دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی،
آزمایشگاه میکروبیولوژی

آزمایشگاه میکروب ۲

اثر عوامل فیزیکی و شیمیایی بر رشد باکتری ها
اثر حرارت

تهیه کننده : سهیلا عباسی

زمینه ی نظری

- به احتمال زیاد دما مهم‌ترین فاکتور محیطی مؤثر بر رشد و بقای میکروارگانیسم‌ها است. هم در دماهای بسیار سرد و هم بسیار گرم، میکروارگانیسم‌ها قادر به رشد نخواهند بود و حتی ممکن است بمیرند. دماهای بیشینه و کمینه‌ی رشد در میان میکروارگانیسم‌های مختلف بسیار متنوع است و نمودی از بازه‌ی دمایی و دمای متوسط زیستگاه آن‌ها است.

- دما به دو شیوه‌ی متضاد برمیکروارگانیسم‌ها اثر می‌گذارد. با بالا رفتن دما، واکنش‌های شیمیایی و آنزیمی سلول با سرعت بیشتری پیش می‌روند و رشد سریع‌تر می‌شود. با وجود این، بالاتر از دمایی خاص، ممکن است اجزای سلولی دچار آسیب‌های برگشت‌ناپذیری شوند شوند.

- بنابراین، با بالا رفتن دما در یک بازه‌ی خاص، رشد و عملکردهای متابولیک تا نقطه‌ی آغاز واکنش‌های دناتوره شدن افزایش می‌یابد. در بالای این نقطه، عملکردهای متابولیک به صفر می‌رسد.

- برای هر میکروارگانیسم یک دمای کمینه، که پایین‌تر از آن رشد امکان پذیر نیست، یک دمای بهینه که رشد در آن سریع‌ترین حالت است و یک دمای بیشینه که بالاتر از آن رشد امکان‌پذیر نیست، وجود دارد. این سه دما، که دماهای اصلی نام دارند، برای هر میکروارگانیسم خاص مشخص هستند.

- دماهای اصلی میکروارگانیسم‌های مختلف به طور گسترده‌ای با هم اختلاف دارند. دمای بهینه برخی از ارگانیسم‌ها ۴ درجه سانتی‌گراد و برخی دیگر تا حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد است.

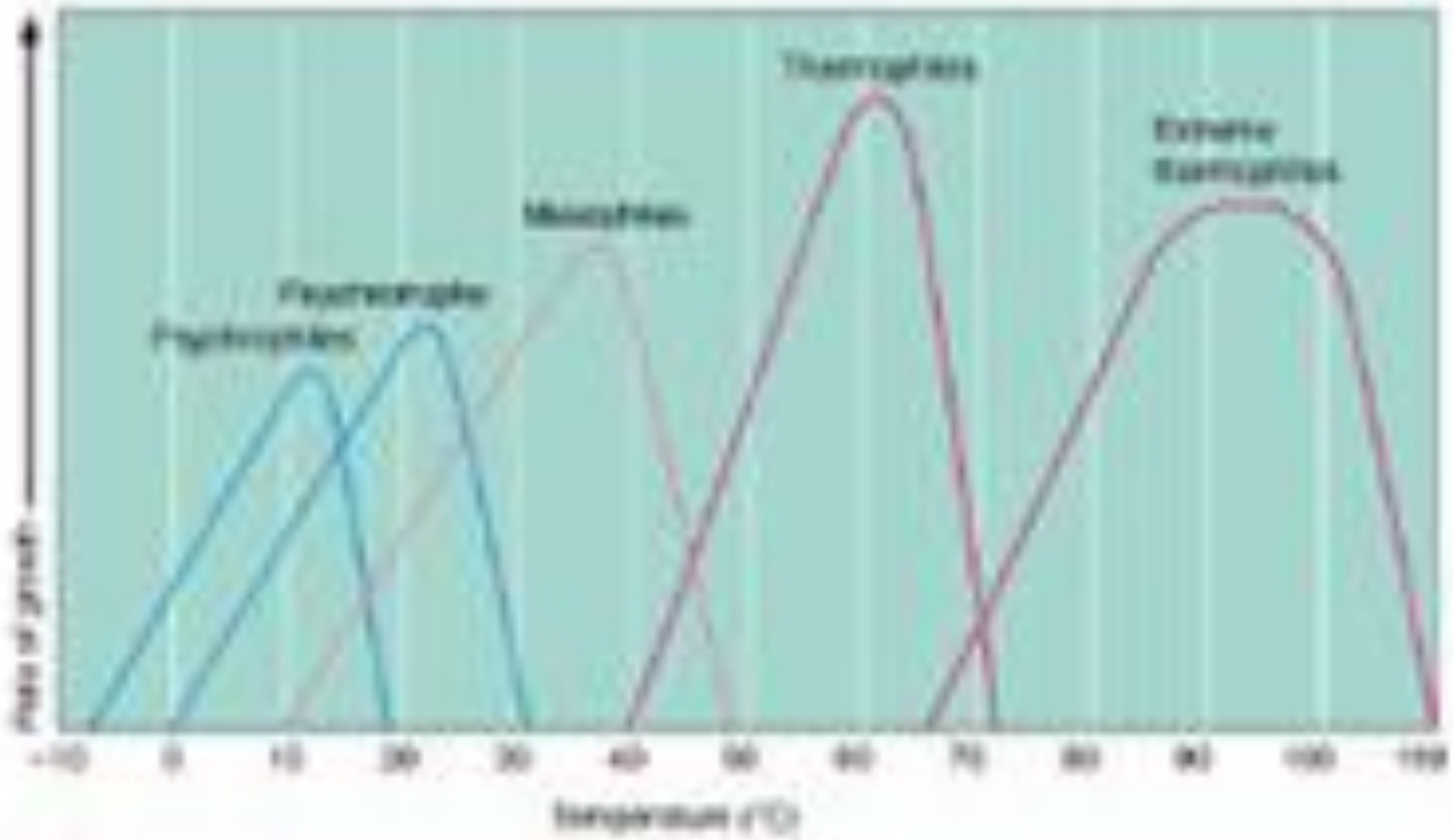
- بازه‌ی دمایی رشد میکروارگانیسم‌ها حتی از این هم گسترده‌تر است، از پایین‌تر از نقطه‌ی انجماد گرفته تا بسیار بالاتر از دمای جوش آب. با وجود این، از آن جایی که این بازه برای هر ارگانیسم خاص به طور معمول ۴۰-۲۰ درجه است، هیچ تک ارگانیسمی قادر به رشد در تمام این بازه‌های دمایی نیست.

