

مايکروبيولوژي طبي

جلد اول



پوهاند دوکتور عبيدالله عبيد



© AAZEM PUBLICATIONS

© AAZEM PUBLICATIONS

وزارت تحصیلات عالی

پوهنتون طبی کابل

معاونیت علمی

دیپارتمنت مایکروبیولوژی

مایکروبیولوژی طبی جلد اول

©

تألیف:

پوهاند دوکتور عبیدالله عبید

نام کتاب	مایکروبیولوژی طبی جلد اول
مؤلف	پوهاند دوکتور عبیدالله عبید
ناشر	پوهنتون طبی کابل
وبسایت	www.kmu.edu.af
چاپ	مطبعة عازم، کابل، افغانستان / ۰۷۹۹۵۷۲۸۱۷
تعداد	۲۰۰۰ جلد
سال	۱۳۹۱
داونلود	www.ecampus-afghanistan.org

کتاب هذا توسط انجمن همکاریهای اکادمیک آلمان (DAAD) از بودیجه وزارت خارجه فدرالی آلمان تمویل شده است.

امور اداری و تخنیکي کتاب توسط مؤسسه افغانیک انجام یافته است.

مسؤولیت محتوا و نوشتن کتاب مربوط نویسنده و پوهنتون مربوطه می باشد، ارگان های کمک کننده و تطبیق کننده مسؤول نمی باشند.

اگر می خواهید که کتابهای درسی شما چاپ گردد، با ما به تماس شوید:

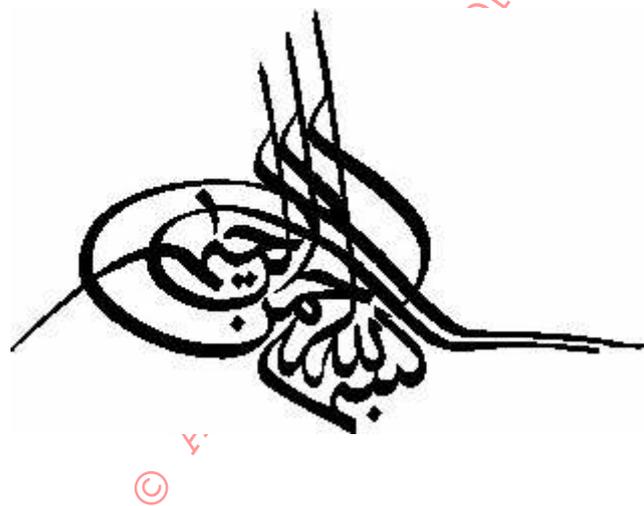
داکتر یحیی وردک، وزارت تحصیلات عالی، کابل

دفتر: ۰۷۵۶۰۱۴۶۴۰

ایمیل: wardak@afghanic.org

چاپ این کتاب به تعداد ۲۰۰۰ جلد به موافقه مؤلف و انتشارات عازم صورت گرفته است.

تمام حقوق نشر و پخش این کتاب نزد انتشارات عازم محفوظ است.



© AAZEM PUBLICATIONS



پیام وزارت تحصیلات عالی

در جریان تاریخ بشریت کتاب برای کسب علم و دانش نقش عمده را بازی کرده و جز اساسی پروسه درسی بوده که در ارتقای کیفیت تحصیلات دارای ارزش خاص می‌باشد. از اینرو باید با در نظر داشت استانداردها و معیارهای شناخته شده جهانی و ضروریات جوامع کتب و مواد درسی جدید برای محصلین آماده و چاپ گردد.

از اساتید محترم مؤسسات تحصیلات عالی کشور قلباً اظهار سپاس و قدردانی می‌نمایم که با تقبل زحمات در جریان سال‌های متمادی با تألیف و ترجمه کتب درسی دین ملی خود را ادا نموده اند. از سایر اساتید و دانشمندان گرانقدر نیز صمیمانه تقاضا می‌نمایم که در رشته‌های مربوطه خود کتب و سایر مواد درسی را تهیه نمایند، تا بعد از چاپ در دسترس محصلین گرامی قرار داده شوند.

وزارت تحصیلات عالی وظیفه خود می‌داند تا جهت ارتقای سطح دانش محصلین عزیز کتب و مواد درسی جدید و معیاری را آماده نماید.

در اخیر از وزارت خارجه کشور آلمان، مؤسسه DAAD، سایر ادارات و اشخاصی که زمینه چاپ کتب طبی اساتید محترم پوهنچی‌های طب کشور را مهیا ساخته اند، صمیمانه تشکر می‌نمایم.

امیدوارم که این کار سودمند ادامه یافته و به سایر بخش‌ها نیز گسترش یابد.

با احترام

پوهاند دوکتور عبیدالله عبید

وزیر تحصیلات عالی

کابل، ۱۳۹۱

© AAZEM PUBLICATIONS

چاپ کتب درسی پوهنځی‌های طب

استادان گرامی و محصلین عزیز!

کامبود و نبود کتب درسی در پوهنتون‌های افغانستان از مشکلات عمده به شمار می‌رود. محصلین و استادان با مشکلات زیاد روبرو می‌باشند. آنها اکثراً به معلومات جدید دسترسی نداشته و از کتاب‌ها و چپترهای استفاده می‌نمایند که کهنه بوده و در بازار به کیفیت پایین فوتوکاپی می‌گردد.

برای رفع این مشکلات در دو سال گذشته ما چاپ کتب درسی پوهنځی‌های طب پوهنتون‌های کشور را آغاز نمودیم و تا اکنون ۶۰ عنوان کتب درسی را چاپ نموده و به تمام پوهنځی‌های طب افغانستان ارسال نموده ایم.

این در حالی است که پلان استراتژیک وزارت تحصیلات عالی (۲۰۱۰ - ۲۰۱۴) کشور بیان می‌دارد:

«برای ارتقای سطح تدریس، آموزش و آماده‌سازی معلومات جدید، دقیق و علمی برای محصلان، باید برای نوشتن و نشر کتب علمی به زبان‌های دری و پشتو زمینه مساعد گردد. برای ریفورم در نصاب تعلیمی ترجمه از کتب و مجلات انگلیسی به دری و پشتو حتمی و لازمی می‌باشد. بدون امکانات فوق ناممکن است تا محصلان و استادان در تمامی بخش‌ها به پیشرفت‌های مدرن و معلومات جدید زودتر دسترسی بیابند.» ©

استادان و محصلین پوهنځی‌های طب با مشکلات زیاد مواجه اند. تدریس به میتود کهنه، عدم دسترسی به معلومات و مواد جدید درسی و استفاده از کتب و چپترهای که به کیفیت بسیار پایین در بازار دریافت می‌گردد از جمله مشکلات عمده در این راستا می‌باشد. باید آن عده از کتاب‌هایی که توسط استادان تحریر گردیده اند، جمع‌آوری و چاپ گردند. با در نظر داشت حالت بحرانی کشور زده، ما به دوکتوران ماهر و ورزیده نیاز داریم تا بتوانند در بهبود و ارتقای تحصیلات طبی و صحت عامه در کشور سهم فعال بگیرند. از اینرو باید توجه زیاده‌تر برای پوهنځی‌های طب جلب گردد.

تا به حال ما به تعداد ۶۰ عنوان کتب مختلف طبی برای پوهنځی‌های طب ننگرهار، خوست،

هرات، کندهار، بلخ، هرات و کابل را چاپ نموده ایم و پروسه چاپ ۵۰ عنوان دیگر جریان دارد که یک نمونه آن همین کتابی است که فعلاً در دسترس شما قرار دارد. قابل یادآوری است که تمام کتب چاپ شده مذکور بصورت مجانی برای پوهنحی‌های طب کشور توزیع گردیده اند. به اثر درخواست وزارت محترم تحصیلات عالی، پوهنتون‌ها، استادان محترم و محصلین عزیز در آینده می‌خواهیم این پروگرام را به بخش‌های غیر طبی (ساینس، انجینیری، زراعت و سایر بخش‌ها) و پوهنحی‌های دیگر هم توسعه دهیم و کتب مورد نیاز پوهنتون‌ها و پوهنحی‌های مختلف را چاپ نماییم.

از آنجاییکه چاپ نمودن کتب درسی یک پروژه پروگرام ما بوده، بخش‌های کاری دیگر ما بطور خلاصه قرار ذیل اند:

۱- چاپ کتب درسی طبی

کتابی که در اختیار شما است، نمونه از فعالیت‌های ما می‌باشد. ما می‌خواهیم که این روند را ادامه دهیم تا بتوانیم در زمینه تهیه کتب درسی با پوهنتون‌های کشور همکاری نماییم و دوران چپتر و لکچرنوت را خاتمه دهیم و نیاز است تا برای مؤسسات تحصیلات عالی کشور سالانه به تعداد ۱۰۰ عنوان کتاب درسی چاپ گردد.

۲- تدریس با میتود جدید و وسایل پیشرفته

در جریان سال ۲۰۱۰ توانستیم در تمام صنوف درسی پوهنحی‌های طب بلخ، هرات، ننگرهار، خوست و کندهار پروجکتورها را نصب نماییم. برای ایجاد محیط مناسب درسی باید تلاش گردد که تمام اطاق‌های درسی و کنفرانس و لابراتوارها مجهز به مولتی‌میدیا، پروجکتور و سایر وسایل سمعی و بصری گردند.

۳- ارزیابی ضروریات

وضعیت فعلی (مشکلات موجوده و چلنج‌های آینده) پوهنحی‌های طب باید بررسی گردد و به اساس آن به شکل منظم پروژه‌های اداری، اکادمیک و انکشافی به راه انداخته شوند.

۴- کتابخانه‌های مسلکی

باید در تمام مضامین مهم و مسلکی کتب به معیارهای بین‌المللی به زبان انگلیسی خریداری و به دسترس کتابخانه‌های پوهنحی‌های طب قرار داده شود.

۵- لابراتوارها

در پوهنځی‌های طب کشور باید در بخش‌های مختلف لابراتوارهای فعال وجود داشته باشد.

۶- شفاخانه‌های کدري

هر پوهنځی طب کشور باید دارای شفاخانه کدري باشد و یا در یک شفاخانه شرایط برای ترینگ عملی محصلین طب آماده گردد.

۷- پلان ستراتیژیک

بسیار مفید خواهد بود که هر پوهنځی طب در چوکات پلان ستراتیژیک پوهنتون مربوطه خود دارای یک پلان ستراتیژیک پوهنځی باشد.

از تمام استادان محترم خواهشمندیم که در بخش‌های مسلکی خویش کتب جدید تحریر، ترجمه و یا هم لکچرنوت‌ها و چپترهای خود را ایدیت و آماده چاپ نمایند. بعداً در اختیار ما قرار دهند، تا به کیفیت عالی چاپ و به شکل مجانی به دسترس پوهنځی‌های مربوطه، استادان و محصلین قرار داده شود. همچنان در مورد نکات ذکر شده پیشنهادات و نظریات خود را به آدرس ما شریک ساخته تا بتوانیم مشترکاً در این راستا قدم‌های مؤثرتر را برداریم. از محصلین عزیز نیز خواهشمندیم که در امور ذکر شده با ما و استادان محترم همکاری نمایند.

از وزارت محترم خارجه آلمان و مؤسسه DAAD (همکاری‌های اکادمیک آلمان) اظهار سپاس و امتنان می‌نماییم که تا اکنون چاپ 90 عنوان کتب طبی درسی را به عهده گرفته که از آن جمله پروسه چاپ ۵۰ عنوان آن جریان دارد. از پوهنځی طب پوهنتون ماینز آلمان (Mainz/Germany) و استاد پوهنځی مذکور دوکتور زلمی توریال، Dieter Hampel و مؤسسه افغانیک نیز تشکر می‌کنیم که در امور اداری و تخنیکی چاپ کتب با ما همکاری نمودند.

بطور خاص از دفاتر جی آی زیبت (GIZ) و CIM (Center for International Migration and Development) یا مرکز برای پناهنده‌گی بین‌المللی و انکشاف که برای من امکانات کاری را طی دو سال گذشته در افغانستان مهیا ساخته است، اظهار سپاس و امتنان می‌نمایم.

از دانشمند محترم پوهاند دوکتور عبیدالله عبید وزیر تحصیلات عالی، محترم پوهنوال محمد عثمان بابری معین علمی وزارت، محترم پوهندوی دوکتور گل حسن ولیزی معین اداری و مالی، رؤسای محترم پوهنتون‌ها، پوهنحی‌های طب و استادان گرامی تشکر می‌نمایم که پروسه چاپ کتب درسی را تشویق و حمایت نمودند. همچنان از همکاران محترم دفتر هر کدام دوکتور محمد یوسف مبارک، عبدالمنیر رحمانزی، احمد فهیم حبیبی، سبحان‌الله و همت‌الله نیز تشکر می‌نمایم که در قسمت چاپ نمودن کتب همکاری نمودند.

داکتر یحیی وردک، وزارت تحصیلات عالی

کابل، نومبر سال ۲۰۱۲ م

نمبر تیلیفون دفتر: ۰۷۵۶۰۱۴۶۴۰

ایمیل آدرس: wardak@afghanic.org

textbooks@afghanic.org



فهرست مطالب

صفحه	موضوع
	مقدمه
۳	تاریخچه
	بخش اول: اساسات میکروبیولوژی
	فصل اول: مورفولوژی میکرواورگانیزم‌ها
۱۳	تعریف میکروبیولوژی
۱۳	پروکاریوت‌ها
۱۷	اسکال اساسی میکروب‌ها
۲۱	میتود بصری
۲۴	ساختمان حجرات ایوکاریوت‌ها
۲۸	ساختمان حجرات پروکاریوت‌ها
۳۰	پروتوپلاست‌ها و سفیر و پلاست‌ها
۵۲	اشکال L باکتری‌ها
۵۳	اندوسپورها
۵۹	تلوین
۶۳	تصنیف باکتری‌ها
۷۴	تصنیف پنچ کنگدم
۸۱	

۸۳	فصل دوم: فزیولوژی مایکرواور گانیزم‌ها
۸۳	ترکیب بیوشیمیک حجره باکتری
۸۷	وسط غذایی
۹۴	تکثر و نمو مایکرواور گانیزم‌ها
۱۰۳	اوصاف کشت باکتری
۱۱۳	تنفس مایکرواور گانیزم‌ها
۱۱۸	تجربید مایکرواور گانیزم‌ها در کلچر خالص
۱۲۰	انزایم‌های مایکرواور گانیزم‌ها
۱۲۵	انتی بیوگرام
۱۴۱	فصل سوم: مایکروبیل فلورانارمل وجود انسان
۱۴۱	رول فلورای ثابت
۱۴۲	فلورای نارمل جلد
۱۴۳	فلورای نارمل دهن و طرق تنفسی علوی
۱۴۳	فلورای نارمل امعاً
۱۴۴	فلورای نارمل احلیل
۱۴۴	فلورای نارمل مهیل
۱۴۵	فلورای نارمل چشم
۱۴۷	فصل چهارم: انتانات
۱۴۹	توکسین‌های مایکروبی
۱۵۱	اندوتوکسین
۱۵۱	اکزوتوکسین
۱۵۲	سیر یک مرض انتانی
۱۵۶	اشکال کلینیکی انتانات
۱۵۸	شدت انتشار امراض انتانی

۱۵۹	فصل پنجم: علم معافیت
۱۶۳	میکانیزم عکس‌العمل‌های غیر وصفی
۱۷۱	میکانیزم عکس‌العمل‌های وصفی
۱۷۷	نقش جنتیک در معافیت
۱۷۸	واکسینیشن
۱۸۲	انتی‌جن
۱۹۱	انتی‌بادی
۲۰۳	معافیت حجروی
۲۰۹	تعاملات معافیتی و اهمیت عملی آن
۲۱۰	انتی‌توکسین‌ها و تست نیوترولایزیشن
۲۳۱	فصل ششم: حساسیت
۲۳۲	تظاهرات موضعی انافلکسی
۲۳۳	فرط حساسیت
۲۳۸	عکس‌العمل ناکافی معافیتی بر علیه عوامل انتانی
۲۳۹	فصل هفتم: جنیتیک مایکرورها
۲۴۰	ساختمان DNA
۲۴۱	ساختمان RNA
۲۴۲	وظایف کروموزوم
۲۴۴	تغییرات فینوتایپیک و جینوتایپیک
۲۴۹	انجینیری جنیتیک مایکرورها
۲۵۱	فصل هشتم: تداوی ضد مایکروبی
۲۵۲	استعمال لابراتواری انتی‌بیوتیک‌ها
۲۵۳	تست حساسیت انتی‌بیوتیک‌ها
۲۵۴	تعیین اندازه انتی‌بیوتیک‌ها در مایعات عضویت
۲۵۶	وقایه امراض انتانی توسط مواد کیمیاوی

۲۶۱	فصل نهم: انتانات مرضی سیستم‌های مختلف عضویت انسان:
۲۶۱	انتانات سیستم عصبی مرکزی
۲۶۳	انتانات سیستم لمف و خون
۲۶۵	انتانات سیستم معدی معایی
۲۶۷	انتانات سیستم بولی تناسلی
۲۶۸	انتانات جلد و اقسام رخوه
۲۷۰	انتانات سیستم تنفسی

مأخذ

© AAZEM PUBLICATIONS

مقدمه

خداوند عزوجل را سپاس بی‌پایان که بنده را توفیق عنایت فرمود تا تألیف کتاب درسی دست داشته را که از طرف دیپارتمنت مایکروبیولوژی با تأیید شورای علمی منحیث یک اشد ضرورت دیپارتمنت برای تدریس محصلان صنوف دوم پوهنحی‌های طب معالجبی، اطفال و منحیث اثر اصلی این جانب برای ترفیع رتبه علمی ام از رتبه پوهنوال به رتبه پوهاند براریم وظیفه سپرده شده بود، به پایان برسانم. از آنجائیکه موجودیت کتاب درسی در شرایط فعلی که دسترسی به مأخذ معتبر و وارد بودن به یکی از لسان‌های خارجی برای هر محصل مقدور نیست، ضروری پنداشته می‌شود تا دیپارتمنت جهت رفع این معضله کتاب درسی داشته باشد، تا استاد و محصل بتواند از آن جهت حل معضلات شان منحیث یک کتاب درسی استفاده نمایند. تاکنون دیپارتمنت مایکروبیولوژی کتاب مکملی که در هر دو سمستر تدریس شود نداشت، که از لکچر نوت‌ها استفاده می‌گردید. خوشبختانه به یاری ایزد متعال اینک کتاب مکمل درسی مضمون مایکروبیولوژی تهیه و به دسترس محصلان عزیز قرار داده می‌شود.

ما در جهان مملو از میکرواورگانیزم‌ها مختلفه زیست می‌نمائیم که بعضی از این میکروب‌ها برای انسان‌ها ایجاد بیماری می‌نمایند، که حتی حوادث ناگوار را که حیات مریضان را تهدید می‌نمایند، در قبال دارد. بناً دانستن مایکروبیولوژی طبی برای اهل طب از ضرورت‌های مهم به شمار می‌رود.

هویداست که انکشاف مایکروبیولوژی ارتباط ناگستنی با دیگر شعبات طبابت دارد و کشفیات در بخش‌های مختلفه علوم طب با تحولات و پیشرفت‌های در عرصه مایکروبیولوژی توأم می‌باشد. براساس این دست آورد، کتاب جدید مایکروبیولوژی مطابق به آخرین تحولات علم طب تحریر و تغییرات معاصر مدنظر گرفته شده است.

مطالب این کتاب مطابق مفردات جدید درسی محصلین پوهنتون طب کابل بوده و از طرف دیگر تجارب نشاندهنده آنست که امراض مختلف میکروبی نظر به شرایط محیطی و یا سایر معیارات در مناطق مختلف شیوع متفاوت داشته و ایجاب می‌نماید که در تحریر این کتاب به پتالوژی مملکت توجه خاص مبذول گردد، که این موضوع نیز در تحریر این کتاب در نظر گرفته شده است.

این کتاب حاوی چهار بخش که عبارت از، اساسات مایکروبیولوژی، باکتریولوژی، وایرولوژی و میکولوژی در سی و چهار فصل با داشتن تصاویر رنگه که خوبتر ذهن‌نشین محصلان عزیز می‌گردد، با استفاده از مأخذ جدید منجمله انترنیت به رشته تحریر در آمده و کوشش به عمل آمده تا در موارد عوامل مرضی، خصوصیات مایکروبیولوژیکی، پتوجنیزس، لوحه کلینیکی، تشخیص لابراتواری، تداوی و وقایه معلومات همه جانبه ارائه گردد.

مأخذ در متن به شکل تحریر گردیده، که صرف به داخل قوس نمبر مأخذ ذکر گردیده درحالیکه اشکال با مخفف ریفرینس (R) و نمبر ماخذ به داخل قوس نگاشته شده است.

از خوانندگان محترم این کتاب صمیمانه تقاضا می‌گردد تا کمبودی‌ها و کاستی‌های کتاب را به دیده اغماض نگریسته و نظریات اصلاحی خویش را به مؤلف ارسال دارند.

امیدوارم آرزوی را که بنده از زحمات و تلاش‌های شباروزی خود دارم و آن جز تربیه سالم اولاد وطن و اعتلای میهن عزیزم افغانستان نیست، بر آورده شده بتواند.

در خاتمه از رهنمائی‌های استادان محترم هر یک پوهاند دوکتور سید الف شاه "غضنفر"، پوهاند دوکتور محمد افضل "انور"، پوهاند دوکتور سید عبدالله "هاشمی" و پوهاند دوکتور حیات الله "حیات" ابراز سپاس و امتنان نموده و نیز از محترم داکتر اجمل "عازم" به پاس زحمات و اهتمام شان در ویرایش و طبع آن اظهار سپاس نمایم.

با احترام

پوهاند دوکتور عبیدالله "عبید" ©

تاریخچه مختصر علم مایکروبیولوژی

مایکرواورگانیزم‌ها پیشتر از سه قرن قبل کشف گردیده بودند اما الی اواسط قرن نوزدهم که مایکروبیولوژی در آن به علم تجربوی میدل گردید، معلومات کمی در مورد مایکروب‌ها در دست بود. بعد از اواسط قرن نوزدهم، الی الحال، پیشرفت‌های فزاینده‌ی درین عرصه صورت گرفته که همچنان ادامه دارد.

حیوانات کوچک لیون هوک

انتونی لیون هوک، تجار هالندی، نخستین شخصی بود که مایکرواورگانیزم‌ها را مشاهده نمود. وی بصورت تفریحی مایکروسکوپ‌های کوچک را می‌ساخت. بعد ازینکه از طریق عدسیه مایکروسکوپ دستی خود مشاهدات انجام داد، وی عالم مخلوقات غیر مرئی را مشاهده نمود که نام آنها را حیوانات کوچک گذاشت. این حیوانات کوچک در هر جا موجود بودند، در قطرات آبی، در خاک و در نمونه‌های حاصله از خراشیدن دندان‌ها. وی در سال ۱۶۷۴ میلادی رسم‌های مفصلی را در مورد کشفیات خود به جمعیت شاهی لندن فرستاد. همه رسم‌ها و ۹ پایه مایکروسکوپ از جمله ۵۰۰ مایکروسکوپ‌های دست ساخته وی هنوز هم موجود اند. قوی ترین مایکروسکوپ‌ی که توسط وی ساخته شده بود، دارای بزرگی‌نمایی به اندازه ۲۶۶ بود که می‌توانست باکتری‌های نسبتاً کوچک را به اندازه نقطه معمول در کلمات، نشان دهد. اما با در نظرداشت تفصیلات موجود در رسم‌های وی، می‌توان گفت که وی باید مایکروسکوپ‌های قوی‌تری را ساخته باشد که مفقود گردیده اند.

البته وی اولین شخصی نبود که مایکروسکوپ‌ها را بسازد اما وی مایکروسکوپ‌های دستی بهتری ساخت و با مهارت بیشتر از آن استفاده به عمل آورد. وی با حسادت از مایکروسکوپ خود که دارای عدسیه واحد بود، استفاده به عمل می‌آورد و مایکروسکوپ‌های مرکب همان زمان را استعمال نکرد. وی از فروش مایکروسکوپ‌های خود امتناع بعمل آورده و نیز دیگران را در مورد آن آموزش نداد. در نتیجه الی ۲۰۰ سال دیگرهم کسی نتوانست مایکروسکوپ‌های قوی مانند وی تهیه نماید.

هوک و نظریه حجروی

زمانیکه لیون هوک رسم های خود را به جمعیت شاهی لندن فرستاد، رابرت هوک متصدی سامان آلات جمعیت بوده و با مایکروسکوپ مرکب تجارب خود را انجام میداد. آلات هوک می توانست ۳۰۰ الی ۵۰۰ مرتبه بزرگنمایی داشته باشد، اما تصاویر آن توسط حلقات ملونه نور تحت پوشش قرار می گرفت. بناءً نمی توانست موجودات کوچک چون باکتری ها را ببیند. اما وی کاغذ کارک را تحت مایکروسکوپ قرار داده و آنرا به نام حجرات مسمی نمود که مانند خانه زنبور به مشاهده می رسید. این کشف باعث به میان آمدن نظریه حجروی گردید که به اساس آن حجرات واحد اساسی و وظیفوی همه موجودات حیه دانسته شد.

تخلیق بنفسه (خودی)

در زمانی که لیون هوک مایکرواورگانیزمها را در هالند مشاهده می نمود عالم دیگری در ایتالیا حادثه مهم دیگری را کشف نمود: در سال ۱۶۶۵ میلادی، فرانسکو ریدی اثبات نمود که تخلیق خودی موجودات ماکروسکوپییک ممکن نمی باشد. به عباره دیگر، موجودات زنده از مواد غیر حیه بوجود نمی آیند. وی تجربه خود را با جارهای مستور و غیر مستور گوشت انجام داد که کرم های گوشت صرف در بوتلی به میان آمد که سر آن باز بود و قابل تماس مگس قرار داشت. یعنی مگس ها با گوشت تماس حاصل نموده و در آن تخم گذاری می کردند. وی ثابت نمود که موجودات حیه صرف از موجودات حیه موجود قبلی، به میان می آیند. با آنهم مایکرواورگانیزمها بحیث استثنا این قانون تلقی می گردید. مایکروبها به سرعت و به تعداد زیاد بعد از مرگ نباتات یا حیوانات تظاهر می نمودند. آیا مایکروبها باعث تجزیه decomposition می گردند و یا اینکه decomposition باعث به میان آمدن مایکروبها می گردد؟ سوالی بود که هنوز به حل نیاز داشت.

نیدهام و سپالانزانی

مسئله تخلیق خودی برای هشتاد سال بصورت متنازع باقی مانده بود اما بعد از آن طرفداران نظریه تخلیق خودی غالب به نظر رسیدند. در سال ۱۷۴۵ میلادی، روحانی انگلیسی به نام جان نیدهام تجربه بی را جهت حل این منازعه پیشنهاد نمود. هر کس میدانست که جوش دادن

سبب مرگ مایکروب‌ها می‌گردد. بناءً وی broth مرغ را جوش داده و آنرا در فلاسک انداخته، و سرپوش فلاسک را مسدود می‌نمود. اگر مایکروب‌ها نمو میکردند، یگانه سبب آن تخلیق خودی بود. عملاً طی این تجربه مایکروب‌ها رشد نمودند. اما عالم ایتالوی به نام لازارو سپالانزانی به این تجربه اکتفا ننمود. وی معتقد بود که شاید مایکروب‌ها بعد از جوش دادن اما قبل از مسدود نمودن فلاسک مداخله نموده باشند. بناءً وی broth را در فلاسک انداخته، آنرا مسدود ساخت و هوای فلاسک را تخلیه نمود. بعداً آنرا جوش داد که مایکروب‌ها نمو نکردند. کسانی که برین دریافت انتقاد داشتند، معتقد بودند که این تجربه صرف اثبات نمود که در عدم موجودیت هوا تخلیق خودی صورت گرفته نمی‌تواند.

تجربه تاریخی پاستور

تنازع فوق الی صد سال دوام نمود. بالاخره اکادمی ساینس فرانسه در سال ۱۸۵۹ میزبانی مسابقه‌ی را به عهده گرفت که طی آن تیوری تخلیق خودی یا رد آن، باید اثبات می‌گردید. لویی پاستور که کیمیادان فرانسوی بود، وارد صحنه گردیده و از فلترهای باید استفاده می‌نمود که هوا را اجازه عبور داده اما مایکروب‌ها را اجازه عبور ندهد تا تیوری مبنی بر لزومیت هوا برای تخلیق خودی را فیصله نماید.

موصوف در معروفترین تجربه خود، broth گوشت را در فلاسک جوش داده و بعداً عنق فلاسک را تحت شعله آتش طویل و منحنی ساخت (که مانند عنق قازها شکل داشت). و بدین ترتیب محتوی فلاسک به هوا ارتباط داشت. زمانیکه وی تجربه خود را انجام داد، مایکروب‌ها رشد نمودند، اما وقتیکه موصوف فلاسک را طوری تغییر موقعیت داد که یک اندازه از محتوی آن با قسمت عنق در تماس گردید، بعد ازینکه فلاسک را بحالت اصلی خود گذاشت، broth دوباره به قسمت قاعده فلاسک برگشت نمود. بزودی دیده شد که محتوی فلاسک ابرآلود و مملو از مایکروب‌ها گردید. علت عدم تداخل مایکروب‌ها در حالت اولی به broth این بود که قوه جاذبه زمین باعث ته نشین شدن مایکروب‌های وارده از هوا در سطح سفلی قسمت عنق گردیده بود و زمانیکه با حرکت فلاسک محتوی آن به تماس این ناحیه در آمد باعث انتقال مایکروب‌ها از این ناحیه به قسمت تحتانی فلاسک گردیده که سبب رشد مایکروب‌ها گردید. بناءً وی اثبات نمود که تخلیق خودی مایکروب‌ها حتی در موجودیت هوا نیز صورت گرفته

نمی‌تواند و اینکه رشد مایکروب‌ها سبب تفسخ غذا و نیز نباتات و حیوانات مرده می‌گردد. موفقیت پاستور قسمی به خوشبختی وی عطف شده می‌تواند چه علمای عدیده قبل از آن نتوانستند تخلیق خودی را رد نمایند، زیرا نمونه‌های آنان دارای اندوسپورهای مقاوم حرارت بودند که در مقابل حرارت مقاوم و توسط جوش دادن تخریب نمی‌شوند. مخصوصاً در تجاربی که از broth نباتی استفاده میشد، بیشتر به ناکامی مواجه می‌گردید، زیرا نباتات بیشتر دارای انواع باکتری‌های می‌باشند که سپورهای مقاوم حرارت را تولید می‌نمایند. Broth گوشت مانند تجربه پاستور به ندرت توسط اندوسپورها ملوث می‌گردد.

- تجربه ساده اما مهم و تاریخی پاستور حقایق ساینسی را در مایکروبیولوژی بر ملا ساخت:
- هیچ موجود زنده به شمول میکرواورگانیزم‌ها توسط تخلیق خودی بمیان آمده نمی‌تواند.
 - مایکرواورگانیزم‌ها در همه جا موجود می‌باشد به شمول هوا، گرد و خاک.
 - رشد مایکروب‌ها سبب تجزیه نباتات و حیوانات مرده و تخریب مواد غذایی می‌گردد.

تیوری مایکروبی امراض

بعد از اینکه تخلیق خودی مایکروب‌ها رد گردید، انقلابی در علم مایکروبیولوژی رخ داد. یعنی مایکروبیولوژی از یک علم مشاهدوی به علم تجربوی تبدیل گردید. ساینسدانان می‌توانستند مسایل مغلقی را مورد توجه قرار دهند. بدین ترتیب تیوری مایکروبی امراض به میان آمد. رابرت کوخ، طبیب آلمانی با استفاده از کارهای پاستور، اثبات نمود که نه تنها مایکروب‌ها سبب امراض می‌شوند، بلکه امراض بخصوص توسط مایکروب‌های معین به میان می‌آیند.

فرضیه کوخ

رابرت کوخ در سال ۱۸۷۶ مرض انتراکس را مطالعه می‌نمود. این مرض حیوانات و نیز انسانها را مصاب می‌سازد. وی دریافت که عامل سببی مرض در خون همه حیوانات مصاب به مرض قابل دریافت است. وی عامل سببی را کشت نموده (امروز به نام bacillus anthracis یاد می‌گردد) که بصورت خالص خارج از عضویت متن بدست آمد. وی بعداً حیوانات سالم را با

همان کلچر مرضی تزریق نموده که آن حیوانات نیز مانند حیوانات قبلی مصاب مرض گردیده و در خون آنها قابل دریافت بود. این چهار مرحله تیوری کوخ را تشکیل می دهد که حتی امروز هم قابل استفاده می باشند. به اساس این نظریه، میکروب معینی عامل سببی مرض مشخصی می باشد. در ضمن مطالعه مرض انتراکس، رابرت کوخ تکنیک حصول و اجرای کشت خالص مایکروبها را نیز به میان آورد. در کلچر خالص صرف نوع واحد باکتری موجود می باشد. کلچرهای مختلط عبارت از کشت های اند که دارای انواع متعدد مایکروبی می باشند که نمونه های آن در طبیعت دیده می شود. اجرای تجارب بالای کشت های مختلط مشکل بوده و سبب اشتباهات می گردد اصلاً در گذشته ها همین کشت های مختلط بود که سبب به میان آمدن نظریه های خیالی در مورد دوران حیات مایکروبها گردیده بود. ساینسدانان به همین اساس توضیحات ارائه نمودند که چگونه باکتری با مرور زمان شکل و اوصاف خود را در کشت تغییر می دهد مثلاً از اشکال مدور به اشکال طولیل و حتی فنر مانند شکل خود را تغییر می دهد. در حقیقت این اشکال، نمایانگر انواع مختلف باکتری ها بود که در اوقات مختلف در وسط متباز می بود و ناشی از کلچرهای مختلط بود نه تغییر شکل یکنوع باکتری. فرضیه کوخ، حصول کلچر خالص و نیز معرفی ماده اگر توسط وی بحیث وسط کشت، تغییرات فوق العاده‌یی را در عرصه مایکروبیولوژی به میان آورد. از سال ۱۳۸۲ الی ۱۹۰۰ میلادی، تقریباً عوامل سببی همه امراضی که در آن زمان در اروپا معمول بود، کشف گردید مانند عامل سببی تایفس، دیزانتی، سفلیس، گونوریا، نومونیا و توبرکلوز که اخیرالذکر توسط شخص رابرت کوخ کشف گردید.



معافیت

در صورتیکه مایکروبهای معینی سبب امراض مشخص گردد، باید ممکن باشد تا امراض مایکروبی یا انتانی را کنترل نمود. برای این مأمول کافی بود تا عامل سببی مرض کنترل گردد بناءً مایکروبیولوژی در دو عرصه عمده پیشرفت نمود: اول، معافیت یا تحریک قابلیت خود عضویت تا با انتانات مقابله نماید و دوم، حفظ الصحه عامه تا پاکی و صفایی توسعه یافته و معروضیت به انتانات کاهش یابد.

از ازمه های قدیم هویدا بود که آنانی که یکبار به عده از امراض مصاب می شدند، برای بار دوم در مقابل همان امراض مقاوم می بودند. بعضی از تغییرات محافظوی در بدن رشد می نمود

یا به عباره دیگر مایکروب‌ها باعث تولید معافیت شده می‌توانست. تولید معافیت توسط مایکروب‌های باید صورت گیرد که میزان را در مقابل همان مایکروب معروض می‌سازد، اما شکل مایکروب تغییر یافته باشد و سبب تولید مرض نگردد.

شریت سازی هیس

رأبرت کوخ اهمیت اجرای کلچر خالص را درک نمود، اما تطبیق آن مشکل بود. وی در تیوری می دانست که اگر حجره واحد باکتری تجرید و در سطح جامد کشت گردد، سبب تولید مجتمع متشکل از همان مایکروب خواهد شد (کالونی‌ها). این کشت، خالص خواهد بود زیرا از نوع واحد حجره منشأ گرفته اند. همچنان وی می دانست که برای نموی مایکروبی برای مواد مغذی نیاز موجود است. بدین منظور وی از مواد مختلفه مانند توتیه کچالو یا جلاتین را به کار برد. جلاتین خوب نتیجه داد اما در درجه حرارت پائینتر از ۳۷ درجه سانتی گراد ذوب گردیده و نمی‌توانست درین درجه که برای کشت اکثریت مایکروب‌های مرضی مساعد است، جامد بماند. همسایه کوخ، خانم فرا هیس می از این مشکل وی آگاه گردیده و از دستگاه شربت سازی ماده اگر را که محصول خزیه های آبی می‌باشد، برای وی فراهم نمود. زمانیکه این ماده با مواد مغذی مانند broth گوشت ترکیب شود، بسیار برای کشت مناسب است زیرا در حرارت پائین تر از صد درجه سانتی گراد جامد می ماند. بدین وسیله کوخ توانست که کشت های خالص را به دست آرد و تحول عمده در مایکروبیولوژی به وقوع پیوندد.

جنر و مرض چیچک

ادوارد جنر که طبیب انگلیسی بود، دریافت که شیردوشانی که بصورت طبیعی انتان نسبتاً خفیف به نام cowpox را کسب نموده بودند، در مقابل مرض مهلک و سؤشکل دهنده به نام small pox مصؤون بودند. وی در سال ۱۷۹۶ از آبله های موجود در دست سارا نیلمز مصاب به cowpox مایعی را اخذ و در بدن طفل هشت ساله یی تلقیح نمود طفل به مرض اخیر الذکر مصاب گردید بعداً جنر مواد منتن با small pox را در بدن عین طفل تلقیح نمود که سبب به میان آمدن هیچگونه عکس‌العملی نگردید. یعنی طفل در مقابل مرض چیچک معاف شده بود. کلمه واکسیناسیون نیز مشتقی از کلمه واکا (لاتین) یا گاو می‌باشد. بدین ترتیب مرض چیچک تحت کنترل در آمد. اما جنر معلومات کافی نداشت تا واکسیناسیون در مقابل سایر امراض انتانی نیز تهیه نماید.

واکسین‌های نخست

پاستور به اساس کارهای انجام یافته توسط کوخ و جنر، اصول عمومی را ترتیب نمود که چگونه واکسین‌ها (عواملی که سبب تولید معافیت می‌شوند اما نه مرض) ساخته شده می‌تواند. پاستور نیز مانند کوخ بالای انترکس کار می‌کرد. در اوایل دهه ۱۸۸۰ وی در مورد کولرای پرنده گان تجاربی را اجرا می‌نمود و دریافت که تزریق مایکروب ضعیف شده کولرا در مرغهای سالم سبب محافظت آنها در مقابل کولرای پرنده گان می‌شد. وی ازین اصل برای ترتیب واکسین انترکس و نیز در سال ۱۸۸۵ برای سگ دیوانه استفاده به عمل آورد. تقریباً در عین زمان دو شخص امریکایی به نام‌های دانیل سلمان و تیوبالد سمیت بصورت تجربوی وانمود ساختند که برعلاوه مایکروب‌های ضعیف شده می‌توان از مایکروب‌های کشته شده نیز استفاده بعمل آورد که این کشفیات سبب تولید واکسین عده زیادی از امراض انتانی گردید.

