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 پرتوهای فرابنفش

تهیه کننده : سهیلا عباسی

# پرتوها

- پرتوها دو نوع اثر بر روی باکتریها دارند: اثر مرگ آور که در آن مرگ باکتریها سرانجام رخ می‌دهد به عبارت دیگر در هر لحظه از زمان درصد ثابتی از سلولهای زنده کشته می‌شوند و تولید جهش ژنی در بین توده باکتریهای زنده.
- پرتوهای آبی- بنفش اشعه خورشید به شدت رشد باکتریها را متوقف می‌سازند.
- هنگامی که میکروب در معرض پرتو فرابنفش قرار داده شده و سپس تحت تاثیر نور مرئی قرار گیرد، بار دیگر زنده می‌شود، این پدیده را دوباره فعال شدن در مجاورت نور می‌نامند.
- پرتوتابی با پرتو فرابنفش ، جهش ایجاد می‌کند و با روشهای مناسب می‌توان جهش یافتگان را از بین توده باکتریها انتخاب کرد.
- از پرتوتابی با پرتو فرا بنفش برای سترون کردن مواد غذایی هم استفاده می‌شود.

# پرتوها

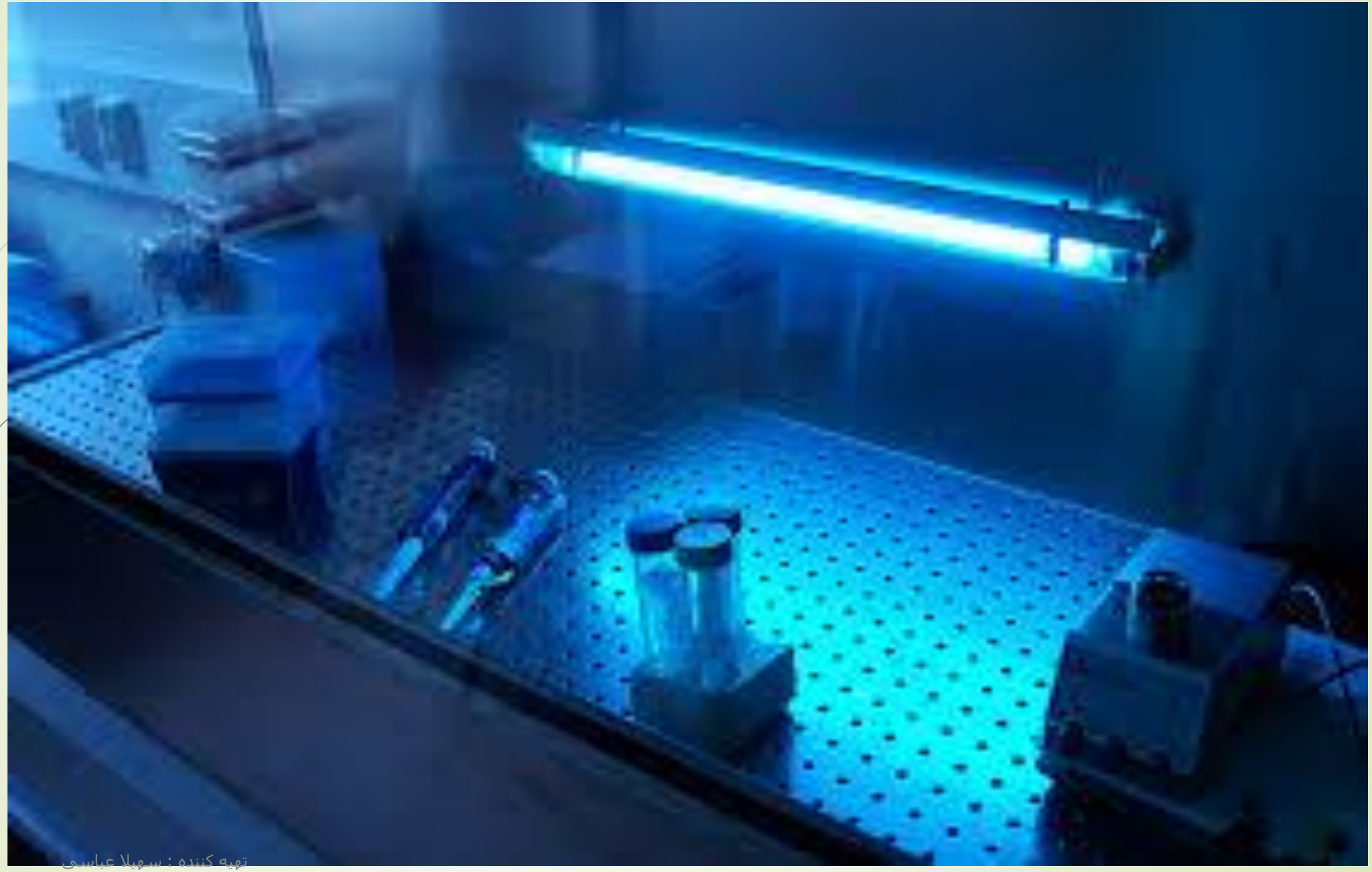
- در نور خورشید علاوه بر پرتوهای طیف مرئی که طول موجشان بین ۵۱۱۱ تا ۰۱۱۱ آنگستروم متغیر است، پرتوهای نامرئی بسیار وجود دارد.
- پرتوهای با طول موج کمتر از نور مرئی شامل پرتوهای غیریونیزان (ماوراء بنفش) و پرتوهای یونیزان (ایکس، آلفا، گاما و پرتوهای کیهانی) می باشد. پرتوهای با طول موج بیشتر از نور مرئی شامل پرتوهای مادون قرمز و پرتوهای رادیویی می باشد.

- قدرت نفوذ پرتوهای نورانی در سلول با طول موج آن ها نسبت معکوس دارد. به این جهت پرتوهای دارای طول موج بالاتر از ۵۰۱۱ آنگستروم قدرت میکروب کشی ناچیزی دارند. (این پرتوها شامل بخشی از امواج مادون قرمز و امواج رادیویی می باشد).

# پرتوهای ماوراء بنفش

- پرتوهای ماوراء بنفش در طول موج ۲۱۱۱ تا ۵۱۱۱ آنگستروم، روی میکروارگانیسم ها اثر کشنده دارند. این پرتوها باید مستقیماً و بدون واسطه روی باکتری ها اثر کند. برای استریل کردن هوای اتاق های جراحی، آزمایشگاه ها و گاهی برای آب های آشامیدنی و مواد غذایی از آن استفاده می شود.
- باکتری ها، اسپور باکتری ها، کپک ها و ویروس ها، در برابر این پرتو حساس هستند. پرتو ماوراء بنفش توسط اسیدهای نوکلئیک موجود در هسته ی میکروارگانیسم جذب می شود. این پرتو موجب می شود پیوند کووالان بین مولکول های تیمین مجاور در روی یک رشته DNA، تشکیل گردد و دیمرهای تیمین- تیمین بوجود آید. این پیوند کووالان رشته DNA را بحدی تغییر شکل می دهد که خاصیت پیوندسازی هیدروژنی بازهای پورین و پیریمیدین مجاور دیمرها دگرگون می شود.