گرما

- میدان حرارتی که در آن باکتریها رشد می‌کنند از چند درجه زیر صفر تا حدود ۸۰ درجه می‌باشد. گاهی باکتریها را از روی این میدان حرارتی به سه گروه تقسیم بندی می‌کنند. باکتریهای سرما دوست فراوان هستند. صفت اصلی که باکتری سرما دوست را مشخص می‌کند توانایی رشد آن در صفر درجه است. اکثر باکتریهایی که مورد مطالعه بیشتر دانشمندان قرار گرفته‌اند از انواعی هستند که در گرمای متوسط بیشتر رشد می‌کنند درجه حرارت برای رشد این گروه بین ۵۲ - ۱۰ درجه است. باکتریهای گرما دوست درجه حرارتی را ترجیح می‌دهند که برای اکثر جانوران غیر قابل تحمل است.

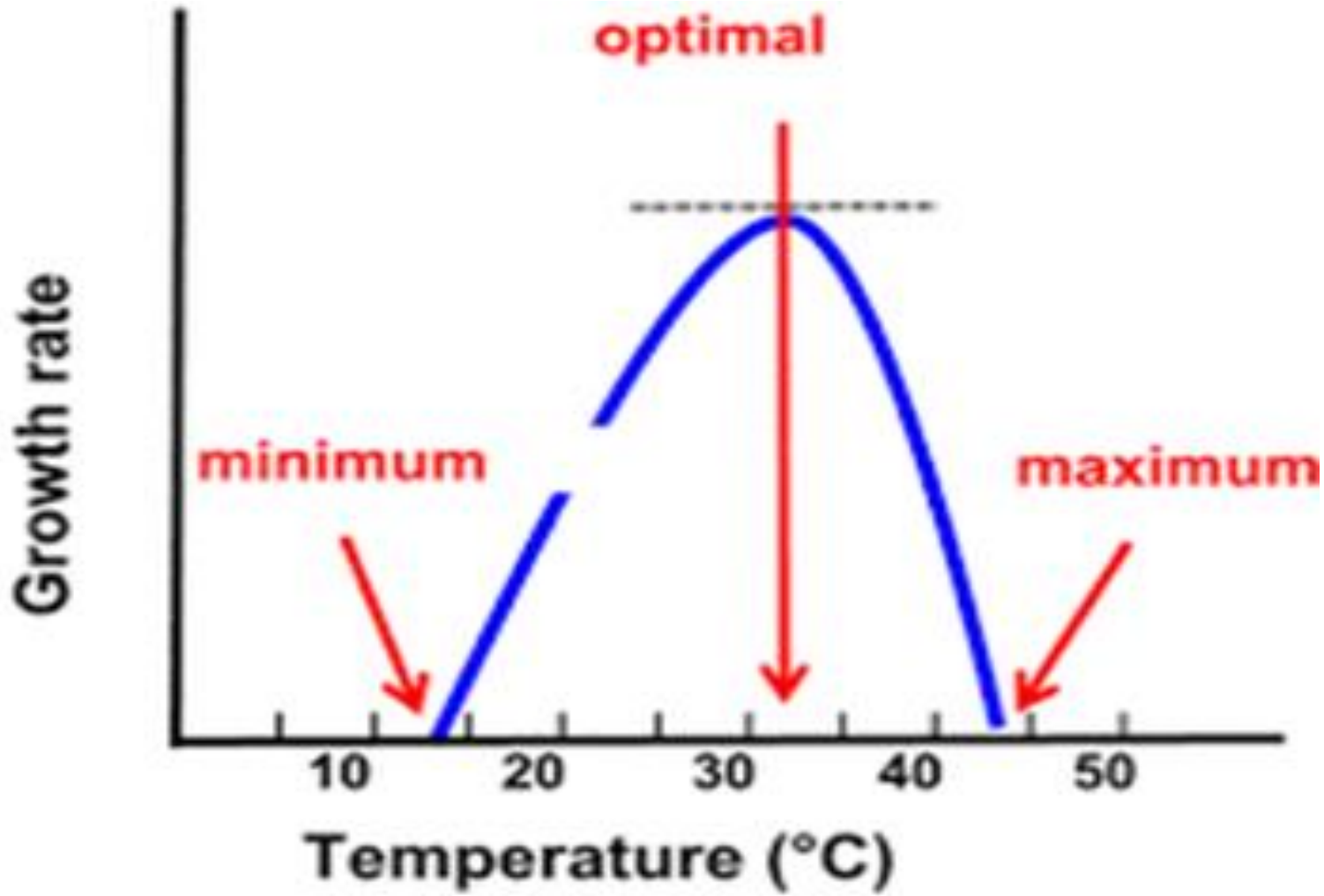
از باکتریهای مقاوم به حرارت می‌توان **مایکوباکتریوم** ، **میکروکوکها** ، **استرپتوکوکها** و برخی **لاکتو باسیلها** را نام برد. تاثیر درجه حرارت بر روی رشد باکتریها مکانیسم پیچیده‌ای دارد. سرعت واکنشهای آنزیمی با گرما تغییر می‌کند. این سرعت در گرمای پایین کند بوده و با بالا رفتن درجه حرارت افزایش می‌یابد. با استفاده از درجه حرارت بالا می‌توان اقدام به کشتن باکتریها کرد. هر قدر درجه حرارت بالاتر باشد زمان مرگ کوتاه‌تر است، باسیل سل در ۵۸ درجه در مدت ۳۰ دقیقه ، در ۵۹ درجه در مدت ۲۰ دقیقه و در ۶۵ درجه در مدت ۲ دقیقه کشته می‌شود. مقاومت گونه‌های مختلف در مقابل حرارت متفاوت است.

Growth Rates of Bacterial Groups at Different Temperatures



• درجه حرارت

- حرارت یکی از مهمترین عوامل موثر بر روی رشد ونمو باکتری است. درجه حرارتی که یک باکتری را در بهترین شرایط رشد و نمو قرار می دهد به طوری که باکتری قادر به انجام کلیه اعمال حیاتی خود باشد، درجه حرارت اپتیموم (optimum) نامیده می شود. در این درجه حرارت ، آنزیم های باکتری دارای بیشترین فعالیت هستند.
- هر نوع باکتری فقط در یک میدان حرارتی معین رشد می کند که از ویژگی های گونه ای محسوب می شود. حداقل درجه حرارتی که باکتری بتواند در آن درجه حرارت به اعمال حیاتی خود ادامه دهد ولی اگر درجه حرارت کمتر شود عامل مزبور نیز متوقف گردد، درجه حرارت حداقل(minimum) نام دارد.
- درمقابل، حداکثر درجه حرارتی که یک باکتری بتواند در آن درجه حرارت به اعمال حیاتی خود ادامه دهد ولی اگر درجه حرارت زیادتر شود اعمال مزبور متوقف گردد، درجه حرارت حداکثر (maximum) نامیده می شود. درجه حرارت های اپتیمم ، مینیمم و ماکزیمم برای هر گروه از باکتری ها اختصاصی است.


optimal
minimum
maximum
Growth rate
10
20
30
40
50
Temperature (°C)

- باکتری ها را بر حسب تحملشان نسبت به دامنه ای از تغیرات دمایی به سه دسته تقسیم می کنند:

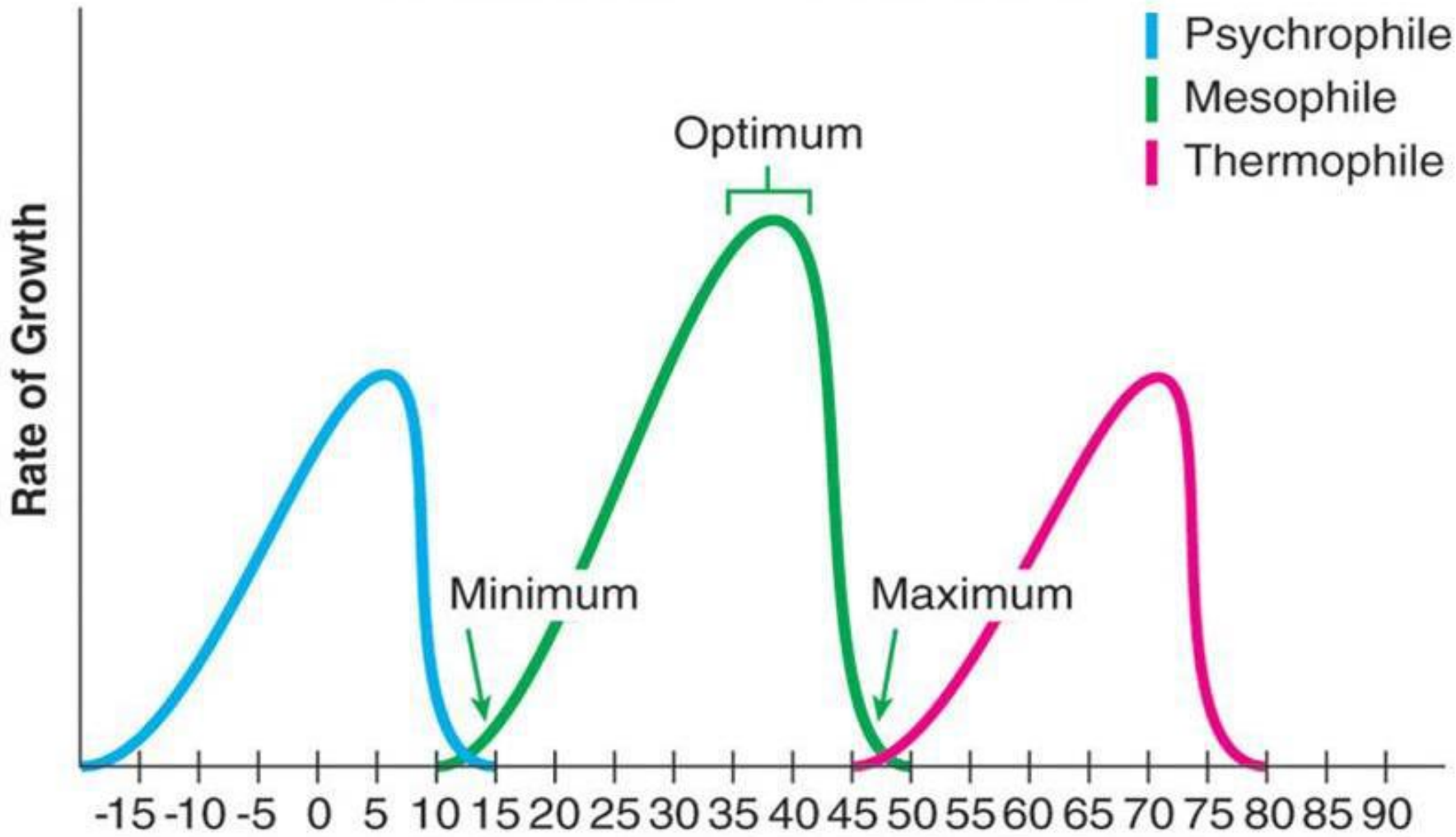
- **۱- باکتری های مزوفیل: Mesophile**

- این دسته از باکتری ها می توانند درجه حرارت های بین ۱۱ تا ۵۴ درجه سانتی گراد را تحمل نمایند.اما درجه اپتیمم آنها بین ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتی گراد است . باکتری های بیماری زا وغیر بیماری زای ساکن در بدن انسان جزء این دسته هستند

- **۲- باکتری های گرما دوست یا ترموفیل: Thermophile**

- درجه حرارت قابل تحمل برای این دسته از باکتری ها بین ۴۵ تا ۸۰ درجه سانتی گراد است و درجه حرارت اپتیمم آنها بین ۶۵ تا ۷۰ درجه سانتی گراد است. مثل باکتری های موجود در چشمه های آب گرم .

- **۳- باکتری های سرما دوست یا کریوفیل : Psychrophile**
- درجه حرارتی که این باکتری ها قادر به تحمل آن هستند بین ۱۴ - تا ۱۴ درجه سانتی گراد قرار دارد. درجه حرارت اپتیمم برای این گروه ۴ تا ۱۱ درجه ی سانتی گراد است.
- اختلاف باکتری ها در تحمل درجات حرارتی مربوط به مقاومت آنزیم ها و پروتئین های باکتری ها در برابرگرماست. از حساسیت و تحمل پذیری باکتری ها به دماهای بالا و پایین در کنترل رشد میکروب ها استفاده می شود.
- البته باید توجه داشت که تقسیم بندی فوق الذکر اسپور باکتری ها را در بر نمی گیرد، زیرا اسپورها به دماهای بالا مقاومند. مثلا" بعضی از اسپورها می توانند تا ۴ ساعت درجه حرارت ۱۱۱درجه سانتی گراد را تحمل کنند.


Psychrophile
Mesophile
Thermophile
Optimum
Rate of Growth
Minimum
Maximum
-15 -10 -5 0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90

- به طورکلی دماهای بین ۵۰ تا ۱۰۰ درجه برای باکتری ها و اسپورهایشان کشنده است. وقتی که دما به بالای ۵۰ درجه می رسد یکسری تغییرات نامطلوب بر روی باکتری به جا می گذارد که این تغییرات علاوه بر آن که به دما بستگی دارد، به زمان هم بستگی دارد.
- وقتی دما بالا می رود، آنزیم های مؤثر بر رشد باکتری دناتوره و تخریب می شوند که نهایتاً متابولیسم سلولی مختل شده و موجب مرگ باکتری می شود، در حالی که وقتی دما پایین می‌آید متابولیسم کم می شود اما باکتری نمی میرد. به همین علت برای بررسی اثر حرارت، از روش های مختلفی از جمله (TDT) و (TDP) استفاده می شود:
- TDT (زمان مرگ حرارتی): زمان لازم برای کشته شدن سوسپانسیونی از باکتری ها و اسپورها در دمایی معین است.
- TDP (نقطهٔ مرگ حرارتی): تعیین دمایی که به مدت ۱۰ دقیقه لازم است تا میکروارگانیسم از بین برود.