حفظ الصحه عمومی

با کشف واکسین‌ها حیات هزاران انسان نجات یافت اما با بهبود حفظ الصحه عمومی، هرچه بیشتر در حفظ حیات انسان‌ها کمک کرد. قبل از نظریه مایکروبی امراض، آب‌های کثیف معمولاً با آبهای آشامیدنی مخلوط می‌گردید که با بهبود شیوه‌ها و میتودهای دفع کثافات و تأمین آب پاک آشامیدنی از اپیدیمی‌های خطرناک کولرا و تب محرقه جلوگیری بعمل آمد. همچنان در عرصه تهیه و نگهداری مواد غذایی پیشرفت‌های به میان آمد که بالاخره پاستورایزیشن مثال آن است که با معروض نمودن کوتاه مدت مواد به حرارت، اکثریت مایکروب‌های مرضی از بین می‌روند، پاستور برای بار نخست این عملیه را جهت محافظت شراب از خراب شدن، اساس گذاشت. همچنان تیوری مایکروبی، سایر اقدامات محافظتی مانند شستن دست‌ها را تنبه نمود. حفظ الصحه عمومی بهتر، نه تنها سبب جلوگیری از مایکروب‌های مرضی می‌گردد، بلکه سبب تقویه مدافعه عضویت در مقابل امراض نیز می‌گردد.

مایکروبیولوژی امروزی

اواخر قرن نهم عصر طلائی مایکروبیولوژی محسوب می‌گردد زیرا تغییرات و کشفیات چنان به سرعت واقع شدند که در نتیجه حیات را بصورت دراماتیک تغییر داد. در قرن بیستم چنین تغییرات کمتر بود. بدین منظور به عرصه‌های کیموترابی، ایمونولوژی، وایرولوژی و جنیتیک انجنیرنگ بازنگری می‌نماییم:

کیموتراپی

عمده ترین پیشرفت قرن بیستم عبارت از کیموتراپی یا تداوی انتانات با مواد کیمیای بود. در قرن نوزدهم نیز علما شیوه های برای جلوگیری انتانات بوجود آوردند اما نمی توانستند آنرا تداوی نمایند. طبیب آلمانی پاول ایهرلیچ به نام پدر کیموتراپی یاد می گردد، زیرا وی برای اولین بار نظریه سمیت انتخابی selective toxicity را به میان آورد. یعنی ادویه باید به مقابل انتانات توکسیک ولی در مقابل عضویت انسان نسبتاً غیر مضر باشد. وی گفت که ادویه عبارت از مرمی های جادویی هستند که می توانند مایکروبها را از بین ببرد. موصوف در سال ۱۹۰۸ میلادی اولین ادویه ضد مایکروبی را بر علیه عامل سببی سفلیس به میان آورد و نام آنرا salvarsan یا نجات دهنده گذاشت. الی بیست سال دیگر این یگانه دوی ضد مایکروبی کشف شده بود. بعد از این اولین فامیل عمده ادویه جات به نام sulfas کشف گردید که ابتدأً صرف به منظور رنگ آمیزی استعمال میشد و بعداً بالآخر تحقیقات کمپنی Farben آلمانی در دهه ۱۳۹۰ بحیث مواد کیموتراپی نیز استفاده گردیدند.

انتی بیوتیک ها مواد کیموتراپی طبیعی اند که نخستین آن به نام پنسیلین در سال ۱۹۲۹ توسط عالم سکاتلندی به نام الکساندر فلمینگ کشف گردید. اما بنابر مشکلات تخنیکی در تصفیه آن الی یک دهه دیگر نیز استعمال کلینیکی نداشت. در دهه ۱۹۴۰ در جریان جنگ دوم جهانی وجوه مالی تولید پنسیلین بدست آمد که این ادویه استعمال و به نام ادویه حیرت انگیز یاد شد.

تب زایمانی

در اواسط قرن نوزدهم، دخول به شفاخانه جهت ولادت خطرناک بود. تعداد زیادی از زنان اطفال صحتمندی به دنیا آورده اما خود به زودی به بیماری خطرناکی دچار می شدند که بالاخره از بین رفته و آرزوی بردن اطفال به خانه را بجا آورده نمی توانستند. امروز ما می دانیم که بیماری متذکره از باعث streptococcus pyogenes به میان آمده که نخست رحم را مبتلا و بعداً به تمام عضویت سرایت می نماید. اعراض آن تب، لرزه، هزیانات و بالاخره مرگ می باشد.

ایگناز سیمیل ویس در سال ۱۸۴۷ میلادی، طبیب شفاخانه ولادی ویانا بود. تعداد وفیات در زمان تصدی وی زیاد و نیز عجیب بود زیرا شفاخانه دو کلینیک ولادی داشت. در کلینیک اول محصلین مسؤول ولادت بوده و در دوم آن قابله ها موظف بودند. وفیات بصورت حیرت انگیز در

کلینیک اول زیاد بود. همه زنان ساعت ها در دهلیز انتظار می کشیدند و می خواستند به کلینیک دوم داخل گردند. موصوف ازین واقعه در تحیر افتاد و دریافت که انگشت یکتن از محصلین بریده شده و با عین اعراض تب زایمانی وفات نمود. وی دریافت که چون محصلین به تطبیقات اناتومی رفته بر اجساد کار می نمایند، ممکن عامل سببی تب زایمانی از اجساد توسط انگشت های محصلین انتقال یابد. وی همه محصلین را امر نمود تا بصورت منظم دستان خود را قبل از ورود به ولادت خانه با کلورین خوب بشویند. چون کلورین بوی اجساد را از بین می برد، وی فکر کرد که شاید مؤثر باشد، همینطور شد، کلورین عامل مرضی را از بین برده و فیصدی وفیات کلینیک اول مانند کلینیک دوم پائین آمد. اما همه وی را به استهزا گرفتند و تقریباً سه دهه بعدتر کوخ و پاستور دریافت های او را بصورت علمی توضیح داده اما افسوس که او تا آنوقت زنده مانده نتوانست و بصورت غیر معمول، از انتان سترپتوکوکال در سال ۱۸۶۴ فوت نمود.

ایمونولوژی

در ایام پاستور و کوخ، این علم جز از مایکروبیولوژی بوده که نقش آن صرف تهیه واکسین ها بر علیه امراض انتانی بود، درحالیکه این علم در قرن اخیر بسیار تکامل نموده است.

واپروولوژی

این علم در سال ۱۸۹۲ با کشف وایرس tobacco mosaic توسط عالم روسی به نام دیمیتری ایوانوسکی آغاز گردید. وی این عامل مرضی را با مطالعه مرض موزایک تنباکو دریافت نمود. وی جهت تشخیص خود، جوس حاصله از نباتات مبتلا به مرض را از فلتری عبور داد که حتی کوچکترین باکتری را اجازه دخول نمی داد. محصول فلتتر شده بازهم سبب تولید مرض گردید که وی عامل آنرا به نام وایرس های قابل فلتتر نامید. این عوامل در سالهای ۱۹۳۰ با کشف الکترون مایکروسکوپ، قابل رویت گردید.

انجیری جنیتیک

دو حقیقت عمده در مورد مایکروبها در نیمه دوم قرن بیستم کشف گردیده که اول آن مشابهت نزدیک میتابولیزم و مشخصات جنیتیک مایکرواورگانیزمها با حیوانات و نباتات بوده و دوم آن، مساعد بودن مایکرواورگانیزمها برای تحقیقات تجربی می باشد. مساعد بودن

باکتری‌ها برای تحقیقات در سهولت کشت و سرعت انقسام آن نهفته است. یعنی عده از باکتری‌ها به سرعت یعنی هر ۲۰ دقیقه بعد یکبار انقسام می‌نمایند که در مدت کوتاهی تعداد باکتری‌های موجود در یک لیتر مایع بیشتر از تعداد انسانان موجود در کره زمین می‌گردد. Genetic engineering یا Recombinant DNA technology عبارت از تخنیک است که طی آن مواد جنیتیک یا DNA از یک موجود بیرون کشیده شده، در آن تغییرات وارد می‌گردد و دوباره به اورگانیزم دیگری داخل می‌گردد تا اثرات خویش را وارد کند. DNA از هر اورگانیزم حاصل شده می‌تواند و DNA موجودات مختلف باهم ترکیب شده می‌تواند. اورگانیزی که بیشتر به حیث میزبان به این منظور استفاده می‌شود، عبارت از E. Coli می‌باشد که حتی برای سنتیز انسولین انسانی بکار می‌رود. این ساحه بسیار وسیع و تا حال تحقیقات در آن جریان دارد.

زمان آینده

مایکروبیولوژی بحیث علم تجربوی کمتر از صد سال عمر دارد. عرصه‌های باکتریولوژی و وایرولوژی آن هنوز هم ضرورت به انکشاف دارد. مثلاً مشکلات عایده از مقاومت در مقابل انتی‌بیوتیک‌ها و یا ظهور انواع جدید وایرس‌ها در اثر تغییرات تدریجی، حالاتی اند که باید مورد توجه قرار گیرد. همچنان کنترل امراض انتانی مشکلی است که هنوز در راستا این علم قرار دارد عده از علما به سنتیز انتی‌بیوتیک‌های جدید و عده هم به تقویه سیستم معافیتی اصرار دارند؛ باید تحقیقات بیشتری صورت گیرد و آنهم با استفاده از Recombinant DNA technology.

عرصه دیگری که مستلزم توسعه است عبارت از مایکروبیولوژی محیطی می‌باشد. ما عمدتاً بر bioremediation یا تصفیه مواد کیمیاوی توکسیک توسط مایکرواورگانیزم‌ها تأکید داریم. بالاخره تعداد زیادی از میکروب‌ها هنوز کشف، نامگذاری یا طبقه بندی نشده‌اند، که تحقیقات در آن جریان دارد، شما هم می‌توانید به مثابه دوکتوران و محققین مایکروبیولوژی در حدود توان تان سهم خود را درین عرصه ایفا نمایید.

فصل اول

مورفولوژی مایکرواورگانیزمها

تعریف مایکروبیولوژی

مایکروبیولوژی از سه کلمه Micro به معنی کوچک و ذره بینی Bio حیه و Logous علم مشتق شده است و عبارت از علميست که کلیه خصوصیات و مشخصات مایکروباها را مورد مطالعه قرار می دهد.

شعبات مایکروبیولوژی

- ۱- مایکروبیولوژی طبی
- ۲- مایکروبیولوژی صنعتی
- ۳- مایکروبیولوژی غذایی
- ۴- مایکروبیولوژی خاک
- ۵- مایکروبیولوژی آب
- ۶- مایکروبیولوژی نباتات

I- مایکروبیولوژی طبی

عبارت از مطالعه عامل (کلیه خصوصیات و مشخصات) امراض انتانی (هم از باکتریایی، فنگسی وایرسی و پرازیتی) می باشد. مایکروبیولوژی طبی از شعبات ذیل تشکیل گردیده است:

- ۱- باکتریالوژی: علميست که خصوصیات و قابلیت مؤلدامرضی باکتریها را مطالعه می نماید.

- ۲- مایکولوژی: علم مطالعه فنگس‌ها را گویند.
- ۳- وایرولوژی: علم‌یست که تمام خصوصیات Virus ها را مورد مطالعه قرار می‌دهد.
- ۴- پرازیتولوژی: علم‌یست که پرازیت‌های را که نزد انسانها ایجاد بیماری می‌نماید مورد مطالعه قرار می‌دهد.
- ۵- ایمنولوژی: علم مطالعه معافیت و مقاومت عضویت در مقابل مایکروب‌ها را گویند.
- ۶- جنیتیک: علم‌یست که خصوصیات ارثی و اختلاف میان نسل‌های مایکروب‌ها را مورد مطالعه قرار می‌دهد.

اساسات بیولوژیک که در مایکروبیولوژی توضیح می‌گردند

بیشترین تنوع بیولوژیک در مایکرواورگانیزم‌ها موجود می‌باشد. این‌ها موجوداتی اند که با چشم مستقیماً قابل رویت نمی‌باشند. تحلیل مایکرواورگانیزم‌ها از نگاه شکل و فعالیت مثلاً مشخصات بیوشمیک و یا میکانیزم‌های جنیتیک می‌تواند در مورد حیات معلومات فراهم نماید. فرضیه ساینسی مفید باید اساسی را برای (generalization) یا تعمیم تشکیل دهد و تنوع مایکروبی عرصه‌یی را تشکیل می‌دهد که این چالش دوامدار در آن موجود می‌باشد. پیشگویی که نتیجه عملی ساینس را تشکیل می‌دهد، عبارت از دست‌آورد حاصله از یکجا نمودن تخنیک و تیوری می‌باشد. بیوشیمی و جنیتیک و سایر تحلیل مایکرواورگانیزم‌ها را تشکیل می‌دهند.

مایکروبیولوژی به نوبه خود حدود اصول ساینسی فوق را توسعه می‌بخشد. بیولوژیست‌ها ممکن رابطه متقابل را که طی آن همه جوانب مستفید می‌گردد، Mutualism بگویند. اصطلاح بیولوژیک mutualism عبارت از symbiosis می‌باشد که وابسته گی مداومی را میان اورگانیزم‌های مختلف تشکیل می‌دهد. در صورتی که اصلاً یک جانب از رابطه منتفع گردد، چنین رابطه به نام parasitism یاد می‌گردد. Parasitism رابطه است که در آن نفع اصلی توسط میزبان برای پرازیت مهیا می‌گردد. مثلاً باکتریها و وایرس‌های پتوجنیک، که اکثراً ضرورت می‌باشد تا شرایط نمویی وجود میزبان را جهت کشت آن در لابراتوار مهیا نماید. این ضرورت بعضاً مشکل بزرگی را برای محققین ایجاد می‌نماید.

اصطلاحات اخیرالذکر (Mutualism-symbiosis-parasitism) مربوط به علم Ecology

می‌باشد و اساسات بیولوژی محیطی در مایکروبیولوژی توضیح گردیده است. مایکرواورگانیزمها تابع تکامل تدریجی بوده‌اند. پروسه تکامل تدریجی (Evolution) در نتیجه انتخاب طبیعی یک عده اورگانیزمهای متنوع به‌میان آمده و نیز مهم می‌باشد تا معلق بودن تاریخ طبیعی مایکرواورگانیزمها را قبل از تصنیف مایکرواورگانیزمها در نظر گرفت. مایکرواورگانیزمها غیر متجانس‌ترین گروه مخلوقات زنده می‌باشند.

در تصنیفات بیالوژیک، Eukaryotes که دارنده هسته غشا دار می‌باشد و Prokaryotes که DNA آن به‌صورت فزبکی از سایتوپلازم تفکیک نمی‌گردد، مشتمل می‌باشد. بعداً در متن توضیح خواهد شد که تفاوت‌های دیگری نیز میان Eukaryotes و Prokaryotes موجود می‌باشد. مثلاً Eukaryotes دارای جسامت نسبتاً بزرگتر بوده و حاوی اورگانیل‌های غشا دار مانند مایتوکاندریا می‌باشند.

مایکروب‌های Eukaryote به نام پروتستها یاد می‌گردد و پروتستها مشتمل بر Algae، Protozoa، Fungi و Slime Molds می‌باشند.

Eukaryotes و Prokaryotes اورگانیزمها‌اند؛ زیرا که همه انزایم‌های لازم برای تکثیر را دارا بوده و وسایل بیولوژیک لازم برای تولید انرژی میتابولیک را حایز می‌باشند؛ اما وایرس‌ها چنین نمی‌باشند؛ زیرا که جهت اجرای فعالیت‌های لازمی فوق به حجره میزبان متکی‌اند.

وایرس‌ها

خواص جداگانه وایرس‌ها آن‌ها را از سایر موجودات زنده مجزا می‌سازد. وایرس‌ها گروپ‌های غیر متجانسی می‌باشند که جهت تکثیر خود به حجره میزبان متکی می‌باشند. می‌توان وایرس‌ها را استتاله‌های جنتیک میزبان دانست. تعاملات میان میزبان و وایرس بسیار وصفی می‌باشد و حدود بیولوژیک وایرس‌ها نشاندهنده ازدیاد در انواع حجرات ممکنه میزبان می‌باشند. وایرس‌ها با داشتن ستراتیژی‌های زیاد در عرصه تکثیر و حیات، تنوع بیشتر را به خود کسب می‌نمایند.

وایرس متشکل از یک مالیکول نوکلیک اسید (DNA یا RNA) بوده که در محفظه پروتینی یا کپسید قرار دارد. پروتین‌های کپسید دار که اکثراً گلیکوپروتین‌ها بوده وصفی بودن تعامل میان وایرس و حجره میزبان را معین می‌سازد. کپسید نوکلیک اسید را محفظه نموده و

اتصال و دخول وایرس را به حجره میزبان مساعد می‌سازد. بعد از دخول وایرس به حجرات، نوکلیک اسید وایرس‌ها دستگاه انزایماتیک حجره میزبان را طوری تغییر می‌دهد تا فعالیت‌های مربوط به تکثیر وایرس را انجام دهند. در بعضی حالات معلومات جنیتیک ناشی از وایرس به حیث DNA در کروموزوم حجره میزبان جا گرفته و در حالات دیگر معلومات جنیتیک وایرس به حیث اساس تولید حجروی عمل نموده و منجر به تولید کاپی‌های از وایرس می‌گردد. در این پروسه DNA وایرس کاپی شده و پروتین‌های مخصوص وایرس ساخته می‌شود. جهت اكمال رشد وایرس‌ها لازم است تا یونت‌های کوچک پروتینی و نوکلیک اسید با هم ترتیب گردیده و وایرس‌های کامل را به بار آورند. وایرس‌های متذکره بعداً وارد محیط خارج حجروی می‌گردند.

وایرس‌های مختلفه سبب منتن شدن عده زیادی از حیوانات و نباتات گردیده و نیز پروکاریوت‌ها و اقلاً یک نوع از الجی‌ها را مصاب می‌سازد. اجسام مشابه وایرس‌ها که معلوم می‌شود در خارج حجره انسانی نمی‌باشد، در داخل فتجی‌ها و نیز در چندین نوع الجی‌ها دریافت شده‌اند.

عده ای از امراض ساری نباتی توسط موجوداتی به نام *Viroids* به وجود می‌آید. این‌ها از مالیکول‌های *Single Stranded RNA* ساخته شده و به شکل ساختمان‌های میله مانند به نظر می‌رسند. *Viroid* کپسید نداشته و وزن مالیکولی آن میان ۷۵۰۰۰ الی ۱۰۰۰۰۰ می‌باشد. معلوم نشده که آیا موجودات اخیرالذکر در داخل حجرات باعث تشکل پروتین می‌گردد. تکثیر حجرات *VIROID* از طریق *RNA Polymerase* متعلق به DNA صورت گرفته و تأثیر آن بالای همین انزایم ممکن باعث پتوجنیسیته *Viroids* گردد.

RNA وایرویدها در نهایت خود دارای *Inverted Repeated Base Sequences* می‌باشد که یک مشخصه *Retrovirus* و *Transposable Elements* ها می‌باشد. بنأ ممکن وایرویدها از *Transposable Elements* با حذف *Sequence* های داخلی به میان آمده باشد.

Scrapie که یک بیماری استحالوی سیستم عصب مرکزی گوسفندان می‌باشد، توسط عاملی به میان می‌آید که کمتر از ۵۰nm جسامت دارد و در مقابل نوکلیرها و سایر مواد غیر فعال کننده نوکلیک اسیدها مقاوم بوده؛ اما توسط پروتین‌ها و سایر مواد تعامل کننده با پروتین‌ها غیر فعال می‌گردد. عامل انتانی آن به نام *Prion* یاد شده و با یک پروتین مشخصی به صورت مشترک خالص *Purify* می‌گردد؛ اما موجودیت نوکلیک اسید در داخل این موجود رد نگردیده است. جین کود دهنده برای تشکل *Prion* ها با استفاده از تخنیک‌های *Recombinant DNA* از دماغ موش لابراتواری به دست آمده است. جین متذکره و *m RNA* مربوطه آن در هردو حجرات سالم و حجرات منتن به *Scrapie* دیده می‌شود. سه نظریه در این مورد موجود است:

الف: Scrapie یک وایرس معمولی بوده که نوکلئیک اسید آن بسیار کوچک بوده و بناً کشف نشده است.

ب: عامل مرضی RNA کوچک بوده که با تمایل زیاد با پروتئین Prion یکجا شده و شکل پروتئین اخیرالذکر را به شکل مرضی تبدیل می‌نماید.

ج: پروتئین Prion به صورت خودی مرضی بوده و باعث تولید انزایم‌های می‌گردد که سبب تغییرات Post Translational می‌گردد که منتج به تبدیل شدن پروتئین نورمال به شکل مرضی Prion می‌گردد این نظریات در مورد عامل سببی امراض Creutzfeld Jakob و Kuru که امراض مشابه را در انسان‌ها تولید می‌نماید نیز تطبیق گردیده می‌تواند.

پروکاریوت‌ها

عمده ترین معیار تشخیص پروکاریوت‌ها سایز کوچک آنها می‌باشد یعنی در حدود یک میکرومتر جسامت دارند. همچنان غشای هستوی دیده نمی‌شود. DNA تقریباً همه باکتری‌ها حلقوی و در حدود یک ملی متر می‌باشد، همین مالیکول حلقوی عبارت از کروموزوم باکتری بوده و باید بیشتر از ۱۰۰۰ مرتبه قات گردد تا در داخل حجره پروکاریوت جاگزين گردیده بتواند. شواهد حاکی است که پیچیده شدن آن به صورت منظم بوده و بخش‌های معینه DNA باهم نزدیک می‌گردند. حصه به خصوص حجره که حاوی DNA است به نام Nucleoid یاد گردیده و توسط الکترون میکروسکوپ قابل ملاحظه می‌باشند. بناً منطقی نخواهد بود تا حکم صورت گیرد که تعیین سرحدات داخل حجروی که در Eukaryotes ذریعه غشأها صورت می‌گیرد، در پروکاریوت‌ها موجود نمی‌باشد. اصلاً در بعضی پروکاریوت‌ها ساختمان‌های احاطه شده با غشأها موجود می‌باشد، مانند: Chromotaphor ها در باکتری فوتوستتیتیک. تفاوت میان چنین ساختمان‌های احاطه شده در غشأهای پروکاریوت‌ها با ساختمان‌های معادل در ایوکاریوت‌ها در این است که غشأهای احاطه کننده بخش‌های مشخص حجره پروکاریوت‌ها عبارت از تمادی غشای حجروی آن می‌باشد.

تنوع پروکاریوت‌ها

سایز کوچک کروموزوم پروکاریوت‌ها باعث محدود شدن اندازه معلومات جنتیک موجود در آن می‌شود. اندازه تخمینی جین‌های پروکاریوت‌ها ۳۰۰۰ بوده که اکثرأ فعالیت‌های اساسی را به پیش می‌برند. مانند، تولید انرژی، سنتیز مایکرومالیکول‌ها و تکثر حجروی. پروکاریوت‌ها جین‌های کمی را دارا می‌باشد که تطابق فزیولوژیک این اورگانیزم را با محیط آن ممکن می‌سازد. پهنای محیط زیست

پروکاریوت‌ها بسیار وسیع می‌باشد و بناً گروه پروکاریوت‌ها یک عده موجودات غیر متجانس از نظر محیط زیست اند که هر کدام با محیط زیست تخصصی خود عادت نموده و بناً محیط زیست انفرادی آن بسیار محدود است.

ازدیاد تعداد محیط‌های زیست پروکاریوت‌ها با در نظر داشت ستراتیژی‌های تولید انرژی میتابولیک آنها توضیح گردیده می‌تواند. نور آفتاب منبع اساسی حیات می‌باشد. بعضی پروکاریوت‌ها مثل باکتری‌های Purple بنفش که بدون تولید آکسیجن انرژی آفتاب را به انرژی میتابولیک تبدیل می‌نماید. باکتری سبز آبی Cyanobacteria اکسیجن تولید می‌نماید که در عدم موجودیت نور باعث تولید انرژی می‌گردد. اورگانیزم‌های ایروبیک مجبور اند جهت تولید انرژی از عملیه تنفس با اکسیجن استفاده نمایند. عده از اورگانیزم‌های غیر ایروبیک Electron Acceptor های غیر از اکسیجن را در تنفس به کار می‌برند. عده ای دیگر غیر ایروبیک‌ها عملیه‌های تخمیری را اجرا می‌نمایند. (۱)

تفاوت میان حجرات پروکاریوت و ایوکاریوت

مشخصات	حجرات پروکاریوت	حجرات ایوکاریوت
I- هسته		دارد
غشای هستوی	ندارد	دارد
هسته چه	ندارد	دارد
کروموزوم	یک عدد	زیاد
تقسیم مایتوتیک	ندارد	دارد
II- سایتوپلازم	ندارد	دارد
Pinocytosis	ندارد	دارد
مایتوکاندریا	ندارد	دارد
رایبوزوم	ندارد	دارد
اجسام گلجی	ندارد	دارد
اندوپلازمیک ریتیکولم	ندارد	دارد
III- ترکیب کیمیاوی	ندارد	دارد
Steriol	ندارد	دارد
Muramic Acid	دارد	ندارد

تصنیف پروکاریوت‌ها

آموزش هر گروه از اورگانیزم‌ها مستلزم تصنیف آن می‌باشد. تصنیف مناسب طوری می‌باشد تا اورگانیزم‌های جدید سریعاً و دقیقاً در کتگوری مربوط خود قرار گرفته بتوانند تعیین کتگوری اورگانیزم باعث کمک در پیشگویی مشخصات می‌گردد که اورگانیزم آنرا با سایر موجودات مشتمل در همان کتگوری تشریح می‌نماید. در شفاخانه‌ها تصنیف مؤفقاانه انتان ممکن بهترین شیوه امحا آن باشد. تصنیف همچنان باعث دانستن روابط خوب میان اورگانیزم‌های مختلف گردد. مثلاً امحای انتان برای مدت زیادتر دوام خواهد نمود مشروط بر اینکه محل زیست آن توسط شکل غیر انتانی همان اورگانیزم اشغال گردد.

مثلاً داشتن DNA در تصنیف پروکاریوت‌ها رول ندارد؛ زیرا همه آنها DNA را دارا می‌باشند و نیز موجودیت یک پلازمید یا محدوده وسیع از میزبان‌ها در تصنیف مهم نمی‌باشد؛ زیرا در اورگانیزم‌های زیاد دیده شده و نیز ممکن بعضاً هیچ موجود نباشد. معیارات مفید ممکن ساختمانی، فزیولوژیک، بیوشمیک و یا جنتیک باشند. سپورها (ساختمان‌های به خصوص که حیات را در شرایط مشکل ممکن می‌سازد) برای تصنیف مهم اند. عده از باکتری‌ها با در نظر داشت قابلیت تخمر قندی آنها تصنیف می‌گردد. تلونین گرام برای تصنیف باکتری‌ها به دو گروه عمده مهم می‌باشد. از معیارات جنتیک به شکل روز افزون در تصنیف استفاده می‌گردد. عده زیادی از آزمایشات جنتیک توسط تکنالوژی DNA Recombinant به میان آمده و امروز ممکن است تا پروب‌های DNA ساخته شده و اورگانیزم‌های مختلفه را کشف نمود. مقایسه DNA جین‌ها منتج به توضیح ارتباط Phylogenetic میان پروکاریوت‌ها گردیده که بدین وسیله می‌توان حجرات مادری اورگانیزم‌ها را پیدا نمود.

باکتری‌ها و آرکیوباکتری‌ها (اشکال عمده پروکاریوت‌ها)

پروکاریوت‌ها مشتمل بر دو گروه می‌باشند که توجه زیاد به آن معطوف گردیده است؛ زیرا که آرکیوباکتری‌ها در لابراتوار به مشکل مطالعه گردیده می‌تواند. مثلاً عده از آرکیوباکتری‌ها در صورت تماس با آکسیجن از بین رفته و عده دیگر در درجه حرارت معادل با غلیان آب زنده‌گی می‌نمایند. با استفاده از بیولوژی مالیکولی می‌توان آرکیوباکتری‌ها را تصنیف نمود، میتانوجن‌ها با اجرای تنفس غیر هوازی سبب تولید میتان می‌گردد. هلوفیل‌ها به غلظت‌های بلند نمک برای زیست خود محتاج اند، ترمواسید و فیل‌ها نیازمند درجه حرارت و یا اسیدیته زیاد اند. این موجودات زنده با همدیگر خود بعضی اوصاف مشترک داشته که آنها را از سایر موجودات زنده

متمایز می‌سازد. موضوع پیچیده عبارت از موجودیت Introns در جین‌های پروکاریوت‌ها به مانند Eukaryotes می‌باشد. تأثیر قسمت‌های اخیرالذکر در جینها معلوم نمی‌باشد.

پروتستها

ایوکاریوت‌های یا هسته داران واقعی: عبارت از موجوداتی اند که اورگانیل‌های غشا دار، مایکروتوبول‌ها و مایکروفیلامینت‌ها داشته و ساختمان داخل حجروی آن نظر به پروکاریوت‌ها مغلقتر است.

ایوکاریوت‌ها مایکروبی به نام پروتست‌ها یاد شده و دارای چهار گروه اند: الجی‌ها، پروتوزوا، فنجی‌ها و Slime Molds.

الجی‌ها

موجوداتی اند که اکسیجن را در اثر فوتوسنتیز تولید می‌نمایند. یک گروه عمده آنها که باکتری‌های سبز آبی (Cyanobacteria) بوده، متعلق به پروکاریوت‌ها گردیده و بیشتر از این مربوط به این کلاس نمی‌گردند. یعنی الجی‌ها صرف اورگانیزم‌های ایوکاریوتیک فوتوسنتیتیک را تشکیل می‌دهد. همه الجی‌ها در غشا فوتوسنتیتیک کلوروپلاست حجروی خود دارای کلوروفیل می‌باشند. اکثریت الجی‌ها مایکرواورگانیزم‌های وحیدالحجروی بوده؛ اما سایرین آن ساختمان‌های بزرگ چندین حجروی اند. کپ‌های ناشی از الجی‌های نصواری چندین متر طولی بوده می‌تواند.

پروتوزوا

عبارت از پروتست‌های وحیدالحجروی غیر فوتوسنتیتیک بوده و شکل ابتدیی آن فلاجیل دار بوده که در اکثریت وجوهات مشابه الجی‌ها می‌باشد. ممکن اجداد آن الجی‌ها بوده که بعداً به هیتروتروف تبدیل گردیده اند. نیازمندیهای میتابولیک از طریق مواد عضوی بر آورده شده چنانچه در چندین حالات دیده شده که در لابراتوار در اثر میوتیشن یا در اثر تطابق با تغییرات محیطی اشکال بدون رنگ الجی‌ها به‌میان آمده است.

اشکال دیگر آن عبارت از سیلیا داران و اشکال آمیبیایی بوده و بالاخره اشکال مغلق و غیر متحرک آن به نام سپروزون‌ها یاد می‌گردد که دارای مرحله استراحت بوده یا سپوردار می‌باشند.

فنگس‌ها

فنگس‌ها گروه پروتست‌های غیر فوتوسنتتیک بوده که به شکل فیلامنتهای تشعبی و شبکوی (هایفا) رشد می‌نمایند که به نام مایسیلیوم شناخته می‌شود. گرچه هایفا دارای جدار می‌باشند؛ اما جدارهای آنان متتعب بوده و حرکت آزادانه هسته‌ها و سایتوپلازم ممکن می‌باشد. کتله فنگسی به صورت مجموعی Coenocyte (کتله چندین حجروی و دارنده سایتوپلازم متمادی) بوده که توسط یک سلسله تیوب‌های منشعب احاطه گردیده است. این تیوب‌ها که از پولی سکراید (مانند شیتین) ساخته شده مترادف دیوار حجروی می‌باشد. اشکال مایسیل دار به نام Mold یاد شده و تعداد کمی سبب تولید مایسیل نشده و به نام Yeast یاد می‌شود؛ اما آنها را می‌توان فنگس نامید؛ زیرا به شکل زوجی تکثیر نموده و دارای اشکال انتقالی می‌باشد. فنگس‌ها با اکتینومایست‌ها (باکتری‌های مایسیلی که به صورت سطحی مشابه فنگس‌ها می‌باشند) هیچ ربطی ندارد. فنگس‌ها ذیلاً تصنیف می‌گردند:

Ascomycotina (Ascomycetes), Zygomycotina (Phycomycetes)

Deutromycotina (Imperfect Fungi), Basidiomycotina (Basidiomycetes)

Slime Molds

این اورگانیزم‌ها در یک مرحله از دوران حیات خویش با داشتن یک کتله چندین حجروی بزرگ که به نام پلازمودیم Plasmodium یاد می‌گردد، متصف می‌باشند. پلازمودیم این موجودات معادل مایسیلیوم فنگس واقعی می‌باشد. هر دو Coenocytes اند. با این تفاوت که در فنگس‌های واقعی جریان نمودن سایتوپلازم محدود به شبکه منشعب تیوب‌های شیتینی بوده؛ اما در اورگانیزم‌های فوق الذکر سایتوپلازم در همه جهات جریان نموده می‌تواند. این عمل باعث می‌گردد تا پلازمودیم در جهات مواد غذایی که معمولاً باکتری است، در حرکت شود.

اشکال اساسی مایکروب‌ها

مایکروب‌ها اورگانیزم‌های کوچک و حیدال‌حجروی اند که اکثراً فاقد کلوروفیل می‌باشند و نظر به خواص بیولوژیک و تولید مثل توسط انقسام دوگانه این‌ها به حجرات Prokaryotic ارتباط می‌گیرند. جسامت مایکروب‌ها توسط مایکرومتر اندازه می‌گردد.

$$1 \text{ Micron } (\mu) = 10^{-3} \text{ mm} = 10^{-4} \text{ cm} = 10^{-6} \text{ m}$$

$$1 \text{ Milli Micron (m}\mu) \text{ Or Nanometer (nm)} = 10^{-6} \text{ mm} = 10^{-7} \text{ cm} = 10^{-9} \text{ m}$$

$$1 \text{ Angstrom units (1 A}^\circ) = 10^{-7} \text{ mm} = 10^{-8} \text{ cm} = 10^{-10} \text{ m}$$

این جسامت در مایکروبها متفاوت می باشد مثلاً کوکسایها یک مایکرون قطر دارند و Bacill ها از ۱۰ - ۲ مایکرون طول و از ۰.۵ - ۰.۲ مایکرون عرض دارند.

باید متذکر شد که شکل و جسامت باکتریها به صورت مطلق ثابت نبوده و اختلاف شکل در بسیاری انواع مایکروبها در اثر عوامل مختلف محیطی مانند اوساط ذریعه، مواد ضد مایکروب، مواد مرضی، پیر و جوان بودن مایکروبها به وجود می آید لکن خواص خصوصی خود را که ارثی می باشد در جریان عملیه تکامل محافظه می کند. (۱)

از نظر مورفولوژی باکتریها به اشکال ذیل دیده می شود:

I- باکتریهای دارای شکل مدور یا Spherie مانند Cocci.

Cocci از Kakkos که معنی مدور را می دهد گرفته شده است و به اساس موقعیت، پلان انقسام حجروی و اوصاف بیولوژیک به ۶ گروه ذیل تقسیم می شوند:

۱- Micrococcus: این کوکسها به صورت منفرد یا غیر منظم قرار می گیرند اینها

Saprophyte بوده در آب و هوا زنده گی می کنند مانند: Micro Coccus Agilis

۲- Diplo Coccus: این کوکسها به صورت حجره ای به تماس هم قرار گرفته و انقسام

شان به یک پلان صورت می گیرد مانند Meningo Cocci, Gonococci و

Pneumococci.

۳- هرگاه انقسام Coccusها به یک پلان صورت گیرد و Cocci شکل دانه تسبیح و یا

زنجیر را به طولهای مختلف اختیار کند به نام Streptococcus یاد می گردد.

۴- اگر Cocci به دو پلان افقی و عمودی انقسام نماید و گروه های چهارگانه را بسازد به

نام Tetracoccus یاد می گردد که این Cocci برای انسانها کمتر Pathogen اند.

۵- اگر Coccusها به چندین پلان (غیر منظم) انقسام نمایند شکل خوشه انگور را به خود

گرفته به نام Staphylococcus یاد می گردد.

۶- هرگاه انقسام Coccusها به سه پلان صورت گیرد و شکل پاکت های ۱۶-۸ حجره ای

و یا بیشتر را به خود بگیرد به نام Sarcina یاد می شود که یک Coccus غیر مرضی

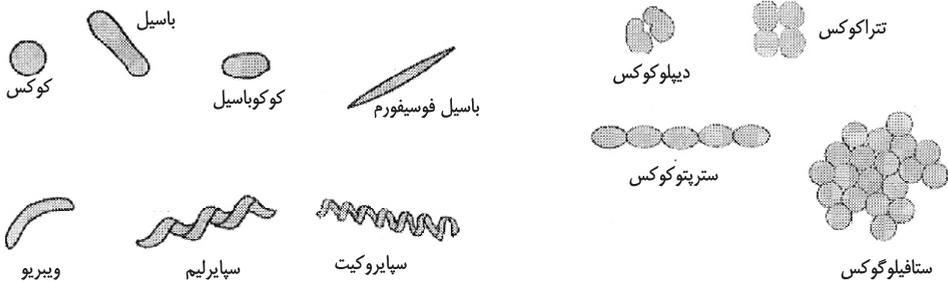
بوده و در ادرار موجود می‌باشد.

II- باکتری‌های شکل چوبک (Rodshape) که شامل Bacill ها و Clostridia می‌باشد. باکتری‌های چوبک مانند دارای اشکال مختلف اند بعضی از آنها دارای شکل کوتاه بوده مانند Francisella Tularencis در حالیکه انواع دیگر آن شکل طولانی دارد مانند Bacillus Anthracis و بعضی از انواع دیگر آنها دارای نهایت باریک می‌باشد مانند Fusobacter بعضی Bacill ها به شک جوره ای قرار می‌گیرد که آنرا به نام Diplobacill یاد می‌کنند مانند Bacteria Of Pneumonia.

بعضی از Bacteria ها شکل زنجیر مانند را می‌گیرد که به نام Strepto-bacill و یا Streptobacteria یاد می‌شود مانند Bacillus Anthracis بعضی از باکتری‌ها در یک نهایت خود تبارز می‌دشته باشند مانند Corynebacterium Diphtheriae و بعضی دیگر دارای شاخه های جانبی می‌باشد مانند Mycobacterium Tuberculosis و غیره.

III- شکل فنر مانند باکتری‌ها (Spiral Shape): اشکال فنر مانند به دو گروه Vibrio و Spirillum تقسیم می‌شوند.