- در نتیجه ی این مکانیسم، بازهای پورین و پیریمیدین نادرستی درون آن رشته وارد می گردد که در امتداد رشته ی تغییر یافته تشکیل می شود. نتیجه ی این عمل، تولید جهش ژنتیکی در ارگانیسم می باشد که عمدتاً این جهش ها مرگ آور می باشد و سلول به زودی می میرد.



# پرتوهای یونیزان

- پرتوهای یونیزان شامل پرتوهایی هستند که در برخورد با مولکول ها، آن ها را یونیزه می کنند.
- تولید یون های فعال و رادیکالی در طی این نوع تابش ها، علت مرگ میکروارگانیسم ها می باشد.
- در میان پرتوهای یونیزان، پرتو ایکس و گاما برای استریلیزاسیون بکار می روند. این پرتوها دارای طول موج کمتری از پرتوهای ماوراء بنفش (پرتوهای غیر یونیزان) هستند. به این جهت کارایی آن ها بیشتر است اما در عمل، کاربرد آن ها دشوار است و نیاز به تجهیزات پیچیده و گران قیمت دارد و برای انسان نیز خالی از خطر نمی باشد

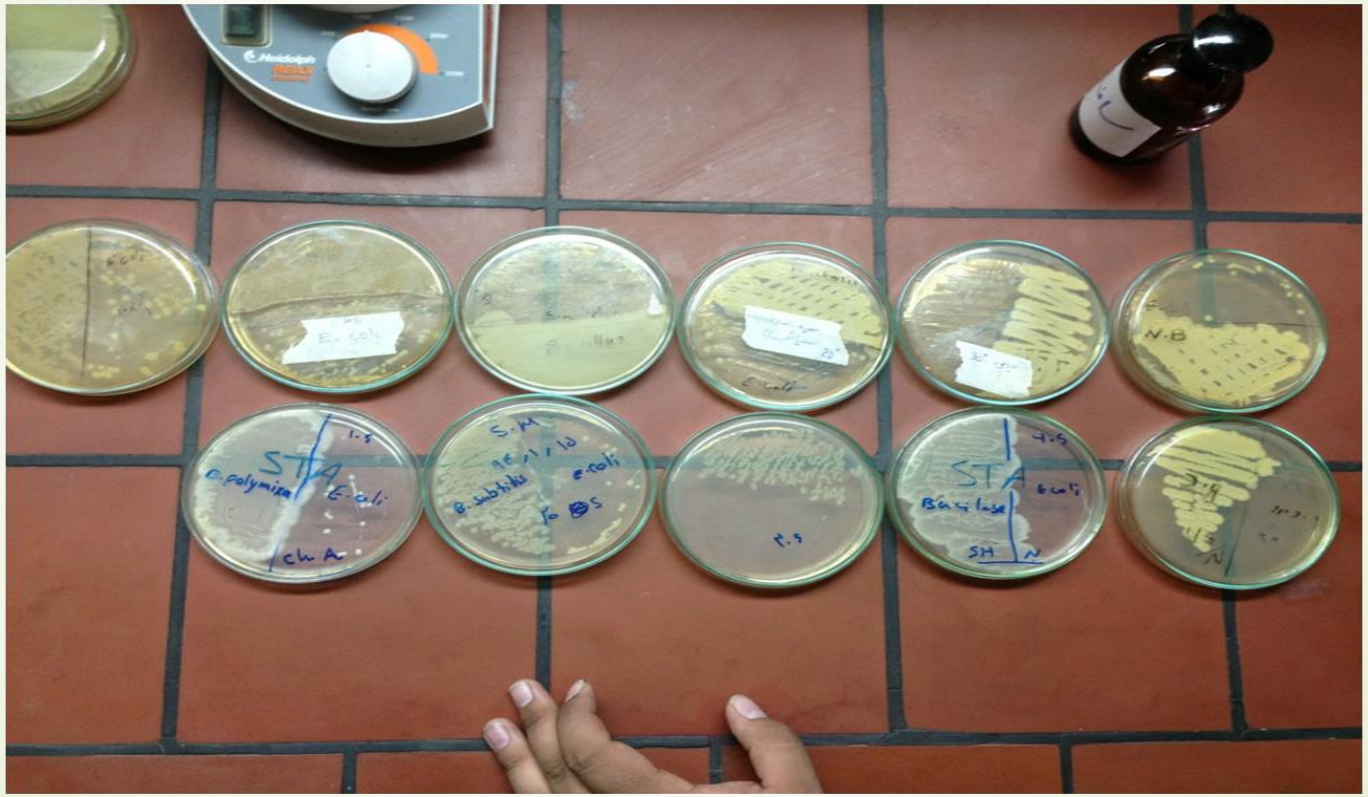
- پرتوهای گاما از پرتوهای ایکس قابل نفوذترند و زمان مورد نیاز آن ها برای استریلیزاسیون، تنها چند ثانیه است.
- در صنعت از پرتوهای یون ساز (بویژه گاما) برای استریلیزاسیون وسایل و بسته های پلاستیکی، سرنگ ها، برخی مواد غذایی (همچون گوشت، چای و توت فرنگی) و بطور کلی برای استریل کردن مواد و اشیایی استفاده می شود که آن ها را نمی توان با سایر روش ها استریل کرد.
- نفع این روش در سترون کردن مواد غذایی بسته بندی و کنسرو شده در این است که بدون بالا رفتن درجه حرارت و تغییر ماهیت فرآورده، می توان اغذیه را حفاظت و نگهداری کرد.

- پرتوهای یون ساز اثرات خود را با بمباران کردن همه ی نقاط سلول آشکار می سازند و برخلاف پرتوهای ماوراء بنفش، جذب انتخابی آن ها توسط مولکول های ساختمانی خاص (مثل DNA) نقشی در مرگ زایی آن ها ندارد. یکی از اثرات عمده پرتوهای یون ساز تشکیل رادیکال های آزاد $H^+$و $OH^-$است.
- فوتون های پرانرژی وقتی از آب عبور می کنند، این رادیکال ها را تولید می کنند. رادیکال های آزاد سرانجام موجب تشکیل پراکسیدها می شوند که عوامل اکسید کننده قوی هستند و در ضمن اثر مرگ زا دارند. رادیکال هیدروژن قدرت احیاء کنندگی شدیدی دارد. رادیکال هیدروکسیل که اکسید کننده ی پر قدرتی است، با ماکرومولکول ها مخصوصاً DNA، شدیداً واکنش پذیر است و از این راه سبب شکستگی زنجیرهای DNAمی شود.