- از بین بردن باکتری ها تحت تأثیر گرما به ۴ عامل بستگی دارد:
- الف) نوع باکتری (که اسپوردار باشد یا نه).
- ب) تعداد باکتری (که هرچه تعداد باکتری ها بیشتر باشد، حرارت بیشتری برای از بین بردن باکتری ها نیاز است).
- ج)pH(pH محیط اگر خنثی باشد حرارت بیشتری برای از بین بردن باکتری ها نیاز است).
- د) غلظت محیط کشت (هرچه محیط حاوی املاح، اسیدهای نوکلوئیک و پروتئین های بیشتری باشد، حرارت بیشتری برای از بین بردن باکتری ها نیاز است).
- یکی از روشهای استریل کردن مواد به خصوص داروها استفاده از شوک حرارتی می باشد.

مواد و وسایل

- 1- کشت باکتری ۲- کریستال ویوله ۳- لوگول ۴ - اتانول ۵- سافرانین ۶ - دستگاه بن ماری ۷- پیست ۸- لوپ ۹- شعله ۱۰- میکروسکوپ ۱۱- پنبه ۱۲- تشتک رنگ آمیزی

شرح آزمایش

- **روش آزمایش مرگ حرارتی :**
- باکتری مورد نظر را در۴ عدد محیط کشت TSB تلقیح می‌کنیم که یکی از آنها محیط کشت شاهد است، ۳ محیط دیگر را در دستگاه بن ماری که روی درجه حرارت ۸۰ تنظیم شده می‌گذاریم. محیط کشت اول را پس از ۱ دقیقه، محیط کشت دوم را پس از ۵ دقیقه و محیط کشت سوم را پس از ۱۰ دقیقه از دستگاه بیرون می آوریم و در ظرف یخ خنک می‌کنیم و به مدت ۲۴ ساعت آنها را به همراه محیط کشت شاهد در انکوباتور می‌گذاریم.
- پس از آن از محیط کشت شاهد و محیط کشتی که باکتری در آن رشد کرده لام تهیه می‌کنیم و آنها را رنگ آمیزی می‌کنیم و زیر میکروسکوپ تغییرات مورفولوژی را دراثرشوک حرارتی مشاهده و یادداشت می‌کنیم.

- **تعیین دمای بهینه رشد:**

- برای تعیین دمای بهینه از سه باکتری در نظر گرفته شده استفاده می‌شود. سه پلیت نوترینت آگار برداشته و هر کدام را به سه قسمت تقسیم کرده با لوپ یکسان که به یک اندازه از محیط بردارد روی پلیت‌ها کشت می‌دهیم پشت پلیت مشخصات را نوشته و بعد پتری دیش ها را در در دماهای مختلف زیر به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت قرار می‌دهیم:

- یخچال (۴- ۰ درجه)، آزمایشگاه (۲۵- ۲۲ درجه)، انکوباتور (۳۷- ۳۵ درجه)، فور (۵۵- ۵۰)

نتیجه گیری :

۵ دقیقه در بنماری

نمونه شاهد : بدون حرارت

۱ دقیقه در بنماری

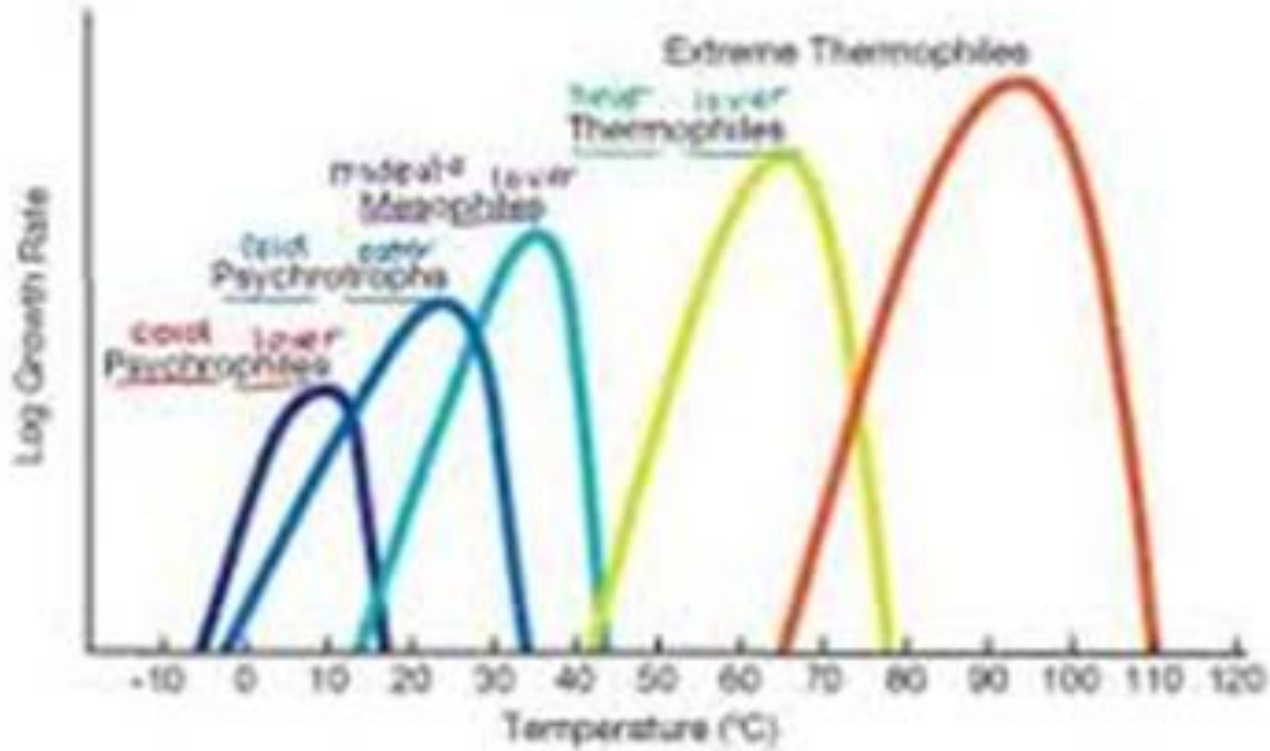
۱۰ دقیقه در بنماری

•سرما

- مقاومت باکتری ها در برابر سرما متفاوت است. بعضی از آن ها نظیر نیسریاگونوره و پسودوموناس آئروژینوزا ،در حرارت صفر درجه فوراً از بین می روند. اما غالب آن ها همچون استافیلوکوک ها، باسیل مولد سل و باسیل مولد تیفوئید، در درجات زیر درجه حرارت می نیمم، مدت ها زنده می مانند.
- بسیاری از باکتری ها در هوای مایع (۱۵۱ - تا ۱۰۵ -) و حتی اکسیژن مایع (۲۴۲ -) زنده باقی می مانند.
- اصولاً دمای پایین، الزاماً میکروب ها را نمی کشد بلکه درجه حرارت های زیر درجه حرارت می نیمم، رشد و تکثیر آن ها را متوقف می کند. در مورد باکتری هایی که در دمای زیر درجه حرارت می نیمم از بین می روند، مکانیسم مرگ هنوز بدرستی شناخته نشده است.