۱- Vibrio ها، Bacteria های اند که تنها یک حلقه فنر مانند داشته و به شکل کامه و یا ویرگول به مشاهده می‌رسد مانند Vibrio Cholera. ۲- Spirillum ها باکتری‌های اند که دارای تعداد زیاد حلقه ها می‌باشند مانند Borella. Liptospira و Treporema



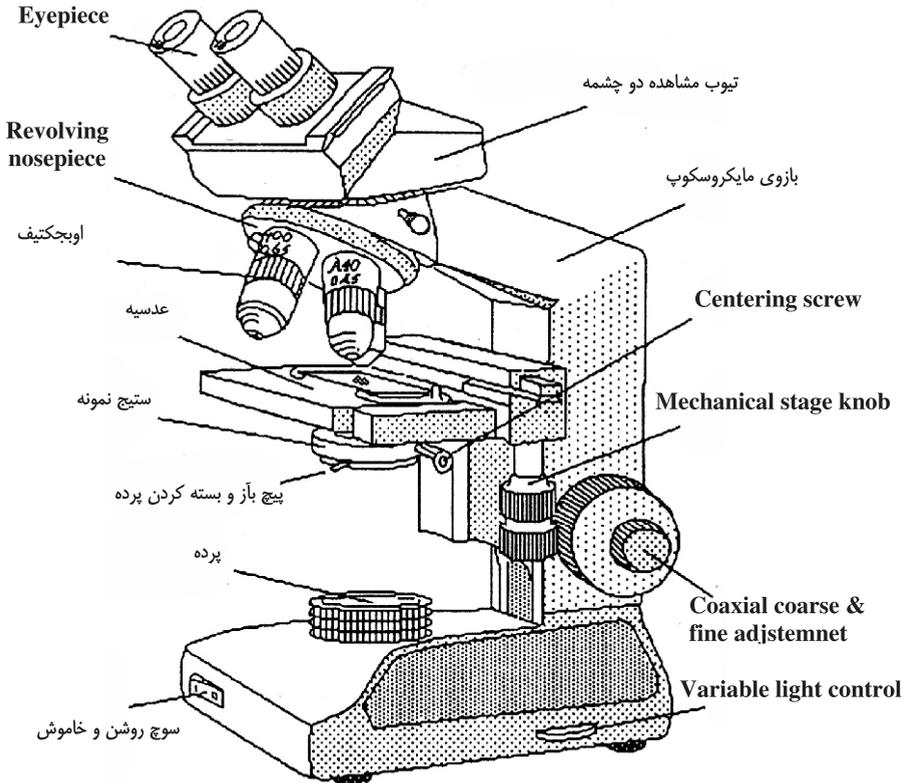
اشکال مختلف مایکروب‌ها

شکل ۱-۱

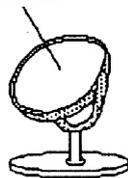
ساختمان حجروی

میتوذهای بصری

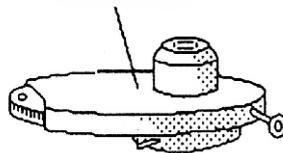
مایکروسکوپ نوری (لایت مایکروسکوپ): قدرت تشخیصیه مایکروسکوپ نوری تحت شرایط (مطلوب) تقریباً نصف طول موج نور مورد استفاده می‌باشد.



آئینه



عدسیه فاز کانترست



مایکروسکوپ دو چشمه (RA)

شکل ۱-۲

(قدرت تشخیصیه عبارت از فاصله ایست که در آن دو منبع نوری نقطوی که باید به شکل دو تصویر جداگانه مشاهده گردند از هم مجزا دیده شوند.) بناً در صورت استفاده از نور زرد که دارای طول موج ۰,۴ مایکرومتر باشد، کوچکترین قطر شی قابل تفکیک ۰,۲ مایکرومتر خواهد بود. بزرگنمایی مطلوب یک مایکروسکوپ عبارت از آن بزرگنمایی است که کوچکترین اجزای قابل تشخیص را مورد رویت قرار دهد. مایکروسکوپ هایی که در باکتریولوژی مورد استفاده قرار می گیرند عموماً دارای عدسیه های اوبجکتیف به توان ۹۰ و عدسیه های عینی به توان ۱۰ می باشند، بناً نمونه مورد مطالعه را ۹۰۰ برابر بزرگتر نشان می دهد. به این ترتیب ذراتی که دارای قطر ۰,۲ مایکرومتر باشند به اندازه ۰,۲ ملی متر بزرگتر معلوم گردیده واضحاً قابل دید می گردند. بزرگنمایی بیشتر از آن قدرت تشخیصیه بهتر را در قسمت رویت جزئیات به میان نیاورده و حتی ساحه دید را کاهش می دهد.

ترئید بیشتر قدرت تشخیصیه فقط با استفاده از نور دارای طول موج کمتر از ۰,۲ مایکرومتر ممکن گردیده می تواند و در نتیجه اجزای که دارای قطر ۰,۱ مایکرومتر باشند قابل رویت می گردند. قیمت چنین مایکروسکوپ ها به نسبت استفاده از عدسیه های کوارتز و سیستم های فوتوگرافیک، فوق العاده بلند بوده و برای استفاده عمومی دارای مشکلات می باشد.

الکترون مایکروسکوپ

الکترون مایکروسکوپ با داشتن قدرت تشخیصیه عالی دانشمندان را قادر نموده تا ساختمان های حشرات Prokaryotic و Eukaryotic را با تفصیلات بیشتر مطالعه نمایند. این قدرت تشخیصیه عالی الکترون مایکروسکوپ در نتیجه این امر است که الکترون ها دارای طول موج کوتاه تر نظر به فوتون های نور سفید می باشند.

عموماً دو شکل الکترون مایکروسکوپ بیشتر معمول می باشند: Transmission Electron Microscope یا (TEM) که شباهت های زیادی با مایکروسکوپ نوری دارد و Scanning Electron Microscope یا (SEM).

TEM اولین نوع الکترون مایکروسکوپ بود و در آن از یک اشعه الکترونی استفاده به عمل می آید که از پستول (منبع) الکترون خارج گردیده و بعد از تعیین جهت آن توسط عدسیه های الکترومقناطیسی تراکم دهنده بالای یک مقطع نازک نمونه مورد نظر، فوکس می گردد. الکترون ها پس از الکترون مقناطیسی تراکم دهنده بالای یک مقطع نازک نمونه مورد نظر، فوکس می گردد. الکترون ها پس از

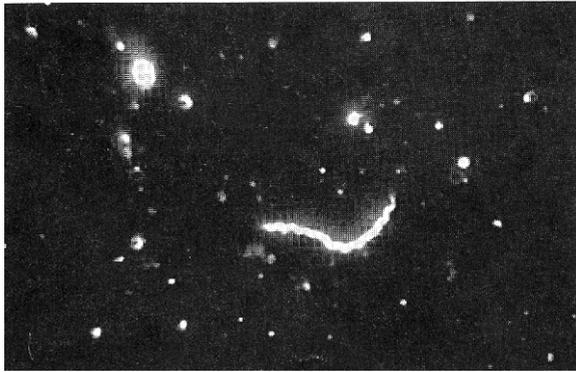
برخورد بالایی نمونه مورد آزمایش نظر به تعداد و کتله اتم‌ها به صورت نامساوی پراکنده می‌گردند. تعدادی از الکترون‌ها از نمونه عبور نموده و توسط عدسیه‌های اوبجکتیف الکترومقناطیسی یکجا و متمرکز می‌گردند و تصویر نمونه مورد معاینه به سیستم عدسیه‌های پروجکتور که باعث بزرگنمایی بیشتر می‌گردد ارائه می‌گردد. تصویر حاصله بالایی یک صفحه‌یی که در اثر اصابت الکترون‌ها روشن می‌شود، دیده می‌شود. این تصویر توسط فلم‌های فوتوگرافیک نیز ثبت گردیده می‌تواند. TEM اجزای را که از هم به اندازه ۰,۰۰۱ مایکرومتر جدا باشند تشخیص نموده می‌تواند. وایرس‌ها با داشتن قطر (۰,۰۰۱) الی (۰,۲) مایکرومتر به ساده‌گی تشخیص گردیده می‌توانند.

SEM نظر به TEM قدرت تشخیصی کمتر داشته؛ با آنهم بالخصوص برای دریافت تصویرهای سه بُعدی از موجودات مایکروسکوپیکی می‌باشد. الکترون‌ها توسط عدسیه‌ها بالایی یک نقطه کوچک متمرکز می‌گردند. در نتیجه عمل متقابل میان الکترون‌ها و نمونه مورد معاینه اشکال مختلفه تشعشعات از سطح نمونه آزاد می‌گردند (طور مثال الکترون‌های ثانوی). تشعشعات متذکره ذریعه آلات کشف کننده اختصاصی آن دریافت گردیده و پس از تقویه در بالایی صفحه تلویزیونی قابل رویت می‌باشد. یک تخنیک عمده در معاینه الکترون مایکروسکوپ استفاده از "سایه افگنی" می‌باشد. در اینصورت یک صفحه نازک فلزات ثقیله (مانند پلاتین) بالایی نمونه مورد معاینه گذاشته شده طوری که نمونه در مسیر اشعه آیون‌های فلزی در خلاء، قرار گیرد. اشعه به یک زاویه کوچک بالایی نمونه هدایت داده شده بناً یک "سایه" ساحه غیر پوشیده بالایی طرف مقابل به‌میان می‌آید. هر زمانی که یک اشعه الکترونی از ساحه عبور نماید، تصویر فلم به دست می‌آید و در نتیجه یک تصویر سه بُعدی حاصل می‌گردد.

تخنیک‌های عمده دیگری که در معاینات الکترون مایکروسکوپ استفاده می‌گردند عبارت از به کار برد مقطع‌های نهایت نازک مواد مغطوس شده، میتود منجمد نمودن نمونه‌ها که به کمک آن از انحراف نتایج که در استفاده از سایر طرزالعمل‌های خشک نمودن به‌میان می‌آید جلوگیری صورت گرفته می‌تواند و استفاده از تلوین منفی با استفاده از مواد متکاثف الکترونی از قبیل Phosphotungstic Acid و نمک‌های Uranyl می‌باشد. در صورت عدم استفاده از این نمک‌های فلزات، تباین لازم برای مطالعه جزئیات نمونه مورد معاینه به دست نخواهد آمد.

مایکروسکوپ ساحه‌تاریک

در مایکروسکوپی ساحه تاریک غالباً از عین مایکروسکوپ ساحه روشن استفاه صورت می‌گیرد. روشنایی مایکروسکوپ ساحه تاریک با به کاربرد کاندنسرهای خاصی به‌دست



شکل ۱-۳ معاینه ساحه تاریک (RV)

می‌آید که شعاع نور مستقیم را مانع گردیده و هم اشعه آئینه کنار خازن را به زاویه مایل منحرف می‌سازد. در نتیجه یک ساحه تاریک ایجاد گردیده که در آن کنارهای روشن نمونه مورد معاینه قابل ویت گردیده و زمانی به دست می‌آید که اشعه مایل از کنار نمونه به طرف اوبجکتیف های میکروسکوپ

منعکس می‌گردند. این تخنیک بالاخص برای مطالعه اورگانیزم‌های از قبیل *Treponema Pallidum* نهایت مؤثر می‌باشد این اورگانیزم یک *Spirochete* بوده و دارای قطر کمتر از ۰,۲ میکرومتر می‌باشد، بنابراین توسط نور مستقیم قابل رویت نمی‌باشد.

مایکروسکوپ فازی (Phase Microscope)

فاز مایکروسکوپ با استفاده از این حقیقت به‌میان آمده است که امواج نوری عبور کننده از اشیای شفاف مانند حجرات، نور به مشخصات موادی که از آن عبور می‌نمایند به فازهای متفاوت خارج می‌گردند. یک سیستم خاص بصری تفاوت های فاز را به تفاوت در کثافت تبدیل می‌نماید. در نتیجه بعضی ساختمان ها نظر به سایر ساختمان ها تاریک تر به نظر می‌رسند. خصوصیت عمده دیگر اینست که ساختمان‌های داخلی را در حجرات زنده قابل تشخیص می‌سازد. درحالیکه در میکروسکوپ های عادی مستحضرات باید به شکل کشته شده و یا تلوین شده مورد استفاده قرار گیرند.

اوتورادیوگرافی (Autoradiography)

اگر حجرات که در آنها اتوم های رادیو اکتیف به کار رفته باشند بالای یک سلاید تثبیت گردیده، با محلول فوتوگرافیک پوشانیده شده و در تاریکی برای مدت زمان مناسب نگهداری شوند، تشعشع که از محلات تجزیه رادیو اکتیف منتشر می‌گردند در بالای فلم ظهور شده، ظاهر می‌گردند. در صورتی که حجرات با تشعشع کننده ضعیف مانند Tritium نشانی گردند، تشعشع

قبل الذکر به اندازه کافی کوتاه گردیده و موقعیت مواد رادیو اکتیف را در حجره آشکار می‌سازد. پروسجیج Autoradiography بالخصوص برای تعقیب تضاعف DNA، با استفاده از Tritium-Labeled Thymidine مؤثر می‌باشد. یکی از اشکال دیگر این میتود که در آن از Probe های نشانی شده با Nucleic Acid استفاده می‌گردد به نام In Situ Hybridization یاد می‌گردد که برای دریافت نوکلیک اسیدهای وایرسی، باکتریایی و فنگسی در حجرات و انساج مستعمل می‌باشد.

ساختمان حجرات ایوکاریوتیک Eukaryotic

هسته (Nucleus)

هسته توسط یک غشایی محدود گردیده که با Endoplasmic Reticulum تمدادی دارد. غشای هستوی دارای قابلیت نفوذیه انتخابی می‌باشد و این قابلیت نفوذیه انتخابی به نسبت موجودیت منافذاتی است که تبادل مالیکول‌ها را میان هسته و سیتوپلازم اجازه می‌دهند. کروموزوم های حجرات Eukaryotic مشتمل بر Macromolecule های طویل DNA به شکل Helix مضاعف می‌باشند و توسط مایکروسکوپ نوری فقط زمانی قابل مشاهده می‌باشند که حجره در حالت تقسیم حجروی بوده و DNA به حد اعظم متراکم باشد، در سایر حالات کروموزوم‌ها متراکم نبوده و طوری مشاهده می‌گردند.

Macromolecule های DNA در حجرات Eukaryotic یا Eukaryotic DNA (Eukaryotic Macromolecule حاوی پروتین اساسی به نام Histone بوده که توسط رابطه های آیونیک با DNA وصل می‌گردند.

ساختمان های سیتوپلازمیک

سیتوپلازم حجرات Eukaryotic متصف به موجودیت Endoplasmic Reticulum، واکپوله‌ها (Vacuoles)، Plastid های دارنده قابلیت تکثیر خودی و Elaborate Cytoskeleton می‌باشند که اخیرالذکر مرکب از Microtubule ها، Microfilament ها و Intermediate Filament ها می‌باشند.

Endoplasmic Reticulum عبارت از یک شبکه Membrano-Bound Channels می‌باشد. در بعضی قسمت های اندوپلازمیک ریتیکولوم این غشاها توسط رایبوزوم‌ها پوش می‌گردند، پروتین‌هایی که در این رایبوزوم‌ها سنتیز می‌گردند از طریق این غشاً داخل کانال های اندوپلازمیک ریتیکولوم شده

و از طریق آن به دیگر قسمت های حجره منتقل می گردند. یک ساختمان مربوطه دیگر به نام جهاز گلجی یا Golgi Apparatus ویزیکول هایی را آزاد می کند که به غشای حجروی وصل گردیده و پروتئین های داخل کیسه را به محیط اطراف رها می سازد.

پلاستیدها مشتمل بر مایتوکاندریا ها که دارای سیستم تنفسی ترانسپورت الکترون (Respiratory Electron Transport System) می باشد و نیز Chloroplast (در اورگانیزم های فوتوسنتتیک) می باشد. پلاستیدها حاوی DNA مربوط خود می باشند که بعضی پروتئین های متشکله آنها (نه تمام پروتئین های مشتمل در آنها) را کود نموده و همچنان دارای T-RNA می باشد.

Cytoskeleton مشتمل بر رشته های Microtubule ها بوده که در وظایف غشای سائوپلازمیک و شکل حجره به همین گونه در Mitotic Spindle های و اجزای فلاجیل نقش دارند، همچنان دارای رشته های اکتین و میوزین حاوی Microfilament ها می باشند و میکانیزم حرکات امیوئید را فراهم می نمایند و بالاخره دارای Intermediate Filament ها می باشند که وظایف آن تا کنون دانسته نشده است.

طبقات سطحی (Surface Layers)

سائوپلازم توسط Plasma Membrane احاطه گردیده که مرکب از پروتئین و فسفولیپید می باشد و شباهت با غشای حجروی پروکاریوتیک دارد. بسیاری حشرات حیوانی طبقه سطحی دیگری ندارند؛ ولی حشرات نباتی دارای یک دیوار خارجی حجروی می باشند که مرکب از سلولوز می باشد. بسیاری مایکرواورگانیزم های Eukaryotic نیز دارای دیوار خارج حجروی می باشند که امکان دارد مرکب از پولی سکراید باشد مانند سلولوز و یا Chitin و یا ممکن مواد غیر عضوی باشد مانند سیلیکا در دیاتومها.

اورگانیل های حرکی (Motility Organelles)

بسیاری مایکرواورگانیزم های Eukaryotic دارای اورگانیل هایی می باشند که به نام فلاجیل (Flagella) و یا سیلیا (Cilia) یاد می گردند به وسیله حرکات موج مانند این اورگانیل ها حجره را قادر به حرکت در آب می سازد.

فلاجیل های Eukaryotic از ناحیه قطبی حجره منشه گرفته حالانکه سیلیا که نظر به فاجیل کوتاه تر می باشند دوردور حجره را احاطه می نمایند. فلاجیل و سیلیا هردو عین ساختمان اساسی و ترکیب کیمیایی را در حشرات Eukaryotic دارا می باشند. هردو متشکل از مایکروتوبول ها (Microtubules) می باشند که عبارت از استوانه های میان خالی پروتئینی بوده که از پروتئین به نام

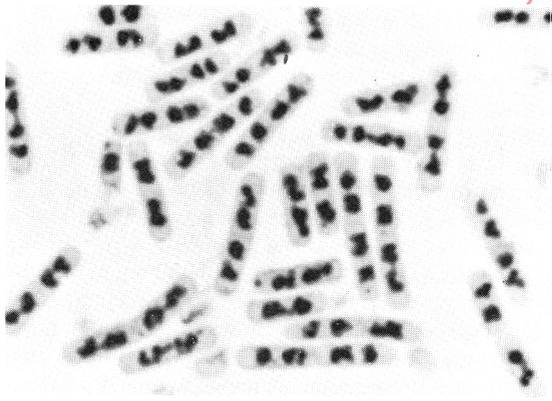
Tubulin تشکیل می‌گردند این مایکروتوبول‌ها توسط یک غشای احاطه می‌گردند. مایکروتوبول‌ها طوری ترتیب می‌گردند که به نام سیستم (۹ + ۲) یاد می‌گردد، یعنی طوری ترتیب می‌یابند که ۹ جوهره مایکروتوبول محیطی توسط دو مایکروتوبول مرکزی احاطه می‌گردند.

ساختمان حجرات پروکاریوتیک (Prokaryotic)

حجره پروکاریوتیک از هر لحاظ نظر به حجره ایوکاریوتیک ساده تر می‌باشد یگانه استثنائاً این می‌باشد که لفاف حجروی آن نظر به حجره ایوکاریوتیک مغلق تر می‌باشد.

نوکلئوئید (Nucleoid)

نوکلئوئید (ساختمان مشابه هسته) در حجرات پروکاریوتیک معادل هسته حجرات ایوکاریوتیک بوده و توسط مایکروسکوپ نوری در مواد ملونه قابل رویت می‌باشد. این ساختمان Feulgen-Positive بوده و نشاندهنده موجودیت DNA در آن می‌باشد. DNA که چارچ



شکل ۱-۴ هسته‌های باسیل سیریس (R1)

منفی دارد، حد اقل طور قسمی توسط Polyamine های کوچک و ایون های مگنیزیم خنثی گردیده؛ ولی پروتین‌های هستون در باکتری‌ها موجود اند و احتمالاً نقش مشابه به هستون موجود در کروماتین های حجرات ایوکاریوتیک را بازی می‌نمایند.

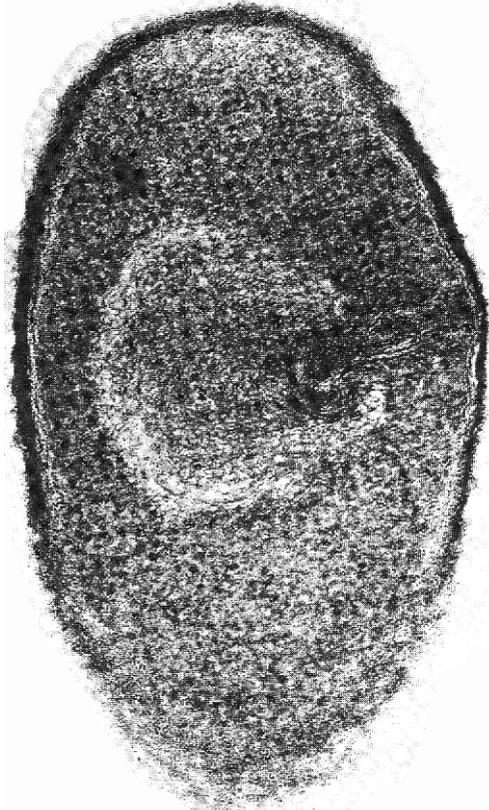
تصاویری که از الکترون

مایکروسکوپ به دست آمده اند (شکل ۱-۴) عدم موجودیت غشای هستوی و یک سیستم مایتوتیک را نشان می‌دهد. نواحی هستوی مملو از فیبریل های DNA می‌باشند.

از مدت طولانی بدینسو چنین دانسته شده که نوکلئوئید حجرات باکتریایی متشکل از یک مالیکول واحد طویل مدور با وزن مالیکولی تقریباً (3×10^9) می‌باشد و بنابر این چنین پنداشته شده می‌تواند که یک کروموزوم واحد Haploid به شکل باز و دارای طول تقریباً ۱mm باشد. تعداد کاپی‌های کروموزوم

در حجره نظر به اینکه حجره در کدام مرحله سیکل حجروی قرار دارد متفاوت می‌باشد با آنهم در صورت موجودیت چندین کاپی تمام آنان دارای عین شکل می‌باشند. اخیراً با استفاده از مطالعات جدید و با استفاده از میتود (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) که برای جدا کردن

مالیکول‌های بزرگ DNA و تشخیص انواع مدور و طویل مورد استفاده قرار می‌گیرد، اصطلاحاتی در این منظره کلاسیک کروموزوم حجروی به میان آمده‌اند. نتایج این مطالعات آشکار ساخت که بعضی پروکاریوت‌ها (مانند *Borrelia burgdorferi* عامل مرض Lyme) دارای کروموزوم خطی می‌باشند. کروموزوم‌های linear یا خطی همچنان در انواع مختلفه *streptomyces* نیز دریافت گردیده است.



الکترون مایکروگراف مقطع نازک *B. subtilis* که نشان دهنده تماس DNA با میوزوم می‌باشد. (R1)

شکل ۱-۵

نوکلئید بسیاری از حجرات باکتریایی در نتیجه لیز آهسته (gentle lyses) بعد از centrifugation جدا گردیده می‌تواند. ساختمان‌های جدا شده مشتمل بر DNA همراه با مقادیر کوچکت *RNA Polymerase* و ممکن بعضی پروتین‌های دیگر باشد. DNA باکتریایی که مستقیماً به کمک فلم حفاظتی الکترون مایکروسکوپ توسط لیز حجره در محلول نمکی

فزیولوژیک تجرید گردیده‌اند، به شکل ساختمان تسبیح مانند شبیه کروماتین حجرات ایوکاریوتیک مشاهده می‌گردند.

معاینه یک سلسله مقطع‌های باریک در حجرات باکتریایی توسط الکترون مایکروسکوپ نشان

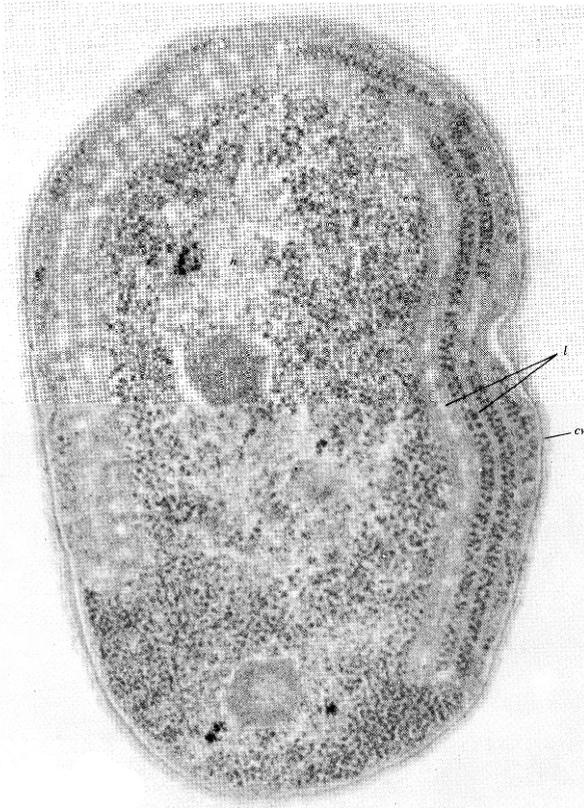
می‌دهد که DNA در یک نقطه با تغلف *invagination* غشای سائتوپلازمیک که به نام *mesosome* یاد می‌شود وصل می‌گردد (شکل 1-5) گمان می‌رود که این اتصال در جدا شدن دو کروموزوم خواهری که متعاقب تضاعف کروموزومی به‌میان می‌آید، نقش دارد.

ساختمان‌های سائتوپلازمیک

حجرات پروکاریوتیک فاقد پلاستیدهای مستقل از قبیل میتوکاندریا و کلوروپلاست می‌باشند و انزیم‌هایی *electron transport* در غشای سائتوپلازمیک قرار گرفته‌اند که به‌شکل ویزیکول‌های کروی و یا طبقات هموار صفحه‌مانند در تحت غشای حجروی مشاهده گردیده می‌توانند. در بعضی *cyanobacteria* ها (در سابق به نام الجی‌های سبز، آبی یاد می‌شدند) غشاهای فوتوسنتتیک اکثراً ساختمان‌های چند طبقوی را می‌سازند که به نام *thylakoid* ها یاد می‌گردد.

باکتری‌ها اکثراً مواد ذخیری را به‌شکل گرانول‌های غیر منحل نگهداری می‌نمایند که به‌شکل پولیمیرهای خنثی و از نظر اوسموتیک غیر فعال می‌باشند. زمانی که منبع نایتروجن، سلفر و یا فاسفورس محدود گردند و یا زمانی که PH پائین باشد، کاربن اضافی موجود در وسط توسط بعضی باکتری‌ها به پولیمیر *Poly-B. hydroxybutyric acid* و توسط باکتری‌های دیگر به پولیمیرهای مختلفه گلوکوز مانند نشایسته و گلیکوجن تبدیل می‌گردند. گرانول‌های فوق به‌هیچ‌منابع کاربن برای سنتیز پروتین و نوکلئیک اسید به کار می‌روند. به همین ترتیب، تعدادی از باکتری‌های فوتوسنتتیک *sulfide* را از H_2S اوکسیدایز نموده و در نتیجه گرانول‌های داخل حجروی دارنده عنصر سلفر را تولید می‌نمایند و بالاخره بسیاری باکتری‌ها گرانول‌های *polyphosphate* را در خود جمع نموده و ذخایر فاسفیت‌های غیر عضوی را می‌سازند که اخیرالذکر در سنتیز ATP مورد استفاده قرار گرفته می‌تواند. گرانول‌های فوق بعضاً به نام گرانول‌های *volutin* و یا گرانول‌های *metachromatic* یاد می‌گردند؛ زیرا با مواد ملونه آبی، به رنگ سرخ تلوین می‌گردند. این وصف، مشخصه عمده برای *corynebacteria* ها می‌باشد.

مایکروتوبول ها که مشخصه حجرات ایوکاریوتیک می باشد، بالعموم در حجرات پروکاریوتیک موجود نمی باشند با وجود آن در بعضی موارد توسط الکترون مایکروسکوپ ساختارهای در باکتری ها مشاهده می گردند که شباهت با مایکروتوبول ها دارد.



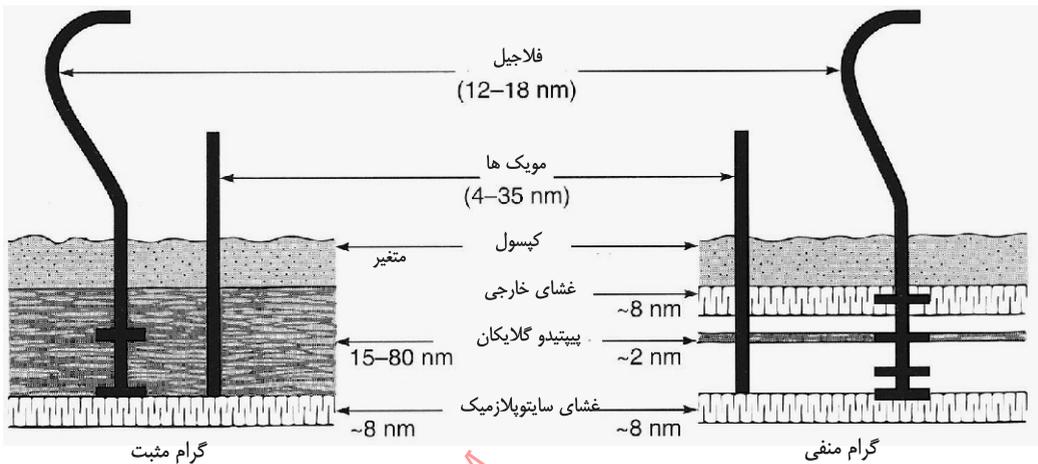
شکل ۱-۶ دیوار حجروی و ساحه هسته (R1)

گروپ های خاص و معین از باکتری ها دارای ویژگیول های احاطه شده توسط پروتین در protein-bound سایتوپلازم خود می باشند. که مشتمل اند بر واکيول های گازی که در باکتری های آبی، شناوری آنها را کنترل می نمایند، carboxysome ها (دارای انزیم ribulosebiphosphat e carboxylase بوده

که انزیم عمده برای تثبیت CO_2 می باشد.) در بعضی باکتری های اوتوتروفیک و magnetosome ها (گرانول های membrane-bound iron) اند که باکتری را قادر به magnetotaxis می سازد (به معنی مهاجرت و یا تمایل حجره در رابطه با ساحه مقناطیسی زمین می باشد.)

لغاف حجروی (Cell Envelope)

طبقاتی که حجره پروکاریوتیک را احاطه می‌نمایند، مجموعاً به نام لغاف حجروی یاد می‌گردد. ساختمان و تشکیل لغاف حجروی در باکتری‌های گرام مثبت و گرام منفی متفاوت می‌باشد، در حقیقت همین تفاوت است که این دو اجتماع بزرگ باکتری‌ها را توصیف می‌نماید. دیاگرام‌های ساده شده دو نوع لغاف حجروی در (شکل ۱ - ۷) نشان داده شده است.



شکل ۱-۷ ترکیب لغاف حجروی مایکروب‌های گرام مثبت و گرام منفی (R1)

بسیاری باکتری‌ها در هر دو گروپ گرام مثبت و گرام منفی Eubacteria و Archeobacteria دارای شبکه پروتئینی و یا گلابی‌پروتئین Paracrystalline دو بُعدی (S-layer) را به حیث خارجی ترین بخش لغاف حجروی دارا می‌باشند. طبقات S-layer عمدتاً مرکب از یک نوع واحد مالیکولر می‌باشند. وظیفه این طبقات طور یقینی معلوم نیست، با آنهم در بعضی موارد چنین معلوم می‌گردد که حجره را از انزایم‌های تخریب کننده جدار حجروی، مهاجم Bdellovibrio bacteriovirus (یک باکتری مهاجم) و از bacteriophage ها محافظه می‌نمایند. همچنان در بعضی انواع Archeobacteria ها شکل حجره را محافظه می‌نماید و نیز در التصاق حجره به طبقه اپیدرم میزبان رول دارد.

الف: The Gram-Positive Cell Envelope لغاف حجروی گرام مثبت: لغاف حجروی

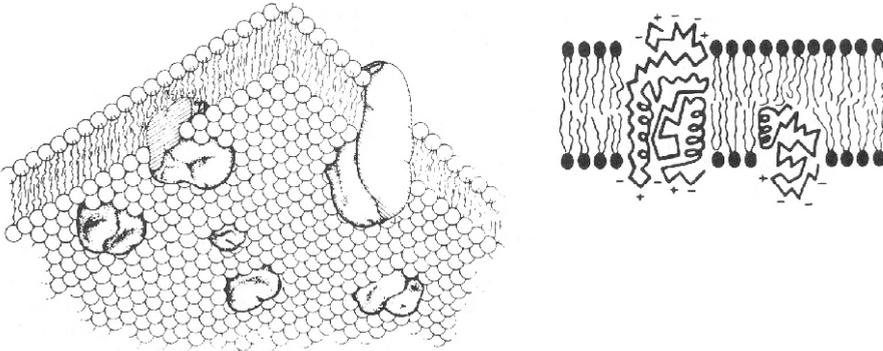
در حجرات گرام مثبت نسبتاً ساده تر بوده و متشکل از دو یا سه طبقه می‌باشد که عبارت از: غشای سایتوپلازمیک، طبقه ضخیم peptidoglycan و در بعضی باکتری‌ها یک طبقه خارجی که به نام capsule می‌باشد. ساختمان و وظیفه این طبقات ذیلاً تشریح می‌گردند.

ب: The Gram-Negative Cell Envelope لاف حجروی گرام منفی: دارای چندین طبقه و ساختمان نهایت مغلق می‌باشد. غشای سایتوپلازمیک که (در باکتری‌های گرام منفی به نام غشای داخلی یاد می‌گردد) توسط یک ورقه نازک peptidoglycan احاطه گردیده که اخیرالذکر توسط یک طبقه مغلق که به نام outer membrane یا غشای خارجی یاد می‌گردد تقویه می‌گردد. ممکن در خارجی ترین طبقه کپسول موجود باشد. فضای میان غشای داخلی و خارجی به نام periplasmic space یاد می‌گردد.

غشای سایتوپلازمیک (The Cytoplasmic Membrane)

الف: ساختمان: غشای سایتوپلازمیک در باکتری‌ها به نام غشای حجروی نیز یاد گردیده و توسط مایکروسکوپ الکترونیک در مقطع‌های نازک قابل رویت بوده این غشای عبارت از غشای واحد مرکب از فسفولیپیدها و پروتئین‌ها می‌باشد. شکل (۱-۸) نمونه تشکل غشای را تشریح می‌نماید. غشای حجرات پروکاریوتیک از حجرات ایوکاریوتیک بنابر عدم موجودیت sterolها تفریق می‌گردد.

تغلفات پیچیده convoluted invaginations در غشای سایتوپلازمیک ساختمان‌های خاصی را به میان می‌آورد که به نام میوزومها یاد می‌شوند. میوزومها به دو نوع می‌باشند: میوزومهای جداری، که در تشکل دیوارهای حجروی در اثنای تقسیمات حجروی وظیفه دارد و نوع دیگر آن میوزومهای جانبی می‌باشد. کروموزومهای باکتری‌ها (DNA) به میوزومهای جداری وصل می‌باشند. تغلفات بیشتر غشای سایتوپلازمیک به طرف سایتوپلازم در باکتری‌هایی یافت می‌گردد که دارای سیستم‌های نهایت فعال ترانسپورت الکترونی باشند (طور مثال باکتری‌های فوتوسنتتیک و باکتری‌های تثبیت کننده نایتروجن)



شکل ۸-۱ مدل ساختمانی غشای حجروی (R1)

ب: وظیفه: وظایف عمده غشای سائیتوپلازمیک عبارتند از:

- ۱- قابلیت نفوذ انتخابی و ترانسپورت مواد منحل.
 - ۲- ترانسپورت الکترونی و oxidative phosphorylation در ایروبها.
 - ۳- افراغ انزیمهای هایدرولازیک.
 - ۴- در بر داشتن انزیمها و مالیکولهای ناقل (Carrier) که در بیوسنتز DNA، پولیمیرهای دیوار حجروی و لیپیدهای غشایی وظیفه دارد.
 - ۵- در برداشتن رسپتورها و سایر پروتینهای chemotactic و سایر انواع سیستمهای transduction.
- حد اقل 50 فیصد غشای سائیتوپلازمیک باید به منظور نشونمای حجره به حالت نیمه مایع باشد. این هدف در حالات پائین بودن درجه حرارت پائین، با سنتیز و ترکیب اسیدهای شحمی غیر مشبوع به دست می آید.

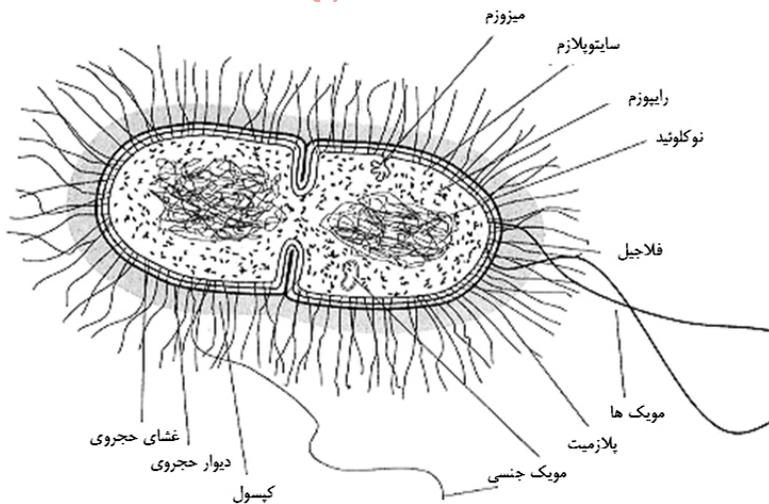
۱- **قابلیت نفوذ و انتقال:** غشای سائیتوپلازمیک به حیث مانع قابلیت نفوذ (مواد منحل lipophobic به شکل غیر فعال از آن عبور نموده نمی تواند) و همچنان به حیث رابطه قابلیت نفوذیه وظیفه اجرای می نماید که در اخیرالذکر سیستمهای خاص پروتینی (permeases) انتشار غیر فعال مواد منحل خاص را تسهیل و یا (energy-dependent active transport) را بر علیه میلان غلظت catalyze می نمایند.

دو شکل سیستم انتقال فعال (ابتدایی و تالی) موجود است. در سیستمهای ابتدایی یا سیستم پمپها (Pumps) انرژی میتابولیک به منظور انتقال مواد منحل از طریق غشای بر علیه میلان غلظت آن مورد استفاده قرار می گیرد. در باکتریهای ایروبیکی پمپ عمده عبارت از Electron transport system می باشد که در آن انرژی حاصله از substrate oxidation جهت خارج

نمودن پروتون ها مورد استفاده قرار می گیرد. پروتون های خارج شونده دوباره از طریق ATPase غشاً، داخل حجره می گردند، انرژی حاصله از این جریان آیونی توسط ATPase به منظور سنتیز ATP از ADP و فاسفیت های غیر عضوی مورد استفاده قرار می گیرد. در باکتری های anaerobic که فاقد سیستم انتقال الکترون ها یا (Electron transport system) می باشند، عکس سیستم فوق صورت می گیرد، خروج پروتون ها توسط ATPase صورت می گیرد که در آن از انرژی حاصله از شکستن ATP به مصرف می رسد.