# روش آزمایش:

- ۱- ابتدا یک کلنی از باکتری مورد نظر را بر روی محیط کشت TSA به صورت متراکم کشت دهید.
- ۲- سپس پلیت را به صورت در باز به مدت ۵ دقیقه در مقابل نور ماوراء بنفش ( لامپ UV ) قرار دهید.
- ۳- پس از گذاشتن درب پلیت، آن را در حرارت ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار می دهید
- ۴- بررسی نتایج مقاومت باکتری را به تست UV نشان می دهد.

# دید کلی از محیط کشت های مختلف باکتری به ترتیب زمان تابیدن uv وتفکیک قدرت اشعه(20و40 کیلوژول)



UV=20Kj

| | 5s | 10s | 20s | 30s | 40s | 50s | 60s |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| B.polymixa | + | + | + | + | + | + | + |
| B.sereuse | + | + | + | + | + | + | + |
| B.subtelis | + | + | + | + | + | + | + |
| E.coli | + | + | + | + | + | + | + |

UV=40KJ

| | 5s | 10s | 20s | 30s | 40s | 50s | 60s |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| B.polymixa | + | + | + | + | + | - | - |
| B.sereuse | + | + | + | + | + | - | - |
| B.subtelis | + | + | + | + | + | - | - |
| E.coli | + | + | + | - | - | - | - |

E. Coli
E-K A-V
Bacillus
P1

# آزمایشگاه میکروب ۲

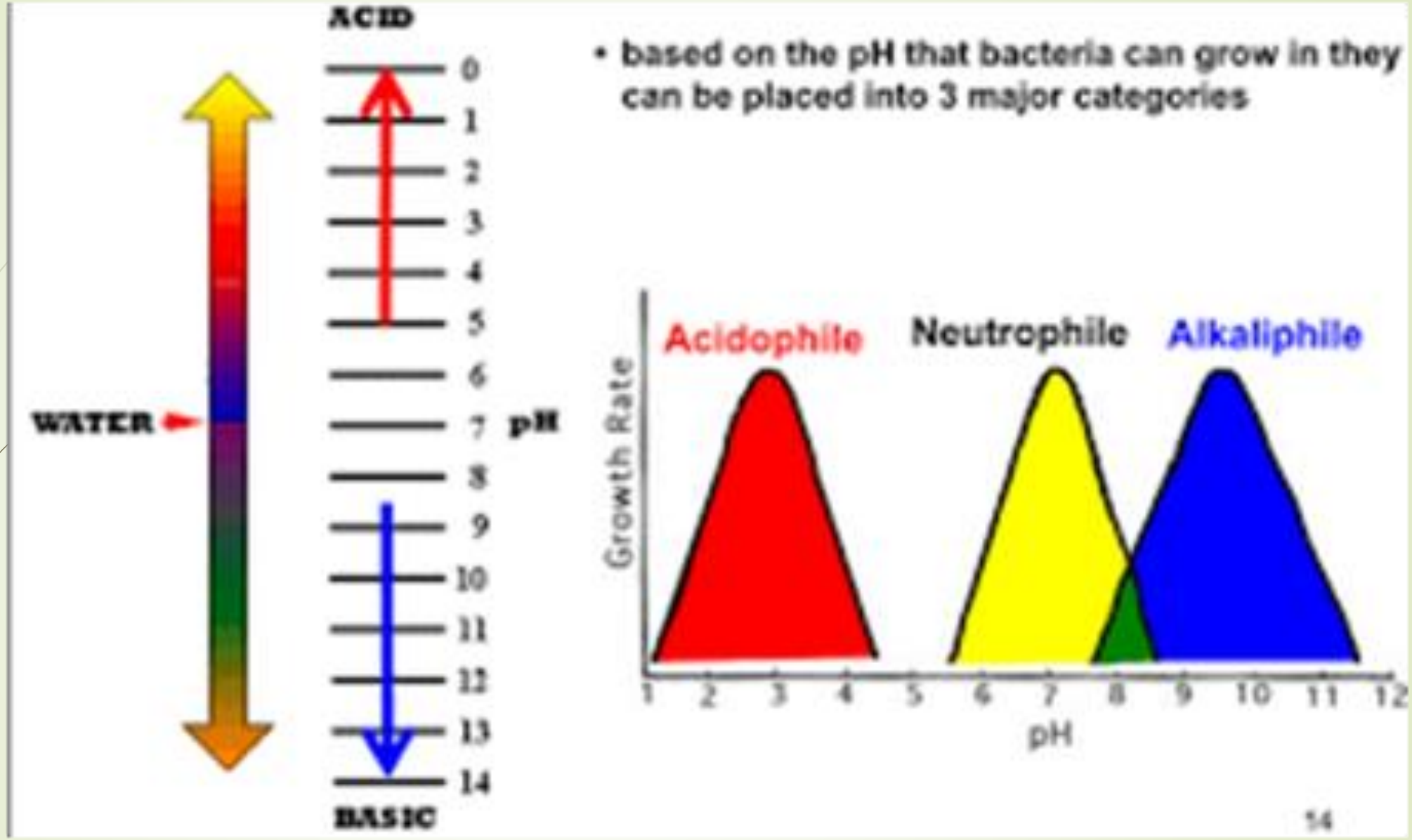
## اثر عوامل فیزیکی و شیمیایی بر رشد باکتری ها

## اثرpH

# اثر شدت اسیدی و شدت بازی

- شدت اسیدی یا شدت بازی یک محلول با pH آن در مقیاسی که در آن pH خنثی ۷ است، بیان می‌شود. مقادیر pH کم تر از ۷ اسیدی و مقادیر بیش تر از ۷ بازی هستند. هر میکروارگانیسم بازه‌ی pH ای دارد که رشد در آن امکان پذیر است و یک بهینه‌ی pH رشد دارد. اغلب ارگانیسم‌ها بازه‌ی رشدی با ۳- ۲ واحد pH را نشان می‌دهند. بیشتر محیط‌های طبیعی، pHای بین ۴ تا ۹ دارند، و لذا با ارگانیسم‌هایی با بهینه‌ای در این بازه بیشتر برخورد می‌کنیم. تنها گونه‌های اندکی قادر به رشد در مقادیر pH کم تر از ۳ یا بیشتر از ۹ هستند.

