوان ماده جامد کننده است بهترین جامد کننده اگار است پلی ساکاریدی است که از جلبک استخراج میشود. در دمای 45 درجه مذاب است مواد احیا کننده برای میکروب های بی هوازی، مواد انتخاب کننده که محیط را برای عده ای از باکتری ها انتخاب میکند مثل متیلن بلو و کریستال ویوله که گرم مثبت ها به آن حساس اما گرم منفی ها رشد میکنند. مواد باز دارنده( Inhibitor ) مثل سیکلو هگزان که جلو رشد قارچ ها را میگیرد.

**طبقه بندی محیط کشت:**

طبقه بندی محیط کشت بر اساس کاربرد : General media محیطی که حداقل مواد لازم برای رشد میکروارگانیسم را دارد و اکثر میکروارگانیسم ها در ان رشد میکنند مثل اگار خوندار و مولر هینتون اگار که فاقد بازدارنده هستند ( محیط اولیه) .

محیط کشت افتراقی( Differential media) : در این محیط ها به دلیل افزودن یک ترکیب خاص ( رنگ و معرف و انتی بیوتیک ) فقط گروهی از باکتری ها رشد میکنند وبعنوان محیط ثانویه کاربرد دارند مثل محیط EMB به دلیل ماده ائوزین که مانع رشد گرم مثبت ها میشود

محیط کشت غنی شده ( Enrichment) : با استفاده از این محیط ها رشد گروه خاصی از از میکروبها افزایش میابد که به علت وجود مواد خاص رشد برخی تشدید میشود مثل محیط مایع سلنیت.

محیط کشت انتخابی ( selective): برخی ترکیبات خاص از رشد باکتری رقیب جلوگیری میکند مثل فنیل اتیل اگار (PEA) مانع رشد باکتری گرم منفی میله ای هوازی شده و شرایط را برای گرم مثبت کوکسی مهیا میکند.

محیط نگهدارنده ( supportive media): انواع میکروب ها رشد میکنند بدون اینکه تاثیری بر یکدیگر داشته باشند مثل BHI و اگار مغذی طبقه بندی محیط کشت بر اساس حالت فیزیکی : محیط مایع : بدون جامد کننده برای غنی سازی است تبادل مواد در ان راحتر است و باعث تسریع رشد میشود محیط کشت نیمه مایع : 2/0٪ اگار داردکه نقش اگار جلو نفوذ اکسیژن را میگیرد . محیط نیمه جامد: 5/0٪تا 7/0٪ اگار دارد کاملا جامد نیست و در لوله ساخته میشود برای تشخیص حرکت باکتری استفاده میشود محیط جامد :1.5٪ تا 1.25٪ اگار دارد که هدف مشاهده کلنی میکروبهاست.

رشد بقا و مرگ میکروارگانیسم:

فعالیت های حیاطی هر موجود به حفظ حالت دینامیک یا موازنه آن کمک میکند حفظ تعادل درون سلولی بوسیله عمل آنزیم های مختلف صورت میگیرد هر انزیم تحت کنترل یک ژن است . ژن و انزیم بستگی به شرایط درو ن سیتوپلاسم دارد هرگونه اختلال در تعادل سلولی به مرگ سلول می انجامد آسیب برگشت پذیر باعث توقف رشد سلول میشود نه مرگ سلول ( باکتریواستاتیک). آسیب برگشت ناپذیر باعث مرگ سلول میشود (باکتریوساید ) تفاوت بین این دو کمی است مثلا 3/0٪ فنل رشد *E.coli* را متوقف میکند اگر به محیط دیگری sub cultur دهیم دوباره رشد میکند اما 1٪ فنل باعث مرگ سلول میشود. جمعیت میکروبها در محیط نسبتا ثابت است رشد با مرگ در حال تعادل قرار دارد رشد، افزایش در مجموع تمام اجزای یک ارگانیسم است بنابراین افزایش اندازه سلول بعلت جذب آب یا رسوب چربی رشد واقعی نیست در ارگانیسم های تک سلولی رشد منجر به افزایش تعداد افراد ایجاد یک جمعیت یا کشت ارگانیسم میشود اگر سلول های میکروبی که تا حد اشباع رشد کرده اند به داخل یک محیط مایع تلقیح شوند بصورت یک منحنی که دارای 4 مرحله است میتوان رشد ان را نشان داد:

**مرحله تاخیری** ( lag phase ): نشاندهنده زمانی است که سلولها بعلت قرار گرفتن در محیط قبلی و شرایط نامساعد از متابولیتها و آنزیمها تخلیه شده وبا محیط جدید سازش میابند در این مرحله انزیم ها و مواد واسطه ای تشکیل و ذخیره میشوند.

**مرحله تصاعدی یا لگاریتمی**( Exponential): سلولها در یک وضعیت ثابت هستند مواد سلولی جدید با سرعت ثابت تولید میشوند و توده سلولی بصورت تصاعده افزایش میابد این روند ادامه میابد تا اینکه تمام شدن یک یا چند ماده غذایی در محیط کشت یا جمع شدن مواد زائد سمی و مهار روند رشد رخ دهد.

**مرحله ثبات در حداکثر میزن رشد یا مرحله رکود**( stationary phas) : در نهایت با تمام شدن مواد مغذی یا تجمع مواد سمی ، رشد میکروب متوقف میشود. در این مرحله تولید وتخریب نیز ادامه دارد یعنی از دست دادن سلولها بعلت مرگ با تولید از طریق رشد وتقسیم سلولی متعادل است.

**مرحله مرگ** ( Death): پس از گذشت یک دوره زمانی سرعت مرگ افزایش میابد تا به یک سطح ثابت برسد پس از مرگ اکثر سلولها تا سالها زنده مانده و از سلول مرده ولیز شده استفاده میکند. مرگ یک میکروب به معنای از دست دادن توانایی تکثیر ( رشد و تقسیم ) بصورت غیرقابل برگشت میباشد .

انواع آسیب های سلولی:

1.آسیب دیدن غشای سلول : هر عاملی که تراوایی غشای سیتوپلاسمی را مختل کند و جذب مواد ضروری و دفع مواد زائد را دگرگون سازد موجب ورود مواد سمی به سلول و اجزای سلول به بیرون تراوش میکند مثل شوینده ها که موانع اسموتیک را در هم شکسته و موجب نشت اجزای سلول از نظر متابولیکی به خارج میشود.

2. اسیب دیدن هسته و ژن ها: برخی از عوامل تمایل خاصی به هسته و ژن ها دارند نظیر رنگ بازی کریستال ویوله که با اسید نوکلئک واکنش میدهد. گرم مثبت ها حساس ترندچرا؟

3.متوقف شدن عمل انزیم ها : آنزیم ها ساختمان پروتئینی داشته و بوسیله الکل ها، فنل، فلزات سنگین متوقف میشوند این پدیده ها غیر قابل برگشتند.

4.سترون کردن و ضد عفونی کردن: به معنای نابود کردن همه موجودات زیان آور و بی زیان میباشد که این عمل بوسیله پالایش ، آتش، حرارت، پرتو ها، مواد شیمیایی انجام میشود.

تعیین حداقل تراکم متوقف کننده : برای سنجش فعالیت ضد میکروبی یک ماده شیمیایی از MIC استفاده میکنند، MIC را با تهیه رقت هایی از یک ماده شیمیایی در محیط کشت و وارد کردن مقدار معینی از میکروب در هر یک از آنها و سنجش رشد میکروب بوسیله سنجش تیرگی محیط پس از مدت مناسب تعیین مینمایند پایین ترین تراکمی که از پیدایش کدورت در محیط جلوگیری میکند MIC مینامند . میزان MIC تحت تاثیر ماهیت و تعدادمیکروب مورد آزمایش و ترکیب کشت و Ph آن درجه حرارت و زمان اتوگذاری قرار میگیرد.