در سیستم های ثانوی، انرژی ذخیره شده در گرادیانت های کاتیون و انرژی پوتانشیل غشاً که در نتیجه پمپ ها به میان می آید برای انتقال فعال مواد منحل از قبیل امینو اسیدها و مواد قندی به داخل حجره مورد استفاده قرار می گیرد. این انتقال توسط سیستم co-transport انجام می پذیرد که در آن: انتقال دهنده به کاتیون ها و مواد منحل وصل گردیده و هر دو را همزمان انتقال می دهد. از آنجائیکه گرادیانت کاتیون ها قویاً به طرف داخل متوجه می باشد، گرادیانت مختلط الکتروکیمیای مواد منحل را برعکس گرادیانت غلظت مربوط آن به طرف داخل حجره می کشاند.

همچنان حجره حاوی ناقلین پروتئینی مخصوص در غشای خود می باشد که انتشار بعضی مواد منحل را به طرف داخل و یا به خارج از حجره مساعدت می نماید. بنابر این، اگر حجره در وسطی قرار داده شود که در آن غلظت بلند گلیسیرول موجود باشد، می تواند گلیسیرول را ذریعه انتشار سهل (Facilitated diffusion) و بدون استفاده از منبع مزدوجه انرژی، به حالت تعادل نگهدارد.



شکل ۱-۹ ساختمان شیماتیک باکتری در حال انقسام

در باکتری‌های گرام منفی، انتقال بسیاری مواد مغذی ذریعه پروتئین‌های اتصالی خاص (*binding proteins*) که در فضای *Periplasmic* قرار دارند تسهیل می‌گردد. مواد مغذی ابتداءً به پروتئین‌های خاص چسبیده که ضریب *dissociation* آن به (10-7-10-6 mol/lit) می‌رسد و بعداً توسط پروتئین انتقال دهنده در غشای داخلی اخذ می‌گردد. این سیستم به نام *shock sensitive* یاد می‌گردد، به نسبت اینکه تغییرات غیر مترقبه اسموتیک (رقیق شدن ناگهانی محیط تعلیقی حجرات) باعث تخریب غشای خارجی گردیده و زمینه خروج پروتئین‌ها اتصالی (*binding proteins*) را مساعد می‌سازد.

علاوه بر انتقال حقیقی که در آن مواد منحل بدون تغییر شکل از طریق غشای عبور می‌نمایند، باکتری‌ها از عملیه استفاده می‌نمایند که به نام (*group translocation*) یا (*vectorial metabolism*) یاد می‌گردند، که بالای اخذ انواع معین مواد قندی مانند گلوکوز و مانوز مؤثر می‌باشد. در این عملیه مرکبات فوق در اثنای عملیه انتقال *phosphorylate* می‌گردند. این عملیه به باکتری‌ها اجازه می‌دهد تا منابع انرژی خود را ترویج، انتقال و میتابولیزم را طور مؤثر مورد استفاده قرار دهند. در این عملیه ابتداءً یک پروتئین انتقال دهنده غشایی در سایتوپلازم *phosphorylate* می‌گردد که در آن *phosphoenolpyruvate* به مصرف می‌رسد. این پروتئین *phosphorylate* شده بعداً به مواد قندی آزاد در غشای خارجی وصل گردیده و آنرا به سایتوپلازم داخل می‌نماید و بعداً به حیث قند فوسفیتدار آنرا آزاد می‌نماید. این سیستم‌های انتقال دهنده مواد قندی به نام سیستم‌های *phosphotransferase* یاد می‌گردد.

در *Escherichia coli*، انتقال آیون پتاسیم به منظور تنظیم فشار داخلی مورد استفاده قرار می‌گیرد. ازدیاد در فشار اوسموتیک خارجی در غلظت ثابت K^+ باعث فعال شدن *gene*‌های کود کننده برای پروتئین‌های انتقال دهنده K^+ می‌گردند و علاوه‌تاً فعالیت پروتئین‌های متذکره را ازدیاد می‌بخشد.

۲- انتقال الکترونی و *Oxidative phosphorylation* سایتوکرومها و سایر انزایمها و مرکبات مربوط به زنجیر تنفسی به شمول عده از *dehydrogenase*‌ها در غشای سایتوپلازمیک قرار دارند. بنابر این غشای سایتوپلازمیک باکتری‌ها شباهت وظیفوی به غشای میتوکاندریا داشته که همین ارتباط توسط بسیاری بیولوجست‌ها برای تقویه این تیوری به کار رفته است که میتوکاندریا از باکتری‌های *symbiotic* منشأ گرفته اند.

۳- اطراح اکزو انزایم‌های هایدرولازیمیک (*Hydrolytic exoenzymes*) تمام اورگانیزمها که

مواد مغذی خود را از پولیمرهای عضوی مکرراورگانیک مانند (پروتین‌ها، پولی سکرانیدها، لیپیدها) به دست می‌آورند. آنزیم‌های هایدرولازیک را اطراح می‌نمایند که پولیمرهای فوق را به واحدها کوچکتر تبدیل نموده و باعث عبور آنها از غشای سایتوپلازمیک می‌گردد. حیوانات بزرگتر چنین آنزیم‌ها را مستقیماً در لومن قنات هضمی اطراح می‌نمایند و باکتری‌ها گرام مثبت آنها مستقیماً در وسط خارجی و باکتری‌های گرام منفی در فضای *periplasmic* آنها فراغ می‌نمایند. بعضی باکتری‌های گرام منفی مانند *Serratia* و *Erwinia Pseudomonas* مقادیر زیادی از *Protease* ها، *Amylase* ها و *Pectinase* ها را به محیط خارج حجروی اطراح می‌نمایند. پروتین‌های اطراح شده در رایبوزوم‌های سایتوپلازمیک به شکل *Preprotein* ها ترکیب گردیده که یک سلسله اضافی 15-40 آمینواسید (معمولاً تقریباً 20 آمینواسید) در نهایت آمینو آن وصل می‌باشند. این سلسله رهنما و یا سگنال دهنده *leader sequence* در هماهنگی با پروتین‌های بالخاصه سایتوپلازم و یا غشای عمل نموده و در مراحل اولی پروسه سنتیز پولی پپتاید ها، رایبوزوم‌ها را به سطح داخلی غشای حجروی وصل می‌نماید. بعداً *translocation* در غشای که توسط سلسله "رهنما" آغاز گردیده صورت می‌گیرد، این مسأله روشن نیست که این عملیه همزمان با ازدیاد در طول زنجیر صورت می‌گیرد و یا اینکه در مراحل اخیر پروسه سنتیز به وقوع می‌پیوندد. سلسله رهنما به تعقیب *translocation* توسط (*membrane-bound leader peptidase*) شکسته و پروتین تکمیل شده در مرحله اخیر از غشای آزاد می‌گردد.

بسیاری باکتری‌های پتوجن آنزیم‌ها (مانند *Ig Al protease*) و توکسین‌هایی را (مانند توکسین کولرا) به یک میکانیزم مشابه فوق اطراح می‌نمایند که فکتورهای مهم *virulence* می‌باشند.

۴- **وظایف بیوسنتتیک:** غشای سایتوپلازمیک ناحیه انتقال دهنده لیپیدها می‌باشد که بالای آن واحدها دیوار حجروی تراکم نموده به همین ترتیب آنزیم‌های بیوسنتیز دیوار حجروی را دارا می‌باشند. آنزیم‌های سنتیز *phospholipid* ها نیز در غشای سایتوپلازمیک قرار دارند. بالاخره، بعضی پروتین‌های (*DNA replicating complex*) در بالای غشای موجود می‌باشند، که احتمالاً در میوزوم‌های جداری که *DNA* متصل آن بوده، قرار داشته باشد.

۵- **سیستم‌های Chemotactic:** جذب کننده‌ها و دفع کننده‌ها بالای آخذه‌های خاص در غشای سایتوپلازمیک وصل می‌گردند. حد اقل 20 آخذه مختلفه شیمورسپتور‌ها در غشای *E. coli* قرار دارند، که بعضی از آنها در مراحل اول پروسه انتقال وظیفه دارند.

ج: مواد ضد باکتریایی که بالای دیوار حجروی اثر دارند: مواد ضد عفونی که دارای گروپ های *lipophilic* و *hydrophilic* می باشند، باعث پاره نمودن غشاهای سائتوپلازمیک و در نتیجه مرگ حجره می گردد. یک گروپ انتی بیوتیک ها، یعنی *polymyxin* ها متشکل از پیپتاید های سکلیک ضد عفونی می باشند که غشاهایی دارند *phosphotidyl ethanolamine* را طور انتخابی تخریب می نمایند. ماده اخیرالذکر یک جزء عمده غشای باکتریایی می باشد. تعدادی از انتی بیوتیک ها طور بالخاصه وظایف بیوسنتتیک غشای سائتوپلازمیک را مختل می سازند طور مثال *novobiocin* و *nalidixic acid* سنتیز *DNA* را نهی نموده، علاوهً *novobiocin* سنتیز *teichoic acid* را نهی می نماید.

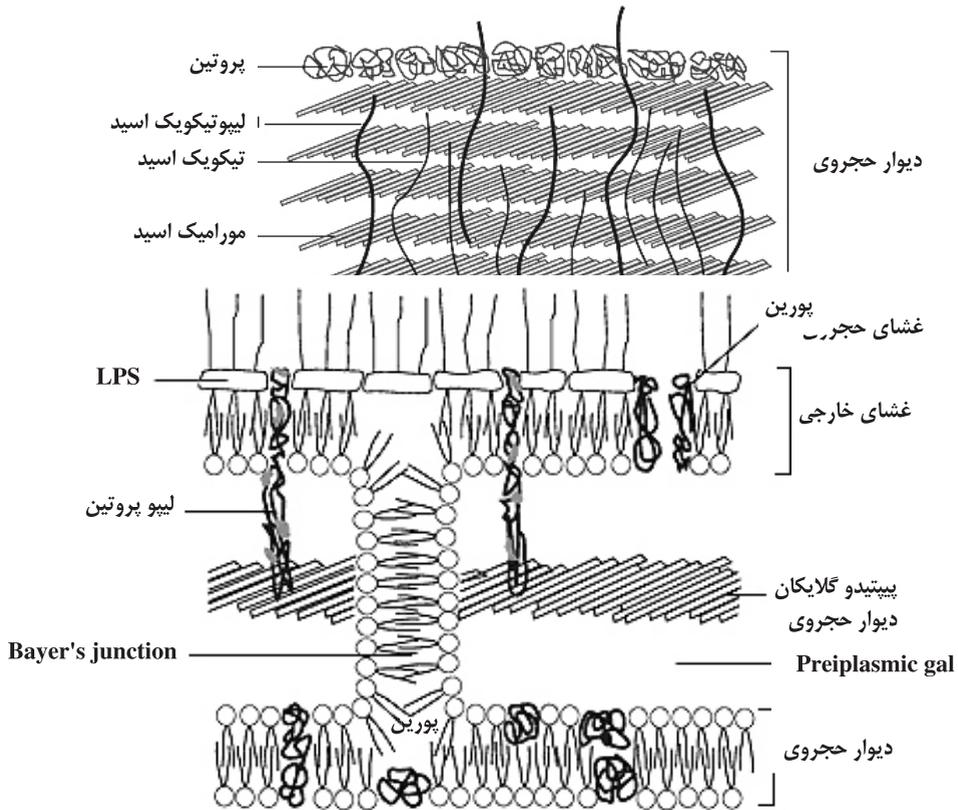
گروپ سوم مواد *membrane-active* عبارت از *ionophore* ها می باشند، مرکبات فوق زمینه انتشار سریع کتیون های معین را از طریق غشاً مساعد می سازد. طور مثال *Valinomycin* طور مشخص انتقال آیون های پوتاسیم را مساعدت می نماید. بعضی مرکبات *ionophore* ذریعه تشکل منفذهای *hydrophilic* در غشاً عمل می نمایند و تعداد دیگر به حیث انتقال دهنده گان آیون های منحل در شحم عمل نموده و از غشاً داخل و خارج می گردند. آیونفورها می توانند حجره را از بین ببرند و علت آن از بین بردن پتانسیل غشاً می باشد که برای عملیه *oxidative phosphorylation* و سایر پروسه های مربوط به غشاً لازم می باشند. مرکبات فوق تأثیر انتخابی بالای باکتری ها نداشته و بالای غشای تمام انواع حجرات عمل نموده می توانند.

دیوار حجروی

طبقات لاف حجروی میان غشای سائتوپلازمیک و کپسول مجموعاً به نام "دیوار حجروی" یاد می گردند. در باکتری های گرام مثبت، دیوار حجروی عمدتاً متشکل از *peptidoglycan* و *teichoic acid* ها بوده؛ ولی در باکتری های گرام منفی، دیوار حجروی مشتمل بر *peptidoglycan* و غشای خارجی می باشد.

فشار اسموتیک داخلی در بسیاری باکتری ها در نتیجه تراکم مواد منحل توسط انتقال فعال آن، (بین 5 الی 20 اتموسفیر) تفاوت می نماید. در بسیاری محیط ها، این فشار برای انفجار حجره کفایت می نماید، ولی بنا بر موجودیت قوت و استحکام فوق العاده دیوار حجروی این عمل صورت گرفته نمی تواند. دیوار حجروی باکتری ها قدرت فوق را از یک طبقه ای حاصل می نماید که متشکل از مواد به نام *murein*، *mucopeptide* و یا *peptidoglycan* (تمام اسامی مترادف هم اند) می باشند. ساختمان *peptidoglycan* ذیلاً تشریح می گردد.

باکتری‌ها نظر به عکس‌العمل‌شان در مقابل تلوین گرام، به دو گروپ گرام مثبت و گرام منفی تقسیم می‌شوند. تلوین فوق به نام هستولوجست Christian Gram مسمی گردیده است، نامبرده پروسیجر تلوین تشخیصی فوق را حین معاینه باکتری‌ها در انساج منتن کشف نمود. در این تلوین ابتدا حجات توسط crystal violet و iodine تلوین گردیده و بعداً با اسیتون یا الکل شسته می‌شود. در مرحله اخیرالذکر باکتری‌های گرام منفی بیرنگ گردیده؛ ولی باکتری‌های گرام مثبت رنگ خود را حفظ می‌نمایند.

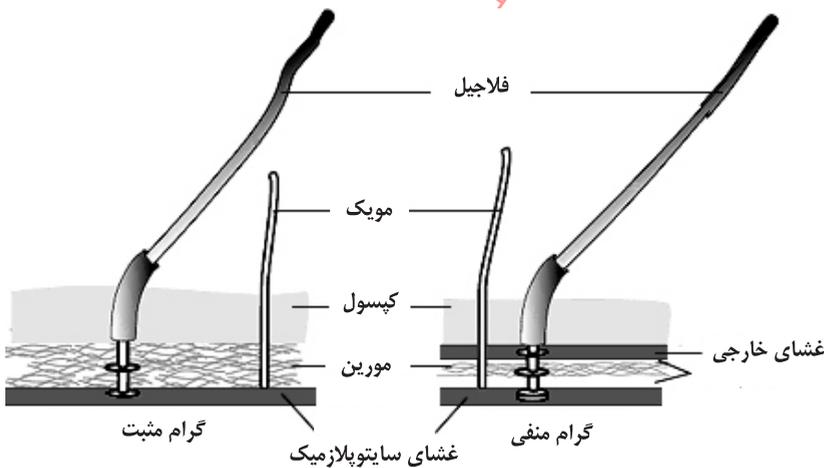


شکل ۱-۱۰

اختلاف میان باکتری‌های گرام مثبت و گرام منفی نشان داده است که این اختلاف در دیوار حجروی وجود دارد: حجات گرام مثبت نیز توسط اسیتون یا الکل بیرنگ گردیده

می‌توانند، مشروط بر اینکه دیوار حجروی آنها پس از مرحله تلوین و قبل از مرحله شستشو بر طرف گردیده باشد. باوجود اینکه ترکیب کیمیای دیوارهای گرام مثبت و گرام منفی حال به خوبی دانسته شده است؛ ولی با آنها علت اینکه دیوار گرام مثبت چگونه خروج رنگ را مانع می‌گردد، فهمیده نشده است.

دیوار حجروی علاوه بر اینکه باعث حفاظت فشار اوسموتیک حجره می‌گردد، نقش اساسی را در تقسیمات حجروی بازی می‌نماید و به همین ترتیب به حیث اساس بیوسنتیز حجره فعالیت می‌کند. شاخص‌های عمده انتیجینیک سطح حجره در طبقات مختلفه دیوار آن قرار داشته و یک مرکب به نام lipopolysaccharide در حجرات گرام منفی مسؤؤل فعالیت endotoxin های غیر وصفی باکتری‌های گرام منفی می‌باشد. طور عموم دیوار حجروی قابلیت نفوذیه غیر انتخابی داشته با آنها یک طبقه دیوار گرام منفی یعنی غشای خارجی آن عبور مالیکول‌های بزرگ را مانع می‌گردد.



شکل ۱- ۱۱

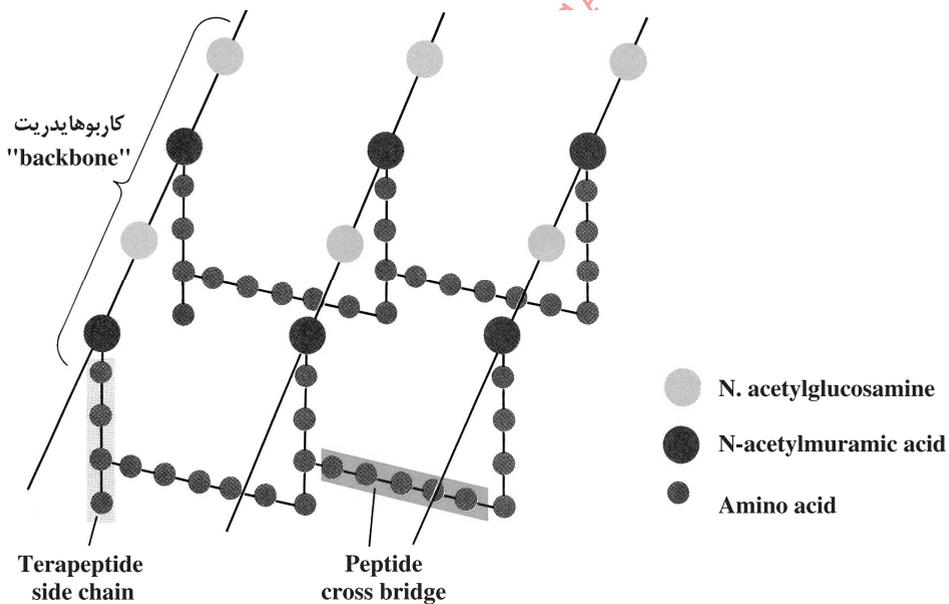
وظایف دیوار حجروی

- ۱- به باکتری‌ها شکل می‌دهد و یا شکل ظاهری حجره باکتری را تعیین می‌نماید.
- ۲- ساختمان‌های داخل حجره باکتری را محافظه می‌نماید.

۳- در انقسام حجروی نقش دارد.

۴- مقاومت را به مقابل عوامل محیطی که متوجه حجره باکتری است به وجود می آورد.

الف: طبقه پپتیدوگلاایکان Peptidoglycan layer: پپتیدوگلاایکان یک پولیمر مغلق بوده که از نظر تشریحی متشکل از سه قسمت می باشد: اساس (ستون فقرات) که مرکب از N-acetylglucosamine و N-acetylmuramic acid به شکل متبادل می باشد، یک ست زنجیره‌های جانبی یکسان tetrapeptide ها که به N-acetylmuramic acid وصل می باشند و یک ست پل های اتصال Peptide های یکسان می باشد. (شکل ۱-۱۲) در بسیاری دیواره‌های حجروی گرام منفی، پل های اتصال مشتمل بر یک رابطه مستقیم پپتاید میان diaminopimelic acid (DAP) و گروه carboxyl در D-alanine نهایت دومی زنجیر می باشد.



شکل ۱-۱۲ ساختمان کیمیای پپتیدوگلاایکان

با آنهم، زنجیره‌های جانبی tetrapeptide تمام انواع دارای تظاهرات عمده مشابه می باشند. بسیاری دارای L-alanine در موقعیت 1 (متصل به diaminopimelic acid) و یا D-glutamate

D-glutamate تعویضی در موقعیت 2 و *D-alanine* در موقعیت 4 می‌باشد. موقعیت 3 بیش از همه متغیر می‌باشد. طوریکه بسیاری باکتری‌های گرام منفی دارای *diaminopimelic acid* در این موقعیت بوده که به آن مرکبات لایوپروتین دیوار حجروی وصل می‌باشد که ذیلاً توضیح می‌گردد. باکتری‌های گرام مثبت دارای *L-lysine diaminopimelic acid* و یا سایر *L-aminoacid* ها در موقعیت 3 بوده می‌توانند.

diaminopimelic acid یک عنصر مختص برای دیوار حجروی پروکاریوتیک بوده و پیشقدم *Lysine* در بیوسنتز باکتری برای امینو اسید فوق می‌باشد. *Mutant* های باکتری‌ها که قبل از *diaminopimelic acid* در پروسه *biosynthetic pathway* نهی می‌گردند، در صورت فراهم نمودن *diaminopimelic acid* دوباره به نموی نورمال خود دوام می‌دهند؛ اما اگر تنها *L-lysine* فراهم گردد، لیز صورت می‌گیرد و با وجود نموی نارمل قادر به تشکیل *peptidoglycan* جدید در دیوار حجروی نمی‌باشند.

این مسأله که زنجیرهای *peptidoglycan* طور متقابل وصل می‌باشند به این مفهوم است که هر طبقه *peptidoglycan* یک مالیکول بزرگ واحد می‌باشد. در باکتری‌های گرام مثبت، به تعداد 40 ورق پپتیدوگلایکان می‌باشند که تقریباً 50 فیصد مواد دیوار حجروی را تشکیل می‌دهند. در باکتری‌های گرام منفی طوری معلوم می‌گردد که فقط 1-2 ورق وجود داشته باشند که 5-10 فیصد مواد دیوار حجروی را تشکیل می‌دهند. باکتری‌ها نظر به ساختمان دیوار حجروی شکل می‌گیرند که این موضوع در خصوص انواع خاص باکتری‌ها مشخص می‌باشد.

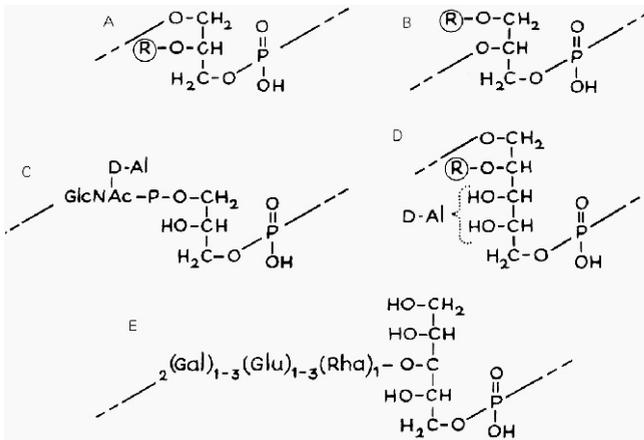
چندین گروه پروکاریوتیک ها، که مجموعاً به نام *archaeobacteria* یاد می‌گردند، فاقد طبقه *peptidoglycan* می‌باشند. در بعضی انواع این گروه یک پولیمیر مشابه موجود می‌باشد که مشتمل بر قندهای *N-acetyl* و سه *L-aminoacid* می‌باشند. این گروه فاقد *muramic acid* و *D-amino acid* ها می‌باشند. در سایر آرکیوباکتری‌ها در عوض یک طبقه غیر پروتینی موجود است. این اورگانیزم‌ها در قسمت لیپیدها و RNA نیز تفاوت‌هایی را نشان می‌دهند.

ب: اجزای خاص دیوار حجروی گرام مثبت: اکثر دیوارهای گرام مثبت، مقادیر قابل ملاحظه اسیدهای *teichoic* و *teichuronic* را دارا می‌باشند که تقریباً 50 فیصد وزن خشک دیوار حجروی و 10 فیصد وزن خشک تمام حجره را احتوا می‌نماید. بر علاوه بعضی دیوارهای گرام مثبت مالیکول‌های پولی سکراید را دارا بوده می‌توانند.

1- *teichoic acid* و *teichuronic acid* عبارت از پولیمیرهای منحل در آب بوده که حاوی *glycerol* و *ribitol* می‌باشند و توسط رابطه‌های *phosphodiester* وصل می‌گردند و

یک یا بیشتر امینو اسید و یا قند را دارا می‌باشند (شکل 1-13) دو نوع *teichoic acid* موجود اند: *teichoic acid* دیواری که توسط روابط کووالانت با *peptidoglycan* وصل می‌باشند و *teichoic acid* غشایی (*lipoteichoic acid*) که توسط روابط کووالانت به گلایکولپیدهای غشا وصل بوده و در میوزومها تراکم می‌نمایند. بعضی انواع *teichoic acid* غشایی می‌باشند.

اسیدهای *teichoic* آنتی‌جین‌های مهم سطحی باکتری‌های گرام مثبت دارند آنها تشکیل می‌دهد و اثرات انتی‌بادی‌ها بالای آنان حاکی بر این است که اسیدهای فوق در سطح خارجی طبقه *peptidoglycan* قرار دارند؛ ولی فعالیت اسیدهای فوق با هضم قسمی پپتیدوگلائیکان



از دید می‌یابد، بناً نتیجه‌گیری می‌گردد که قسمت اعظم *teichoic acid* ممکن بین غشای سائتوپلازمیک و طبقه پپتیدوگلائیکان موجود بوده و از طریق منفذها در

شکل ۱-۱۳ واحدهای تکراری تیکوییک اسید

طبقه اخیرالذکر، در جهت خارج حجره امتداد یابد. در *pneumococcus* ها (*streptococcus pneumoniae*) اسیدهای *teichoic* شاخص‌های آنتی‌جینیک را حمل می‌نمایند که به نام *Forssman antigen* یاد می‌گردند. در *streptococcus pyogenes* اسید *lipoteichoic* با *M-protein* مرتبط می‌باشند که از غشای حجروی از طریق طبقه پپتیدوگلائیکان تبارز می‌نماید. مالیکول طویل *M-protein* همراه با *lipoteichoic acid* مایکروفیبریل‌های را می‌سازند که اتصال *S. Pyogene* را به حجرات حیوانی مساعدت می‌نماید.

واحدها متکرر ممکن گلیسیرول باشند که به واسطه رابط‌های 1/3 و یا 1/2 وصل می‌باشند و یا واحدها معلقتر دیگری باشند که در آن گلیسیرول و یا *ribitol* با بقایای قندی

مانند گلوکوز، گلکتوز و یا *N-acetylglucosamine* یکجا می‌باشند. این زنجیره‌ها ممکن 30 و یا بیشتر واحد متکرر را به شکل طولانی در خود داشته باشند، گرچه زنجیره‌های دارای 10 و یا کمتر واحد نیز معمول می‌باشند.

بسیاری *teichoic acid* ها دارای مقادیر زیاد *D-alanine* می‌باشند که اکثراً در موقعیت‌های 2 و 3 و 2 و 3 گلیسرول و یا موقعیت 3 و یا 4 *ribitol* وصل می‌باشند؛ اما *D-alanine* در بعضی از اشکال مغلق تر *teichoic acid* ها به یکی از بقایای قندی وصل می‌باشند. علاوه بر *D-alanine* مرکباتی دیگری از قبیل گلوکوز، گلکتوز، *N-acetylglucosamine* و *acetylgalactose amine* و یا *succinate* ها نیز ممکن به گروه‌های آزاد هایدروکسیل *D-alanine* و *glycerol* و *ribitol* وصل باشند. ممکن بیشتر از یک نوع مرکب قندی علاوه بر *D-alanine* در نوع واحد مایکروبی موجود باشد در صورت فوق این مسأله ثابت نگردیده که آیا قندهای مختلفه در عین مالیکول *teichoic acid* قرار دارند و یا در مالیکول‌های دیگر. ترکیب *teichoic acid* که توسط یک نوع معین باکتری ساخته می‌شود نظر به ترکیب وسط نشونمایی متفاوت بوده می‌تواند. وظیفه *teichoic acid* ها تا هنوز هم مورد مباحثه می‌باشد. *Teichoic acid* ها آیون مگنیزیم را با خود وصل نموده که ممکن نقشی را در رسانیدن آیون فوق به حجره داشته باشد. همچنان نقشی را در وظایف نورمال پاکت حجروی دارا می‌باشند، بنابر این تعویض *choline* با *ethanolamine* در تیکوئیک اسید *Pneumococcus* ها باعث مقاومت حجره در مقابل *autolysis* و عدم توانمندی آن برای اخذ *DNA transformation* می‌گردد. تیکوئیک اسیدهای غشایی ممکن به حثت یک اتصال دیوار به غشای حجروی مربوطه وظیفه اجرا نماید.

اسیدهای *tichuronic* عبارت از پولیمیرهای مشابه بوده؛ ولی واحدها متکرر اسیدهای قندی مانند (*N-acetylmanosuronic* و یا *D-glucosuronic acid*) را به عوض فسفوریک اسید در خود دارند. مرکبات فوق در صورت محدود بودن فوسفات به عوض تیکوئیک اسید سنتتیز می‌گردند.

۲- پولی سکرایدها: هایدرولیز دیوار در انواع معین باکتری‌های گرام مثبت باعث حصول قندهای خنثی مانند *glucosamine*، *galactose*، *arabinose*، *mannose* و قندهای اسیدی مانند *glucuronic acid* و *mannuronic acid* می‌گردد. ممکن این قندها در واحدها فرعی پولی سکرایدها در دیوار حجروی وجود داشته باشند با وجود آنهم کشف این مسأله که اسیدهای تیکوئیک و تیکورونیک ممکن دارای انواع مختلفه قندها باشند باعث گردیده که منشأ این قندها نامعلوم باقی بمانند.

ج: مرکبات خاص دیواره‌های حجروی گرام منفی: دیواره حجروی گرام منفی دارای سه مرکب می‌باشد که خارج از طبقه پیپتیدوگلاایکان قرار داشته و عبارتند از: لایپوپروتین، غشای خارجی و لیبوپولی سکراید می‌باشد.

۱- lipoprotein: مالیکول‌های لایپوپروتین غیر معمول سبب اتصال غشای خارجی و طبقات پیپتیدوگلاایکان می‌باشند. لایپوپروتین دارای 57 امینو اسید می‌باشند، که نمایانگر تکرار یک سلسله مرکب از 15 امینو اسید می‌باشد و توسط روابط پیپتایدی به *diaminopimelic acid* موجود در زنجیرهای جانبی *tetrapeptide peptidoglycan* وصل می‌باشد. مرکبات شحمی، مشتمل بر *diglyceride thioether* می‌باشند که به *cysteine* نهایی آن وصل می‌باشد و به صورت غیر کووالانت به غشای خارجی تثبیت می‌گردد. لایپوپروتین از نظر تعداد زیادترین پروتین در حجرات گرام منفی می‌باشد (معادل به 700000 مالیکول در یک حجره). وظیفه آن (با در نظر داشت میوتانت ها که فاقد آن می‌باشند) عبارت از تثبیت غشای خارجی و اتصال آن بالای طبقه پیپتیدوگلاایکان می‌باشد.

۲- غشای خارجی: غشای خارجی یک ساختمان دو طبقه یی می‌باشد: ورقه داخلی آن از نظر ترکیب شباهت به غشای سائتوپلازمیک دارد حالانکه فوسفولیپیدهای ورقه خارجی با مالیکول‌های لیبوپولی سکراید (LPS) تعویض گردیده اند. در نتیجه ورقه های این غشاً غیر متناظر گردیده و خواص این دو طبقه به طور قابل ملاحظه از غشاهای بیولوژیک مشابه آن مانند غشای سائتوپلازمیک، متمایز می‌گردد.

توانایی غشای خارجی در رابطه با عدم اجازه دخول به مالیکول‌های هایدروفوبیک از جمله خواص غیر معمول غشاهای بیولوژیک بوده و حجره را (در صورت *enteric bacteria* ها) از نمک های صفراوی محافظه می‌نماید. نظر به ماهیت شحمی آن غشای خارجی مالیکول‌های هایدروفیلیک را نیز اجازه دخول به حجره نمی‌دهند. با وجود آنهم، غشای خارجی دارای کانال های بالخاصه می‌باشند که مشتمل بر مالیکول‌های پروتینی به نام *porin* ها می‌باشند که دیفوجن غیر فعال مرکبات هایدروفیلیک با وزن مالیکولی پائین را اجازه می‌دهد این مرکبات مشتمل بر قندها، امینو اسیدها و آیون های معین می‌باشد. مالیکول‌های بزرگ انتی بیوتیک غشای خارجی را نسبتاً به آهسته گی می‌شگافند که این موضوع حاکی بر مقاومت نسبتاً بیشتر باکتری‌های گرام مثبت در مقابل انتی بیوتیک ها می‌باشد. قابلیت نفوذیه غشای خارجی نظر به یک نوع گرام منفی به نوع دیگر آن وسیعاً متفاوت می‌باشد. به گونه مثال: *Pseudomonas aeruginosa* در برابر مرکبات *antibacterial* شدیداً مقاوم می‌باشد و غشای خارجی آن

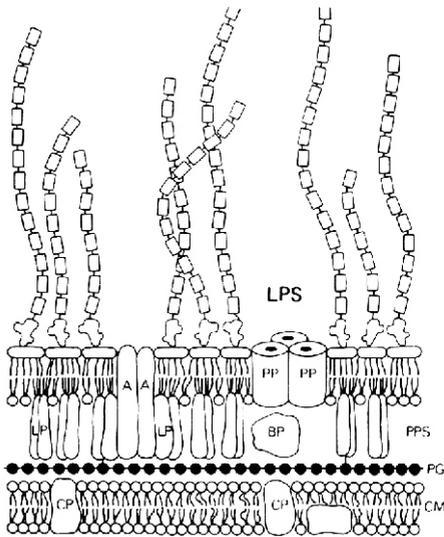
نسبت به *E. coli* تقریباً 100 مرتابه قابلیت نفوذیه کمتر دارد. پروتئین‌های عمده غشای خارجی که به اساس *gene* های کود کننده آن نامگذاری شده‌اند، نظر به عدم موجودیت آن در میوتانت‌ها و نظر به تجاری که در آن پروتئین‌های خالص به شکل غشاهای مصنوعی دوباره ترکیب می‌گردند، به چندین کتگوری تقسیم می‌گردند. به گونه مثال پورین‌ها که مثال آن *OmpC*، *D* و *F* و *PhoE* در *E. coli* و *Salmonella typhimurium* است از جمله پروتئین‌های *trimeric* بوده که هر دو طرف غشای خارجی را تنقب می‌نمایند. این‌ها منفذهای نسبتاً غیر وصفی را تشکیل داده که انتشار آزاد مواد منحل‌ه هایدروفیلیک کوچک را از طریق غشا اجازه می‌دهند. پورین‌ها در انواع مختلف دارای حدود دفع سازی متفاوت می‌باشند که از وزن مالیکولی 600 در *E. coli* الی بیشتر از 300 در *P. aeruginosa* تفاوت می‌نماید.

اجزای گروه دوم از پروتئین‌های غشای خارجی که در بسیاری موارد به پورین‌ها شباهت دارند نمونه آن *LamB* و *Tsx* می‌باشد. *LamB* یک پورین قابل تحریک بوده و رسپتور برای باکتریوفاز *lambda* می‌باشد و مسؤؤل انتشار مالتوز و *maltodextrin*‌ها از غشا می‌باشد. *Tsx* رسپتور برای باکتریوفاز T6 بوده و مسؤؤل انتشار *nucleoside*‌ها و بعضی آمینواسیدها می‌باشد. بر علاوه *LamB* عبور مواد منحل‌ه دیگر را نیز اجازه می‌دهد و نشاندهنده عمل متقابل مواد منحل‌ه با نواحی مخصوصه در *channel* می‌باشد.

پروتئین *OmpA* در غشای خارجی بسیار وافر می‌باشد. پروتئین فوق به حیث رسپتور برای چندین باکتریوفاز فعالیت نموده و نیز در تثبیت غشای خارجی بالای طبقه *peptidoglycan* سهیم می‌باشد. علاوه مویک *pilus* جنسی در *F-mediated bacterial conjugation* می‌باشد.

غشای خارجی همچنان دارای یک ست پروتئین‌های کمتر وافر بوده که در انتقال مالیکول‌های خاص، مانند *Vit B12* و منعلق *ironsiderophore* سهیم می‌باشند. اینان وابستگی زیادی به مرکبات (مورد انتقال) شان نشان داده و احتمالاً مانند سیستم‌های کلاسیک انتقال در غشای داخلی (سایتوپلازمیک) فعالیت دارند. جهت اجرای وظیفه مناسب این پروتئین‌ها، ایجاب می‌نماید تا انرژی را با پروتئینی به نام *TonB* بدست آورد. سایر پروتئین‌های اضافی کوچک مشتمل بر تعداد محدودی از آنزیم‌ها به شمول فوسفولیپازها و پروتيازها می‌باشد به همین‌گونه بعضی پروتئین‌های *penicillin-binding* در آن مشتمل می‌باشند.

توپولوژی پروتین‌های عمده غشای خارجی، به اساس مطالعه و تحلیلات روابط متقابل و ارتباط وظیفوی در (شکل 1-14) نشان داده شده است. غشای خارجی به هردو یعنی طبقه *murein* و غشای سایتوپلازمیک وصل می‌باشد. ارتباط با طبقه میورین اساساً توسط لایوپروتین غشای خارجی تأمین می‌گردد. تقریباً یک برسه مالیکول‌های لایوپروتین توسط روابط کوولانت با میورین وصل بوده و در نگهداری این دو ساختمان با همدیگر مساعدت می‌نمایند. یک اتحاد غیرکوولانت بعضی پورین‌ها با طبقه میورین نقش کمتری در ارتباط دادن طبقه خارجی با این ساختمانها دارد. پروتین‌های غشای خارجی در رایبوزوم‌های متصل با سطح سایتوپلازمیک غشای داخلی سنتز می‌یابد و اینکه چگونه پروتین‌های متذکره به غشای خارجی می‌رسند تا اکنون فهمیده نشده است، ولی درینمورد چنین پیشنهاد می‌گردد که انتقال در نواحی چسبیدگی میان غشای سایتوپلازمیک و غشای خارجی صورت می‌گیرد، که این مسأله توسط الکترون مایکروسکوب بخوبی مشاهده گردیده می‌تواند. نواحی یا زون‌های متذکره به اساس اسم کاشف آن به نام "*Bayer junctions*" نیز یاد می‌گردند در حجره *E. coli* تقریباً 200 *junction* متذکره وجود دارد.



شکل ۱-۱۴ ساختمان مالیکولی غشای

خارجی باکتری گرام منفی

۳- *LPS* (lipopolysaccharide)

لیپوپولی سکراید در دیوار حجروی گرام منفی مشتمل بر لیپید مغلقی به نام لیپید A می‌باشد که به آن یک پولی سکراید که متشکل از یک هسته و یک سلسله نهایی یونتهای متکرر اند وصل می‌باشد.

لیپید A متشکل از واحدهای *phosphorylated glucosamine disaccharide* بوده که به آن

یکتعداد زنجیرهای طویل اسیدهای شحمی وصل می‌باشند. β -hydroxymyristic acid که یک

اسید شحمی C14 می‌باشد دائماً درین شحم موجود بوده و مشخصه آن می‌باشد، سایر

اسیدهای شحمی همراه با گروپ های تعویضی در فوسفیت آنها، نظر به نوع باکتری متفاوت می‌باشند.