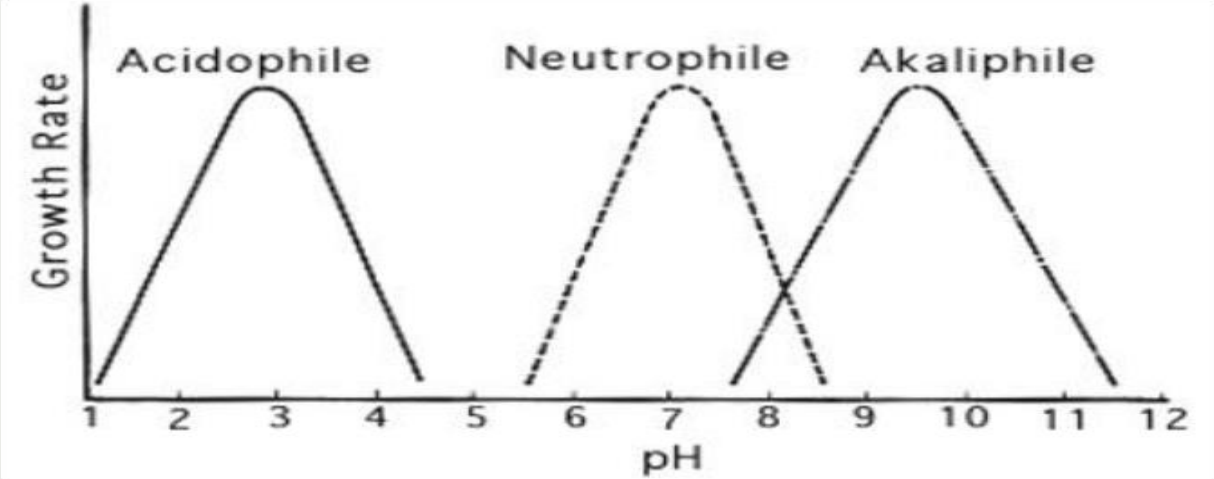
- ارگانیسم هایی که در بازه‌ی pH به اصطلاح اطراف خنثی (۵/۵ تا ۵/۷) به طور بهینه رشد می‌کنند، خنثی دوست نام دارند. در مقابل، ارگانیسم‌هایی که در pH پایین‌تر از ۵/۵ بهتر رشد می‌کنند، اسید دوست نامیده می‌شوند.


ACID
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
pH
WATER
BASIC
• based on the pH that bacteria can grow in they can be placed into 3 major categories
Acidophile
Neutrophile
Alkaliphile
Growth Rate
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
pH
14

- برخی در pH اسیدی ملایم و برخی در pH بسیار پایین بهتر رشد می‌کنند. بسیاری از قارچ‌ها و باکتری‌ها در pH برابر ۵ یا حتی کم‌تر، بهتر رشد می‌کنند، در حالی که تعداد محدودتری از جمله جنس *اسیدوتیوباسیلوس* در زیر pH برابر ۳ بهترین رشد را دارند. بسیاری از اسید دوست‌ها قادر به رشد در pH برابر ۷ نیستند و بسیاری دیگر نمی‌توانند در دو واحد pH بالاتر از pH بهینه‌ی خود رشد نمایند.

- فاکتور بسیار مهمی که اسید دوستی را کنترل می‌کند، پایداری غشای سیتوپلاسمی است. هنگامی که pH تا pH خنثی بالا رود. غشای سیتوپلاسمی باکتری‌های به شدت اسید دوست تخریب شده و سلول لیز می‌شود. این مسئله نشان می‌دهد که نه تنها این ارگانیسم‌ها تحمل هستند بلکه غلظت بالای یون هیدروژن در واقع برای پایداری غشای آن ها ضروری می باشد.

تعداد کمی از اکسترموفیل‌ها بهینه‌ی pH رشد بسیار بالایی دارند و بعضی از این‌ها حتی می‌توانند در pH بالاتر نیز رشد کنند. میکروارگانیسم‌هایی که بهینه‌ی pH رشد ۸ یا بیشتر دارند، قلیا دوست نامیده می‌شوند. میکروارگانیسم‌های قلیا دوست به طور معمول در زیستگاه‌های به شدت قلیایی مانند دریاچه‌های قلیایی و خاک‌هایی با کربنات بالا یافت می‌شوند.




بعضی باکتریها به تغییرات PH خیلی حساس هستند و برای این باکتری ها محیط کشت باید حالت بافری داشته باشد.
برای محیط کشت بافری از نمک های KH2PO4 - K2HPO4, , NAH2PO4 NA2HPO4 استفاده میشود.

# میدان PH باکتریها

- باکتری های روده ای به مراتب بیشتر از انگلهای جانوری ، محیط اسیدی و قلیایی را تحمل می‌کنند. این قبیل باکتریها فقط بعد از تحمل اسیدیته معده و خاصیت قلیایی صفرا در روده می‌توانند در آن فعالیت کنند. بسیاری از باکتریهای گیاهی و خاک شرایط نسبتاً قلیایی را ترجیح می‌دهند.

**مواد و وسایل مورد نیاز:**

- 1- کشت ۲۴ ساعته باکتری: *اشریشیا کولی، استافیلوکوکوس آرئوس، باسیلوس سرئوس*
- ۲- محیط کشت نوترین براث با pHهای:
  - ۱۰- ۲/۹- ۴/۸- ۶/۷- ۸/۶- ۶- ۲/۵- ۴/۴- ۳-۶/۳- ۸/۲

## روش کار:

جهت انتخاب باکتری از یک باکتری گرم منفی (*اشریشیا کولی*)، یک باکتری گرم مثبت (*استافیلوکوکوس آرئوس*) و یک باکتری اسپوردار (*باسیلوس سرئوس*) استفاده می‌کنیم.