- یکی از مهمترین دلایل مرگ باکتری ها در اثر سرما، پاره شدن جدار آن ها در نتیجه ی بوجود آمدن تبلورات کریستال های نوک تیز یخ در داخل آن ها است. بروز این نوع کریستال ها در حالتی رخ می دهد که باکتری ها را به آرامی سرد کنند.
- در صورتی که باکتری ها را یک مرتبه سرد نمایند، سیتوپلاسمشان به ماده ی یکنواخت بلور مانندی تبدیل می شود که مدت ها به همان حال باقی می ماند. حال اگر باکتری ها مجدداً در شرایط مساعد قرار گیرند، سیتوپلاسمشان به حالت ابتدایی بر خواهد گشت و شروع به رشد و تکثیر می کنند.

2-9: The Effect of Temperature on Microbial Growth



دانشگاه اصفهان

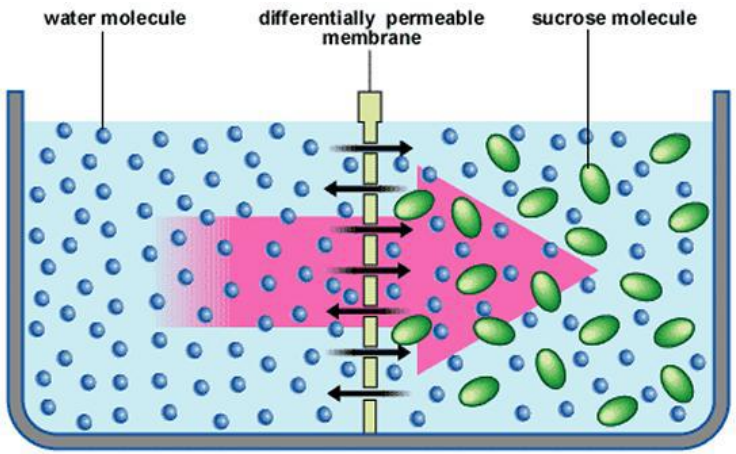
دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، آزمایشگاه میکروبیولوژی

آزمایشگاه میکروب ۲

اثر عوامل فیزیکی و شیمیایی بر رشد باکتری ها
اثر فشار اسمزی

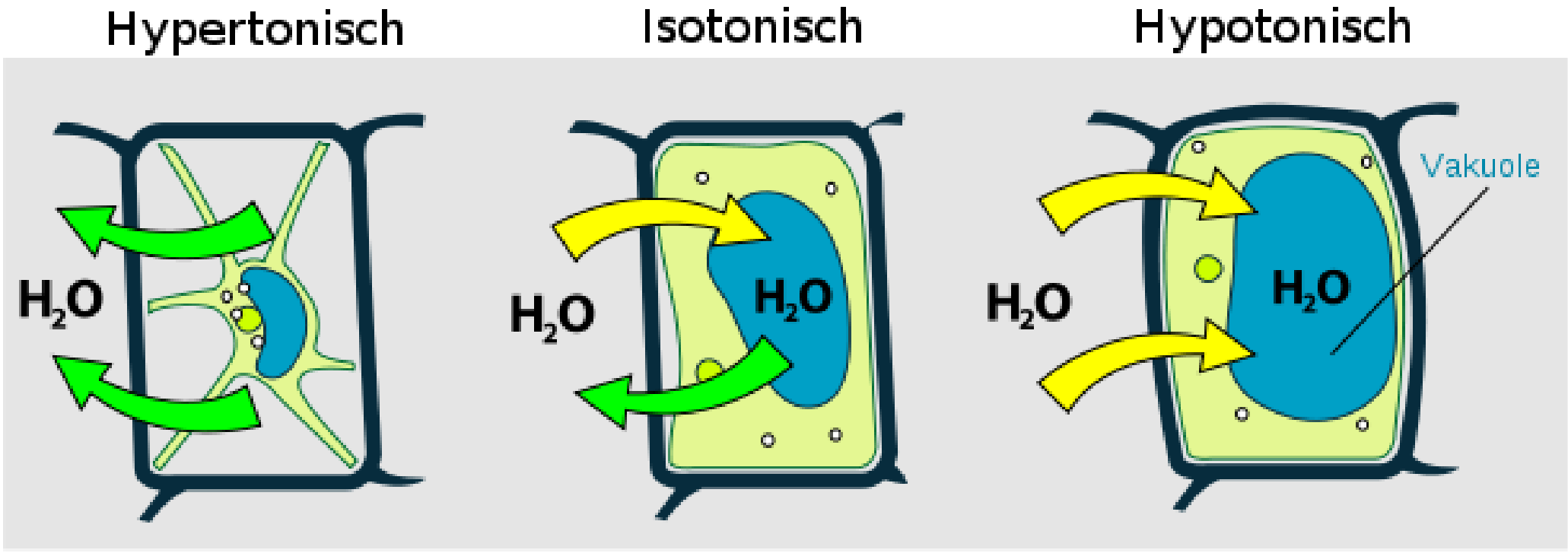
فشار اسمزی

- اسمز عبارت است از انتشار مولکول های حلال از خلال پرده ی نیمه تراوا.



- فشار اسمزی یک محلول مستقیماً به تراکم مواد حل شده در آن بستگی دارد.
- دو محلول با فشار اسمزی یکسان را اصطلاحاً ایزوتونیک می نامند.
- هنگامی که دو محلول با فشار اسمزی نابرابر مقایسه می شود، محلول واجد فشار اسمزی بالا را هیپرتونیک و دیگری را هیپوتونیک می نامند.
- هنگامی که یک سلول سالم در محلول با فشار اسمزی بالا قرار گیرد، پلاسمولیز حاصل می شود.یعنی آب از سیتوپلاسم به محیط خارج سلول عبور می کند و پروتوپلاسم در داخل سلول بصورت توده کوچکی چروکیده می شود. در این حالت فعالیت متابولیکی متوقف می ماند و سلول به حالت خفته در می آید یا می میرد. چنین سلول هایی اگر به سرعت به شرایط اسمزی طبیعی انتقال داده شوند سالم می مانند.

- اگر یک سلول سالم در محلول با فشار اسمزی پایین قرار بگیرد، تورژسانس حاصل می شود. در این حالت آب از خارج سلول وارد سیتوپلاسم شده و سلول متورم می شود. اگر این سلول دارای دیواره ی سلولی نباشد سلول آن قدر متورم شده که نهایتا می ترکد ولی در سلول هایی که دارای دیواره هستند، دیواره از پارگی سلول جلوگیری می کند.