هسته پولی سکراید در تمام انواع باکتری گرام منفی که دارای LPS باشند باهم مشابه اند. با آنهم هر نوع دارای یک واحد اختصاصی متکرر می‌باشند. یونتهای متکرر اکثراً *trisaccharide* های خطی و یا *tetra or pentasaccharide* های منشعب می‌باشند.

مالیکول های LPS منفی به صورت غیر کوولانت توسط کتیون های دو ولانسه اتصال متقابل می یابند؛ این مسئله باعث ثبات دادن به غشأ گردیده و مانع یی را در مقابل مالیکول های هایدروفوبیک به میان می آورند. برطرف نمودن کتیون های دو ولانسه توسط *chelate* ها و یا بیجان نمودن توسط انتی بیوتیک های پولی کتیونیک، غشای خارجی را برای مالیکول های بزرگ هایدروفوبیک قابل نفوذ می سازد.

LPS که برای حیوانات نهایت توکسیک می باشد، در باکتری های گرام منفی به نام *endotoxin* یاد می گردد زیرا به سطح حجره قویاً چسبیده و فقط در صورتی آزاد می گردند که حجره *lyse* گردد. هرگاه LPS به لیپید A و پولی سکراید تجزیه گردد، تمام *toxicity* آن مربوط به اول الذکر می باشد. به عبارت دیگر پولی سکراید مثل انتیجینیک عمده سطح حجروی می باشد و به نام *O antigen* یاد می گردد. خصوصیت انتیجینیک به یونتهای متکرر نهاییات نسبت داده می شود که با ساختن یک طبقه هایدروفیلیک پولی سکرایدها دورادور حجره را احاطه می نمایند. تعداد ممکنه انواع انتیجینیک نهایت زیاد بوده؛ تنها در *Salmonella* این تعداد بیش از 1000 تثبیت گردیده است.

LPS توسط روابط هایدروفوبیک به غشای خارجی وصل می گردند. LPS در غشای سایتوپلازمیک سنتیز گردیده و به موقعیت نهایی آن انتقال داده می شود. موجودیت LPS برای فعالیت بسیاری پروتین های غشایی لازم می باشند.

تمام باکتری های گرام منفی دارای LPS غشای خارجی مرکب از تعداد متفاوت واحداث متکرر *Oligosaccharide* نمی باشند؛ گلایکولیپیدهای غشای خارجی باکتری ها که در سطح مخاط جا می گیرند (طور مثال *Neisseria meningitidis*، *Haemophilus N. gonorrhoeae*، *Haemophilus Ducreyi*، *Influenza*) دارای گلایکان های نسبتاً کوتاه و منشعب می باشند. این گلایکولیپیدهای کوچکتر با ساختمانهای "R-type" LPS فاقد *O antigen* قابل مقایسه بوده که توسط میوتانت های باکتری های انتریک مانند *E. Coli* تولید می گردد. با وجود آن ساختمان های آن بیشتر به *glycosphingolipid* های غشای حجروی پستانداران

شباهت داشته، که بهتر است به نام lipooligosaccharide ها (LOS) مسمی گردند. این مالیکول ها ساختمان انتیجینیک خیلی متفاوت داشته و حتی در عین strain واحد تفاوت های ساختمانی را نشان می دهند.

LOS یک فکتور مهم ویرولانسی می باشد. Epitop هایی در LOS تشخیص گردیده اند که ساختمان حجره میزبان را تقلید نموده و در نتیجه قادر می گردند که از عکس العمل معافیته در میزبان فرار نمایند. بعضی LOS (طور مثال در *N. Gonorrhoeae*، *N. Meningitidis* و *H. Ducreyi*) در نهایت خود دارای *N-acetyl-lactosamine* ($\text{Gal}\beta 1-$ *4-GlcNAc*) می باشند که از نظر immunochemical شباهت به پیشقدم antigen کریوات سرخ انسانها دارد. در موجودیت انزایم باکتریایی به نام *sialyltransferase* و مرکبات مربوط به میزبان و یا باکتریا (*Monophospho N-acetylneuraminic acid, CMP-NANA*)، بقایای *N-acetyl-lactosamine* سیلایل دار (*sialylated*) می گردد. این *sialylation* که به صورت *invivo* صورت می گیرد زمینه تقلید مالیکولی انتیجن میزبان را به اورگانیزم مهیا و ماسک بیولوژیکی را تهیه می دارد که فکر می گردد *sialic acid* آنرا فراهم می نماید.

۱- فضای *periplasmic* فضا میان غشای داخلی و خارجی به نام *periplasmic space* یاد می گردد که مشتمل بر طبقه *murein* و یک محلول پروتینی *gel* مانند می باشد. فضای پیریپلازمیک تقریباً 20-40 فیصد حجم حجره را احتوا می نماید که قابل ملاحظه می باشد. پروتین های پیریپلازمیک مشتمل اند بر *protein* هایی اتصال با مرکبات خاص (طور مثال، امینواسیدها، قند، ویتامین ها و آیون ها)، انزایم های هایدرولایتیک (طور مثال، *alkaline phosphatase* و *5'-nucleotidase*) می باشند که مرکبات غیرقابل انتقال را به مرکبات قابل انتقال می شکنند، و نیز دارای انزایم های *detoxifying* مانند β -*lactamase* و *aminoglycoside-phosphorylase* می باشند که انتی بیوتیک های معین را غیرفعال می سازند. پیریپلازم همچنان دارای پولیمیر های منشعب و متکاتف *D-glucose* می باشند، که از 8 الی 10 یونت طویل می باشد و طور متفاوت با گلیسیرول فوسفات و *phosphatidylethanolamine* تعویض می گردند. بعضی از آنها حاوی ایستر های *O-succinyl* می باشند. این اولیگوسکرایدهای غشایی نقش مهمی را در *osmoregulation* بازی می نمایند، زیرا حجرات کشت شده در اوساط با *osmolarity* پائین، سنتیز مرکبات فوق را 16 مرتبه از دیاد می بخشد.

د: انزایم‌هاییکه بالای دیوار حجروی حمله می‌نمایند: رابطه β 1-4 در ستون فقرات پپتیدوگلاایکان توسط انزایم lysozyme هایدرولیز می‌گردد. انزایم متذکره در افزایشات حیوانات (اشک، لعاب دهن، افزایشات انفی) و به همین‌گونه در سفیدی تخم مرغ موجود است. باکتری‌های گرام مثبت که توسط lysozyme در محیط با فشار اسموتیک پائین مواجه گردد، لیز می‌شود؛ اما در صورتیکه فشار اسموتیک وسط بلند برده شود تا با فشار اسموتیک داخل حجره در حالت تعادل قرار گیرند، proplast های آزاد رها می‌گردند. غشای خارجی حجرات گرام منفی را در مقابل lysozyme محافظه نموده مگر اینکه توسط مرکبات مانند ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) که یک chelating agent می‌باشد از هم گسیخته شود؛ در وسط متعادل آزوتیک حجراتیکه با EDTA-lysozyme مواجه می‌گردند spheroplast ها را تشکیل می‌دهند که هنوز هم بقایای دیوار گرام منفی مغلق را به شمول غشای خارجی دارا می‌باشند.

باکتری‌ها خود دارای یکتعداد autolysin می‌باشد که عبارت اند از انزایم‌های هایدرولایتیک که بالای پپتیدوگلاایکان‌ها حمله می‌نمایند، به شمول گلاایکوسیدها، امیازها، و پپتیدازها. انزایم‌های متذکره احتمالاً وظیفه اساسی را در نمو و انقسام حجره بازی می‌نماید؛ ولی این فعالیت‌ها در زمان انحلال حجرات مرده یا اوتولیز بیشتر ظاهر می‌گردد.

علاوتاً انزایم‌هاییکه باعث تخریب دیوار حجروی می‌گردند در حجراتی دریافت می‌شوند که تمام باکتری‌ها را بلع می‌نمایند مانند پرتوزوا و حجرات فگوسیت حیوانات تکامل یافته تر.

ه: نشونمای دیوار حجروی: با ازدیاد کتله پرتوبلاست‌ها، دیوار حجروی با اتصال واحداث جدیدالتشکیل در طبقات مختلفه دیوار حجروی، طولیتر می‌گردد. در streptococc ها، اتصال به طبقه اساسی دارنده انتیجن در ناحیه استوایی دیوار حجروی اخذ موقع می‌نماید؛ در بعضی باکتری‌های گرام منفی چنین گمان می‌رود که پروسه اتصال طور تصادفی پیش می‌رود، گرچه اتصال موضعی که توسط بیجا شدن سریع و یا تغییر و تبدیل عین منظر به‌میان آمده می‌تواند. در E. coli، نشونمای چوکات غشای خارجی منحصراً در قطب‌های حجره صورت می‌گیرند، که اجزای بالخاصه مانند فگورسپتورها و permease ها به‌صورت تصادفی در این چوکات داخل می‌گردند. چنین گمان می‌رود که طبقه پپتیدوگلاایکان E. coli توسط اتصالات موضعی تصادفی نشونما می‌نماید. در Bacillus subtilis تجارب pulse-chase نشان داده اند که پپتیدوگلاایکان و اسیدهای تیکوتیک به شکل بلاک‌های موجود می‌باشند، و کمتر از 12 ناحیه در یک حجره واحد برای دخول مواد جدیدالتشکیل موجود اند.

و: پرتوبلاست‌ها، سفیروپلاست‌ها و L-form‌ها: اگر در اثر فکتورهای خارجی دیوار حجروی باکتری‌های گرام مثبت کاملاً تخریب گردد (تخریب murein توسط lysozyme و نهی سنتتیز آن

توسط پنسلین) و همچنان باکتری‌ها در وسطی گذاشته شود که فشار اسموتیک آن پایینتر از فشار اسموتیک داخل حجره باکتری‌ها باشد. در اینصورت باکتری‌ها به lysis معروض خواهد شد. اگر باکتری در محیطی گذاشته شود که فشار اسموتیک آن مساوی به فشار اسموتیک داخل حجره باکتری باشد در اینصورت باکتری به lysis مواجه نشده و حجره به وجود می‌آید که به نام protoplast یاد می‌گردد.

اگر دیوار حجروی باکتری‌های گرام منفی در اثر فکتورهای خارجی قسملاً تخریب گردد و باکتری در وسطی گذاشته شود که فشار اسموتیک آن پایینتر از فشار اسموتیک داخل حجره باکتری باشد در اینصورت باکتری به lysis مواجه می‌شود درحالیکه اگر باکتری در وسطی قرار داده شود که فشار اسموتیک آن معادل (Isotonic) باشد در اینصورت حجره به lysis معروض نشده از شکل بیضوی و چوبک مانند به شکل مدور در می‌آید که به نام spheroplast یاد می‌گردد.

اگر چنین حجرات قادر به نشوونما و انقسام باشند، در اینصورت به نام L. form یاد می‌گردند. نام L از انستیتوت lister در لندن گرفته شده است. کلچر L. form ها مشکل بوده و اکثراً وسطی را ایجاب می‌نمایند که توسط agar جامد گردیده و دارای فشار اسموتیک مناسب باشند. L. form ها توسط پنسلیلین نظر به lysozyme به سهولت تولید گردیده که این موضوع عطف به ضرورت بر بقایای پپتیدوگلاایکان می‌نماید.

بعضی اشکال L. form ها با برطرف نمودن محرک به شکل نورمال باسیلی اعاده گردیده می‌توانند. بنابراین قادر به این می‌گردند تا سنتیز نورمال دیوار حجروی را از سر بگیرند. با وجود آن سایر انواع ثابت داشته و هرگز اعاده نمی‌گردند. فکتوریکه ظرفیت اعاده باکتری را تعیین می‌نماید ممکن موجودیت بقایای پپتیدوگلاایکان باشند، که بطور نورمال در بیوسنتیز خود بحیث پیشقدم عمل می‌نمایند. بعضی انواع باکتری‌ها به صورت خودبخودی باعث تولید L. form می‌گردند. تشکل L. form با وساطت دوایی و یا بشکل خودبه خودی باعث ایجاد انتانات مزمن در میزبان می‌گردند و اورگانیزمها با نشان دادن مقاومت در اعضای دفاعی وجود جاگزین می‌گردند. از آنجاییکه انتانات L. form در برابر تداوی انتی بیوتیک نسبتاً مقاوم می‌باشند، مشکلات خاصی را در مقابل شیموتراپی به میان می‌آورند. اعاده حالت شان به شکل باسیلی باعث عود اتان گردیده می‌تواند.

کپسول و Glycocalyx

کپسول قسمت خارجی دیوار حجروی مایکرواورگانیزمها را احاطه می‌نماید. تمام باکتری‌ها دارای مواد کپسولی می‌باشند؛ ولی در نزد بعضی انواع آنها مواد کپسولی زیاد متراکم بوده و یک قشر ضخیم را می‌سازد که به سهولت و به طور واضح به مشاهده می‌رسد. مثلاً Klebsiella

اما در بعضی باکتری‌ها کپسول عبارت از یک قشر نازک بوده که توسط الکترون مایکروسکوپ دیده می‌شود مثلاً Streptococci.

بسیاری باکتری‌ها حین نمو در محیط طبیعی مقادیر بزرگ پولیمیرهای خارج حجروی را سنتتیز می‌نمایند. (به استثنای کپسول poly-D-glutamic acid در Bacillus anthracis)، مواد خارج حجروی پولی سکراید می‌باشند. زمانیکه پولیمیرها یک طبقه متکاثف و واضح را درآورد حجره می‌سازند، به نام کپسول یاد می‌گردد و زمانیکه یک شبکه سست فیبریل‌ها را تشکیل دهد که به خارج از حجره تمديد یافته باشند، به نام glycocalyx یاد می‌گردد. در برخی موارد کتلات پولیمیر طوری تشکیل می‌گردد که به نظر می‌رسد کاملاً از حجره جدا گردیده ولی حجره در آن محبوس گردیده است، در چنین موارد پولیمیرهای خارج حجروی به حیث یک طبقه ساده (slime layer) عطف می‌گردند. پولیمیرهای خارج الحجروی توسط انزایم‌هایی سنتتیز می‌گردند که بالای سطح حجره باکتریایی قرار دارند. طور مثال Sterptococcus mutans از دو انزایم glucosyl transferase و fructosyl transferase برای سنتتیز زنجیرهای طویل دکستران (poly-D-glucose) و لیوان‌ها (poly-D-fructose) استفاده می‌نمایند (یعنی homopolymer ها).

پولیمیرهای که حاوی بیشتر از یک نوع مونوسکراید باشند به نام heteropolymer ها یاد می‌گردند.

کپسول در متهاجم بودن باکتری‌های پتوجن کمک نموده، حجات encapsulated از هایدرولیز مصوون می‌باشند مگر اینکه انتی بادی‌های کپسولی آنها احاطه نماید. گلایکوکالکس در چسپیدن باکتری به سطوح محیطی به شمول حجات نباتی و میزبان حیوانی نقش بازی می‌نماید. طور مثال ظرفیت چسپندگی شدید S. Mutans به مینای دندان، به گلایکوکلکس نسبت داده می‌شود. حجات باکتریایی عین نوع و یا سایر انواع بداخل گلایکوکلکس محبوس می‌گردد، که طبقه یی به نام پلک را بالای سطح دندان تشکیل می‌دهند، تولیدات اسیدی که توسط این باکتری‌ها افزاز می‌گردد باعث caries دندان می‌گردد.

وظایف کپسول

۱- محافظه باکتری‌ها از علیه Phagocytosis.

۲- محافظه باکتری‌ها از تأثیرات انتی بادی‌ها.

۳- محافظه باکتری‌ها از تأثیرات Bactriophage.

۴- باکتری‌ها را از خشک شدن محافظه می‌کند.

۵- در تعیین type باکتری‌ها کمک می‌کند.

۶- قدرت Virulence دارد.

فلاجیل Flagella

الف: ساختمان: فلاجیل باکتریایی ساختمان‌های رشته‌مانند اند که مرکب از پروتین بوده و دارای قطر $12-30\mu\text{m}$ می‌باشند. ساختمان‌های فوق ارگانهای تحرکی برای اورگانیزم‌های دارنده آن می‌باشد. فلاجیل دارای نهایت و قاعده می‌باشد. فلاجیل منشأ خود را از اجسام مدور (Basal Granul) که در داخل دیوار حجروی موقعیت دارند می‌گیرد.

به اساس تعداد و موقعیت فلاجیل در حجره باکتری، باکتری‌های فلاجیل دار را به چهار گروه ذیل تقسیم می‌نمایند:

۱- باکتری‌های Monotrichus: باکتری‌های که در یک نهایت خود صرف یک عدد فلاجیل دارند مانند *Vibrio cholera*.

۲- باکتری‌های Lophotrichus: عبارت از باکتری‌های اند که در یک نهایت خود چند عدد فلاجیل دارند مانند *Pseudomonase*.

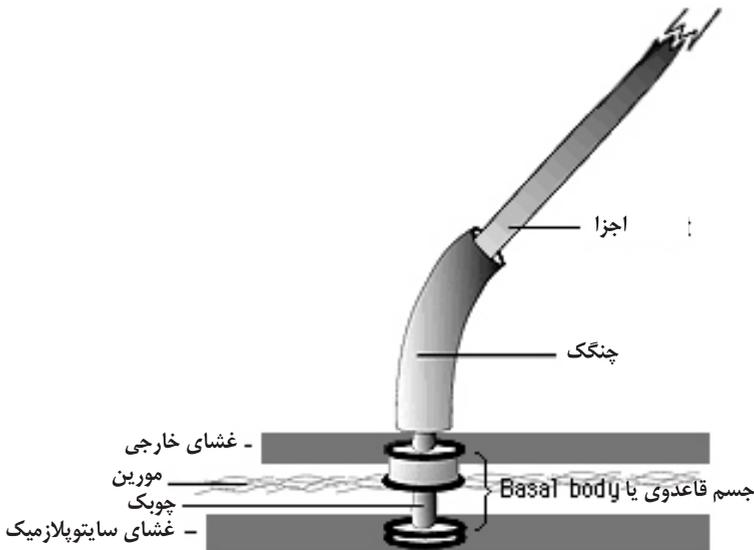
۳- باکتری‌های Peritrichus: عبارت از باکتری‌های اند که در تمام سطح خود دارای فلاجیل اند. مانند *Salmonella typhi*.

۴- باکتری‌های Amphotrichus: عبارت از آن نوع باکتری‌های اند که در هر دو نهایت خود یک یا چندین عدد فلاجیل دارند مانند *Spirillum Volutance*.

فلاجیل باکتریایی متشکل از چندین هزار مالیکول‌های پروتین متشکله می‌باشند که به نام flagellin یاد می‌گردد. در بعضی انواع (مثلاً *Compylobacter*)، فلاجیل مرکب از دو نوع فلاجیلین می‌باشند؛ ولی در اکثر انواع نوع واحد دریافت شده است. فلاجیل در نتیجه تراکم واحدهات آن به شکل فنر مانند یا helical به میان می‌آید. اگر فلاجیل بوسیله تکان میخانیکی برداشته شوند، به زودی در نتیجه سنتیز، تراکم، و بیرون آوردن واحدهات فلاجیلین، فلاجیل جدید تشکیل نموده و در ظرف 3-6 دقیقه تحرک دوباره اعاده می‌گردد. ساختمان اساسی فلاجیلین

احتمالاً در انواع مختلفه باکتری ها از هم متفاوت می‌باشند. پروتئین‌های فوق شدیداً آنتی‌جینیک بوده (H.antigens) و بعضی عکس العمل‌های معافیتی بر علیه اتانات به این پروتئین‌ها مربوط می‌باشد.

فلاجیل توسط یک ساختمان مغلق که متشکل از یک چنگک و یا یک قاعده می‌باشد به حجره باکتریایی التصاق می‌نماید. چنگک ساختمان کوتاه منحنی مانند بوده و طوری معلوم می‌گردد که بحیث یک مفصل عمومی میان motor که در قاعده موجود است و خود فلاجیل عمل می‌نماید. Basal body یا قاعده یک ست حلقه‌ها را دارا می‌باشد که یک جوهره در باکتری‌های گرام مثبت و دو جوهره در باکتری‌های گرام منفی می‌باشند. ساختمان الکترون مایکروسکوب و دی‌گرام‌های تشریحی در ساختمان‌های گرام منفی نشان داده شده است. حلقه‌های P و L در حجات گرام مثبت موجود نمی‌باشند. طی مطالعات جنی‌تیک ساختمان مغلق فلاجیل آشکار گردیده که بیش از 40 جین مؤلد در قسمت تجمع و وظایف آن دخیل می‌باشند.



شکل ۱- ۱۵ ساختمان فلاجیل

ب: وظیفه: فلاجیل های باکتریایی چرخنده های نیمه جامد فنری بوده که حجره به آن به صورت حرکی چرخش می‌دهد. این چرخش ذریعه جریان یافتن پروتون ها بطرف حجره به اساس میلان (گرادیانت) تولید شده توسط پروتون پمپ های اساسی به میان می‌آید؛ در عدم موجودیت منبع انرژی میتابولیک این قدرت توسط قوه محرکه پروتونی که توسط آیونفورها تولید می‌گردد به دست می‌آید. باکتری هایی که در محیط الکالین زندگی می‌نمایند (alkalophile ها) این انرژی را بیشتر از گرادیانت آیون سوئیم برای تأمین تحرکیت فلاجیل، بدست می‌آورد تا از گرادیانت پروتون.

تمام اجزای مربوط به موتور فلاجیل در لفاف حجروی موجود اند. فلاجیل هایی که به لفاف حجروی مجزا و سربسته وصل باشند، تا زمانی فعالیت می‌نمایند که مرکبات تنفسی در وسط موجود و یا گرادیانت پروتون به طور تصنعی ایجاد گردیده باشد.

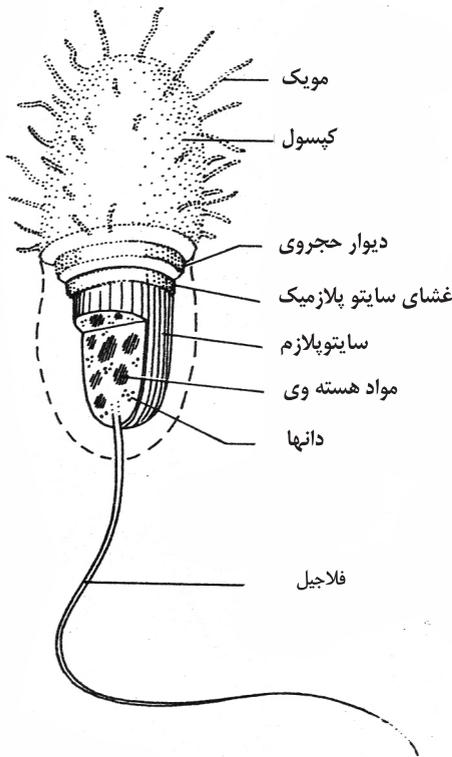
هر زمانیکه یک باکتری peritrichous شنا می‌نماید، فلاجیل آن طوری باهم یکجا می‌گردند که یک بندل خلفی را تشکیل داده و با دورهای مخالف عقربه ساعت، حجره را به طرف مقابل به یک خط مستقیم می‌رانند. در خلال وقفه ها، فلاجیل سمت حرکت را تغییر داده و بطور آنی از هم جدا می‌گردند و در نتیجه باعث توقف حجره گردیده و به طرف یک سمت جدید که به صورت اتفاقی تعیین می‌گردد، شنا را از سر می‌گیرد. این خاصیت باعث می‌گردد که chemotaxis به میان آید یعنی حرکت مایکروب به طرف مواد کیمیاوی یا حرکت خالص حجره بطرف منبع می‌باشد. موجودیت جاذب کیمیاوی (مانند قند و یا یک آمینواسید) به کمک آخذه هایی محسوس می‌گردد که در غشای حجروی موقعیت دارند (در بسیاری انواع، عین آخذه در انتقال مالیکول ها از طریق غشا سهیم اند). حجره باکتریایی برای تشخیص گرادیانت های کیمیاوی ساحوی ناقادر تلقی می‌گردد (یعنی گرادیانت های موجود میان دو قطب را نمی‌توانند کشف نمایند)، ولی تجارب نشان داده که حجره می‌تواند قادر به تشخیص گرادیانت های زمانی باشد، یعنی غلظت های را که زمان دور شدن حجره از منبع جاذب کاهش می‌یابد و زمان نزدیک شدن حجره به جاذب ازدیاد می‌یابد، تشخیص نموده می‌تواند. بعضی مرکبات به عوض جاذب بودن بحیث دافع فعالیت می‌نمایند. یکی از میخانیکیت هاییکه ذریعه آن حجرات به مواد جاذب و یا دافع عکس العمل نشان می‌دهند عبارت عملیه‌های cGMP-mediated methylation و demethylation پروتین‌های خاص در غشا می‌باشد. مواد جاذب باعث

نهی مؤقتی demethylation این پروتین‌ها گردیده در حالیکه مواد دافع باعث تحریک demethylation پروتین‌های متذکره می‌گردد.

میخانیکیت که بواسطه آن تغییری در خاصیت حجره در عکس العمل با یک تغییر در محیط به میان می‌آید به نام sensory transduction یاد می‌گردد. Sensory transduction نه تنها مسؤؤل chemotaxis می‌باشد؛ بلکه همچنان مسؤؤل aerotaxis نیز می‌باشد (حرکت بسوی غلظت مطلوب اکسیجن)، phototaxis (حرکت باکتری فوتوسنتتیک بطرف نور) و electron acceptor taxis (حرکت باکتریای تنفسی بطرف اکسپتورهای الکترونی بدیل از قبیل nitrate و fumerate) می‌باشد. درین سه نوع رسپتورها، مانند chemotaxis حرکت خالص توسط تنظیم عکس العمل حرکی صورت می‌گیرد.

(Fimbriae) Pili

بسیاری باکتری‌های گرام منفی دارای ضمایم سطحی سخت می‌باشند که به نام pili (کلمه لاتین به نام موی) و یا fimbriae ("fringes") (L) می‌باشند. ساختمان‌های متذکره نظر به فلاجیل کوتاه تر و باریکتر بوده؛ و همانند فلاجیل متشکل از واحداث فرعی پروتینی به نام pilinها می‌باشند. بعضی pili دارای یک نوع واحد pilin بوده و در سایرین بیشتر از یک نوع pilin موجود می‌باشند. پروتین‌های کوچک که در بالای سطح pili قرار دارند، مسؤؤل اتصال آن اند. دو نوع pili موجود اند: pili معمولی که در چسپیدن باکتری‌های همزی symbiont به حجره میزبان نقش دارد؛ و pili جنسی که



شکل ۱-۱۶ دیاگرام مقطعی باکتری

مسئول یکجا نمودن حجرات donor و recipient در پروسه conjugation باکتریایی می‌باشد. Pili در (شکل ۱ - ۱۶) ارائه گردیده که در آن pili جنسی توسط ذرات فاژ پوشیده شده که برای آن منحنیت رسپتورهای خاص فعالیت می‌نمایند. مالیکول های pilin به شکل فنرمانند ترتیب یافته و یک سلندر مستقیم را تشکیل می‌دهند که قادر به چرخش نبوده و فاقد قاعده کامل می‌باشد.

Virulence باکتری های معین پتوجن نه تنها مربوط تولید توکسین می‌باشد؛ بلکه "colonization antigens" نیز در آن رول دارد. و چنین دریافت گردیده که انتیجن های متذکره عبارت از pili های معمولی و مسئول تامین خاصیت چسپندگی می‌باشند. در اشکال E.coli enteropathogenic هر دو خاصیت یعنی تولید توکسین و انتیجن های (pili) colonization از نقطه نظر جنیتیک توسط پلازمیدهای قابل انتقال تعیین می‌گردند.

در یک گروه coccus های گرام مثبت یعنی streptococc ها، fimbriae محل انتیجن عمده سطحی یعنی M protein می‌باشد. Lipoteichoic acid مترافق با این fimbria ها مسئول چسپیدن گروه streptococc A ها به حجرات اپیتیل میزبان می‌باشد.

Pili در باکتریای مختلفه از نقطه نظر انتیجینیک از همدیگر متمایز بوده که باعث تشکل انتی بادی در میزبان می‌گردند. انتی بادی ها در مقابل pili یک نوع باکتری باعث جلوگیری از اتصال نوع دیگر نخواهد گردید. بعضی باکتریها مثلاً N. gonorrhoeae، قادر اند تا pili با انتیجینهای متفاوت را تولید نماید (دگرگونی انتیجینیک) و بنابراین در موجودیت انتی بادی ها در مقابل انواع قبلی pili، نیز می‌توانند به حجرات اتصال یابند.

اندوسپور ها (Endospores)

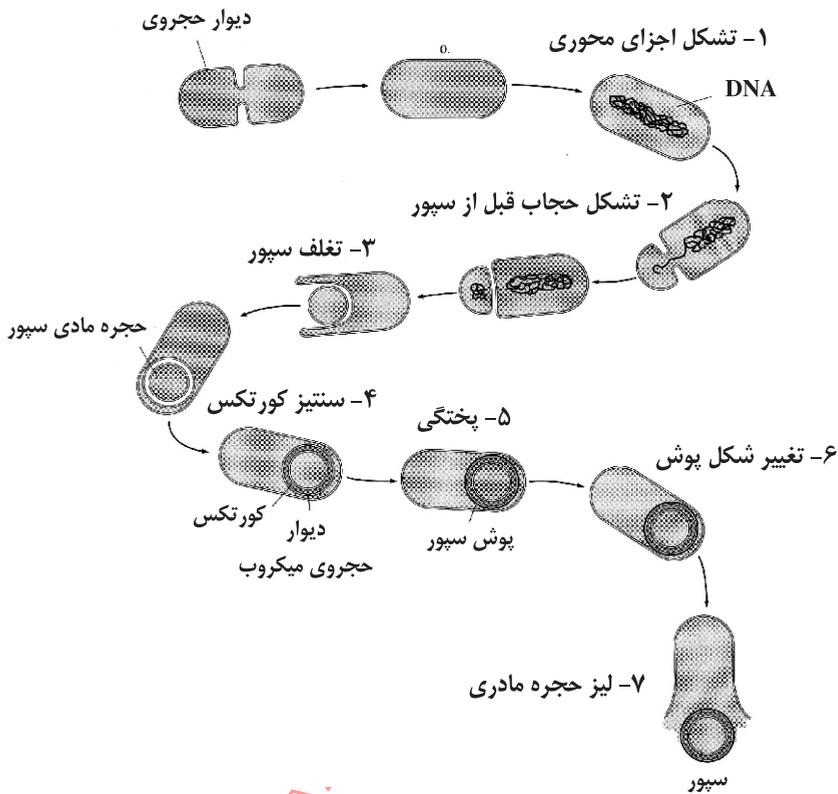
باکتری های چندین جنس قادر به تشکل endospore می‌باشند. دو نوع بسیار معمول آن قرار ذیل اند: rod های گرام مثبت، که شامل باسیل های جنس ایروبییک اجباری و clostridium جنس انیروبییک اجباری می‌باشند و coccus های گرام مثبت sporosarcina و احتمالاً عامل ریکیتسیایی Q-fever، Coxiella burnetii می‌باشند. اورگانیزم‌های فوق در عکس العمل با شرایط محیطی یک سلسله تغییراتی را از خود نشان می‌دهند طوریکه: در شرایط فقدان غذایی هر حجره یک سپور واحد داخلی را می‌سازد که در صورت اوتولیز حجره مادری،

آزاد می‌گردد. سپور یک حجره در حال استراحت بوده که در مقابل خشکی، حرارت و مواد کیمیای شدیداً مقاوم می‌باشد، در صورت مساعد شدن شرایط غذایی دوباره فعال گردیده و سپور یک حجره واحد نباتی vegetative را تولید می‌نماید و یا به عباره دیگر سپور ها عبارت از اجسام مدور یا بیضوی اند که در داخل حجره باکتری تشکیل گردیده که از جمله خصوصیت ارثی بعضی از مایکرواورگانیزم‌ها محسوب شده که در مرحله معین از تکامل حیاتی مایکرواورگانیزم‌ها صورت گرفته باعث مقاومت و قدرت حیاتی بیشتر شان به مقابل حوادث خارجی می‌گردد.

الف: تولید سپور (Sporulation):

پروسه تولید سپور زمانی آغاز می‌گردد که شرایط غذایی نامساعد گردد، فقدان منابع نایتروجن یا کاربن (و یا هر دو) عامل عمده شمرده می‌شود. تولید سپور به صورت کتلوی در کلچرهای واقع می‌گردد که مرحله نشونما را به نسبت این فقدان پایان داده اند. تولید سپور در بر گیرنده تولید تعداد زیادی ساختمان ها، انزایم ها و میتابولیت های جدید و از بین رفتن بسیاری اجزای نباتی حجره می‌باشد. این تغییرات یک پروسه واقعی تفریق پذیری را نشان می‌دهد: یک سلسله جین‌هایی که تولیدات آنها شکل و ترکیب نهایی سپور را تعیین می‌نمایند فعال گردیده و در عین حال سلسله دیگر جین‌ها که مسؤول وظایف نباتی حجره می‌باشند غیرفعال می‌گردد. این تغییرات باعث دگرگون نمودن خصوصیت ترانسکریپشن RNA polymerase گردیده، که بواسطه یکجاشدن پروتین اساسی پولیمیر با یکی از پروتین‌های promoter- specific که به نام فکتور سگما یاد می‌شود صورت می‌گیرد. فکتورهای مختلفه سگما در جریان نشونمای نباتی و تولید سپور تولید می‌گردند.

سلسله تولید سپور بسیار مغلق می‌باشد: تفریق پذیری حجره نباتی *B subtilis* به یک endospore تقریباً 7 ساعت را در شرایط لابراتوار در بر می‌گیرد. درین پروسه وقایع مختلفه مورفولوژیک و کیمیای طی مراحل متوالی صورت می‌گیرند. هفت مرحله مختلفه تشخیص گردیده اند. در جریان پروسه بعضی باکتری ها انتی بیوتیک های پیتایدی را آزاد می‌سازند که ممکن در تنظیم sporogenesis نقش داشته باشند.



شکل ۱- ۱۷ مراحل تشکیل سپور

از نظر مورفولوژی تولید سپور با تولید یک filament قاعدوی آغاز می‌گردد (شکل ۱- ۱۷) این پروسه با قات شدن غشای بطرف داخل آغاز شده و یک ساختمان مضاعف غشایی را به میان می‌آورد که سطوح آن شباهت به سطح سنتیز کننده دیوار حجروی لفاف حجروی دارد. نقاط نمونکننده طور پیشرونده بطرف قطب حجره پیش رفته و سپور در حال انکشاف را احاطه می‌نماید. این دو غشای سپور بعداً در سنتیز فعال طبقات خاص حصه می‌گیرند که لفاف حجروی را تشکیل می‌دهند. دیوار سپور و کورتکس میان غشاهای مقابل هم قرار دارند. *coat* و *exosporium* در خارج از غشاهای مقابل قرار دارند. در سایتوپلازم جدید تشکیل و یا *core* بسیاری انزایم‌های نباتی حجرات کاهش یافته و توسط یک سیت از اجزای تشکیل دهنده خاص سپور تعویض می‌گردند. سپور ها از نظر موقعیت خود در حجره *bacill* به اشکال ذیل تصدیف می‌گردد:



۱- سپورهایی که موقعیت مرکزی دارند مانند *baullus anthracis*



۲- سپور هایی که موقعیت نهایی دارند مانند *clastridium tetani*



۳- سپورهایی که موقعیت تحت نهایی دارند مانند *clostridium botulinum*

ب: خصوصیات اندوسپور

۱- کور (Core): عبارت از پروتوبلاست سپور می‌باشد. که دارای یک هسته کامل (کروموزومها)، تمام اجزای مربوط به جهاز سنتز پروتین و سیستم تولید انرژی ذریعه عملیه *glycolysis* می‌باشد. سائتوکروم ها حتی در انواع ایروبییک کمبود می‌باشند، که سپورهای این انواع متکی به *Electron transport pathway* مختصر حاوی *flavoprotein* ها می‌باشد. یک‌عده انزایم‌های حجرات نباتی طور مقداری ازدیاد می‌یابد (مثلاً *alanine recemase*) و یک عده انزایم‌های بالخاصه (مثلاً *dipicolinic acid synthetase*) تشکیل می‌یابند. انرژی لازم برای نشونما به غرض *ATP* به شکل *3-phosphoglycerate* ذخیره می‌گردد.

مقاومت سپورها در مقابل حرارت قسملاً به نسبت حالت *dehydrate* آنها و قسملاً به نسبت موجودیت مقادیر زیاد *calcium dipicolinate* (5-15% وزن خشک سپور) می‌باشد، که اخیرالذکر در *lysine biosynthetic pathway* از یک میانجی به‌میان می‌آید. به طرق که تا هنوز بخوبی دانسته نشده اند، خصوصیات متذکره باعث ثبات به انزایم‌های سپور می‌گردند، که اکثریت آنها زمانیکه از حجره به شکل محلول تجزید گردند در مقابل حرارت به‌صورت نورمال غیر مقاوم می‌باشد.

۲- دیوار سپور: داخلی ترین طبقه ایکه غشای داخلی سپور را احاطه می‌نماید به نام دیوار سپور یاد می‌گردد. که دارای پپتیدوگلاایکان نورمال بوده و به دیوار حجروی حجرات نباتی نشونما کننده تبدیل می‌شود.

۳- کورتکس *cortex* ضخیم ترین طبقه لفاف سپور می‌باشد. که دارای یک شکل غیرمعمول پپتیدوگلاایکان می‌باشد و حاوی رابطه های متقابل کمتر نظر به پپتیدوگلاایکان دیوار حجروی می‌باشد. پپتیدوگلاایکان کورتکس در مقابل *lysozyme* نهایت حساس بوده، که اوتولیز آن در نشونمای سپور نقش دارد.

۴- پوش یا *coat* از یکنوع پروتین کراتین مانند ترکیب گردیده که دارای تعداد زیاد رابطه‌های *disulfide* داخل مالیکولی می‌باشند. خاصیت غیرقابل نفوذیه این طبقه باعث می‌گردد که سپور در مقابل مواد کیمیای ضد باکتریایی مقاومت نسبی نشان دهد.

۵- *Exosporium*: اگزوسپوریوم عبارت از یک غشای لیپوپروتینی دارای یک اندازه کاربوهایدریت می‌باشد.

• فعالیت: بسیاری اندوسپورها قادر نیستند تا بعد از تشکل به صورت فوری به فعالیت آغاز نمایند، ولی پس از استراحت چند روزه و یا فعال شدن برای بار اول در یک وسط غنی مغذی پس از تخریب پوش سپور توسط یکی از عوامل می‌توانند به شکل فعال در آیند. از جمله عاملین که بالای سپور به صورت دراماتیک غلبه حاصل می‌نمایند یکی حرارت، تخریش، اسیدی بودن و مرکبات دارنده گروپ های آزاد *sulphydryl* می‌باشند.