آزمایش در محیط آگار: برای سنجش قدرت متوقف کنندگی مواد شیمیایی ، پمادها، آنتی بیوتیک ها بکار میرود. باکتری را روی محیط جامد کشت و در سطح آگار چاهک ایجاد کرده ومواد مورد نظر را در آن ریخته یا دیسک های کاغذی استریل را در ماده شیمیایی فرو برده و روی سطح آگار میگذارند. بعداز 24 ساعت اینکوبیت هاله های توقف رشد هویدا میشود. قطر هاله ها به قدرت نفوذ مواد شیمیایی و قدرت ضد میکروبی آن بستگی دارد.

**آنتی بیوتیک ها:** اصطلاح انتی بیوز ، Antibiosis اول بار در 1889 بوسیله ویلمن برای توجیه ماهیت رقابتی جوامع بیولوژیک که در آن قوی ترین و اصلح ترین زنده میمانند مورد استفاده قرار گرفت . انتی بیوتیک فراورده های حاصل از فعالیت میکروب هاست که بطور اختصار رشد عده ای از میکروب عا را متوقف میکند یا میکشد

مکانیسم عمل داروها ی ضد میکروبی عبارتند از: 1. مهار وتولید دیواره سلولی ( باسیتراسین – پنی سیلین – وانکومایسین ) 2. جلوگیری از عملکرد غشای سلولی ( ایمدازول – تریازول – پلی مکسین ) 3. مهار سنتز پروئین ( جلوگیری از ترجمه و نسخه برداری مثل کلرامفنیکل ، تتراسایکلین). 4-مهار سنتز اسید نوکلئیک ( ریفامپین ، سولفانامید). مقاومت به دارو های ضد میکروبی از طریق تولید آنزیم ، تغییر نفوذ پذیری ، تغییر هدف ساختمانی ، تغییر مسیر متابولیسم، تغییر آنزیم های متابولیکیایجاد میشود.

**تاثیر عوامل محیطی روی میکروارگانیسم ها**:1-( Heat): مهمترین عامل که در رشد و مرگ میکروب ها موثر است. میکروبهایی که دمای رشدشان پایین است psychrophilos (سرمادوست) گویند (20 درجه) عامل فساد مواد غذایی یخچالی هستند میکروبهایی که دارای حرارت بهینه رشد 20-50درجه هستند مزوفیل گویند اغلب پاتوژن ها جز اینها هستند باکتری هایی که بهینه رشد بالایی دارند ترموفیل گویند.

2-پتانسیل احیا Eh: توانایی ارگانیسم ها در انجام واکنش اکسیداسیون –احیا. Eh+ نشاندهنده اکسیداسیون و شرایط هوازی و Eh- نشاندهنده احیا و شرایط بی هوازی است .

3- نیاز آبی aw: میکروبها جهت رشد نیاز به آب دارند. 4-فشار ( pressure): این فشار در رابطه با ستون هوا در سطح زمین است میکروب هایی که فشار را تحمل میکنند باروفیل Barophiles گویند. 5-pH : بشترین تاثیر pH روی پروتئن و آنزیم هاست که رشد میکروب ها را تحت تاثیر قرار میدهد. 6-خاصیت آهن ربایی Magnetism : گرایش باکتری ها بطرف آهن ربا ، که قادر به تولید fe3o4 و fe3s4 میباشد 7-تشعشعات که DNA دو زنجیره وتک زنجیره رامیشکند اشعه گاما ، UV ، مادون قرمز که میتوانند عامل موتاسیون شوند. 8- مواد غذایی شامل ترکیبات آلی و معدنی است.

4-غلظت یون H :اکثر ارگانیسم ها در محدوده باریکی از Ph بصورت بهینه رشد میکند.به باکتری هایی که در محیط اسیدی حدود سه رشد میکند اسیدوفیل ها و در حدود 6-8 باکتری نوترالوفیل و در محدوده 10.5 باکتری آلکالوفیل گویند.