Hypertonisch
Isotonisch
Hypotonisch
H_2O
H_2O
H_2O
H_2O
H_2O
Vakuole
Plasmolyse
Grenzplasmolyse
Turgeszent

- فشار اسمزی پروتوپلاسم باکتری سالم بیش از فشار اسمزی محیط کشت است. به عبارت دیگر سلول باکتری تراکم بیشتری از املاح، اسیدهای آمینه و سایر ترکیبات آلی و کانی در مقایسه با محیط کشت دارد. این فشار اسمزی بالا موجب نفوذ آب (بنا به خاصیت اسمز) از خلال غشاء سیتوپلاسمی نیمه تراوا به درون سلول می شود و باعث می شود که تحت شرایط معمول کشت، سلول ها معمولاً حالت آماس داشته باشند. در این حالت دیواره سلولی باکتری ها از پاره شدن غشاء سلولی باکتری ها جلوگیری می کند.
- در باکتری های بدون دیواره، تحت این شرایط غشاء سیتوپلاسمی پاره و سلول لیز می شود. به این جهت باکتری های بدون دیواره را در شرایط ایزوتونیک نگهداری می کنند.
- پلاسمولیز کردن باکتری های گرم مثبت به مراتب دشوارتر از باکتری های گرم منفی است، زیرافت شار اسمزی در باکتری های گرم مثبت چند برابر باکتری های گرم منفی است. شکل سلول های پرورش یافته در محیط واجد فشار اسمزی نسبتاً بالا، تغییر یافته و بصورت دراز، رشته ای و متورم در می آید و سلول ها بطور نامنظم رنگ می گیرند.

- **میکروب های اسموفیل : Osmophile**میکروب هایی را که به فشار اسمزی بالا سازش پیدا کرده باشند، اسموفیل می نامند.
- **میکروب های هالوفیل : Halophile**میکروب هایی را که قادر به رشد در محلول های فاقدنمک نمی باشند، هالوفیل می نامند.

- میکروارگانیسم‌های دریایی معمولاً به سدیم کلراید نیاز ویژه‌ای دارند و در مقادیر آب فعال دریا به طور بهینه رشد می‌کنند. چنین ارگانیسم‌هایی نمک دوست نام دارند.

- هالوفیل‌ها نوعاً برای رشد به مقداری حداقل از سدیم کلراید نیاز دارند، اما بهینه آن‌ها بر اساس ارگانیسم و زیستگاه متفاوت است. برای مثال، ارگانیسم‌های دریایی معمولاً با ۴-۱٪ سدیم کلراید

- ارگانیسم‌های محیط‌های فوق نمکی (محیط‌هایی که نمک آن‌ها از دریا بیشتر است)، در ۱۲-۳٪ بهترین رشد را دارند،

- ارگانیسم‌های گرفته شده از محیط‌های فوق نمکی افراطی حتی به سطوح بالاتری از سدیم کلراید نیازمند هستند و نیازمندی رشد به سدیم کلراید را نمی‌توان با کلرید پتاسیم جبران کرد، یعنی این که نمک دوست‌ها به Na^+ نیاز مطلق دارند.

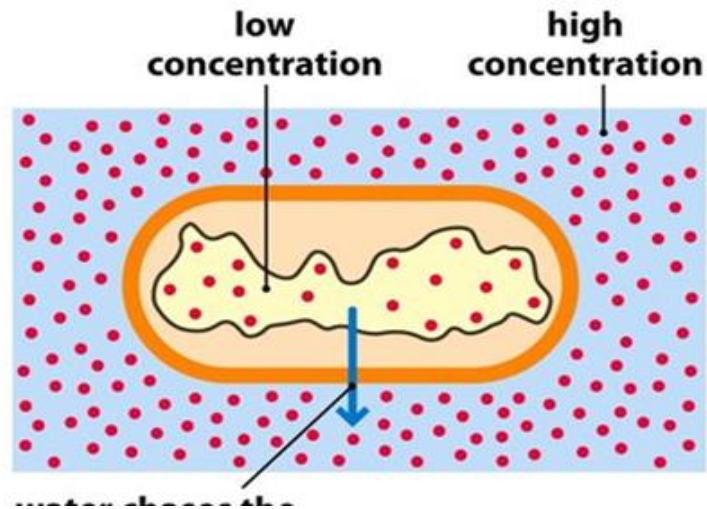
- بیشتر میکروارگانیسم‌ها نمی‌توانند در محیط‌هایی با آب فعال بسیار پایین مقاومت کنند و تحت چنین شرایطی یا می‌میرند یا دهیدراته شده و به شکل خفته در می‌آیند. تحمل کننده-های نمک تا حدی قادر به کاهش a_w محیط خود هستند، اما در نبود ماده‌ی محلول اضافه شده بهترین رشد را دارند.

- ارگانیسم‌هایی که دارای توانایی رشد در محیط‌های بسیار نمکی هستند، نمک دوست افراطی نام دارند. این ارگانیسم‌ها برای رشد بهینه، بر اساس گونه به ۳۰-۱۵٪ سدیم کلراید نیاز دارند.ارگانیسم‌هایی که می‌توانند در محیط‌هایی با شکر بالا به عنوان یک ماده‌ی محلول رشد کنند اسموفیل نامیده می‌شوند و آن‌هایی که قادر هستند در محیط‌های بسیار خشک (که مواد محلول حل شده در آن به دلیل فقدان آب خشک شده‌اند) رشد کنند گزروفیل نام دارند.

Bacterial growth: osmotic pressure

- High salt concentrations can be used to preserve food (cure meats).
  - Cause a hypertonic environment and plasmolysis.
  - This is an imperfect way to preserve food because some bacteria are **halophilic** and require and thrive in high salt concentrations.

Plasmolysis



- بعضی از ارگانیسم‌ها در آب فعال پایین به خوبی رشد کرده و در واقع برای رشد به آن نیازمند هستند. این ارگانیسم‌ها نه تنها از دید سازگاری برای زندگی تحت این شرایط، بلکه از دیدگاهی کاربردی نیز حائز اهمیت هستند.
- برای مثال، در صنعت مواد غذایی، که مواد محلولی مانند نمک و ساکارز به طور متداول به عنوان نگهدارنده برای بازدارنده‌های رشد میکروبی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