• *Initiation*: پس از فعال شدن در صورت مساعد بودن شرایط محیطی سپور *germination* را آغاز می‌نماید. انواع مختلفه آخذه هایی را دارند که قادر به تفکیک سنگنال های وسط مغذی می‌باشند، بنا برین، در یک نوع آغاز فعالیت توسط *L-alanine* و در نوع دیگر توسط *adenosine* تحریک می‌گردند. اتصال به *effector* باعث فعال شدن یک نوع *autolysin* گردیده که به سرعت پپتیدوگلائیکان کورتکس را می‌شکند. آب گرفته شده و *calcium dipicolinate* آزاد ساخته می‌شود، و یکتعداد دیگر مواد متشکله سپور توسط انزایم‌های هایدرولازینیک شکستنده می‌شوند.

• *Outgrowth*: تجزیه کورتکس و طبقات خارجی باعث به میان آمدن یک حجره جدید نباتی می‌گردد که مشتمل بر پروتوپلاست سپور با دیوار احاطه کننده آن می‌باشد. یک دوره بیوسنتز فعال طی می‌گردد که با انقسام حجروی خاتمه می‌یابد این دوره به نام *outgrowth* یاد می‌گردد. *Outgrowth* موجودیت تمام مواد مغذی اساسی برای نشونمای حجره را ایجاب می‌نماید.



تلوین Staining

مواد ملونه با پروتوپلازم باکتریایی طور کیمیای ترکیب می‌گردند، در صورتیکه قبلاً زنده باشد، پروسه تلوین باعث مرگ آن می‌گردد. ازینرو این پروسه دارای اثر بوده و ممکن تغییرات مصنوعی *artifact* را سبب شود.

مواد ملونه ایکه بیشتر معمول اند عبارت از نمک ها می‌باشند. مواد ملونه قلعوی متشکل از یک کتیون رنگه و یک انیون بیرنگ می‌باشد (طور مثال *methylen blue+ chloride*): مواد ملونه اسیدی برعکس آن می‌باشند (طور مثال *sodium+ eosinate*). حجرات باکتریایی از نقطه نظر داشتن اسیدهای هستوی غنی می‌باشند این نوکلئیک اسیدها حامل چارج منفی به

شکل گروپ های فوسفات می‌باشند که با چارج های مثبت رنگهای قلوی ترکیب می‌گردند. رنگهای اسیدی حجرات باکتریایی را تلوین نمی‌کنند و بنابراین برای تلوین مواد محیطی یا اطراف باکتری به کار می‌روند که باعث تولید یک رنگ متباین می‌گردد. رنگهای قلوی حجرات باکتریایی را طور همسان تلوین می‌نمایند مگر اینکه RNA سایتوپلازمیک قبلاً به تخریب مواجه گردیده باشد. تخنیک های خاص تلوین به کار می‌روند تا بوسیله آن فلاجیل، کپسول، دیوار حجروی، غشای حجروی، گرانول ها، هسته و سپور متمایز گردند.

تلوین گرام Gram stain

تلوین گرام در سال 1884 میلادی توسط Hans cristian Gram مایکروبیولوژیست دنمارکی به‌میان آمد و به اساس این تلوین تمام مایکرواورگانیزم‌ها به دو گروپ Gram positive و Gram negative تقسیم می‌شوند علت این واکنش ارتباط به ساختمان کیمیایی دیوار حجروی دارد. دیوار حجروی باکتری‌های گرام منفی مقدار بیشتر لیپید را احتوا نموده و مقدار کمپلکس murien آن کم می‌باشد و همچنان ضخامت آن از دیوار حجروی باکتری‌های گرام مثبت کمتر است (ضخامت دیوار حجروی باکتری‌های گرام مثبت $100-500 \text{ \AA}$ ، درحالیکه این دیوار در باکتری‌های گرام منفی $100-150 \text{ \AA}$ می‌باشد) الکل غلیظ دیوار حجروی باکتری‌های گرام منفی را حل نموده یا تغییر ساختمان می‌دهد در نتیجه فرار Complex کرسنال Gension Violet را از حجره میسر ساخته در نتیجه باکتری‌های گرام منفی رنگ Carbol fuchsin را به خود گرفته و به رنگ سرخ دیده می‌شود.

تلوین Acid-Fast

باکتری های acid-fast عبارت از آن نوع باکتری می‌باشند که رنگ carbol fuchsin (fuchsin قلوی در محلول فینول - الکل - آب منحل می‌گردد) را حتی بعد از مواجه شدن با ماده بیرنگ کننده هایدروکلوریک اسید الکل حفظ می‌کنند. ابتداء سمیر حجرات یک سلاید در محلول carbol fuchsin مغطوس شده و بعداً با بخار حرارت مواجه ساخته می‌شود. به تعقیب آن عملیه بیرنگ سازی توسط acid-alcohol بالای آن تطبیق می‌گردد و بالاخره یک رنگ مخالف (آبی یا سبز) به آن علاوه می‌گردد. باکتری‌های acid-fast (مایکوباکتری‌ها و بعضی

انواع actinomycete های مربوطه) رنگ سرخ را به خود اختیار می کنند و بقیه رنگ مخالف را به خود می گیرند.

تهیه، تثبیت و تلوین سمیر

توسط یک قلم الماس بالای یک سلاید مایکروسکوپ یک دایره به قطر ۱,۲ تا ۱,۵ سانتیمتر رسم کشیده و نمره ای لابراتوار را در قسمت تباشیری آن می نویسیم، سلاید را پاک نموده بالای شعله آتش قرار می دهیم. نمونه را به صورت متجانس در دایره هموار نموده، احتیاط می نماییم که دست را به شدت شور ندهیم که می تواند سبب تولید ایروسول (aerosol) گردد. مایعات مخاطی مانند مایع بین پلورا، حبن و غیره را سانتریفیوژ نموده مایع بالائی آن دور می شود. رسوب آن با یک قطره ای آخری آن مخلوط می گردد، یک لوپ ازین مخلوط در بین دایره هموار می گردد.

مواد قیچی توسط یک لوپ معقم بسیار نازک در دایره هموار می گردد یا در داخل دایره با یک لوپ آب مقطر به شکل Emulsion آورده شده در آن هموار می شود.

سواب ها به بسیار ملایمت در قسمت وسط سلاید لول داده می شود، سلایدی که با غوطه کردن در الکل و شعله قبلاً ضد عفونی شده باشد. انسان باید محتاط باشد و سواب را بالای سلاید کش نکند، زیرا این کار حجات را تخریب می کند. بگذارید سلاید در هوا خشک شود یا برای زود خشک شدن زیر چراغ آنرا بگذارید.

وقتی که سلاید به صورت مکمل خشک گردید با دو یا سه مرتبه به سرعت گذشتاندن از داخل شعله ای چراغ Bunsen آنرا با حرارت تثبیت کنید. از حرارت دادن زیاد خودداری کنید، زیرا این کار باعث نتیجه ای غلط تلوین Gram و تغییر شکل حجات می گردد. بگذارید که سلاید سرد شود.

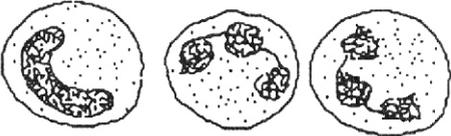
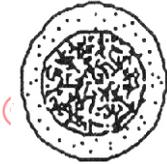
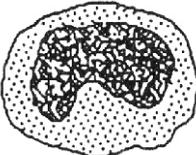
طریقه تلوین با میتیلین بلو (Methylene Blue Staining Method)

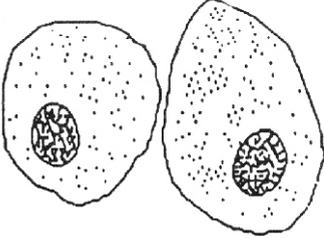
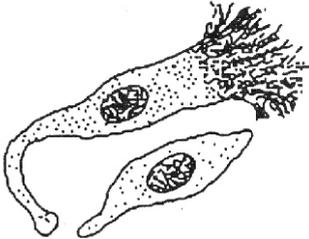
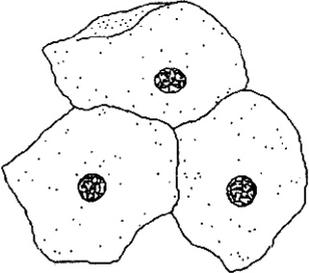
- ۱- بعد از تثبیت بالای سلاید مقدار کافی محلول رنگ میتیلین بلو (D113) باندازید.
- ۲- بگذارید که رنگ برای ۱ تا 3 دقیقه عمل نماید.
- ۳- رنگ را از بالای سلاید دور ساخته سلاید را به ملایمت طوری در آب بشوئید که عقب سلاید به طرف جریان ملایم آب باشد.

۴- عقب سلاید را با کاغذ جاذب پاک نموده در Rack آنرا بگذارید تا آب آن جریان نموده در هوا خشک شود.

۵- توسط اوبجکتیف Oil Immersion سلاید را معاینه کنید.

۶- در راپور موجودیت و تعداد حجرات قیحی را و باکتری‌ها را که آیا نادر اند یا به تعداد کم و یا بسیار زیاد یا متوسط موجود اند ذکر نمائید. همچنان شکل آنها را که به شکل Rods یا Cocci اند راپور بدهید.

<p>نوع حجره Cell type</p>	<p>خواص ساختمانی Morphological Characteristics</p>
<p>گرانولوسیت ها The granulocyte</p> 	<p>جسامت: 12-16 میکرومتر هسته: در شکل جوان به شکل U و در شکل پخته پارچه - پارچه می باشد. تعداد پارچه ها از 2 تا 5 بوده که با تار های نازک باهم وصل می باشند.</p>
<p>لمفوسیت ها The lymphocyte</p> 	<p>نوع بزرگ: جسامت: 12-16 میکرومتر سایتوپلازم. هسته: مدور با کمی فرو رفتگی نوع کوچک: جسامت 9-12 میکرومتر سایتوپلازم هسته مدور</p>
<p>مونوسیت یا مکرופاژ The monocyte or macrophage</p> 	<p>جسامت: 15-18 میکرومتر سایتوپلازم هسته</p>

<p>حجرات اپیتل انتقالی Transitional epithelial cells</p> 	<p>جسامت: 18-45 میکرومتر شکل: ناک مانند یا دوک چوب مانند. می‌تواند مدور دم دار باشد. سایتوپلازم: هسته: نسبتاً کوچک، بیضوی یا مدور</p>
<p>حجرات اپیتل تیوبولر Tubular epithelial cells</p> 	<p>جسامت: 18-32 میکرومتر شکل: طویل دوک مانند چوب مانند یا مکعبی بعضی اوقات Ciliated یا with brush border سایتوپلازم هسته: بیضوی</p>
<p>حجرات اپیتل هموار Squamous epithelial cells</p> 	<p>جسامت: 22-45 میکرومتر شکل: بزرگ، هموار، زاویه دار، می‌تواند قات شود، حتی به شکل سیگار شود. سایتوپلازم: فراوان هسته کوچک و مدور</p>

طریقه تلونین گرام (Gram Staining Method)

- ۱- بعد از تثبیت توسط حرارت بالای سلاید مقدار کافی گرام کریستال ویولیت Gram's crystal violet (D109) برای یک دقیقه بریزید.
- ۲- سلاید را توسط آب بشوئید طوری که پشت سلاید را به مقابل یک جریان آب ملایم بگیرید.

- ۳- تمام آب را چپه کنید و سلاید را با گرام آیودین (Logul) (D110) برای یک دقیقه بپوشانید.
 - ۴- محلول آئودین را با آب بشوئید طوری که عقب سلاید را بمقابل یک جریان ملایم آب بگیرید.
 - ۵- رنگ سلاید را توسط الکل به (مدت 20 تا 30 ثانیه بریدیا توسط چند قطره اسیتون به مدت 2 تا 3 ثانیه) و فوراً توسط یک جریان ملایم آب سلاید را بشوئید.
 - ۶- سلاید را با محلول رقیق Carbol fuchsin stain (D107) بپوشانید. بعد از یک دقیقه سلاید را توسط آب بشوئید طوری که عقب سلاید را به مقابل یک جریان ملایم آب بگیرید.
 - ۷- عقب سلاید را توسط کاغذ جاذب خشک کنید و بالای Rack آنرا بگذارید تا در هوا خشک شود.
 - ۸- توسط اوبجکتیف قوه ای ضعیف تمام سلاید را معاینه کنید و مناسبترین جای سلاید را برای معاینه توسط اوبجکتیف ایل ایمرشن انتخاب کنید.
- بنفش تیره باکتری‌های گرام مثبت Gram Positive bacteria
 سرخ باکتری‌های گرام منفی Gram Negative bacteria
 سایتوپلازم سرخ خفیف، هسته سرخ تیره حشرات قیچی Pus Cells
 سایتوپلازم سرخ خفیف، هسته سرخ تیره حشرات اپیتل Epithelial Cells
 بنفش تیره حشرات خمیر مایه Yeasts
- طریقه تلوین البرتس (Albert's Staining Method)**
- ۱- بعد از تثبیت با حرارت مقدار کافی Albert's stain (D104) برای ۳ تا ۵ دقیقه بالای سلاید باندازید.
 - ۲- سلاید را با آب بشوئید طوری که پشت سلاید به طرف یک جریان ملایم آب قرار داشته باشد.
 - ۳- آب را دور نموده بالای سلاید مقدار کافی (Gram's iodine 110) باندازید و بگذارید برای یک دقیقه تعامل نماید.
 - ۴- سلاید را با آب بشوئید طوری که پشت سلاید به طرف یک جریان ملایم آب باشد. پشت سلاید را همراهی کاغذ جاذب پاک نموده بگذارید در هوا خشک شود.
 - ۵- سلاید را توسط اوبجکتیف ایل ایمرشن معاینه کنید.

نتیجه

حجرات باکتری‌ها	سبز
خط‌های عرضانی حجرات باکتری	آبی - سبز
گرانول‌های میتاکروماتیک	نصواری سیاه تیره

تلوین Acid - Fast

باکتری‌های acid-fast عبارت از آن نوع باکتری می‌باشند که رنگ carbolfuchsin (fuchsin) قلوی در محلول فینول - الکل - آب منحل می‌گردد) راحتی بعد از مواجه شدن با ماده بیرنگ کنند.

هایدروکلوریک اسید الکل را حفظ می‌کنند. ابتدا سمیر حجرات یک سلاید در محلول carbolfuchsin مغطوس شده و بعداً با بخار حرارت مواجه ساخته می‌شود. به تعقیب آن عملیه بیرنگ سازی توسط acid-alcohol بالای آن تطبیق می‌گردد، و بالاخره یک رنگ مخالف (آبی یا سبز) به آن علاوه می‌گردد.

باکتری‌های acid-fast (مایکوباکتری‌ها و بعضی انواع actinomycete های مربوطه) رنگ سرخ را به خود اختیار می‌کنند و بقیه رنگ مخالف را به خود می‌گیرند.

طریقه تلوین سرد زیل نیلسن (Cold Ziehl- Neelsen Staining Method)

۱- بعد از تثبیت با حرارت یک کاغذ فلتر را که کمی خوردتر از سلاید باشد بالای سلاید بگذارید که smear را بیوشاند.

۲- بالای سلاید به اندازه کافی Cold Ziehl- Neelsen Stain (D115) برای سه دقیقه باندازید.

۳- کاغذ فلتر را برداشته سلاید را با آب طوری بشوئید که عقب سلاید به طرف جریان ملایم آب باشد.

۴- رنگ سلاید را تا رنگ گلابی خفیف توسط acid alcohol (D 48) زایل نمائید. از یک طرف سلاید گرفته آنرا بالا و پائین نمائید تا بیشتر رنگ از آن جدا نه شود. این کار برای یک smear ضخیم به طور اوسط تقریباً سه دقیقه را در بر می‌گیرد. زایل نمودن رنگ به صورت مکمل ضروری است تا نتیجه مثبت کاذب نیاید.

۵- اسید الکل را طوری بشوئید که عقب سلاید به طرف جریان ملایم آب باشد.

۶- برای یک دقیقه سلاید را با Malachite-green (D 112) تلوین نمائید.

۷- سلاید را آبکش نموده عقب سلاید را توسط کاغذ جاذب پاک کرده در هوا خشک کنید.

نتیجه

باسیل‌های اسید فاست سرخ روشن
 باسیل‌های غیر اسید فاست سبز تاریک

طریقه تلوین گیمزا (Giemsa Staining Method)

۱. سمیر (Smear) خشک شده را برای 2 تا 3 دقیقه با methanol پوشانیده و بعد آنرا بگذارید تا در هوا خشک شود. به این صورت سمیر تثبیت می‌گردد.

۲. محلول Giemsa stain (D 108) را با buffered water, pH 7.2 (D 58) ذیلاً رقیق نمائید:

برای C. trachomatis 40:1 یعنی یک ملی لیتر رنگ گیمزا 40 ملی لیتر بفر.

برای پرازیت‌های خون 10:4 یعنی 4 ملی لیتر رنگ گیمزا 40 ملی لیتر بفر.

۳. محلول رقیق شده ای گیمزا را بالای سلاید در یک staining جار باندازید تا سمیر را بپوشاند.

۳. سمیر را در داخل رنگ قرار ذیل بگذارید:

C. trachomatis را برای 1.5 تا 2 ساعت و پرازیت‌های خون را برای 25 تا 30 دقیقه.

۴. ستینینگ جار را در لگن دستشوئی گذاشته و آب نل را بالای آن جاری سازید تا کف آن از جار سر ریزه کند. این کار باعث می‌شود تا گرانول‌های رنگ در بالای سمیر رسوب نکند.

۵. سلاید را در جار "jar" در آب نل بشوئید، پشت آنرا با کاغذ جاذب پاک کرده در Rack آنرا بگذارید تا در هوا خشک شود.

۶. تلوین را با استفاده از اوبجکتیف قوه ای ضعیف مایکروسکوپ چک نموده بعد با اوبجکتیف آیل ایمرشن معاینه کنید.

Bacteria shape شکل باکتری‌ها	Gram reaction تعامل گرام	Morphology ساختمان	Genus جنس
	Gram + گرام مثبت	Cocci in clusters کوکس‌های خوشه‌ای	Staphylococci
	Gram + گرام مثبت	Cocci in chains کوکس‌های زنجیری	Streptococci
	Gram + گرام مثبت	Oval diplococci with or without capsules دیلوکوک‌های بیضوی	Pneumococci
	Gram - گرام منفی	Diplococci	Neisseria
	Gram + گرام مثبت	Diphtheroids (like Chinese letters) دیفترئوید مانند حروف چینی	Corynebacterium
	Gram + گرام مثبت	Branching chains زنجیرهای شاخه‌دار	Lactobacillus
	Gram + گرام مثبت	Rods with spores چوبک با اسپور	Bacillus
	Gram + گرام مثبت	Rods with terminal or sub terminal spores چوبکها با اسپورهای نهائی یا در وسط	Clostridium
	Gram + گرام مثبت	True branching rods چوبک‌های شاخه‌دار حقیقی	Actinomyces
	Gram - گرام منفی	Uniform rods of various length & thickness	Enterobacteria ceae & other genus
	Gram - گرام منفی	Spindle-shaped rods چوبک‌های دوک‌مانند	Fusobacterium

	Gram – گرام منفی	Comma-shaped rods چوبک های به شکل کامه	Vibrio
	Gram + گرام مثبت	Budding yeasts خمیر مایه جوانه زده	Candida & other yeasts

تلوین منفی (Negative Staining)

این عملیه مشتمل بر تلوین محیط یا اطراف توسط یک رنگ اسیدی می‌باشد که حجرات را به شکل بیرنگ نمایان می‌سازد. معمولاً رنگ سیاه nitrosin مورد استفاده قرار می‌گیرد. ازین میتود برای تلوین حجرات و یا ساختمانهایی مورد استفاده قرار می‌گیرد که طور مستقیم تلوین آنها مشکل باشد.

تلوین فلاجیل

فلاجیل ها ساختمانهای بسیار باریک اند (دارای قطر 12-30µm) و بوسیله مایکروسکوپ نوری قابل رویت نمی‌باشند. با وجود آن، موجودیت و ترتیب آنها با مواجه ساختن حجرات با سسپنشن کلوئیدی بی ثبات نمک های tanic acid واضح می‌گردد. با بکار برد عملیه متذکره رسوب زیاد بالای دیوار حجروی و فلاجیل به میان می‌آید. بدین ترتیب قطر ظاهری فلاجیل به اندازه یی ازدیاد می‌یابد که با تطبیق تلوین fuchsin قلوی در تحت مایکروسکوب نوری قابل مشاهده می‌گردد.

در باکتری های peritrichous، فلاجیلها حین حرکت به شکل بندل ها در می آیند، این بندل ها به اندازه کافی ضخامت داشته و مشاهده آن تحت مایکروسکوب ساحه تاریک و phase contrast صورت گرفته می‌تواند.

تلوین کپسول

توسط عملیه تلوین منفی و یا معادل آن به مشاهده می‌رسد. یکی از میتودهای تلوین کپسول عبارت از (Welch Method) می‌باشد که در آن از محلول crystal violet استفاده شده و به تعقیب آن با محلول copper sulfate شستشو می‌گردد. محلول اخیرالذکر برای از بین بردن رنگ اضافی بکار می‌رود زیرا شستن با آب باعث منحل کردن کپسول خواهد شد. علاوه‌تاً نمک مس به اطراف نیز رنگ می‌دهد که بالتیجه حجره و محیط اطراف آن رنگ آبی تیره را به خود اختیار نموده در حالیکه کپسول دارای رنگ آبی خفیف تر خواهد بود.

تلوین هسته

هسته‌ها توسط رنگ feulgen که مختص به DNA می‌باشد قابل تلوین می‌باشند.

تلوین سپور

سپورها اکثر اوقات در حجره تلوین ناشده به شکل اجسام روشن داخل حجروی و در حجره تلوین شده به شکل یک ساحه بیرنگ به مشاهده می‌رسند. دیوار سپور نسبتاً طور نسبی غیرقابل نفوذیه می‌باشد؛ ولی رنگ‌هایی موجود اند که با حرارت دادن مستحضر، قادر به نفوذ در آن می‌گردند. عین قابلیت غیرقابل نفوذیه بعداً در قسمت جلوگیری از بیرنگ ساختن سپور حین مواجه کردن آن با الکل نقش دارد در حالیکه با عین میتود حجرات نباتی بیرنگ ساخته شده و بالاخره با رنگ مخالف تلوین گردیده می‌تواند. سپورها معمولاً با رنگ‌های malachite green و یا carbolfuchsin تلوین می‌گردند.

تغییرات مورفولوژیک حین نشونما

انقسام حجروی

به صورت عموم، باکتری‌ها ذریعه عملیه انقسام دوگانه تکثر می‌نمایند. متعاقب طویل شدن حجره، یک غشای مستعرض حجروی تشکل و بعداً دیوار جدید حجروی را به میان می‌آورد. در باکتری‌ها، غشای مستعرض و دیوار جدیدالتشکیل از طبقات خارجی به طرف داخل نشونما نموده درین پروسه میوزوم‌های جداری طور صمیمی اشتراک دارند. هسته که قبل از انقسام دوچند گردیده است، به صورت مساویانه به دو حجره دختری تقسیم می‌گردد.

اگرچه باکتری‌ها فاقد دوک میتوتیک یا (mitotic spindle) اند، ولی غشای مستعرض به نحوی تشکل می‌یابد که کروموزوم‌ای تشکیل شده در اثر chromosomal replication را از همدیگر جدا می‌سازد. این پروسه با التصاق کروموزوم‌ها به غشای حجروی تکمیل می‌گردد. مطابق به یک مودل، اتمام یک سیکل DNA replication سنتیز فعال غشا را در بین نواحی التصاق دو کروموزوم دختری به میان می‌آورد که بوسیله نموی غشای مستعرض به طرف داخل از هم جدا می‌گردند. ذخیره مواد در دیوار حجروی جدیدالتشکیل ادامه یافته و منتج به طویل شدن و بالاخره تضاعف لفاف حجروی می‌گردد.

دسته بندی حجره

اگر حجرات بعد از انقسام موقتاً باهم چسپیده باقی بمانند، دسته بندی ها با مشخصات معین به میان می آیند. مطابق به پلان انقسام و دفعات انقسام که در آن حجرات باهم چسپیده باقی می مانند، اشکال ذیل در coccus ها حاصل می گردند: زنجیری (ستریپتوکوکس)، جوهره یی (نوموکوکس)، بندل های مکعبی (sarcinae) و یا پلک های هموار. Rod ها ممکن جوهره ها و یا زنجیرها را تشکیل دهند.

متعاقب انشقاق در بعضی باکتری ها حرکات خاص پس از انشقاق صورت می گیرند. طور مثال حرکت شلاق مانند یا whipping حجرات را به موقعیت های موازی در می آورند؛ انقسام مکرر و حرکات شلاق مانند منتج به خصوصیت ترکیب pallisading در باسیل های دیفتتری می گردد.

تغییرات در سیکل حیاتی

در جریان انکشاف باکتری از شکل ساکن به شکل محرک، یکتعداد تغییرات معین قابل رویت به میان می آیند. حجرات تمایل به بزرگ شدن داشته، گرانول ها را از دست داده و پروتوپلازم با مواد ملونه قلوی رنگ تاریک تر را به خود می گیرد. زمانیکه نشونما دوباره آهسته گردد، تغییرات مخالف به صورت تدریجی به میان می آیند. بالاخره، در کلچرهای کهنه حجراتی دریافت می گردند که دارای مورفولوژی غیرمعمول می باشند این اشکال به نام involution forms یاد می گردند. چنین حجرات دارای فلامنت ها، جوانه ها، حجرات شاخوی بوده که اکثر شان زنده نمی باشند.

تصنیف باکتری ها

تعريفات: تصنیف، نامگذاری و تشخیص عبارت از سه عرصه مجزا، ولی باهم مرتبط در علم تکسانومی می باشند. تصنیف عبارت از تنظیم اورگانیزم‌ها به اساس شباهت ها و روابط به داخل گروپ های توکسانومیک می باشد. تصنیف اورگانیزم‌های پروکاریوتیک مانند باکتریها مستلزم معلوماتی می باشد که به صورت تجربوی و نیز بشکل نظری به دست آید، زیرا مشخصات بیوشمیک، فزیولوژیک، جنتیک و مورفولوژیک اکثراً برای توضیح کافی گروپ های توکسانومیک لازم می باشند. نامگذاری عبارت از تعیین نام اورگانیزم‌ها به اساس قواعد بین

المللی و در مطابقت با مشخصات همان اورگانیزم می‌باشد. تشخیص عبارت از استفاده عملی از تصنیف جهت نیل به اهداف ذیل می‌باشد:

- ۱- تجرید و تفکیک اورگانیزم‌های مطلوب از غیر مطلوب
- ۲- تصدیق و تأیید خواص اورگانیزم در کشت و یا در حالات کلینیکی
- ۳- تجرید و تشخیص عوامل سببی امراض. هدف اخیر الذکر ممکن تعیین تداوی انتخابی را جهت محو اورگانیزم مساعد سازد. عملیه تشخیص صرف بعد از تصنیف مناسب یک گروه ممکن می‌باشد.

معیارات تصنیف باکتری

معیارات مناسب برای تصنیف باکتری مشتمل بر عده زیادی از مشخصات ذکر شده در فوق می‌باشد. معلومات مفیدی را می‌توان ذریعه معاینه مایکروسکوپی و مشاهده شکل حجره و موجودیت و یا عدم موجودیت ساختمانهای بخصوص مانند سپور و فلاجیل فراهم نمود. پروسیجرهای تلوین مانند تلوین گرام در مورد ماهیت حجره معلوماتی مفیدی ارایه نموده می‌تواند. عده از باکتریها سبب تولید صباغات وصفی گردیده و عده دیگر به اساس انزایم‌های خارج الحجروی خود تشخیص می‌گردد. فعالیت این پروتین‌ها را اکثراً می‌توان به شکل ساحات شفاف در اطراف کالونیهای که در موجودیت مواد غیر قابل حل روئیده باشد، دریافت نمود. (مثلاً هیمولیز در وسط اگر که حاوی حجرات سرخ خون باشد). تعاملات متصالبه ایمنونولوژیک می‌تواند در مورد ساختمان‌های سطحی مشابه در باکتریهای متفاوت معلومات دهد. تست‌های مانند تست اوکسیداز که در آن از *electron acceptor* مصنوعی استفاده به عمل می‌آید، جهت تفکیک اورگانیزم‌ها به اساس موجودیت انزایم تنفسی (*cytochrome C*) استعمال می‌گردد. تست‌های ساده بیوشمیک می‌تواند در مورد موجودیت فعالیت‌های مشخص میتابولیک معلومات موثق دهد. معیارات تعیین موفقانه گروه باکتریهای مرتبط با هم، مشتمل بر اندازه گیری حساسیت آنها در مقابل انتی بیوتیکها می‌باشد.

همه مشخصات قبل الذکر توسط جین‌های اورگانیزم‌های مورد معاینه به صورت مستقیم و یا غیر مستقیم تعیین می‌گردد. انکشافات و پیشرفت‌های در عرصه بیولوژی مالیکولی ممکن می‌سازد تا مرتبط بودن جین‌های انواع مختلفه باکتری‌ها را مورد تحقیق قرار دهیم.

اهمیت معیارات توکسانومیک بستگی به گروه مورد معاینه دارد. مشخصاتی که در اعضای یک گروه به صورت مشترک موجود باشد، برای تفکیک اعضای آن مفید نمی‌باشد، اما می‌توان گروه را توسط آن تعریف نمود، (مثلاً همه ستافیلوکوک‌ها انزایم کتلاز را تولید می‌نمایند.) علاوتاً بی‌ثباتی

جنیتیک می‌تواند سبب تغییرپذیری زیادی در عده‌ای از اورگانیزم‌ها گردد، مثلاً جین‌های مقاومت در مقابل انتی‌بیوتیک‌ها و یا جین‌های کودکننده انرژی‌ها توسط پلازمیدها انتقال یافته می‌تواند. (پلازمید عبارت از عناصر جنیتیک خارج از کروموزوم بوده که میان باکتری‌های غیر مرتبط تبادل‌گرددیده می‌تواند). اکثریت معیارات تصنیف به اساس نموی مایکرواورگانیزم‌ها در لابراتوار استوار می‌باشد. بعضاً اورگانیزم‌های پتوجن مانده *treponema* در لابراتوار نمی‌رویند و در چنین حالات معاینات نوکلئیک اسیدها ممکن مفید باشد.

سیستم‌های تشخیص و تصنیف

کلیدها

کلیدها باکتری‌ها را به شیوه‌ی تنظیم می‌نماید که تشخیص مؤثر اورگانیزم‌ها را ممکن می‌سازد. یک سیستم تشخیصیه آیدیال باید کمترین مشخصات لازم برای تشخیص درست را در بر داشته باشد. گروه‌ها به اساس موجودیت (+) و یا عدم موجودیت (-) مشخصات تشخیصیه به گروه‌های فرعی تقسیم می‌گردد. ادامه پروسه با استفاده از مشخصات مختلفه محققین را قادر می‌سازد تا کوچکترین گروه فرعی مشتمل بر اورگانیزم مورد مطالعه را دریافت نماید. در مراحل ابتدایی ممکن گروه‌های فرعی تشکیل‌گردد که از نظر جنیتیک با هم مرتبط نباشد. مثلاً باکتری‌های که صباغ سرخ را تولید می‌نماید، گروهی را تشکیل می‌نمایند که باکتری‌های بسیار متفاوت مانند *Serratia marcescens* و باکتری فوتوستنتیتیک بنفش در آن شامل می‌باشد. دو نوع متذکره باکتری‌ها اشکال متفاوت داشته و به دو شکل کاملاً متفاوت میتابولیزم انرژی متکی می‌باشند. با آنهم تعیین مقدماتی گروه‌های باکتری مفید می‌باشد زیرا محققین را کمک می‌نماید تا با شناسایی کلچرهای دارنده صباغ سرخ جستجو خود را به چند نوع معین مایکروبی محدود سازد.

توکسانومی عددی

توکسانومی عددی یا کمیوتری در دهه ۱۹۶۰ مروج گردید. از تشخیص کمیوتری برای ساختن تست‌های تشخیصیه که در آن انواع کلینیکی مایکروب‌ها از طریق کودهای عددی و یا سیستم‌های probabilistic تشخیص می‌گردد، استفاده به عمل می‌آید.

تصنیف فایلوژنیک (Phylogentic classification)

Phylogentic classification عبارت از اندازه‌گیری *genetic divergence* در فایلم‌های مختلفه می‌باشد. ارتباط نزدیک phylogentic میان دو اورگانیزم وانمودکننده موجودیت اجداد مشترک

میان شان می‌باشد و معلومات حاصله از فوسیل‌ها چنین نظریات را در خصوص اکثریت نباتات و حیوانات آسان ساخته است. اما چنین معلومات در مورد باکتریها موجود نمی‌باشد.

خواص جنیتیک باکتریها تبادلۀ بعضی از جین‌ها را میان اورگانیزم‌های دارنده پیوند ضعیف، ممکن ساخته است. علاوهً تکثیر باکتریها تقریباً در همه موارد بشکل vegetative بوده و میکانیزم‌های تبادلۀ جنیتیک آنها نادراً زمینه تبادلۀ حصص بزرگ از جینوم آنها را مساعد می‌سازد. بنأ مفهوم نوع species در پروکاریوت‌ها و ایوکاریوت‌ها کاملاً متفاوت است. نوع باکتریایی عبارت از گروهی از باکتریها است که مشخصات معینی میان آنها مشترک بوده و عموماً مشابهت نزدیک باهم دیگر دارند. توکسانومیست‌ها می‌توانند نوع باکتریایی را به biotypes تصنیف نمایند و می‌توانند species شامل در genera را کلاستر نمایند. جدول ذیل طبقات معمول توکسانومیک را نشان می‌دهد؛ اما عمدتاً صرف از نوع، جینس و خانواده استفاده به عمل می‌آید.

تفاوت قابل ملاحظه جنیتیک میان باکتری‌ها موجود می‌باشد و DNA باکتریها تفاوت کسب می‌نمایند؛ اما جین‌های سازنده رایبوزوم‌ها نسبتاً ثابت تر بوده و به سرعت کمتری تفاوت کسب نموده اند که در مطالعه و کشف باکتریها مفید می‌باشد.

توضیح کتگوریها و گروه‌های عمده باکتری‌ها

دو گروه عمده باکتریها موجود می‌باشد: eubacteria و archeobacteria. شکل معمولتر باکتری را تشکیل می‌دهد در حالیکه archeobacteria باعث تولید پپتیدوگلاایکان نمی‌گردد که یک تفاوت عمده را میان این دو نشان می‌دهد. همچنان archeobacteria در شرایط غیر معمول زنده‌گی می‌نمایند مانند درجه حرارت بسیار بلند، نمک زیاد و یا PH بسیار پائین. علاوهً این‌ها تعاملات غیر معمول میتابولیک را اجرا می‌نمایند مانند تشکیل میتان. ©

ایوباکتری‌های گرام منفی که دیوار حجروی دارند

این گروه غیر متجانس بوده که دارای لفاف حجروی مغلق بوده و شکل حجروی آن مدور، بیضوی، راد‌های مستقیم و تاب خورده، فتری و یا میله مانند می‌باشد. بعضی اشکال دارای کپسول بوده و تکثیر بشکل انقسام دوگانه می‌باشد اما بعضاً با جوانه زدن هم صورت گرفته می‌تواند. Myxobacteria می‌تواند myxospore و fruiting bodies را به‌میان آورد. در صورتیکه حرکت موجود باشد، ذریعه فلاجیل و یا لغزیدن صورت می‌گیرد. اعضا این گروه ممکن فوتوتروپیک و یا غیر فوتوتروپیک بوده و مشتمل بر اشکال هوازی، غیر هوازی، غیر هوازی اختیاری و microaerphilic می‌باشد. بعضی از اعضای آن پرازیت‌های مطلق داخل حجروی می‌باشد.

ایوباکتری‌های گرام مثبت که دیوار حجروی دارند

اکثراً دیوار حجروی این اورگانیزم‌ها به صورت گرام مثبت تلومین می‌گردد. حجرات ممکن مدور، میله مانند و یا چوبک‌ها باشد. چوبک‌ها و میله‌ها ممکن غیر منشعب و یا هم منشعب باشند. تکثیر عموماً توسط انقسام دوگانه بوده و بعضی اشکال سپور تولید می‌نمایند (endospores). این اورگانیزم‌ها عموماً chemosynthetic heterotrophs بوده و مشتمل بر انواع هوازی، غیر هوازی و غیر هوازی اختیاری می‌باشند. این گروه شامل بر باکتری‌های ساده دارای سپور و بدون سپور بوده و نیز انواع پیچیده و مغلق که عبارت از اکتینومایسیت‌ها و انواع مشابه آن می‌باشند، در آن شامل است.

Eubacteria های فاقد دیوار حجروی

این اورگانیزم‌ها به صورت معمول mycoplasma نامیده شده و مشتمل بر کلاس mollicutes می‌باشند. این‌ها مواد پیشقدم peptidoglycan را ساخته و توسط غشا پلازمایی احاطه گردیده‌اند. اورگانیزم‌های متذکره مشابه اشکال L بوده اما مایکوپلازما نمی‌توانند مانند اشکال L دوباره به شکل غشا دار تبدیل گردد. علاوه‌تاً هیچ تشابه جنیتهیک میان مایکوپلازما و اشکال L وجود ندارد. شش genera در مایکوپلازما موجود بوده که صرف دو آن برای انسانها پتوجن می‌باشند. این اورگانیزم‌ها بسیار pleomorphic بوده و اندازه آن متفاوت بوده که بعضی آن حتی قابل فلتر می‌باشد (0.2 میکرومتر). تکثیر ذریعه جوانه زدن، fragmentation، انقسام دوگانه و یا به صورت ترکیب از میتودهای فوق می‌باشد. اکثراً مستلزم اوساط مغلق بوده که کالونی‌های وصفی fried egg را تشکیل می‌دهد. یکی از مشخصات ویژه آن نیاز به کولسترول برای نمو می‌باشد.

Archeobacteria ها

این اورگانیزم‌ها اغلباً در شرایط غیر معمول زیست نموده بعضاً بشکل همزیستی در طرق هضمی حیوانات موجود می‌باشند. این‌ها مشتمل بر اورگانیزم‌های ایروبییک، غیر ایروبییک و غیرایروبییک اختیاری بوده و به شکل chemolithotroph heterotroph و یا facultative heterotroph می‌باشند. بعضی از انواع آن mesophiles بوده درحالیکه انواع دیگر در درجه حرارت بلندتر از ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد نمو می‌نمایند. انواع اخیرالذکر عادت به زیست نمودن در درجه‌های حرارت بسیار زیاد را کسب نموده که به نام hyperthermophilic یاد می‌شود و انزایم‌های موجود در حجرات شان نسبت به انزایم‌های حجرات میزوفیلیک باثبات تر می‌باشند. بعضی از این انزایم‌های باثبات مانند DNA polymerase / Thermus aquaticus بخش عمده از میتودهایی amplification را تشکیل می‌دهد، مانند عملیه PCR. تفاوت میان archeobacteria و Eubacteria را می‌توان توسط عدم

موجودیت دیوار حجروی peptidoglycan موجودیت شحمیات isoprenoid diether و یا diglycerol tetra ether و موجودیت RNA بخصوص، نشان داد. همچنان archaeobacteria عده ای از تشابهات مالیکولی با eukaryotes دارند. حجرات آن ممکن مختلف الشكل باشند و اشکال مدور، فنری، هموار یا میله مانند، دیده شده می‌تواند. شکل وحیدالحجروی و چندین حجروی در میله ها و یا به شکل تجمعات نیز دیده شده می‌تواند. تکثر به صورت انقسام دوگانه، جوانه زدن، constriction، fragmentation و یا میکانیزم‌های نامعلوم صورت گرفته می‌تواند.