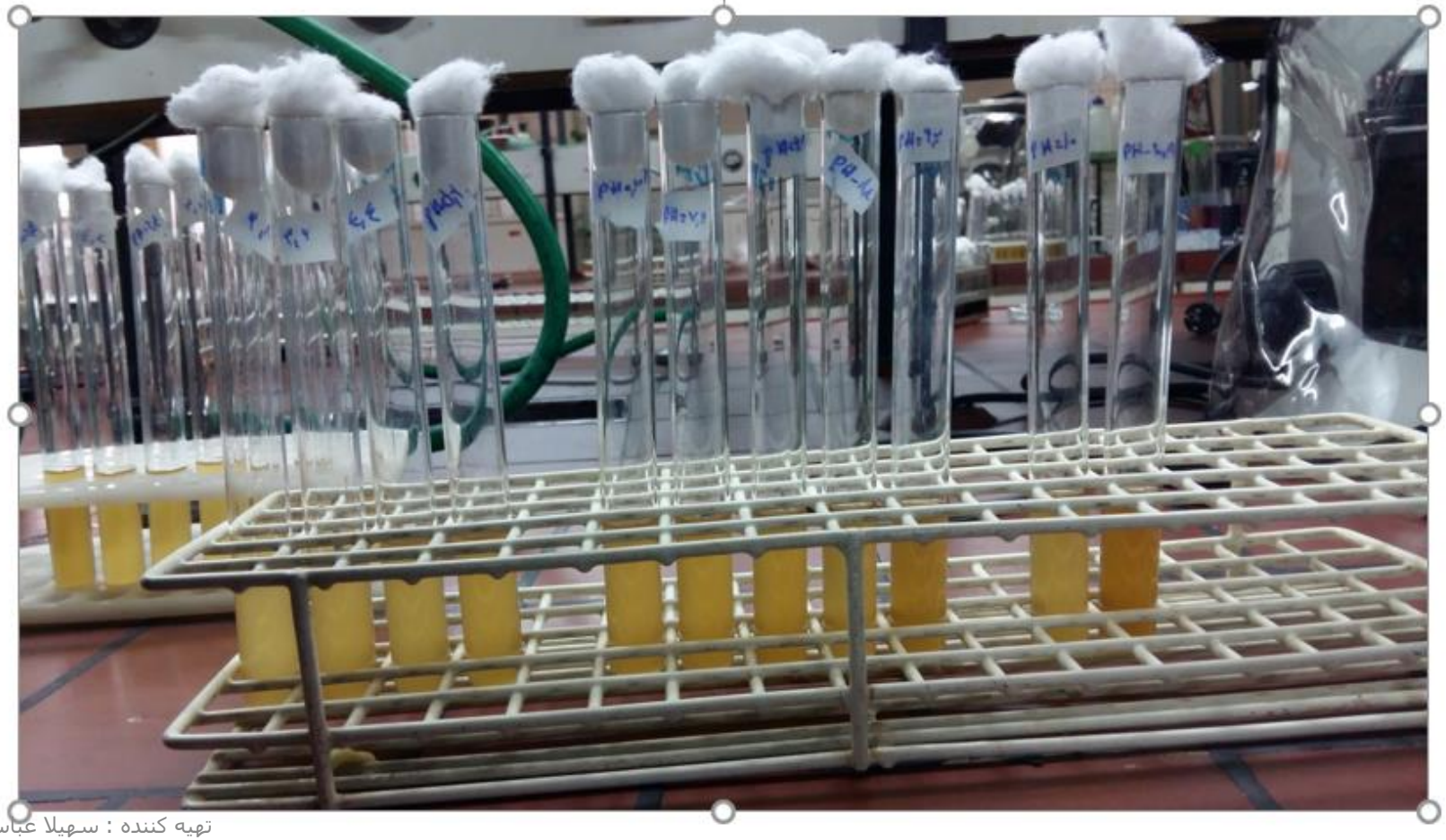
۱- یکی از باکتری‌ها را انتخاب کرده و به تمام گام‌های pH تلقیح می‌کنیم.

۲- لوله ها را به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور ۳۷ درجه قرار می‌دهیم.

۳- با توجه به رشد باکتری منحنی تغییرات pH را برای هر باکتری رسم می‌کنیم.

۴- pH اپتیمم هر باکتری را تعیین می‌کنیم.

# رشد کلبسیلا در سری pH



## باسیلوس سرئوس

| 2.8 | 3.6 | 4.6 | 5.2 | 6 | 6.8 | 7.6 | 8.4 | 9.2 | 10 | 10.6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 0 | +4 | +2.5 | +3 | +3.5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

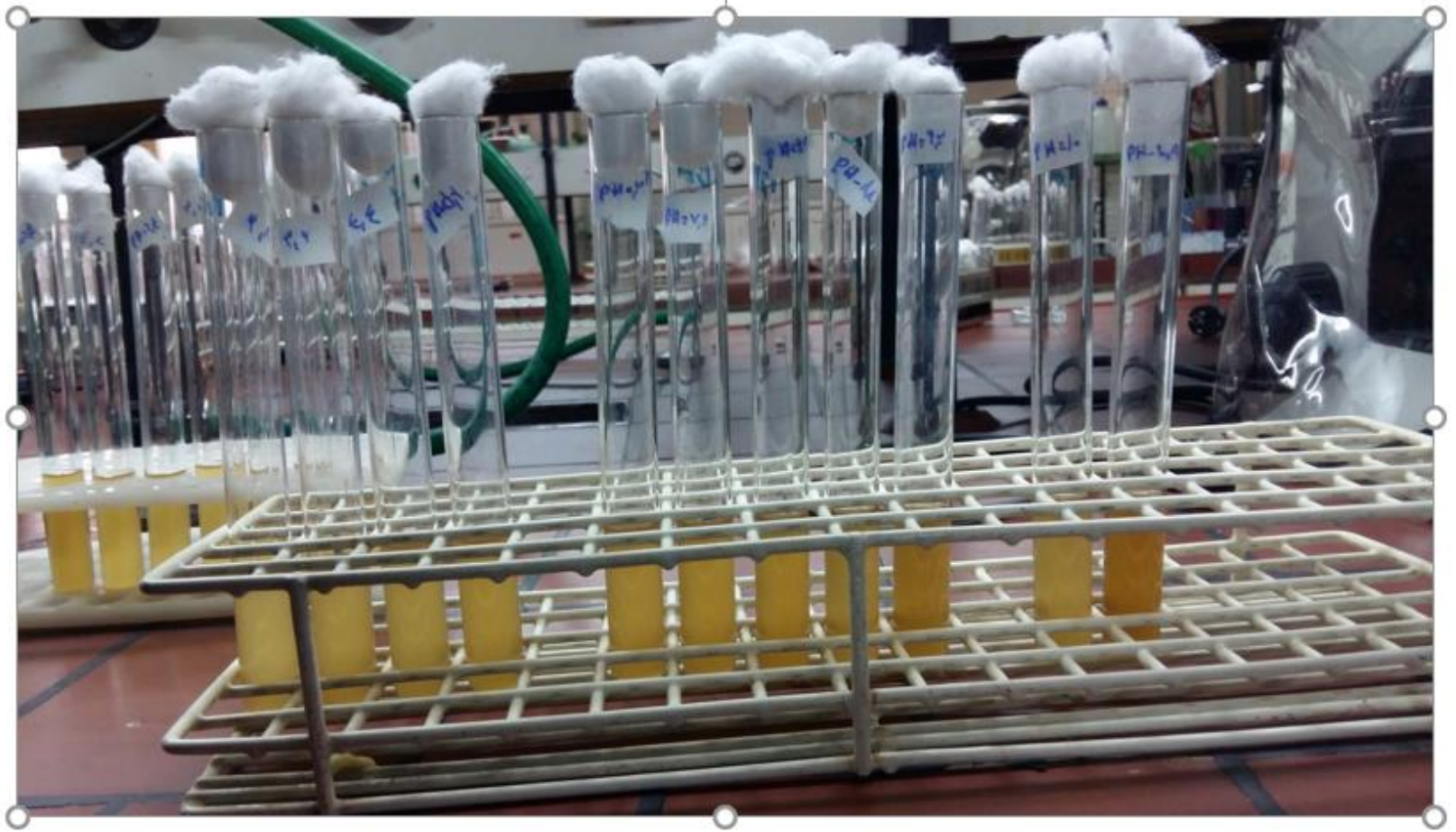
# مقایسه محیط های کشت حاوی *استافیلوکوکوس آرئوس* ومحیط شاهد