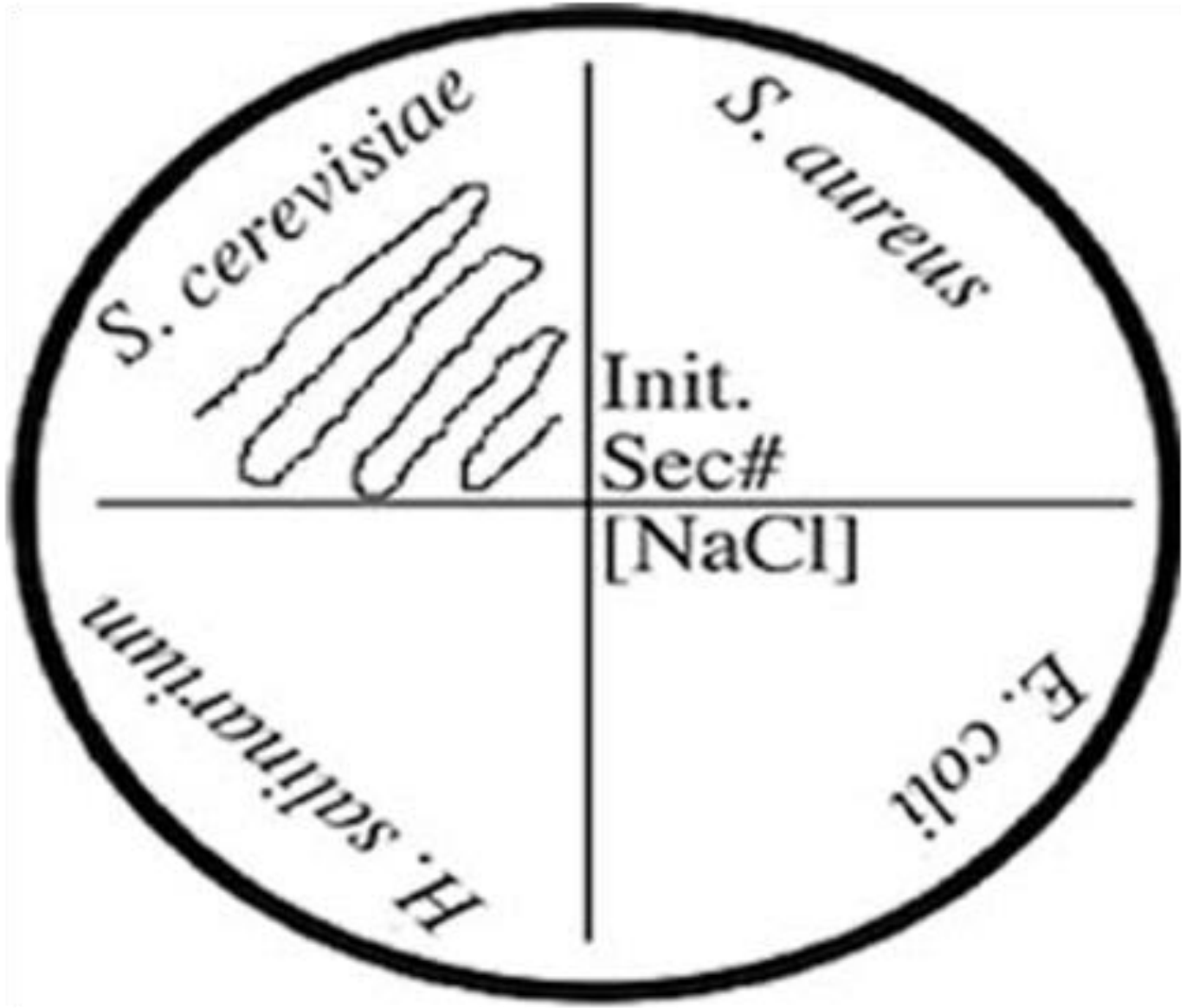
- همان طور که گفته شد اگر سلول را در محلولی hypotonic قرار دهیم که غلظت مواد غیر نافذ آن کمتر از ۲۸۲ mOsm/lit باشد آب به درون سلول منتشر خواهد شد و آن را متورم خواهد کرد، آب پیوسته به درون سلول منتشر می شود و ضمن رقیق سازی مایع داخل سلولی، مایع خارج سلولی را غلیظ خواهد کرد؛ این اتفاق تا زمانی ادامه می یابد که اسمولاریته در محلول تقریبا برابر شود. محلول های کلرید سدیم با غلظت کمتر از ۰/۹ درصد هیپوتونیک هستند و سلول را متورم می سازند.
- اگر سلول را در محلولی hypertonic که غلظت مواد غیر نافذ آن بیشتر است قرار دهیم، آب از سلول وارد مایع خارج سلولی خواهد شد و ضمن تغلیظ مایع داخل سلولی، مایع خارج سلولی را رقیق خواهد کرد. در این مورد سلول چروکیده خواهد شد تا این که غلظت دو طرف برابر شود. محلول های کلرید سدیم با غلظت بیشتر از ۰/۹ درصد هیپرتونیک هستند.
- محلول ۰/۹ درصد کلرید سدیم و محلول ۵ درصد گلوکزهم نمونه هایی از محلول های ایزوتونیک هستند.