Subtyping و استفاده از آن

در بعضی حالات مثلاً در اپیدیمی‌ها لازم است تا strains یک نوع را از هم تفکیک نمود و یا اینکه یک سترین معین را تشخیص نمود. این عملیه به نام تعیین تایپ‌های فرعی (subtyping) یاد می‌گردد. درین عملیه از مشخصات باکتریایی استفاده بعمل می‌آید که تشخیص مفصلتر از نوع را ممکن سازد. جهت متمر بودن کار در همه عملیه‌های subtyping لازم است تا مایکروب‌های مشتمل در واقعات را از مایکروب‌های غیر مشتمل تفکیک نمود. حسب معمول subtyping ذریعه biotyping، serotyping، تست‌های حساسیت مقابل‌انتهی بیوتیک‌ها، bacteriophage typing و bacteriocine typing صورت می‌گیرد. مثلاً به اساس تفاوت‌های انتیجینیک در انتیجن LPS O بیشتر از 130 سیروگروپ ویریبوکولرا کشف گردیده اند، اما صرف اشکال O1 و O139 در کولرای اپیدیمیک و پاندمیک نقش دارد. در اشکال اخیر صرف سترین‌های که سبب تولید توکسین می‌گردد، virulent می‌باشد، مثلاً شکل O1.

nontoxicogenic V. cholera با کولرای اپیدیمیک ارتباط نداشته و از specimen‌های محیطی، مواد غذایی و از مریضان مصاب به اسهالات sporadic تجرید گردیده است.

مواجه شدن با عامل سببی که از یک منبع واحد انتانی منشأ می‌گیرد، در تعداد زیادی از وقوعات انتانات نقش دارد. عموماً می‌توان گفت که این عوامل سببی یا مایکرواورگانیزم‌های مرضی clonal می‌باشد یعنی از یک حجره واحد مادری منشأ گرفته و زاده همان حجره می‌باشد و بدینصورت در همه موارد از نظر جنیٹیک یکسان اند. بنابراین می‌توان گفت که subtyping نقشی مهمی در تشخیص مایکرواورگانیزم‌ها دارد. پیشرفت‌های اخیر در عرصه بیوتکنالوژی توانمندی ما را در subtype نمودن مایکرواورگانیزم‌ها بسیار زیاد ساخته است. تکنالوژی hybridoma منتج به ساختار انتی‌بادیهای monoclonal در مقابل انتیجینهای سطح حجرات گردیده است. میتودهای molecular typing قدرت تشخیصیه سیستم‌های subtyping را ازدیاد بخشیده و اثرات قابل ملاحظه بر اپیدیمولوژی انتانات

داشته است. این شیوه در مقابل مواد معین حساس می‌باشد مثلاً میتود‌های برای تشخیص *dipopolysaccharide* میتودهای تشخیص پروتئینها و میتودهای تشخیصیه نوکلئیک اسید. تحلیل و مطالعه LPS ذریعه *Sodium Dedecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) در باکتریهای گرام منفی به ساده‌گی اجرا شده می‌تواند.

Multi Locus Enzyme Electrophoresis (MLEE) نیز برای مایکرواورگانیزم‌های پتوجن مورد استفاده قرار گرفته است. با استفاده ازین میتود علما در مرکز کنترل امراض CDC توانسته‌اند تا دریافت نمایند که سیروتایپ *O157:H7 E. Coli* را که در وقوعات *hemorrhagic colitis* و *Hemolytic uremic syndrome* نقش دارد، از یک clone که در امریکایی شمالی به صورت گسترده موجود است، تولد گردیده‌اند.

انکشافات و پیشرفتهایی حاصله که در عرصه تجزیه، تسلسل و *amplification* نوکلئیک اسیدها به میان آمده، منتج به میان آمدن سیستم‌های *subtyping* به اساس نوکلئیک اسیدها می‌گردد که مشتمل‌اند بر *pulse field gel electrophoresis* *ribotyping* *plasma profile analysis* و *PCR amplification* و *nucleic acid sequence analysis*

شیوه‌های تشخیص مایکرواورگانیزم‌ها بدون زرع آن

تعداد تخمینی مایکروب‌های کشت ناشده واضح نمی‌باشد؛ اما معلومات اخیر نشان می‌دهد که بسیار زیاد است. تشخیص مایکروب‌ها تا این اواخر مستلزم کشت و حصول کلچر خالص و بعداً اجرا معاینات فزیولوژیک و بیوشمیک می‌باشد. علما از مدت زیادی در مورد مایکروب‌های غیر قابل زرع معلومات داشتند و فعلاً از شیوه کار می‌گیرند که با کمک PCR و با استفاده از rRNA می‌توان مایکروب‌ها را تشخیص نمود. از این شیوه برای کشف و تشخیص یک نوع از اکتینوماپسیت‌ها استفاده شده که *whipple disease rod shape bacterium* است و پیشنهاد گردیده تا به نام *Tropheryma whippelli* مسمی شود. عامل سببی *bacillary angiomatosis* تشخیص گردیده و نام آن *Bartonella henselae* می‌باشد و نیز به اثبات رسیده که *pneumocystis carinii* از جمله فنگس‌ها می‌باشد.

تصنیف سیستم پنج Kingdom

تا به قرن نهم همه اورگانیزم‌ها به دو کنگدم نباتات و حیوانات تقسیم شده بودند. در سال 1866 کنگدم سومی (protista) توسط Haeckel پیشنهاد شده که همه مایکرواورگانیزم‌ها را در بردارد.

تصنیف پنج کنگدم که در 1969 توسط Whittaker پیشنهاد گردیده قرار ذیل است:

Monera (Prokaryote, Uni cellular)

Protista (Eukarote, Uni cellular)

Fungi (Eukaryote, Uni or Multi cellular)

Plantae (Eukaryote, Multi cellular)

Animalia (Eukaryote, Multi cellular)

تصنیف پروکاریوتها با استفاده از سیستم Bergeys در طبابت این امکان را میسر می‌سازد تا اورگانیزم‌های مؤلدامرضی را تشخیص و در قسمت تطبیق ادویه فارمکولوژیک خیلی کمک می‌رساند، همچنان زمینه را مساعد می‌سازد تا Strain های جدید کشف گردند و در لست مایکرواورگانیزم‌ها گنجانیده شوند.

Bergey's Manual بار اول در 1932 چاپ شده و در 1984 بار دوم به چاپ رسیده بود. در January 1980 کمیته بین المللی باکتریولوژی یک لست نامگذاری باکتری هایی را تهیه نمود که در آن 2500 نوع باکتری و 10000 نام جا داده شده بود همچنان نام های حذف شده دوباره در آن شامل گردیده. Prokaryote ها به صورت عموم در دو کتگوری Archeobacteria و Eubacteria تقسیم گردیده است که باکتری های مؤلدامرض برای انسان در گروپ Eubacteria تصنیف گردیده است.

اصطلاحاتی که در نامگذاری بین المللی استعمال می‌شوند، قرار ذیل اند:

۱- Kingdom: به نام عالم یاد گردیده که قبلاً ۵ کنگدم تشریح گردیده.

۲- Class: گروپ مایکرواورگانیزم است که آخر نام کلاس به cetes ختم می‌شود مانند

Actinomycetes.

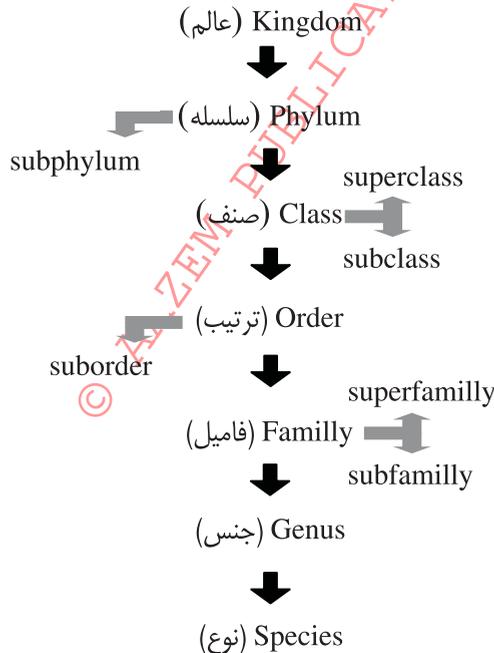
۳- ORDER: کوچکتر از کلاس بوده و در آخر کلمه آن در نگارش ales نوشته می‌شود مانند Actinomycetales.

۴- Family: کوچکتر از ORDER بوده و آخر آن به حروف aceae ختم می‌شود مانند Actinomycetaceae.

۵- Genus: نشاندهنده یک بخش از یک فامیل است و معمولاً نام کاشف آن با کلمه لاتین نوشته می‌شود مانند Nocardia.

۶- Species: عبارت از یک نوع از genus است که به شکل لقب و یا وصف نوشته می‌شود مانند: Albus, Aureus, Asteroides.

۷- Strain: عین نوع است مگر با بعضی خصوصیات خاص.



فصل دوم

فزیولوژی مایکرواورگانیزم‌ها

I- ترکیب بیوشیمیکی حجره باکتری

اساس ترکیب کیمیای حجره باکتری‌ها را عناصر عمده کیمیای از قبیل نایتروجن، کاربن، هایدروجن و اکسیجن که دارای منشأ عضوی اند تشکیل می‌دهد، مثلاً ۸-۱۵٪ وزن خشک باکتری‌ها را نایتروجن و ۴۵-۵۵٪ آنرا کاربن می‌سازد. بطور کل و بخاطر سهولت مطالعه مواد سازنده حجره باکتری را بدو قسمت مایع و جامد تقسیم می‌نمایند:

۱- **قسمت مایع (آب):** آب قسمت عمده حجره باکتری را تشکیل داده که در سایتوپلازم انواع مختلفه باکتری‌ها یک حجم متغیر از ۷۵-۸۵٪ را احتوا می‌کند، مثلاً در *Escherichia coli* و در کورینه باکتریم دیفتیری و ویبریو کولرا ۸۵٪ حجم شانرا آب می‌سازد و در باکتری‌های کپسول دار این فیصدی به نود می‌رسد. آب در حجره باکتری بصورت آزاد و یا در ترکیب با دیگر اجزای ساختمانی باکتری یافت می‌شود، آب ترکیبی جزء ساختمانی سایتوپلازم بوده و نه می‌تواند محلل باشد در حالیکه آب آزاد در حجره باکتری پراکنده بوده و یک حالت کلئیدل را بوجود می‌آورد و مانند منبع یون‌های هایدروجن و هایدروکسیل عمل می‌کند همچنین آب آزاد رول عمده‌یی در پرورسه هایدرولیز مواد دارد که طور مثال می‌توان از تجزیه پروتین‌ها، لپیدها که بخاطر یکجا شدن آنها با آب آزاد صورت می‌گیرد، نام برد.

۲- **قسمت جامد یا Dry Matter عضوی، غیر عضوی:** قسمت جامد مواد سازنده حجره باکتری‌ها شامل مواد عضوی و غیر عضوی است.

- ا- مواد غیر عضوی (مواد معدنی): فاسفور، سلفر، سودیم، مگنیزیوم پوتاشیم، کلسیوم، سلیکان، آهن، کلورین و عناصر کمیاب کیمیاوی از قبیل مولبدنیم، کوبالت، برون، منگانیز، Zinc و مس از جمله مواد معدنی موجود در ساختمان حجره باکتری‌ها بوده که 2-14% وزن خشک کتله مایکروبی کشت شده در اوساط غذائی استاندارد را می‌سازد.
- ب- مواد عضوی: قسمت عضوی ماده خشک باکتری‌ها شامل پروتین‌ها، کاربوهایدریت‌ها، لیپیدها، نوکلئیک اسیدها و دیگر ترکیبات می‌باشد.
- پروتین‌ها: پروتین‌ها قسمت عمده ماده خشک باکتری‌ها را می‌سازد، این ماده در سایتوپلازم، هسته، غشای سایتوپلازمیک و در دیگر ساختمان‌های حجره باکتری موجود است، پروتین در حجره باکتری معمولاً به اشکال نکلیوپروتین و لیپوپروتین موجود است.
 - کاربوهایدریت‌ها: کاربوهایدریت‌ها و الکول‌های پولی‌الکول‌ها 10-28% وزن خشک باکتری‌ها را می‌سازد که شکل عمده موجودیت کاربوهایدریت‌ها در حجره باکتری ترکیب پولی‌سکراید یک آنست که بطور آزاد و یا به حالت ترکیب با پروتین‌ها و لیپید در دیوار حجره و در کپسول باکتری‌ها وجود دارد. قابل یادآوری است که در سایتوپلازم بسیاری از باکتری‌ها مقادیر نسبتاً زیادی Inclusion های کیمیاوی مشابه گلیکوژن و یا نشایسته وجود دارد.
 - لیپیدها: باکتری‌های که از خود ذخیره شحمی دارند و گرانول‌های شحمی را تولید می‌کند 40% وزن خشک شانرا لیپیدها می‌سازد ولی آنچه باکتری‌های که ذخیره شحمی ندارند و نمی‌توانند گرانول‌های شحمی را تولید نمایند 10% وزن خشک شان را لیپیدها می‌سازند. شحم در حجره باکتری به اشکال آزاد، خنثی و ترکیبی موجود می‌باشد که 26-28% شحم موجود در حجره باکتری را شحم آزاد تشکیل می‌دهد، در حالیکه مقدار شحم ترکیبی زیاد بوده و در جدار باکتری موقعیت دارد که با تأمین قابلیت نفوذیه جدار باکتری مقابل مواد غذائی در تغذی باکتری سهم می‌گیرد.
 - نوکلئیک اسید: مقدار نوکلئیک اسید در حجره باکتری مربوط به نوع باکتری و چگونگی ترکیب وسط غذائی می‌باشد که 10-13% ماده خشک باکتری‌ها را می‌سازد مقدار R.N.A معمولاً در حدود 10% و از D.N.A 3-4% می‌باشد.

II- میکانیزم تغذی باکتری‌ها و تصنیف آنها مطابق به تایپ تغذی شان

تبادلۀ دائمی مواد و ترکیبات با محیط ماحول یک خاصیت ذاتی تمام موجودات زنده است، منجمله باکتری‌ها در جریان فعالیت های حیاتی باکتری شرایط معین لازمست که مهمتر از همه موجودیت مواد غذائی است که با استفاده از آن ها انرژی مورد نیاز خود را حاصل نموده و اجزای ساختمانی خود را سنتیز می‌نمایند.

نفوذ مواد غذائی به داخل حجره باکتری به سه طریقۀ صورت می‌گیرد:

۱- **انتشار ساده یا Simple diffusion**: عبارت از نفوذ غیر اختصاص مواد به حجره باکتری است. درین پروسه حجم مالیکولی مواد اهمیت زیاد داشته و سرعت آن نهایت ضعیف است، در جریان این عملیۀ محصولات Lipophilic موجود در کپسول و Cell wall باکتری رول ارزنده دارد.

۲- **انتشار سهیل یا Easeing Diffusion**: جهت اجرای این پروسه موجودیت انتقال دهنده های مخصوص (Messengers) در سایتوپلازم حجره باکتری که خواص مواد محیط حجره باکتری را به سایتوپلازم می رساند ضروری است. درین طریقۀ مصرف انرژی کم بوده و سرعت آن مربوط به غلظت و تجمع مواد محیط باکتری است.

۳- **انتقال فعال یا Active transportation**: آوانیکه غلظت مواد غذائی در داخل حجره باکتری نسبت به محیط آن بلند برود، باکتری‌ها با استفاده ازین میکانیزم تغذی بقیه مواد غذائی موجود در محیط را اخذ می‌نمایند که درینحالت غلظت مواد غذائی در داخل حجره باکتری صد ها مرتبه بلندتر از غلظت آن در محیط می‌باشد و در پیشبرد این پروسه انتقال دهنده های مخصوص که ماهیتاً آنزیم بوده و به نام Permease یاد می‌شود سهم می‌گیرند در Active transportation مصرف انرژی زیاد است.

تصنیف باکتری‌ها نظر به تایپ تغذی شان

باکتری‌ها مطابق به تایپ تغذی شان به دو گروپ Autotrophic و Heterotrophic تقسیم می‌شوند.

۱- **باکتری‌های Autotroph**: آن دسته از باکتری‌های اند که عمل فوتوسنتیز و شیموسنتیز را انجام می‌دهند و قادر اند که از مرکبات غیر عضوی مواد عضوی را تهیه کنند، این

باکتری‌ها به مرکبات عضوی کاربن ضرورت نداشته و نمی‌توانند آنها را جذب کنند، بلکه اجزای ساختمانی خود را بوسیله جذب آب و مرکبات ساده نایتروجن دار (امونیاک و نمکها آن و نمک Nitric Acid) تشکیل می‌نمایند.

۲- **باکتری‌های Heterotroph:** باکتری‌های اند که جهت تغذی خود را به کاربن عضوی مانند قندها و اسیتون، به امینواسیدها، اسیدهای شحمی، مرکبات مختلفه نایتروجن (نیترات ها و امونیاک) و به مواد غیرعضوی مانند Ca, Fe, K, Mg و حتی به ویتامین‌ها ضرورت دارند.

باکتری‌های هتروتروف به نوبه خود به دو گروه Parasite ها و Sprophyte ها تقسیم

می‌شوند:

- ا- سپروفایت‌ها: باکتری‌های اند که با استفاده از مواد عضوی محیط ماحول خود زندگی می‌کنند که اکثریت باکتری‌های موجود در کره ارض مربوط به سپروفایت‌ها است، باکتری‌های Non - Pathogen شامل این گروه می‌باشند.
- ب- پرازیت‌ها: درین گروه تعداد کمی از باکتری‌ها شامل بوده که در جریان رشد و تکامل تدریجی خود به حیات طفیلی عادت می‌گیرند و برای تغذیه و تأمین حیات خود به مواد عضوی به خصوص به پروتین حیوانی نیاز دارند. باکتری‌های مؤلدامراض یا Pathogen شامل این گروه می‌باشند.

گرچه نمی‌توان هتروتروف را به دو گروه دیگر یعنی پرازیت‌ها و سپروفایت‌ها تقسیم نمود اما با آنها تا کنون کدام نوع دیگری در بین این دو گروه حایل نشده است به دلایل ذیل نمی‌توان مرز تفریقی را بین پرازیت‌ها و سپروفایت‌ها مشخص کرد:

- ۱) پرازیت‌ها بعد از خارج شدن از اورگانیزم زنده می‌تواند، در اوساط غذایی که حاوی مواد غذایی عضوی باشند حیات به سر برند.
- ۲) بعضی از مایکروب‌ها Pathogen برای انسان، می‌توانند در محیط سپروفایت باشند.
- ۳) بعضی از مایکروب‌های سپروفایت در شرایط نامساعد می‌توانند بیماری‌های مختلف را برای انسان و حیوان تولید کنند.
- ۴) همچنانیکه اشاره شد، نایتروجن و مرکبات آن نقش عمده ای در تغذی باکتری‌ها ایفا

می‌نماید که اینک بر حسب تایپ استفاده باکتری‌ها از نایتروجن، تصنیف آنها بیان می‌گردد:

- مایکروبهایی که نایتروجن را از هوا می‌گیرند.
- مایکروبهایی که از ترکیبات معدنی نایتروجن استفاده می‌نمایند.
- مایکروبهایی که در مجاورت یک امینواسید و یا مخلوطی از آنها رشد و نمو میکنند.
- مایکروبهایی که در اوساط غذائی پروتئین دار کشت می‌شوند.

برعلاوه، تصنیف عمده دیگری بر حسب قدرت باکتری‌ها در سنتیز مرکبات مغلق و بیچیده موجود است که ذیلاً ارائه می‌گردد:

- ۱- باکتری‌های که کاربن را از CO_2 و نایتروجن را از مرکبات غیر عضوی فراهم می‌کنند، اینها شامل اتوتروف‌های اند که قابلیت فوتوسنتیز را دارند و بوسیلهٔ اوکسیدیشن ساده مرکبات غیر عضوی انرژی مورد نیاز خود را تهیه می‌کنند.
- ۲- باکتری‌های که کاربن را از مرکبات عضوی و نایتروجن را از مرکبات غیر عضوی گرفته و انرژی تهیه می‌کنند که اغلب سپروفایت‌ها درین زمره اند.
- ۳- باکتری‌های که کاربن و انرژی را از مواد عضوی و نایتروجن را از امینو اسید تهیه می‌کند.
- ۴- باکتری‌های که کاربن را از مرکبات عضوی و نایتروجن را از کمپلکس امینواسیدها جذب کرده و انرژی تهیه می‌کنند که در ضمن به یک یا چند ویتامین هم ضرورت دارند.

اوساط غذائی و تهیه آن‌ها

هدف از استعمال اوساط غذائی تهیه کلچر خالص باکتری‌ها از مواد و محصولات مختلفه است که در ضمن تجرید و تکثیر ژرم مطالعه خصوصیات مایکروب و معرفت با محصولات خود مایکروب را امکان پذیر می‌سازد.

پایه و اساس کار مایکروبیولوژی مربوط به اوساط غذائی بوده و اکثر اوقات کیفیت و چگونگی این اوساط نتیجهٔ امور تحقیقاتی را معین می‌سازد. در ترکیب اوساط غذائی مواد اورگانو جنیزس که جهت ساختن سایتوپلازم لازم است وجود دارد که معمولاً شامل Peptone یا (عصاره گوشت یا Meat Extract، محصولات بیولوژیکی یا مواد صنعتی مشابه آنها که مواد

متذکره حاوی مواد Organogenes که در قالب مالیکول های بزرگ است، می باشد. اوساط غذائی ماهیتاً مواد و عناصر چون کاربن، نایتروجن، هایدروجن، اوکسیجن، مرکبات غیر عضوی که دارای پتاسیم، سودیم، کلسیم، کلورین، آهن، مگنیزیم و همچنین یکتعداد مایکروالیمنت ها از قبیل کوبالت، آیودین، منتریم، برون، مولبدینوم و مس را دارا می باشند. همچنین باکتری ها بر علاوه مواد فوق به عوامل رشد دهنده نیازمند اند که رول این مواد معادل نقش ویتامین ها در حیوانات می باشد. این مواد که دارای منشأ حیوانی یا نباتی اند و در ترکیب خود نوکلئیک اسید، Panthotin و ویتامین های مختلفه A، B و C را دارند. قسمی باید در ساختار اوساط غذائی ترکیب شوند که بتوانند از طرف باکتری ها مورد استفاده قرار گیرند. مواد غذائی توسط باکتری ها تنها در نتیجه تعامل اوساط اخذ می گردد، زیرا حساسیت غشای حجروی باکتری ها مقابل تغییرات PH وسط نهایت حساس بوده و حساسیت غشا نظر به PH وسط تغییر می یابد نظر به اینکه مایکرووب های مختلفه جهت رشد، نمو و تکثر خود به اوساط غذائی مختلفه ضرورت دارند لذا وسط Universal یا یکسان برای تمام باکتری ها وجود ندارد. در تهیه یک وسط غذائی باید نکات ذیل مراعات شود:

- ۱- اوساط غذائی باید حاوی تمام مواد باشد که برای مایکروب ضروری است.
- ۲- تعامل PH وسط باید مطابق به حساسیت غشای حجروی هر مایکروب عیار گردد.
- ۳- وسط غذائی باید مرطوب باشد، زیرا میدانیم که مایکرواورگانیزم ها مطابق به قوانین آسموزس و دیفیوژن تغذیه می کند.
- ۴- وسط غذائی باید ایزوتونیک Isotonic باشد.
- ۵- وسط غذائی باید معقم باشد تا بتوان کلچر خالص مایکروب را حاصل نمود.

تصنیف اوساط غذائی

اوساط غذائی نظر به حالت فیزیکی ترکیب، چگونگی طبیعی و مصنوعی پیدایش و بالاخره نظر به مفهوم و کارایی باکتریولوژیک آنها تصنیف می شوند.

۱- نظر به حالت: از این لحاظ سه نوع وسط غذائی وجود دارد: مایع، جامد خشک و یا پودری. در پراتیک روزانه اوساط غذائی جامد را از Agar و یا ژلاتین تهیه می کنند (Agar از یک نوع نبات بحری بدست می آید) زیرا Agar در آب به ۸۰ - ۸۶ درجه سانتی

گراد ذوب شده و در حرارت ۳۷ - ۴۰ درجه سانتی گراد دوباره شکل جامد را به خود می‌گیرد. با استفاده از اوساط اگر دار می‌توان تمام باکتری‌های پتوجن را پرورش داد، زیرا حرارت اعظمی Optimum برای این نوع مایکروب‌ها معادل درجه حرارت طبیعی عضویت انسان است. امروز در بخش صنایع طبیعی اوساط غذائی خشک (پودری) کانسرو شده را می‌سازند که در ترکیب آنها تمام مواد ضرورت جهت رشد و تکثیر باکتری‌ها شامل است، طرز استفاده از این اوساط چنین است که اولاً آنرا در آب حل نموده و جوش می‌دهند و بعداً آنرا در تیوپ‌ها و پتری دیش‌ها جا می‌دهند. این نوع اوساط غذائی برای مدت دو سال قابل استفاده می‌باشد، تهیه این اوساط با این سهولت و ترکیب غنی آن، امکان آنرا به محققین می‌دهد تا ازین اوساط در لابراتوارهای مایکروبیولوژی در محلات مختلف استفاده نمایند (زمین - بحر - فضا).

۲- نظر به ترکیب: با در نظر داشت ترکیب اوساط غذائی دو نوع آنرا می‌توان معین کرد، دو نوع ساده و مغلق موجود بوده در جمله اوساط غذائی ساده می‌توان از Meat broth، Peptone water و Meat Water نام برد. اوساط که شامل دو یا چندین نوع وسط غذائی ساده باشد در جمله اوساط غذائی مغلق کتگوری می‌شوند.

۳- نظر به چگونگی پیدایش و موجودیت شان: دو گروه طبیعی و مصنوعی از هم تفریق می‌شوند. Blood Agar، سیروم حیوانی، شیر، پارچه‌های کچالو، جزء اوساط غذائی طبیعی و اوساط که چگونگی ترکیب آنها معلوم است جزء اوساط غذائی مصنوعی بشمار می‌روند.

۴- نظر به مفهوم و کارائی باکتریولوژیک: اوساط غذائی نظر به مفهوم و کارائی باکتریولوژیک در لابراتوار به اوساط غذائی عمومی و خصوصی تقسیم می‌گردند. Meat broth، Meat peptone broth و اوساط غذائی که در اساس خود از آنها تهیه گردیده‌اند. در کتگوری اوساط غذائی عمومی تصنیف می‌شوند (به شمول اشکال جامد آنها)، اوساط غذائی عمومی، به نوبه خود به اوساط غذائی Elective و تشخیص تفریقی (Differential Diagnostic) تقسیم می‌شوند.

الف: اوساط غذائی Selective: این اوساط با چنین ترکیبی تهیه می‌گردند که زمینه رشد یک یا چند باکتری را با مهیا ساختن شرایط Optimum برای آنها تأمین می‌کند. درین نوع

اوساط باکتری‌های مختلفه را می‌توان کشت کرد ولی قبل از همه آن باکتری رشد می‌کند که وسط برای آنها انتخابی Selective باشد و سایر باکتری‌ها یا اینکه اصلاً نمو ننموده و یا اینکه خیلی ضعیف نمو می‌کنند. این نوع اوساط برای انواع میکروب‌های که مورد توجه طبیبان قرار دارد، استعمال می‌شوند که البته خیلی شدید و سریع نسبت به سایر میکروب‌های همراه خود می‌رویند.

ب: اوساط Differential Diagnostic تشخیص تفریقی: با در نظر داشت مفهوم این اوساط بازهم انواع ذیل آنها قابل تفریق است:

- اوساط پروتین دار: عبارت از اوساط اند که جهت معلوم نمودن فعالیت Proteolytic باکتری‌ها به کار می‌روند که حاوی مواد پروتینی در ترکیب خود اند مانند شیر، جلاتین و Meat peptone.
- سیروم خون: اوساط که برای تشخیص فعالیت هیمولایتیکی باکتری‌ها به کار می‌روند مثلاً Blood Agar.
- مواد کیمیایی: اوساط که در ترکیب خود دارای چنان مواد کیمیایی اند که برای عده ای از باکتری‌ها منحیث مواد غذائی بوده درحالی‌که باکتری‌های دیگر نمی‌توانند از آن استفاده نمایند.
- ارجاعی: اوساط که فعالیت Reductive یا ارجاعی باکتری‌ها در آن معین می‌گردد.
- عمل تخمیری انزایم‌ها: اوساط که جهت تحقیق و پیدا نمودن انزایم‌های متعلقه هر باکتری و مشخص نمودن عمل تخمیری آنها به کار می‌روند.

میتود های تعقیم اوساط غذائی

تعقیم اوساط غذائی به میتود ها و روش های مختلفه صورت می‌گیرد ولی در تعقیم هر وسط غذائی بایست اجزای ترکیب دهنده آن جدا در نظر گرفته شود که ذیلاً چگونگی تعقیم اوساط غذائی توضیح می‌گردد:

- ۱- اوساط Agar دار و Synthetic اگر در ترکیب خود پروتین طبیعی نداشته باشند به حرارت ۱۱۵ - ۱۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ - ۲۰ دقیقه در Autoclave تعقیم می‌شوند.

۲- اوساط که در ترکیب خود کاربن و شیر دارند (Lactose) به حرارت 100°C در موجودیت رطوبت (بخار) به مدت ۳۰ دقیقه برای دو مرتبه و یا به حرارت 112°C درجهٔ سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو برای دو مرتبه تعقیم می‌شوند.

۳- اوساط که در ترکیب خود مواد پروتینی از قبیل سیروم خون، Ascites و مواد پروتینی اند به میتود Filtration و یا Tendalization تعقیم می‌شوند. طرز العمل در میتود اخیرالذکر چنان است که وسط به حرارت $80 - 70^{\circ}\text{C}$ برای یکساعت در سه روز متوالی تعقیم می‌شوند.

۴- اوساط که در ترکیب خود مواد پروتین طبیعی دارند به میتود Filtration تعقیم می‌شوند. اوساط غذائی تعقیم شده بعد از تعقیم بایست کنترل شوند که به این منظور آنها را ترموستات به حرارت 37°C می‌گذارند طوری که اوساط غذائی تعقیم شده در اتوکلاو را مدت 24h و اوساط غذائی تعقیم شده توسط بخار را مدت 72h در ترموستات محفوظ نگهدارند.

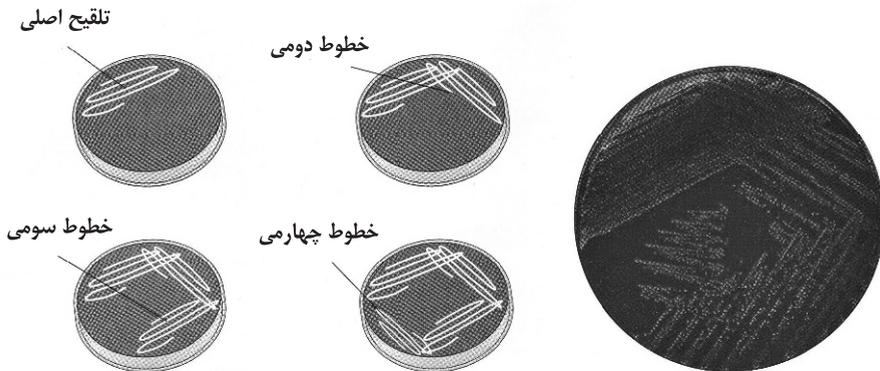
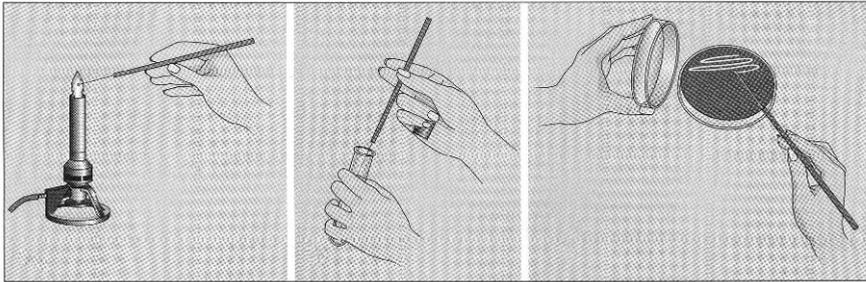
تخنیک کشت باکتری‌ها در اوساط غذائی

مواد که در اوساط غذائی کشت می‌شوند متعدد اند، کلچر باکتریائی، آب، مواد زمینی افزادات و محصولات مختلفهٔ انسان‌ها (ادرار، مواد غایطه، قی آسی‌ها، بلغم) محصولات حیوانی، پارچه‌های اجساد... و غیره می‌توانند به حیث مواد کشت شونده استعمال شوند. در پراتیک روزانه جهت کشت باکتری‌ها اکثراً از لوپ باکتریایی استفاده می‌شود. کشت باکتری‌ها مستلزم یکسلسله حرکات و مانورهای ماهرانه است که توسط انگشتان دست اجرا می‌شود (Manipulation) که البته تمام این حرکات و مانورها باید در مجاورت منبع حرارت (شعله چراغ الکولی) صورت گیرد.

جهت کشت باکتری‌ها در لابراتوار چنین عمل می‌کنیم:

- ۱- قبل از اخذ مواد لوپ عموداً داخل شعله چراغ قرار داده می‌شود تا تعقیم گردد.
- ۲- دو تیوب که در یکی از آنها کلچر کهنه باکتریایی وجود دارد و دیگر آن که هنوز بکلی معقم و تازه است طوری با دست چپ اخذ می‌شوند که نهایت مطلوبه آنها آزاد، باشد.
- ۳- لوپ معقم مانند قلم با دست راست اخذ شده و نهایت آزاد تیوب‌ها با دور نمودن پنبه از آن در مجاورت شعله چراغ باز می‌گردد.

- ۴- به وسیلهٔ لوپ از تیوب که حاوی کلچر کهنه باکتریایی است طوری مواد اخذ می‌گردد که در جدار تیوب تماس نه نماید و این مواد در تیوب دیگر که حاوی وسط (معقم striel) غذائی تازه است و به کلی معقم می‌باشد، جا داده می‌شود.
- ۵- نهایت باز تیوب‌ها در مجاورت آتش به وسیلهٔ پنبه مسدود می‌گردد.
- ۶- لوپ مجدداً تعقیم می‌گردد.
- ۷- در تیوب که جدیداً مواد کشت شده، تاریخ اجرای کلچر، نام کلچر کهنه و اسم اجرا کننده با قلم رنگه نوشته شده و تیوب در ترموستات اقلاناً برای ۲۴ ساعت نگهداری می‌شود.



کشت مایکروب‌ها به میتود خطوط

شکل ۱-۲

ترموستات Thermostat

جهت رشد و تکثیر باکتری‌ها شرایط مساعد حرارتی لازم است که برای انواع مختلفه باکتری‌ها مختلف است، جدول ذیل تقسیمات باکتری‌ها را نظر به حرارت Optimum شان نشان می‌دهد:

	Minimum	Optimum	Maximum
Psychrophilic	0 °c	15-20 °c	30-35 °c
Mesophilic	10 °c	30-37 °c	40-45 °c
Thermophilic	35 °c	50-60 °c	70-75 °c

باکتری‌های Pathogen تماماً مربوط به گروه Mesophilic می‌باشد که حرارت مساعد جهت رشد و تکثیر شان معادل به حرارت نارمل وجود انسان یعنی 37°C است. بخاطر تأمین حرارت مساعد جهت رشد و تکثیر باکتری‌ها از ترموستات استفاده می‌شود. که حرارت اعظمی Optimum را برای هر باکتری بصورت دائمی آماده نموده می‌تواند.

جدار ترموستات از دو لایه یا طبقه ساخته شده است که آب یا هوا در بین آن موجود بوده و توسط یک منبع حرارت (گاز یا برق) گرم می‌شوند، دروازه ترموستات بایست که بطور محکم بسته شود در سرپوش ترموستات Thermameter ترمامیتر و سوراخ‌های تهویه موجود است. در لابراتوارهای بزرگ از ترموستات‌های بزرگ که مانند یک اتاق اند و تماماً مجهز می‌باشند. استفاده می‌گردد کلچر باکتری‌ها را مدت 24h در ترموستات جا می‌دهند که این مدت ازدیاد اعظمی باکتری‌های Pathogen را تأمین می‌نماید.

نمو، ابقاً، حیات و مرگ مایکرواورگانیزمها

زنده ماندن مایکرواورگانیزمها در محیط طبیعی

تعداد مایکرواورگانیزمها در بیوسفیر تقریباً ثابت می‌باشد یعنی نمو و تکثیر مایکروب‌ها در موازنه با مرگ مایکروب‌ها قرار دارد. زنده ماندن یک گروه از مایکروب‌ها در محیط قسملاً به رقابت موفقانه برای دریافت مواد غذایی و نگهداشت ذخیره‌ی یک عده از حشرات زنده حین مواجه شدن به قلت مواد غذایی، مربوط می‌باشد. اکثریت معلومات در مورد فزیولوژی مایکروب‌ها از مطالعه حشرات تجرید شده در لابراتوار که تحت شرایط آیدیال نمو می‌کنند، بدست آمده است. اما باید خاطر نشان ساخت که

اکثریت مایکروب‌ها در محیط طبیعی ممکن به قلت مواد غذایی دچار گردیده و بناً وادار به رقابت برای دریافت مواد غذایی گردد که این حادثه باعث تفاوت مشخصات فزیولوژیک مایکروب در شرایط طبیعی از شرایط لابراتوار گردیده می‌تواند. همچنان باید دانسته شود که محل زیست مایکروبی خالی به زودی توسط مایکروب‌های دیگری مملو می‌گردد و بدین لحاظ برنامه‌های که در آن مایکروب‌های پتوجن صرف از محل زیست آنها تصفیه می‌گردد، نظر به میتود‌های که در آن در محل زیست مایکروب پتوجن مایکروب‌های غیرپتوجن به صورت تعویضی جاگزین می‌گردد، کمتر موفق دانسته می‌شود.

نمو

نمو عبارت از تزايد منظم در مجموعه اجزای متشکله یک اورگانیزم می‌باشد. بناً ازدیاد در سایز و اندازه که به تعقیب داخل شدن آب و یا ذخیره شدن شحمیات و یا پولی سکراید‌ها به وقوع می‌پیوندد، نمودی واقعی دانسته نمی‌شود. تکثر حجروی پدیده است که در نتیجه نمودی حجره به وقوع می‌پیوندد.