| PH | ۲/۸ | ۳/۶ | ۴/۴ | ۵/۲ | ۶ | ۶/۸ | ۷/۶ | ۸/۴ | ۹/۲ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| میزان رشد | ۰ | ۰ | +۲ | +۳ | +۳ | +۴ | +۳ | +۲ | +۲ |

| PH | 10 | 10.8 |
|---|---|---|
| میزان رشد | +1 | +1 |

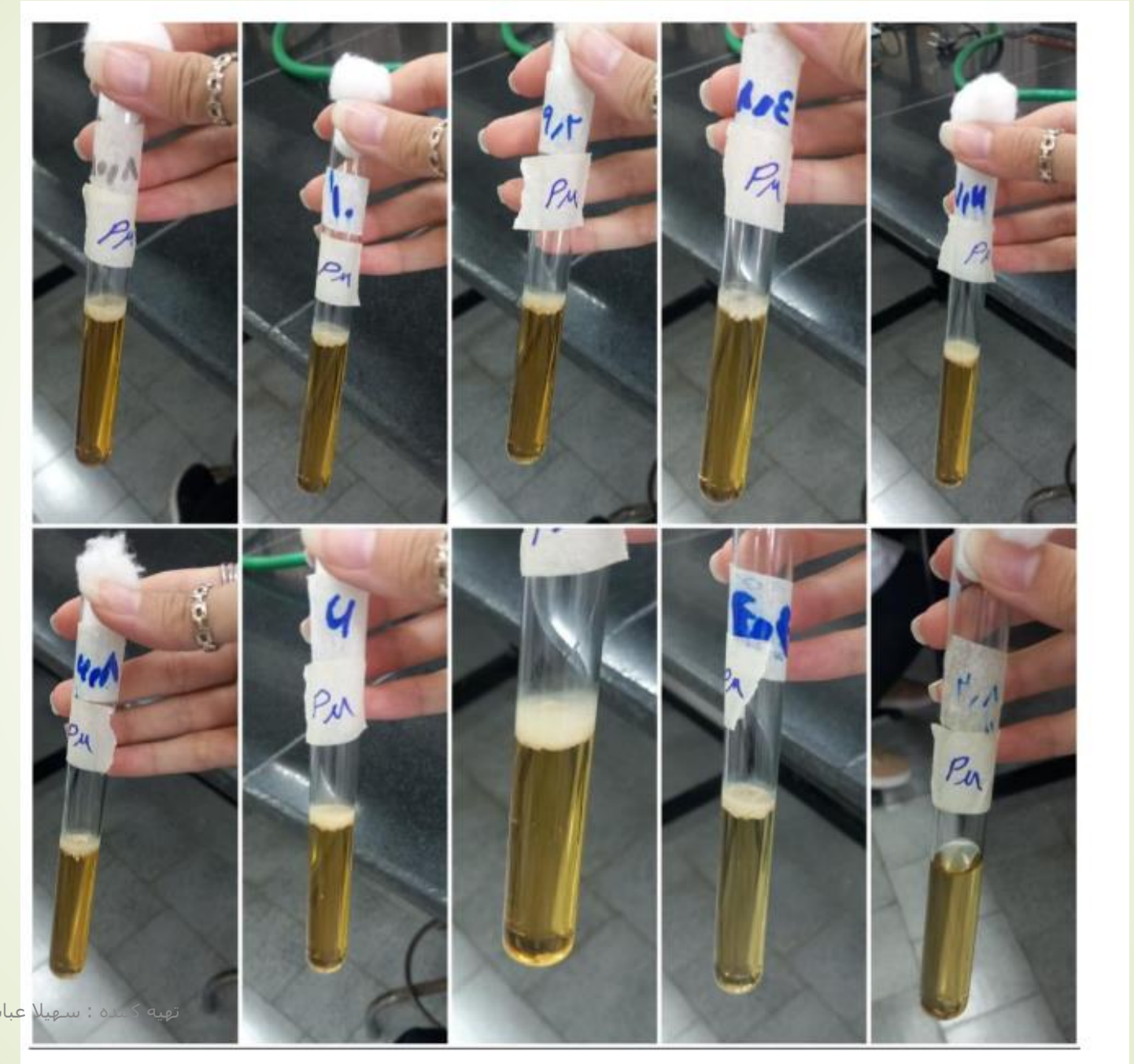
# مقایسه محیط های کشت حاوی استافیلوکوکوس آرئوس ومحیط شاهد