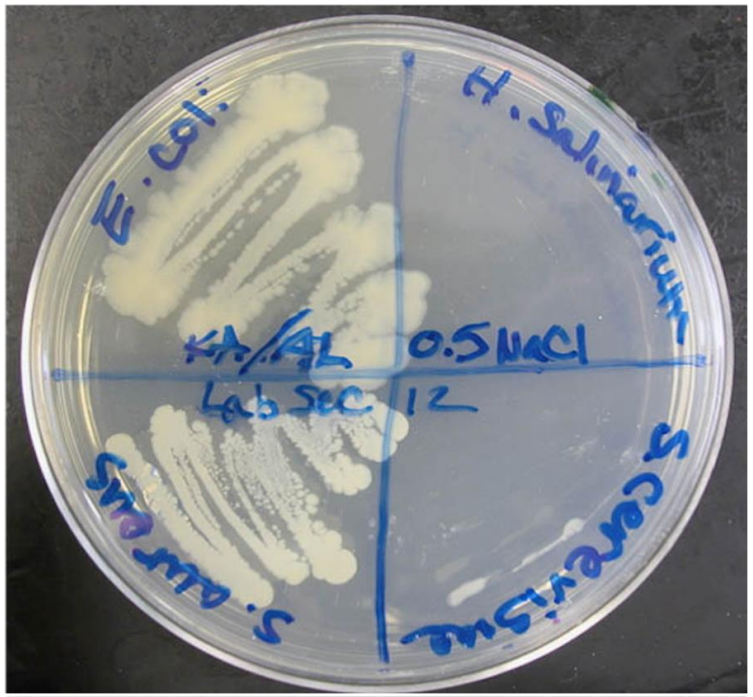
مواد و وسایل

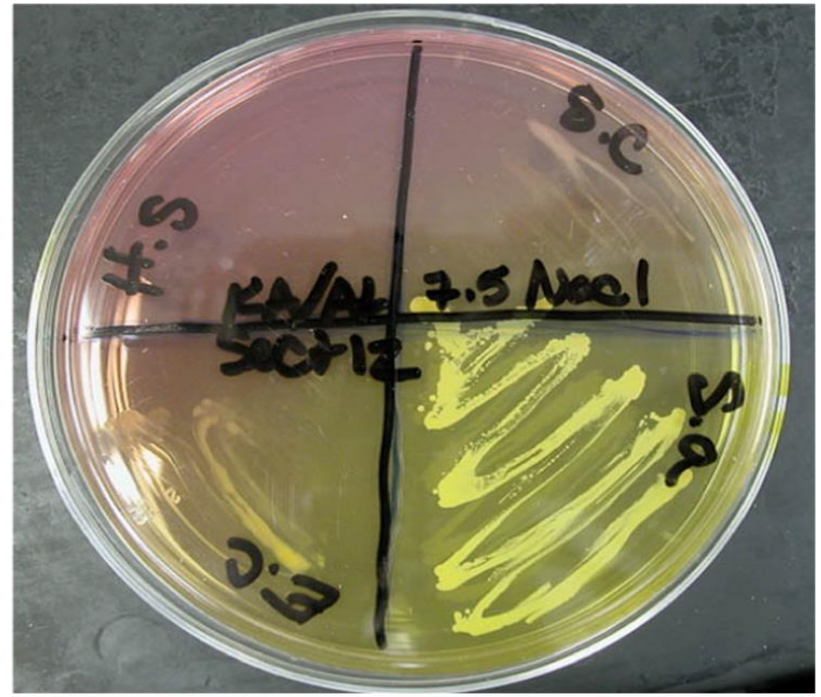
- 1- کشت باکتری ۲- کریستال ویوله ۳- لوگول ۴- اتانول ۵- سافرانین ۶- انکوباتور ۶- پیست ۷- لوپ ۸- شعله ۹- میکروسکوپ ۱۰- پنبه ۱۱- تشتک رنگ آمیزی
- و محیط کشت های TSAبا درصد متفاوت:
- TSA + 1% Glucose (محیط کشت شاهد)
- TSA + 1% G + 5% NaCl
- TSA + 1% G + 10% NaCl
- TSA + 1% G + 15% NaCl
- TSA + 1% G + 5% Sucrose
- TSA + 1% G + 30% S

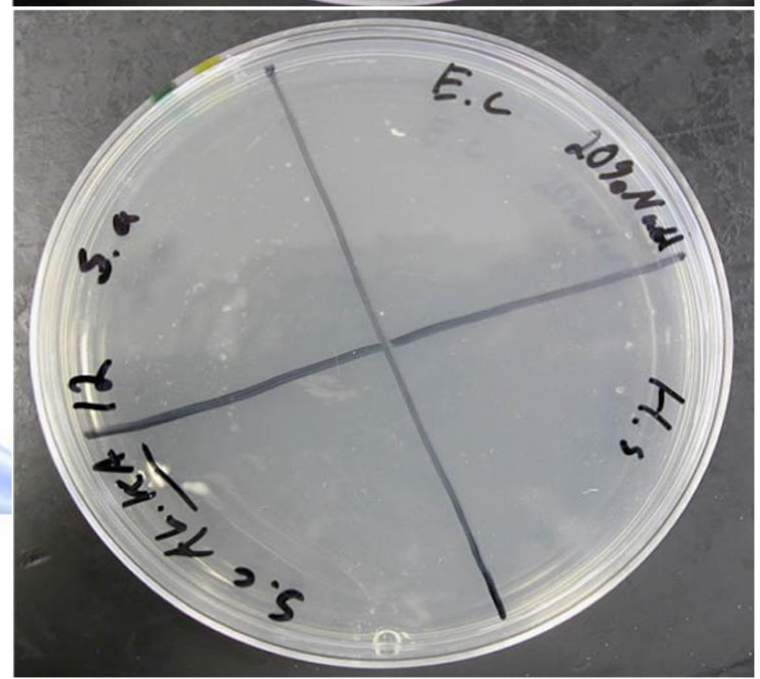
شرح آزمایش

- ۱- باکتری استافیلوکوکوس آرئوس را در محیط کشتهای TSA با درصدهای متفاوت NaCl و ساکارز که در بالا گفته شد، کشت می‌دهیم.
- ۲- آنها را در انکوباتور می‌گذاریم.
- ۳- پس از ۲۴ ساعت ، از محیط کشت شاهد لام تهیه می‌کنیم و با استفاده از رنگ آمیزی گرم مورفولوژی اصلی باکتری را مشاهده می‌کنیم.
- ۴- سپس محیط کشتی که باکتری در آن رشد نکرده را نیز یادداشت میکنیم و از محیط کشت قبلی آن لام تهیه می‌کنیم و مورفولوژی تغییر یافته‌ی آن دراثر تحمل فشار اسمزی را هم با رنگ آمیزی گرم مشاهده می‌کنیمSA + 1% G + 5% Sucr .

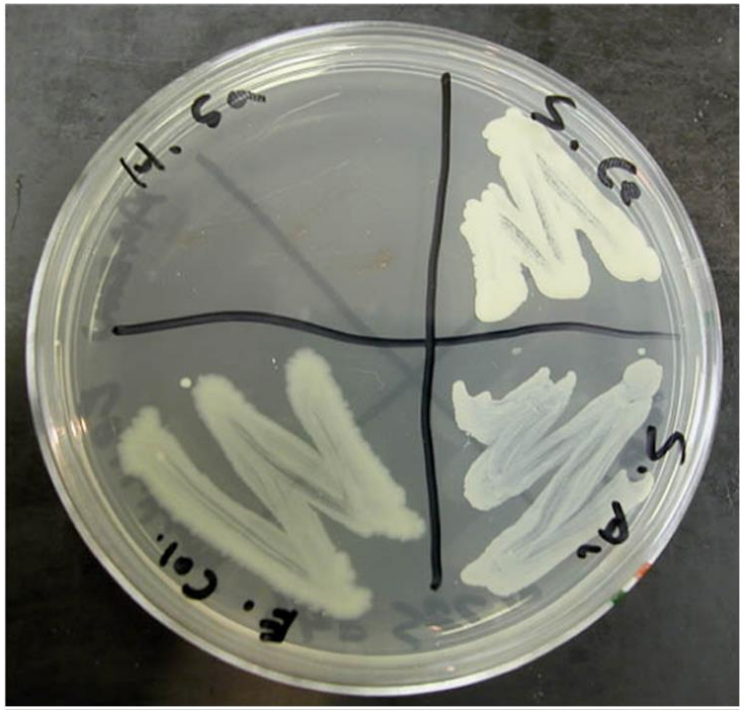

S. cerevisiae
S. aureus
Init.
Sec#
[NaCl]
H. salinarium
E. coli


E. coli
H. Salinarium
S. aureus
S. cerevisiae
KA/AL 0.5 NaCl
Lab Sec 12


S.C
S.A
KA/AL 7.5 NaCl
Sec 12
S.A
E.C


E.C 20% NaCl
H.S
S.C AL.KA 12
S.A

AL.KA
S.C
Sec 12
S.A
25% NaCl
H.S
E.C



0/5-10-20-50

از حسن توجه شما سپاسگزارم