5-هوا :نقش اکسیژن به عنوان یک پذیرنده هیدروژن است در باکتری های هوازی، اما بی هوازی های اجباری به ماده دیگری غیر از اکسیژن به عنوان پذیرنه هیدروژن نیاز دارند و نسبت به اکسیژن حساسند هوازی ها و بی هوازی های اختیاری دارای آنزیم سوپراکسیددسموتاز و کاتالاز هستند. بی هوازی ها فاقد این دو هستند که بسته به این موارد برای کشت بی هوازی ها از پارافین ،سدیم تیوگلیکولیت ، کندل جار، دسی کاتور استفاده میشود

.

راهنمای عملی سیستماتیک باکتریولوژی برگی ( Bergy s Manual) در 4جلد در 1984 چاپ شد که بر اساس ویژگی دیواره سلولی به 4 گروه:

1- یوباکترهای گرم منفی که دیواره سلولی دارند

2- باکتری های گرم مثبت که دیواره سلولی دارند

3- یوباکترها ی فاقد دیواره سلولی

4- وارکئو باکتریها تقسیم بندی نمود

**اسپیروکت ها**:

در آبهای الوده ، فاضلاب ، خاک وجود دارند. مواد آلی در حال پوسیدن ودر بدن انسان و حیوان یافت میشود شکل مارپیچی دارند هوازی و بی هوازی بوده و با شکاف عرضی تقسیم میشوند.

سه جنس بیماریزا *Treponema* که مولد سفلیس که از راه آمیزش جنسی منقل میشود ، *Borrelia* عامل تب راجعه که بوسیله کنه و شپش منتقل میشود *leptospira* عامل لپتوسپیروز که از راه اب آلوده ، ادرار حیوانات سگ و گربه و خوک به انسان انتقال میابد و بصورت عفونت کلیه نمایان میشود.

**باکتری های مارپیچی خمیده**:

فاقد رشد محوری بوده و دارا ی تاژک هستند و بصورت ماپیچ های سخت و میله ای میباشد اکثرا بی آزار و آبزی هستند فقط کمپیلوباکتر فیتوس سپتی سمی و بیماری ناشی از مواد غذایی الوده ایجاد مینماید



**کوکوسها و باسیل های گرم منفی هوازی** :

جنس سودوموناس مهمترین است که عامل عفونت مجاری ادراری ، سوختگی، آبسه ، مننژیت است روی محلول های ضد عفونی ، و در حمام دیده میشود. *Brucella* کوکوباسیل غیر متحرک ،انگل اجباری پستانداران است. از راه فراورده های شیر و لاشه آلوده حیوان وارد بدن انسان میشود وتب نوسانی پدید میاورد . *Brodetella* باسیل غیر متحرک ،دارای کپسول ، منحصر بدن انسان است ، بوردتلا پرتئوسیس عامل اصلی سیاه سرفه است. *Francisella*  :باکتری های پلی مورف هستند فرانسیسلا تولارسیس عامل تولارمیا یا تب خرگوش است که از طریق تماس مستقیم با خرگوش و گزش مگس گوزن منتقل میشود

**باسیل های گرم منفی بی هوازی اختیاری**:

در این گروه دو زیر گروه انتروباکتریاسه و ویبریوناسه وجود دارد.

***الف-باکتری های روده ای*** :ساکن روده انسان و حیوانات است گلوکز و کربوهیدرات را تخمیر میکند با آزمایش استاندارد IMViC شناسایی میشوند. انواع متحرک و غیر متحرک دارند . توکسین هایی بنام باکتریوسین تولید میکند

*E.coli*: ساکن اصلی روده مختص کارهای ژنتیکی است وجود این باکتری در آب و غذا معرف آلودگی مدفوعی است میتواند عفونت مجرای ادراری و اسهال ایجاد کند.