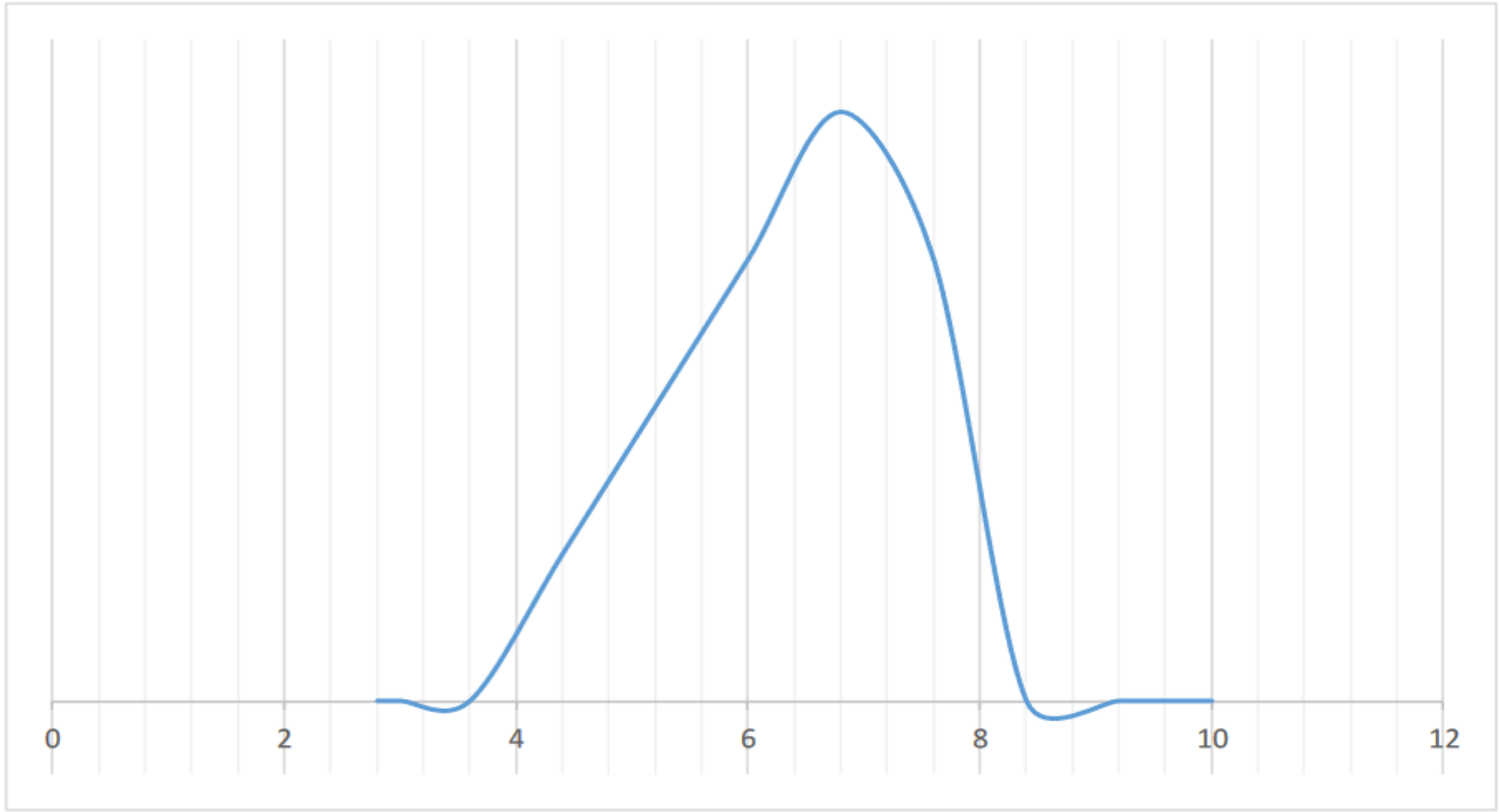
# رشد کلبسیلا در سری pH



## باسیلوس سرئوس

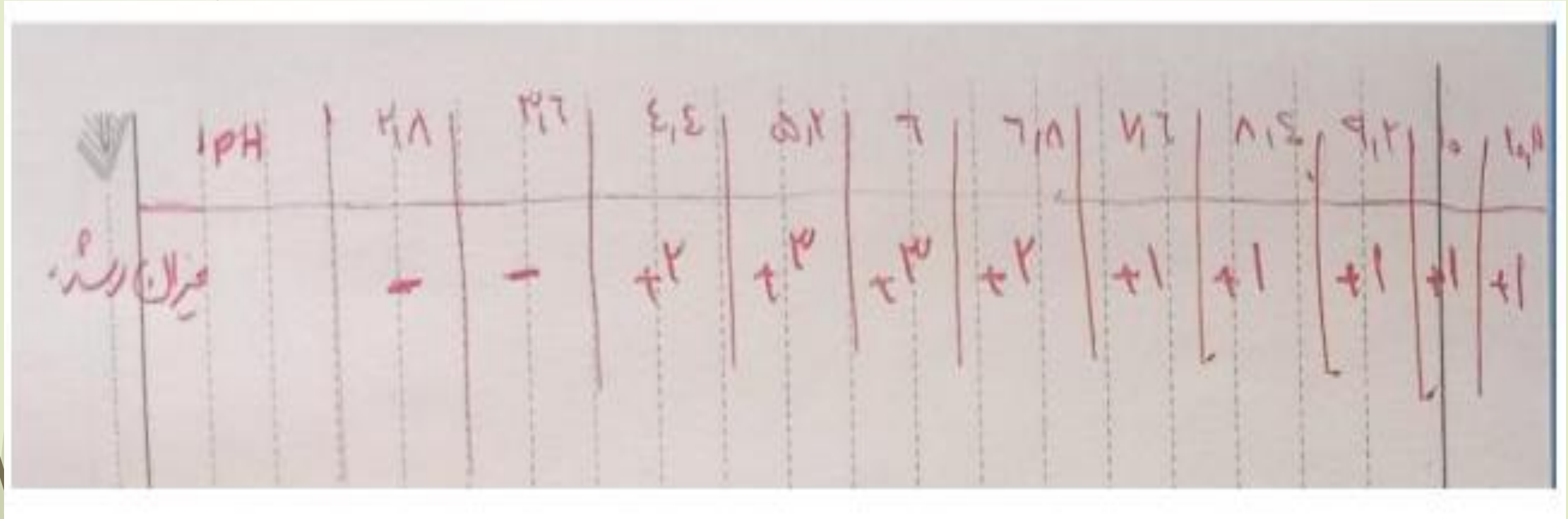
| 2.8 | 3.6 | 4.6 | 5.2 | 6 | 6.8 | 7.6 | 8.4 | 9.2 | 10 | 10.6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 0 | +4 | +2.5 | +3 | +3.5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |



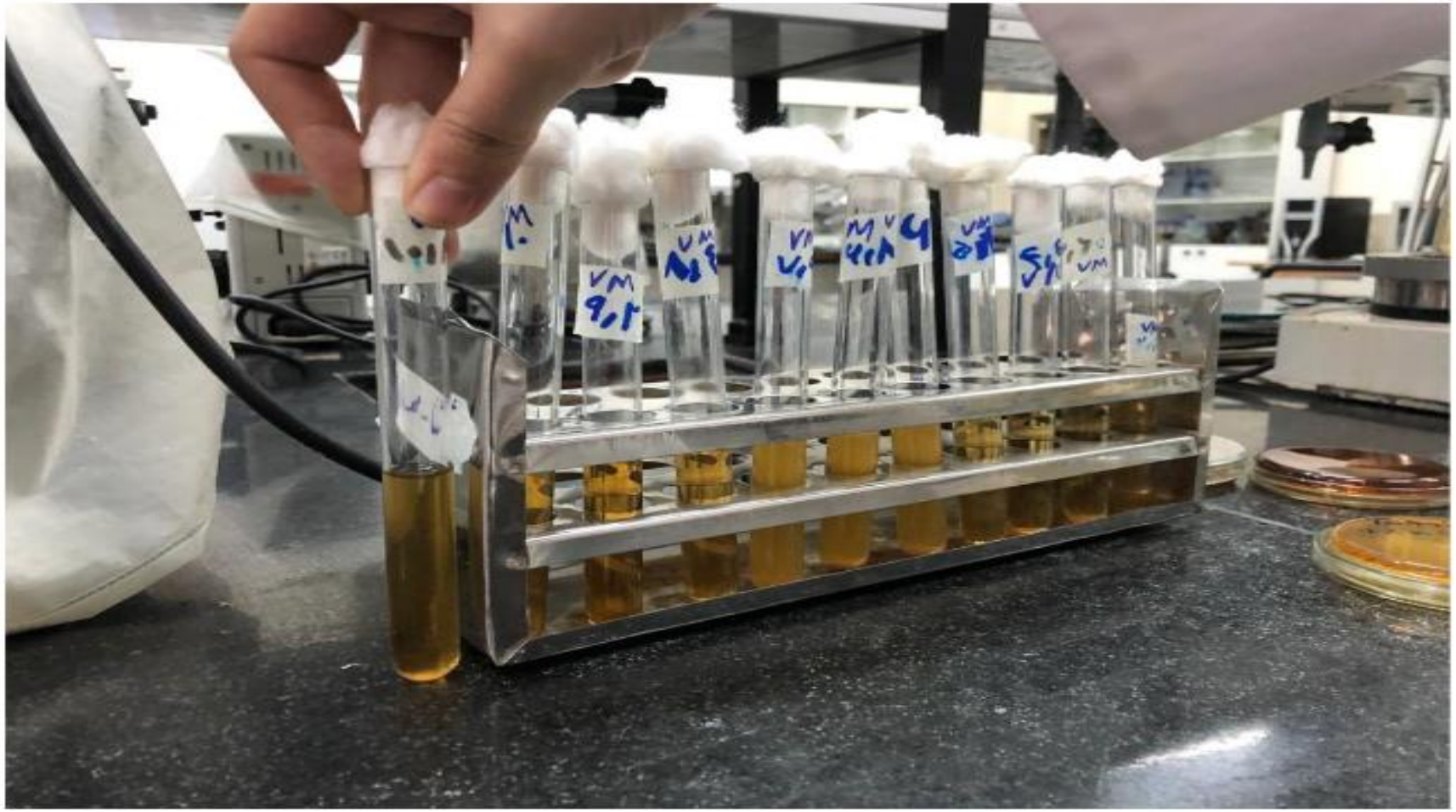



باکتری **باسیلوس سرئوس**

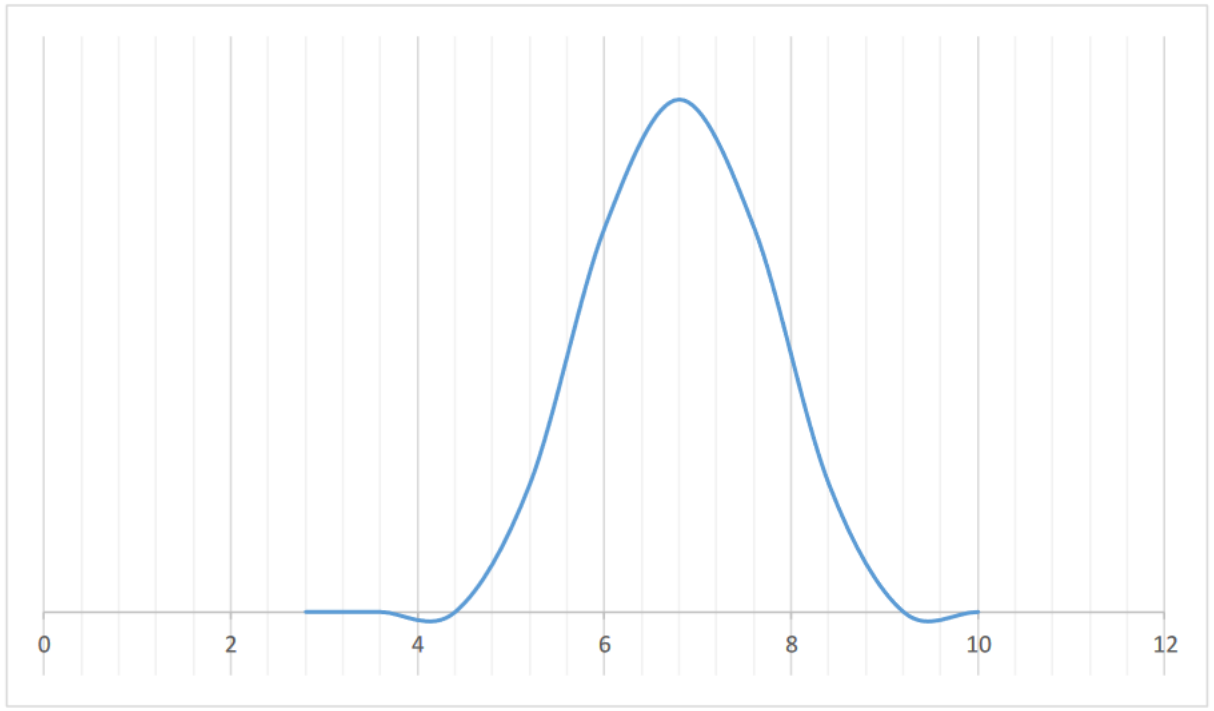
رشد در بازه ۴.۴ تا ۷.۶ و بیشترین رشد در ۶.۸


pH
۱
۲٫۸
۳٫۶
۴٫۴
۵٫۲
۶
۶٫۸
۷٫۶
۸٫۴
۹٫۲
۱۰
۱۰٫۸
+۱
+۱
+۱
+۱
+۱
+۲
+۳
+۳
+۲
+۱
+۱
+۱
-
-
+۲
+۳
+۳
+۲
+۱
+۱
+۱
+۱
میزان رسوب

برای باکتری E.coli



این باکتری نوتروفیل محسوب میشود




باکتری **ایکلای**

رشد در بازه پی اچ ۶ تا ۷.۶ - بیشترین رشد در پی اچ ۶.۸

از حسن توجه شما سپاسگزارم
تهیه کننده : سهیلا عباسی