سالمونلا: همه باکتری این جنس بیماریزا است سالمونلا تایفی ، تب تیفوئید با تب بالا،لکه قرمز رو ی شکم ، سینه ، و گاستروانتریت ایجاد میکند. سالمونلا تایفی موریوم که عامل سردرد ،لرز ، استفراغ ، اسهال و تب است.

شیگلا: عامل اسهال خونی یا شیگلوز ، اسهال خفیف ، شکم درد ، چرک و خون در مدفوع میشود.

کلبسیلا: عامل اصلی سپتی سمی در کودکان و ذات الریه است.

سراشیا: سراشیا مارس سا نس پیگمان قرمز تولید میکند برای سنجش باکتری ها از راه هوا،در جنگ بیولوژیک بکار میرود. موجب پیدایش عفونت ادراری میشود.

یریسنیا : یرسینیا پستیس عامل طاعون خیارکی و طاعون ششی است در عقده های لنفاوی نفوذ کرده و انرا حجیم میکند .

اروینیا : بماریزای گیاهی است اروینیا هربی کولا هنگامیکه وارد محلول های درون سیاهرگی گردد عفونت عمومی تولید میکند .

***ب- خانواده ویبریوناسه :***

گرم منفی بی هوازی اختیاری خمیده هستند جنس ویبریو کلرا( *Vibrio cholera)*عامل وبا است که با اسهال ابکی همراه است. *V.parahemolyticus* عامل گاستریت بوده و بوسیله صدف های خوراکی به انسان منتقل میشود.

**کوکوس های گرم مثبت** : شامل دو جنس استافیلوکوکوس و استرپتوکوکوس است *staph* در زیر میکروسکوپ خوشه ای بی حرکت و بدون اسپور ،کاتالاز + ،هوازی، روی بلاد آگار کلنی طلایی میدهد ، در برابر حرارت خشکی و مواد شیمیایی مقاوم است و اختلالات گوارشی ایجاد میکند. کواگولاز+ ، است که پلاسمای خون را منعقد میکند فیبرین حاصل بافت آلوده را احاطه و باکتری از تهاجم فاگوسیت ها در امان میماند st.a عفونت پوستی ، دمل، کورک، کفیرک، زرد زخم ، ذات الریه ، مننژیت ، و آبسه مغزی ایجاد میکند.

استرپتوکوک : همولیزین آلفا ، بتا ، گاما ایجاد میکند موجب اریتم پوست ، همولیز گویچه های قرمز و آنزیم های هیالورونیداز ، پروتئناز، استرپتوکیناز، تولید میکند که باعث انتشار عفونت میشود. باعث تب زایمان ، باد سرخ ع تب مخملک ، گلو درداسترپتوکوکی ع تب روماتیسمی میشود وعامل پوسیدگی دندان میباشد.

**باسیل ها و و کوکوس اسپور دار :** تشکیل اندوسپور از نظر پزشکی و غذایی حائز اهمیت است زیرا در برابر حرارت مقاوم است اکثرا گرم مثبت هوازی و بی هوازی هستند دو.جنس مهم اسپوردار دارند

باسیلوس آنتراسیس : عامل سیاه زخم که در گاو ، گوسفند ، اسب بیماری ایجاد و به انسان منتقل میشود.

کلاستردیوم : بی هوازی اجباری است ، کلاستردیوم تتانی عامل کزاز، کلستردیوم بوتولینوم عامل بوتولیسم ، کلستردیوم پرفرنجنس قانقرن گازی ایجاد میکند.

**باکتری های میله ای گرم مثبت بدون اسپور:**

لاکتوباسیلوس که اسید لاکتیک تولید میکند ودر محیط اسیدی رشد میکند در پوسیدگی دندان نقش دارد برای تولید کلم شور ، دوغ و ماست استفاده میشود. باکتری بیماریزای این جنس لیستریا مونوسایتوجنز است که در تولید آبسه ، اندوکاردیت مشارکت دارد.

**ریکتسیاها** :

شامل ریکتسیا و کلامیدیا است انگل اجباری درون سلولی وشبیه ویروس ها هستند میله ای و کوکوباسیل گرم منفی بیحرکت وتقسیمشان دوتایی ، بوسیله حشرات به انسان منتقل میشوند. کوکسیلا برونتئی عامل تب Q که مشابه انفولانزا و هپاتیت است که از راه هوا یا مواد غذایی و حشرات منتقل میشود. ریکتسیا عامل تیفوس همه گیر *R.prowasekii* که بوسیله شپش منتقل میشود. تیفوس موشی بومی به وسیله کک موش منقل میشود. *R.rickettsii تب* خالدار کوهای راکی بوسیله کنه منتقل میشود.

.

باسیل ها و و کوکوس اسپور دار :

تشکیل اندوسپور از نظر پزشکی و غذایی حائز اهمیت است زیرا در برابر حرارت مقاوم است اکثرا گرم مثبت هوازی و بی هوازی هستند دو.جنس مهم اسپوردار دارند

باسیلوس آنتراسیس : عامل سیاه زخم که در گاو ، گوسفند ، اسب بیماری ایجاد و به انسان منتقل میشود.

کلستردیوم : بی هوازی اجباری است ، کلاستردیوم تتانی عامل کزاز، کلستردیوم بوتولینوم عامل بوتولیسم ، کلستردیوم پرفرنجنس قانقرن گازی ایجاد میکند.

**قارچ ها:**

قارچ ها همگی هتروتروفند برای رشد به ترکیبات آلی برای اخذ انرژی و کربن نیاز دارند قارچ ها هوازی هستندساپروفیت ودر خاک و اب بسر میبرند که در گردش عناصر در طبیعت دخالت دارند علم مطالعه قارچ شناسی Mycology و قارچ شناسی پزشکی Medical mycology مینامند. قاچ ها شامل مخمر ها (Yeast) کپک ها و قارچ های گوشتی است. مخمر ها قارچ هایی تک سلولی بوده و کپک ها پر سلولی و رشته ای هستند ( سفیدک ، زنگ و سیاهک ) . قارچ های گوشتی شامل قارچ چتری کلاواریا و پاف باله میباشد. ریسه کپک یا قارچ عبارت است از رشته های مرکب از سلول های پشت سر هم که انرا Hypha مینامند .

مخمر قارچهای تک سلولی فاقد ریشه بوده و به شکل کروی یا بیضوی دیده میشود این دسته از قارچ ها مانند کپک ها درطبیعت انتشار وسیع داشته و روی میوه ها و برگ ها بصورت پوشش سفید پودر مانند پیدا میشود مخمر ها با جوانه زدن تکثیر میابند و به طریق بی هوازی اختیاری رشد مینمایند که از اکسیژن یا ترکیبات آلی بعنوان پذیرنده نهایی e استفاده میکنند در برابر اکسیژن هیدرات کربن را تخمیر کرده اتانول و دی اکسید کربن تولید میکند این فرایند اساس صنایع تهیه مشروبات الکلی و شیرینی پزی است ساکارومیسز برای تهیه اتانول و دی اکسید کربن جهت ور امدن نان بکار میرود. برخی از قارچ ها دو شکلی هستند این قبیل قارچ ها اغلب بیماریزا و قادرند بصورت کپک یا به حالت مخمر رشد نماید این پدیده تابع درجه حرارت محیط میباشد قارچ در 37 درجه مخمر در 25 درجه بشکل کپک دیده میشود.

**پروتوزوئر ها :**

جانداران یوکاریوت تک سلولی هستند که به قلمرو آغازیان تعلق دارد اینها ساکن آب ، خاک بوده و از ذرات مواد غذایی و باکتری ها تغذیه میکند عده ای از آنها فلور طبیعی بدن جانداران هستند . در دستگاه گوارش موریانه و گاو به هضم سلولز کمک میمند و عده ای کیست تولید میکنند انتاموبا هیستولایتیکا باعث آلودگی آب میشود.