اندازه غلظت مایکروبی *Microbial concentrations*

غلظت مایکروبی به اساس غلظت حجرات (تعداد حجرات زنده فی واحد حجم کلچر) و یا به اساس غلظت کتله زنده *biomass* (وزن خشک حجرات فی واحد حجم کلچر) تعیین می‌گردد. این دو پارامتر همیشه معادل نمی‌باشند. در مطالعه جنتیک حجرات غلظت حجرات مهم است تا اندازه گردد اما در مطالعه بیوشیمی و یا تغذی حجرات غلظت بایومس مهم می‌باشد. غلظت حجرات از شمارش حجرات زنده بدست می‌آید اما در بسیاری موارد جهت سهولت کار از مکردیت کلچر که با شیوه‌های فوتوالکتریک اندازه می‌گردد، به حیث معیار غلظت حجرات استفاده به عمل می‌آید. همچنان اندازه گیری سهل غلظت بایومس توسط اندازه گیری مقدار یکی از اجزای متشکله حجره مانند پروتین و یا اندازه گیری حجم حجراتی که از *suspension* ته نشین گردیده اند، صورت می‌گیرد.

تکثر و نمودی مایکرواورگانیزم‌ها

نمو و تکثر باکتری‌ها در اوساط غذایی جامد:

نمودی باکتری‌ها عبارت از ازدیاد حجم سایتوپلازم آنها است که متعاقب سنتیز مواد حجروی صورت می‌گیرد. باکتری‌ها با سپری نمودن مراحل مختلف انکشاف می‌یابد که معمولاً حجره جدید باکتریایی (حجرهٔ دختر) نسبت به حجره مادری خود کوچکتر می‌باشد،

حجرات دختری به نوبه خود نمو می‌کنند و بزرگ می‌شوند که اینحالت را Physiological Gigantisme می‌نامند. افزایش تعداد باکتری‌ها که در نتیجه فعالیت خود آنها صورت می‌گیرد عبارت از تکثر یا تولید مثل باکتری‌ها می‌باشد، تکثر باکتری‌ها بوسیله تقسیم ساده عرضی یا Simple Transvers Division و تکثر اولیه یا تکثر نباتی Vegetative Reproduction در سطوح مختلف صورت می‌گیرد و در نتیجه اشکال مختلفه از حجرات مانند خوشه ئی، زنجیری و جوهره ئی... بوجود می‌آید همچنان مایکرواورگانیزم‌ها بوسیله جوانه زدن، ایجاد شگاف در رشته های سیگمانته، تشکیل حجرات مشابه سپور به وسیله Conidia های متحرک و بالاخره بوسیله Conjugation تولید مثل می‌نماید که حادثه اخیرالذکر تولید مثل جنسی نزد باکتری‌ها قبول شده است.

تقسیم عرضی باکتری‌ها تنها یک پروسه ساده انقسام یک حجره مادری به دو حجره مشابه دختری نبوده بلکه تقسیم عوامل مستقل و جداگانه یک حجره مادری است به حجرات دختری یا به عباره دیگر تجرید مداوم حجرات کوچک دختری است از یک حجره بزرگ مادری چنانچه نگاشته شد این حجرات دختری به نوبه خود بزرگ می‌شوند و بعد از رشد و انکشاف همچنان انقسام می‌یابند که البته بعد از چند بار Generation از بین می‌روند.

سرعت تقسیمات حجروی در باکتری‌ها مختلف بوده و مربوط به نوع باکتری، سن شرایط کشت اوساط غذایی، درجه حرارت و غیره می‌باشد که در صورت موجودیت شرایط مساعد بعضی از باکتری‌ها می‌توانند بعد از هر ۲۰ - ۳۰ دقیقه تکثر کنند. افزایش تعداد حجرات جدید باکتری‌ها مطابق به دفعات Yeneve یا مدت انقسام قرار ذیل محاسبه می‌گردد:

1	2	4	8	16	32	-----	N	تعداد حجرات
0	1	2	3	4	5	-----	n	مدت انقسام

بعد از n مرتبه تکثر تعداد مجموعی حجرات مساوی به N خواهد بود یعنی $N = 2n$ (البته بعد از ختم Generation اول) به این معنی که اگر در یک وسط غذایی صرف یک باکتری موجود باشد و 30 Generatime دقیقه باشد (هر 30 دقیقه بعد، نسل جدید به میان می‌آید). تعداد مجموعی باکتری‌ها بعد از 24 ساعت مساوی است به: $N = 248$ زیرا $n = 48$ است در صورتیکه تقسیمات حجره باکتری در هر 20 دقیقه صورت گیرد.

تکثر باکتری‌ها توسط بعضی از عوامل مانند تجمع مواد Toxic، تغییرات PH وسط، اتمام مواد غذائی و غیره محدود می‌گردد.

در اوساط غذائی جامد باکتری‌ها به اثر تکثر ایجاد کالونی می‌نماید و کالونی عبارت از مجتمع مایکروبی است که متعاقب تکثر مایکروب در سطح اوساط غذائی بعد از کشت بوجود می‌آید. از لحاظ شکل و حجم این کالونی‌ها از هم فرق داشته و توسط رشته‌های Cytoplasmic به هم مرتبط اند، اشکال کالونی‌ها مختلف بوده می‌تواند به شکل کروی، درختی، ستاره‌یی و یا Rosette – Shaped باشد، همچنین اشکال مستقیم و دانه دار آنها نیز دیده می‌شود، حاشیه کالونی‌ها می‌شود که منظم و یا اینکه غیر منظم و دندان دار باشد، کالونی‌ها ممکن است مطح، محدب، گنبدی، و یا حفره دار بوده و سطح آنها لشم (S. Form) و یا اینکه درشت (R. Form) باشد. کالونی‌ها از لحاظ سایز خود به چهار گروپ تقسیم می‌شوند: کالونی‌های بزرگ به قطر 4 – 5mm، کالونی‌های متوسط به قطر 2 – 4mm، کالونی‌های کوچک به قطر 1 – 2mm و بالاخره کالونی‌های کوچکتر یا رشد نکرده به قطر کمتر از 1mm. همچنین کالونی‌ها از نظر رنگ، کثافت و قوام خود از هم فرق دارند که انواع مختلفی آنها از قبیل کالونی‌های مکدر شفاف، خشک، مرطوب، رنگه و بی رنگ موجود است.

نمو و تکثر باکتری‌ها در اوساط غذائی مایع

مراحل نمویی مایکروب‌ها که در وسط کلچر مایع مطالعه می‌گردد، شش مرحله می‌باشد. این مراحل ذیلاً توضیح می‌گردد:

A- مرحله نموی بطی Lag phase: این مرحله عبارت از زمانی است که حجرات در آن به محیط زیست جدید خود را عیار می‌سازند. انزایم‌ها و سایر مواد استقلابی سنتتیز گردیده و تا حدی که برای آغاز نمو لازم باشند، ذخیره می‌گردد. در صورتیکه حجرات از یک وسط به وسط دیگر کاملاً متفاوت و غیر قابل زیست انتقال یابند، ممکن که مرحله نموی بطی برای مدت زیادی دوام نماید تا اشکال mutant مایکروب به میان آید و زمینه را برای ازدیاد تعداد خود مساعد سازد.

B- عبارت از یک مرحله کوتاه بین مرحله A و C می‌باشد.

C- Exponential phase: در جریان این مرحله باکتری‌ها به شکل ثابت ازدیاد می‌یابند. مواد حجروی جدید به یک نسبت ثابت سنتتیز گردیده و کتله حجرات به شکل

exponential ازدیاد می یابد. این مرحله الی وقوع یکی از دو حوادث ادامه دارد: یا اینکه یک یا بیشتر مواد مغذی در وسط به اتمام رسیده و یا اینکه تولیدات میتابولیک توکسیک تجمع یافته و مانع نمو می گردد. برای اورگانیزم‌های ایروبییک مواد غذایی که معمولاً محدود می گردد، عبارت از اوکسیجن می باشد. زمانیکه غلظت حجرات به 10^7 حجره فی ملی لیتر می رسد، نمو حجرات از سبب قلت اوکسیجن بطی می گردد مگر اینکه اوکسیجن به میتود های agitation و یا bubbling در وسط داخل ساخته شود اما زمانیکه تعداد حجرات باکتریایی به $5 \times 10^9 - 4$ حجره فی ملی لیتر برسد، دیفوژن اوکسیجن نمی تواند تقاضا وسط را در هیچگونه شرایط تکافو نماید و بناً نمو بطی می گردد.

D- عبارت از یک مرحله گذار به مرحله E می باشد.

E- مرحله ساکن اعظمی maximum stationary phase: اختتام مواد غذایی و یا تجمع مواد توکسیک بالاخره باعث می گردد تا نمو کاملاً توقف یابد اما اکثراً یک عده کم از حجرات درین مرحله از بین رفته و در مقابل حجرات جدید از طریق نمو و انقسام آنرا تعویض می نمایند. در صورتیکه چنین واقع گردد، تعداد مجموعی حجرات ازدیاد یافته در حالیکه تعداد حجرات زنده ثابت می ماند.

F- مرحله مرگ و یا مرحله تنقیص: بعد از اختتام مرحله ساکن اعظمی که طول آن نظر به اورگانیزم و نظر به شرایط کشت متفاوت می باشد، میزان مرگ حجرات ازدیاد یافته تا اینکه به یک سرعت ثابت برسد. اکثراً بعد از اینکه اکثریت حجرات از بین بروند، میزان مرگ کاهش یافته که بدینگونه یک عده از حجرات زنده برای ماه ها و یا حتی سالها می توانند زنده بمانند. چنین زنده ماندن در بعضی حالات وانمود کننده تعویض حجرات می باشد یعنی یک عده از حجرات با استفاده از مواد غذایی حاصله از حجرات مرده و لیز شده، نمو می نمایند.

نگهداشت حجرات در مرحله exponential

حجرات را می توان با انتقال مکرر به اوساط مشابه تازه در مرحله نمو exponential نگهداری نمود. برای این هدف دو آله اوتومات ساخته شده است که عبارتند از: chemostat & turbidostat

تعریف و اندازه مرگ حجرات

مفهوم مرگ حجرات:

مرگ حجرات مایکروبی به معنی از دست دادن دائمی قابلیت تکثر (نمو و انقسام) می‌باشد. از نظر پرکتیک مرگ حجرات با کشت حجرات در وسط جامد تثبیت می‌شود. در صورتیکه یک حجره قابلیت تشکیل کالونی را در همه اوساط از دست داده باشد، حجره مرده پنداشته می‌شود. واضح است که اعتماد بالای این تست به انتخاب وسط و شرایط بستگی دارد. مثلاً کشت که در یک وسط 99 در صد حجرات را مرده وانمود سازد، ممکن در وسط دیگری 100 فیصد حجرات را زنده نشان دهد. علاوه بر این نمی‌توان عده محدود از حجرات زنده یک سمپل بزرگ کلینیکی را در کشت مستقیم دریافت نمود زیرا مایع موجود در همان سمپل ممکن خود سبب نهی نموی مایکروبی گردد. در چنین حالات باید که نخست سمپل مورد نظر در وسط مایع رقیق گردد تا به نموی حجرات زنده زمینه را مساعد سازد.

تعیین اندازه نموی مایکروبی

طرق مختلفی برای اندازه گیری نموی مایکروبی موجود است. در عده از میتود ها تعداد حجرات مایکروبی اندازه می‌گردد، حالانکه در میتود های دیگر کتله مجموعی تجمع مایکروبی محاسبه می‌گردد. کتله مجموعی مایکروب‌ها نیز مستقیماً متناسب به تعداد حجرات آن می‌باشد. تعداد حجرات مایکروبی در یک تجمع باکتری طوری حساب می‌گردد که تعداد حجرات موجود در فی ملی لیتر مایع یا فی گرام مواد جامد اندازه می‌گردد. از آنجائیکه تجمعات مایکروبی معمولاً بسیار بزرگ هستند، اکثریت میتود های شمارش تعداد حجرات بر اساس شمارش مستقیم یا غیر مستقیم نمونه های کوچک استوار می‌باشد که بدین ترتیب در مرحله بعدی می‌توان اندازه تمام تجمع مایکروبی را محاسبه نمود. فرض کنید که در یک بر میلیونم حصه شیر ترش شده هفتاد حجره باکتری را دریافت گردید، پس در فی ملی لیتر آن باید هفتاد میلیون حجره موجود باشد.

مشکل میتود اخیرالذکر این است که نمی‌توانیم یک بر میلیونم حصه یک ملی لیتر مایع یا گرام غذا را تعیین نمائیم. بناً باید از میتود غیر مستقیم استفاده بعمل آید، یعنی از رقیق سازی مسلسل استفاده بعمل می‌آوریم. مثلاً اگر یک ملی لیتر شیر متذکره را به نودو نو ملی لیتر آب خلط نمائیم، تعداد باکتری در محلول حاصله صد مرتبه نظر به محلول اصلی کمتر خواهد بود، هر قدر این عملیه رقیق سازی را ادامه دهیم، به همان اندازه تعداد باکتری متناسباً کمتر می‌شوند که بالاخره می‌توان تعداد حجرات موجود را نیز محاسبه نمود. در مواد جامد مانند غذا می‌توان یک حصه آنرا با ۹ حصه آب مخلوط نمود و بعداً توسط pipette می‌توان عملیه رقیق سازی را بیشتر ادامه داد و بالاخره تعداد حجرات آنرا محاسبه نمود.

شمارش حجرات در plates

معروفترین شیوه اندازه گیری تعداد حجرات باکتری عبارت از میتود شمارش در پلیت یا Plate count می‌باشد. مفاد مهم این شیوه عبارت از شمارش حجرات زنده می‌باشد اما این شیوه حد اقل ۲۴ ساعت را در بر می‌گیرد، زیرا طی این زمان کالونی‌های قابل رویت باکتری‌ها تشکیل گردد. مثلاً در شمارش حجرات باکتری که به منظور کنترل کیفیت شیر اجرا می‌گردد، نباید نمونه مورد نظر در مدت طولی معاینه گردد.

Plate count به این فرضیه استوار می‌باشد که هر حجره باکتری در نتیجه انقسام باعث بروز یک کالونی می‌گردد. همچنان فرض می‌گردد که نمونه مورد کشت متجانس بوده و حجرات به شکل باهم چسبیده یا پاغنده‌ها موجود نمی‌باشند.

زمانیکه plate count اجرا می‌گردد، مهم است تا تعداد محدودی از کالونی‌ها در پلیت بوجود آیند، زیرا در صورت وجود کالونی‌های بسیار زیاد، عده از کالونی‌ها باهم بسیار نزدیک روئیده و حتی عده از کالونی‌ها هیچ نمی‌رویند و ممکن نیست تا شمارش آن صورت گیرد. عموماً پلیت‌های حاوی ۲۵ الی ۲۵۰ کالونی قابل شمارش می‌باشند. جهت حصول اطمینان از اینکه تعداد کالونی‌های پلیت در همین حدود خواهد بود، نمونه باید چندین بار رقیق ساخته شود که به نام رقیق‌سازی مسلسل serial dilution یاد می‌گردد.

رقیق‌سازی مسلسل

اگر فرض گردد که یک نمونه مایکروبی دارای ده هزار حجره فی ملی لیتر می‌باشد. اگر یک ملی لیتر ازین نمونه کشت گردد، به اساس تیوری در بطری دیش متوسط ده هزار کالونی بوجود می‌آیند. این تعداد قابل شمارش نمی‌باشد. اگر یک ملی لیتر نمونه متذکره با ۹ ملی لیتر آب مقطر یکجا ساخته شود، در هر ملی لیتر آن یکهزار حجره وجود خواهد داشت که در صورت کشت در پلیت هنوز هم یکهزار کالونی بوجود خواهد آمد که غیر قابل شمارش می‌باشد. اما اگر یک بار دیگر هم یک ملی لیتر محلول حاصله با ۹ ملی لیتر آب مقطر مخلوط گردد، سبب به میان آمدن محلولی می‌گردد که هر ملی لیتر آن صد حجره می‌باشد. چنین محلول اگر به اندازه یک ملی لیتر در وسط کشت گردد، سبب به میان آمدن ۱۰۰ کالونی ممکنه در پلیت می‌گردد که قابل شمارش می‌باشد.

میتود ریخت در پلیت و هموار نمودن در پلیت

شمارش در پلیت به یکی ازین دو میتود صورت می‌گیرد. در میتود ریخت، باید نخست نمونه مورد نظر را که حسب دلخواه رقیق شده باشد، به اندازه یک ملی لیتر یا حتی ۰٫۱ ملی لیتر در

داخل دیش یا پلیت جاگزین می‌گردد. بعداً ماده اگر مایع شده را که درجه حرارت آن ۵۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد، بالای آن علاوه می‌گردد. پلیت را آهسته تکان داده تا محتوی مایکروبی به خوبی داخل ماده اگر پراکنده گردد. اما در این میتود بعضی باکتری‌های حساس در مقابل حرارت تلف می‌شوند و در صورتیکه وسط برای مایکروب انتخابی باشد، برای تشخیص مایکروب دیدن اوصاف کالونی مانند رنگ آن نیز مهم می‌باشد. چون درینصورت باکتری‌ها عمدتاً در قسمت متوسط وسط قرار دارند، بنابر تشخیص آن ممکن مشکل باشد. جهت جلوگیری از این مشکلات، از میتود دوم یعنی از میتود هموار نمودن استفاده بعمل می‌آید. درین میتود نخست اگر مایع شده در وسط ریخته می‌شود. بعد از سرد شدن، نمونه مایکروبی به اندازه یک ملی لیتر یا ۰٫۱ ملی لیتر توسط میله مخصوص و معقم شیشه‌یی بالای سطح ماده اگر هموار می‌گردد. درین میتود کالونی‌ها در سطح وسط قرار گرفته و از تماس آن با اعماق ماده اگر که حرارت آن بلند است، جلوگیری بعمل می‌آید.

فلتریشن

در صورتیکه تعداد باکتری‌ها بسیار کم باشد، مانند جهیل‌ها و دریا‌های نسبتاً معقم، می‌توان تعداد باکتری‌ها موجود در آن را با میتود فلتریشن تعیین نمود. صد ملی لیتر یا بیشتر آب را از غشای فلتری که منافذ آن برای عبور باکتری کافی نباشد، عبور داده می‌شود. بدین ترتیب، باکتری‌ها از فلتر عبور نتوانسته و بالای سطح فلتر نگهداری می‌گردد. این فلتر منبسط به پلیت حاوی اگر مغذی منتقل که در آن کالونی‌های ناشی از باکتری‌های موجود در سطح فلتر می‌رویند. این میتود عمدتاً در خصوص باکتری‌های *coli form* اجرا می‌گردد. باکتری‌های متذکره در آب نشان دهنده ملوئیت آب یا غذا با مواد غایبه می‌باشد. کالونی‌های این مایکروب زمانی وصفی می‌باشند که در اوساط مغذی تفریقی کشت گردد.

میتود MPN یا Most Probable Number Method

این میتود دیگر برای تعیین تعداد باکتری می‌باشد که یک میتود احصائیبوی می‌باشد. درین میتود چنان پنداشته می‌شود که اگر یک نمونه برای چندین مراتبه بصورت متواتر رقیق ساخته شود، بالاخره تعداد آن به حدی کم می‌گردد که قابل کشت در وسط نمی‌باشد. پس هر قدر مراتب رقیق‌سازی الی سرحد عدم قابلیت کشت زیاد باشد، به همان اندازه غلظت مایکروبی در نمونه اصلی زیاد می‌باشد. این یک میتود تخمینی می‌باشد که ۹۵٪ قابل اطمینان است.

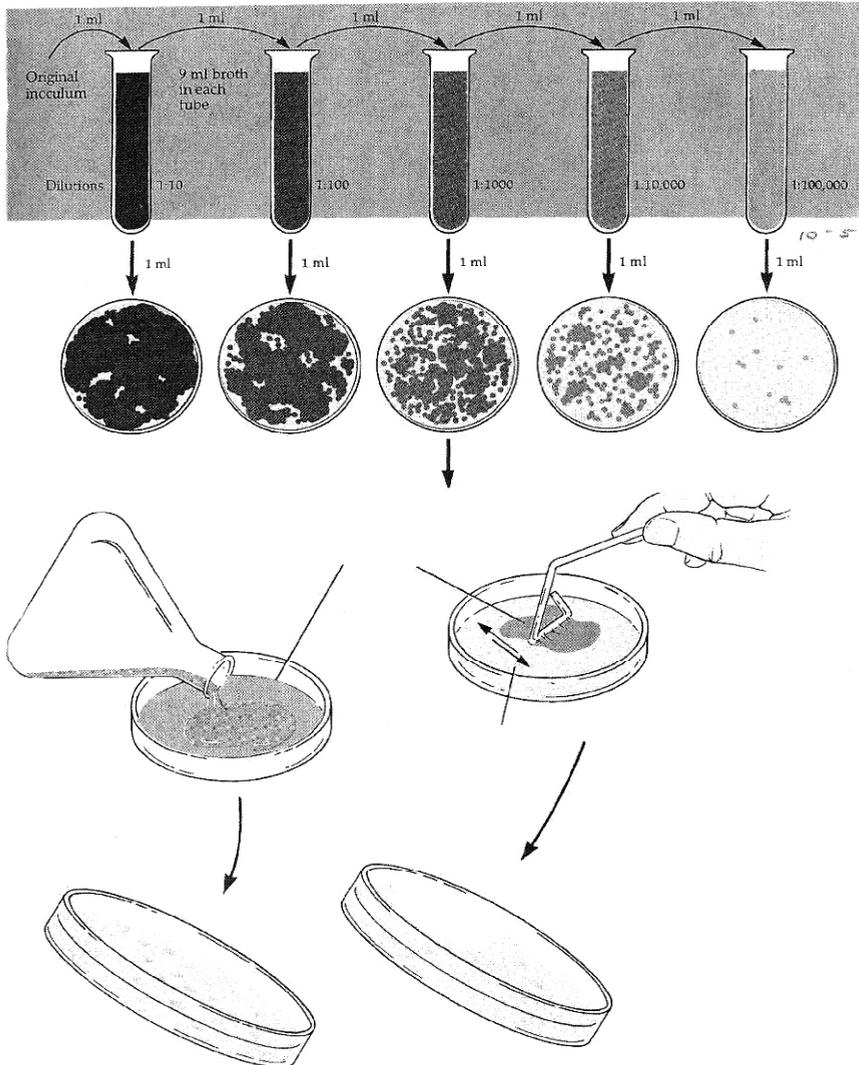
میتود رویت مستقیم تحت مایکروسکوپ

درین شیوه اندازه معین از نمونه مورد نظر بالای یک قسمت مشخص از ساحه سلاید مایکروسکوپ قرار داده شده، تلوین گردیده و بعداً مشاهده می‌شود. مثلاً برای تعیین تعداد باکتری شیر، ۰,۰۱ ملی لیتر از نمونه اخذ و در یک سانتی مربع ساحه سلاید که قبلاً نشانی گردیده، هموار می‌گردد. بعداً ذریعه مایکروسکوپ دیده شده، تعداد حجرات در هر ساحه دید محاسبه و اوسط آن تعیین می‌گردد. چون وسعت ساحه دید هر آئینه اوبجکتیف مایکروسکوپ قابل تعیین است، بناً گفته می‌توانیم که ساحه دید به چه اندازه وسعت دارد. در صورتی که وسعت ساحه دید معلوم باشد، اوسط تعداد حجرات فی ساحه دید را بر همین ساحه تقسیم می‌نمایند. عدد حاصله مساوی است به تعداد حجرات باکتری موجود در سلاید فی ملی متر مربع ساحه سلاید می‌باشد. اگر به شیوه فوق تعداد حجرات فی ملی متر مربع محاسبه گردد، به آسانی می‌توان تعداد حجرات را در سانتی مربع نشانی شده سلاید نیز تعیین کنیم که به این صورت گفته می‌توانیم که ۰,۰۱ ملی لیتر نمونه به چه اندازه حجرات را احتوا می‌کند. در میتود رویت مستقیم مایکروسکوپی از سلاید های مخصوص به نام *Petroff Hausser counter* نیز استفاده می‌شود که در سلاید های آن فرو رفته گی های کم عمق موجود می‌باشد حجم معین از محلول باکتری بالای آن انداخته می‌شود. بعداً کورسلاید که دارای مربعات با وسعت معین می‌باشد، پوشیده شده که بعد از تعیین تعداد حجرات فی مربع، می‌توان آنرا به ضریب معینه ضرب نموده تعداد مجموعی حجرات را بدست آورد. همچنان آلات برقی تعیین کننده تعداد حجرات در محلول ها موجود می‌باشد. مفیدیت این میتود (رویت مستقیم یا محاسبه آلات برقی) عبارت از محاسبه سریع بوده که مانند طرق دیگر مستلزم مدت زمان زیاد نمی‌باشد، اما درین میتود حجرات زنده و حجرات غیر زنده تفریق شده نمی‌تواند و نیز در میتود رویت مستقیم، حجرات متحرک بخوبی اندازه شده نمی‌تواند.

میتود های غیر مستقیم برای تعیین تعداد حجرات مایکروبی همیشه لازم نیست تا تعداد حجرات بصورت مستقیم محاسبه گردد، بلکه در ساینس و صنعت، از میتود های آتی غیر مستقیم نیز استفاده بعمل می‌آید:

Turbidity (مکدریت): در عده از تجارب اندازه نمودن مکدریت محلول جهت تخمین تعداد حجرات کافی می‌باشد. یعنی هر قدر تعداد حجرات زیاد باشد، به همان اندازه محلول بیشتر مکدر یا ابر مانند می‌گردد. درین شیوه از آله به نام کالوریمتر یا سپکتوفوتومتر استفاده می‌گردد. آله متذکره دارای آخذه یی برای روشنی می‌باشد. ابتداً سمپل مورد نظر در بین منبع نور و آله قرار داده شده هر قدر که مکدریت محلول زیاد باشد، به همان اندازه نور جذب گردیده و مانع مواصلت نور به آخذه کالوری متر

می‌گردد. که بدین صورت تعداد حجرات را می‌توان اندازه نمود. این میتود برای اندازه گیری ملوثیت مایعات با مواد مفید نیست زیرا تعداد مایکروب‌ها درینصورت معمولاً بسیار کم بوده که قابل کشف توسط این میتود نمی‌باشند، یعنی حد اقل ده الی صد میلیون حجره باید فی ملی لیتر محلول موجود باشد، تا توسط کالوری متر کشف گردد.



شکل ۲-۲

فعالیت میتابولیک: این میتود با اندازه نمودن محصولات استقلابی میکروب‌ها تطبیق می‌گردد. مثلاً اسیدها یا کاربن دای اکساید با ازدیاد تعداد باکتری‌ها، بیشتر تولید گردیده و بنأ افزایش در اندازه آن نشان دهنده ازدیاد در تعداد باکتری‌ها می‌باشد. بگونه مثال می‌توان گفت که باکتری شیر اکسیجن مصرف می‌نماید. ماده *methylene blue* به محلول آن علاوه و بعداً محلول در تیوب دارای سرپوش محکم قرار داده می‌شود. چون ماده متذکره در موجودیت اکسیجن رنگ آبی داشته و در عدم آن، فاقد رنگ است، بنأ هر قدر تعداد باکتری زیاد گردد، به همان اندازه رنگ تیوب کمتر می‌گردد. این میتود غیر دقیق بوده در لابراتورهای تجربی مورد استفاده قرار گرفته اما برای مقاصد تجارتي عمدتاً استعمال ندارد.

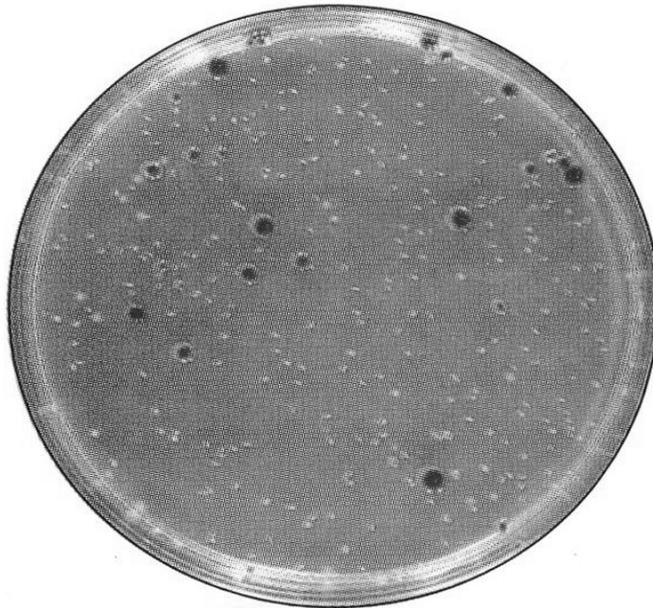
وزن خشک: نموی بعضی از ارگان‌های میله مانند *molds* را به مشکل می‌توان با میتود های قبیل الذکر اندازه نمود. در فنگس‌ها میتود *plate count* نمی‌تواند ازدیاد در *biomass* را اندازه نماید و در عوض اندازه سپورهای غیر زوجی را نشان می‌دهد که مورد قناعت نمی‌باشد، بنأ با استفاده از میتود اندازه گیری وزن خشک، فنگس‌ها ابتدا از سایر مواد توسط فلاتر مخصوص جدا، در بوتل توزین قرار داده می‌شود. بعداً توسط آله خشک کننده، آب آن خارج می‌گردد که وزن خشک آن بدست می‌آید. عین میتود را می‌توان در خصوص باکتری‌ها نیز به کار برد، که در بین صورت باکتری‌ها توسط *centrifugation* از سایر مواد جدا ساخته می‌شوند.

اوصاف کشت باکتری‌ها

تعریف: خصوصیات و چگونگی رشد باکتری‌ها در اوساط غذایی، اوصاف کشت باکتری‌ها نامیده می‌شود.

در اوساط غذایی جامد حجم کالونی‌ها (بزرگ، متوسط، کوچک و کوچکتر)، شکل (کروی، مستقیم و غیره)، رنگ (بنفش، سفید، لیمویی، طلایی، سیاه و غیره)، کثافت و بالاخره مشخصات کنار و سطح کالونی (*S-Form & R-Form*) در نظر گرفته می‌شود، در حالیکه در اوساط غذایی مایع موجودیت مکدریت و تجانس آن در نظر گرفته می‌شود.

اوصاف کلچری باکتری‌ها در اوساط غذایی مربوط است به نوع هر باکتری، درجه حرارت، شرایط کشت، PH وسط غذایی مخصوصاً مربوط است به درجه رشد باکتری در وسط غذایی.



شکل ۲-۳ اوصاف کشت میکروب‌ها

میتود حصول کلچر خالص باکتری‌های Aerobic یا هوازی

حصول کلچر خالص و تجرید نوع معین از باکتری اساس امور باکتریولوژی است، زیرا در پراکتیک روزانه بیش از همه به موادی برمیکوریم که باکتری‌های مختلفه را در خود دارند و این مأمول که نوع باکتری بصورت مشخص تعیین شود و مشخصات آن مطالعه شود صرف زمانی میسر است که باکتری مورد نظر بطور خالص تجرید شده حصول گردد.

اولین و عمده ترین گام در مطالعه مواد که حاوی باکتری‌های مختلف النوع اند این است که کالونی‌های جداگانه هر باکتری بطور خالص بدست آید تا بعداً آزمایشات بیوشیمیک و دیگر تست‌های لابراتواری نزد هر باکتری بطور جداگانه صورت گیرد.

که در نتیجه با در نظرداشت میکروب که با سیروم خون مخلوط باشد و اجرای تست‌های سیرولوژیک، بیولوژیک و الرژیک نوع باکتری بطور یقینی تشخیص می‌گردد که در لابراتوار جهت حصول کالونی‌های جداگانه هر باکتری از اوساط Agar دار در Petri - Dish ها و Tube ها استفاده می‌گردد.

میتود Drigalsky

جهت بدست آوردن کلچر خالص باکتری‌ها از کشت باکتری‌ها در اوساط غذایی جامد استفاده می‌گردد طوری‌که مواد تحت مطالعه در اوساط غذایی بصورت خطوط کوچک کشت شده بعداً ۱۸۰ درجه پطری دیش دور داده شده و مجدداً در قسمت دیگری از ظرف به عین میتود کشت صورت می‌گیرد، درین میتود که به میتود Drigalsky معروف است مواد به تدریج به مصرف رسیده و باکتری‌ها در خطوط مختلف و به گروپ‌های مختلف می‌روند. (شکل ۲ - ۱)

میتود Shukewitch

ازین میتود جهت حصول کلچر خالص باکتری‌های متحرک مثلاً *Clostridium. Tetani* و *Proteus Vulgaris* استفاده می‌شود طوری‌که مواد در قسمت تحتانی تیوب جا داده شده که بعد از گذشت ۱۲ - ۱۸ ساعت باکتری‌های مذکور در سطح تیوب (Slant) می‌رویند که به سهولت می‌توان کلچر خالص آنرا بدست آورد. در حالیکه دیگر باکتری‌ها نمی‌توانند به سطح تیوب برسند.

کشت مایکرواورگانیزم‌ها

کشت یا Cultivation عبارت از پرورش تکثیر اورگانیزم‌ها ذریعه فراهم نمودن شرایط مساعد محیطی می‌باشد. مایکرواورگانیزم‌های تکثیرکننده باعث بوجود آوردن مایکرواورگانیزم‌های همانند خود شده و نیازمند به عناصر لازم برای ترکیب کیمیاوی آنها می‌باشد. مواد مغذی باید عناصر فوق را به اشکال قابل دسترس میتابولیکی در خود داشته باشند. علاوتا اورگانیزم‌ها برای سنتیز ماکرومالیکولها و نگهداشت غلظت‌های کیمیاوی لازم در غشاً، به انرژی میتابولیکی ضرورت دارند. فکتورهایی که باید حین نشونما در وسط زرعیه کنترل گردند شامل مواد مغذی، pH، درجه حرارت، تهویه، غلظت مواد نمکی و قوه ایونیک محیط می‌باشند.

ایجابات نشونما

بیشترین وزن خشک مایکرواورگانیزم‌ها را مواد عضوی از قبیل کاربن، هایدروجن، نایتروجن، اکسیجن، فاسفورس و سلفر تشکیل می‌دهد. علاوه برآن آیون‌های غیرعضوی مانند پتاسیم،

سودیم، آهن، مگنیزیم، کلسیم، و کلوراید برای ایجاد سهولت در کتالایز انزیماتیک (Enzymatic catalysis) و حفظ میلان غلظت کیمیاوی در امتداد غشای حجروی لازم اند. اکثراً مواد عضوی از ماکرومالیکول‌هایی متشکل اند که توسط (anhydride bonds) با هم وصل اند. سنتیز آنهایدارید باند ضرورت به انرژی کیمیاوی دارد. انرژی متذکره از دو رابطه phosphodiester در ATP حاصل می‌گردد. انرژی اضافی که برای حفظ ترکیب ثابت سایتوپلازمیک حین نشونما در محیط کیمیاوی متغیر خارج حجروی ضرور است از *proton motive force* یا نیروی محرک پروتون حاصل می‌گردد. *Proton motive force* عبارت از انرژی پتانسیل است که در نتیجه انتقال پروتون‌ها از بین غشا حاصل می‌گردد. در *eukaryote* ها غشا قسمتی از مایتوکاندریا و یا کلوروپلاست بوده می‌تواند. در *prokaryote* ها غشا عبارت از غشای سایتوپلازمیک حجره می‌باشد.

نیروی محرک پروتون یک تفاوت میلان الکتروکیمیاوی بوده و متشکل از دو جز می‌باشد: تفاوت در pH (غلظت آیون هایدروجن) و تفاوت در چارج آیونیک. چارج قسمت خارجی غشاً نظر به قسمت داخلی غشاً آن بیشتر مثبت می‌باشد. تفاوت بین چارج باعث می‌گردد که حین دخول پروتون به سایتوپلازم از طریق غشاً انرژی آزاد گردد. انرژی آزاد شده در قسمت حرکت حجره، حفظ میلانهای مالیکولی و آیونیک در بین غشاً و سنتیز روابط آنهایدارید در ATP و یا همه این اهداف مورد استفاده قرار می‌گیرد. برعکس حجراتی که دارای یک منبع ATP باشد، امکان دارد از انرژی روابط آنهایدارید برای ایجاد نیروی محرک پروتون استفاده نماید که این به نوبه خود در قسمت تحرکیت حجره و حفظ میلانهای کیمیاوی آن مورد استفاده قرار گرفته می‌تواند.

یک اورگانیزم برای نشونما به عناصر عضوی و تمام آیون‌های لازم برای انرژی و کتالایز ضرورت دارد. علاوه‌تاً باید یک منبع انرژی برای ایجاد نیروی محرک پروتون و سنتیز ماکرومالیکول‌ها موجود باشد. مایکرواورگانیزم‌ها نظر به ضروریات تغذیوی و منابع انرژی میتابولیک باهم تفاوت‌های زیادی دارند.

منابع انرژی میتابولیک

سه میکانیزم عمده‌ایکه برای تولید انرژی میتابولیک استفاده می‌گردند عبارت از *fermentation*، *photosynthesis* و *respiration* می‌باشند. حد اقل یکی از میکانیزم‌های فوق باید برای نشونمای

یک اورگانیزم به کار برده شوند.

تخمیر (Fermentation)

تشکل ATP در تخمیر توأم با انتقال الکترون‌ها نمی‌باشد. تخمیر متصف است با *substrate phosphorylation* که عبارت از یک پروسه انزیماتیک بوده و در آن رابطه *pyrophosphate* بواسطه یک میانجی میتابولیک *phosphorylate* شده مستقیماً به ADP/انتقال می‌یابد. این میانجی‌های *phosphorylate* شده توسط ترتیب دوباره مواد *fermentable* مانند گلوکوز، لکتوز و یا *arginine* تشکیل می‌گردند. از آنجائیکه تخمیر با تغییر در حالت اوکسیدشن یا ریدکشن مواد قابل تخمیر توأم نمی‌باشد، ترکیب عناصر در تولیدات تخمیر باید با مواد فوق یکسان باشند. طور مثال تخمیر یک مالیکول گلوکوز $C_6H_{12}O_6$ در عملیه *Embden Meyerhof pathway* منتج به حصول دو رابطه پایروفاسفیت در ATP و تولید دو مالیکول لکتیک اسید $C_3H_6O_3$ می‌گردد.

تنفس (Respiration)

تنفس مشابه به یکجا شدن یک پروسه وابسته به انرژی با خروج چارج از یک *battery* می‌باشد. ارجاع کیمیای یک اوکسیدانت (*electron acceptor*) از طریق یک سلسله خاص ناقلین الکترونها در غشاً باعث ایجاد نیروی محرک پروتون در غشای باکتری می‌گردد. ارجاع کننده (*electron donor*) امکان دارد عضوی و یا غیرعضوی باشد؛ طور مثال لکتیک اسید منحیث ارجاع کننده برای بعضی اورگانیزم‌ها و گاز هایدروجن منحیث ارجاع کننده برای سایر اورگانیزم‌ها فعالیت می‌نماید. اوکسیجن گازی (O_2) غالباً بحیث اوکسیدانت فعالیت نموده ولی اوکسیدانت‌های بدیل که توسط بعضی اورگانیزم‌ها استفاده می‌گردند شامل CO_2 ، SO_4 و NO_3 می‌باشند.

فوتوسنتز (Photosynthesis)

فوتوسنتز مشابه به تنفس بوده که در آن ارجاع یک اوکسیدانت از طریق سلسله خاص ناقلین الکترونها باعث ایجاد نیروی محرک الکترون می‌گردد. تفاوت میان دو پروسه فوق در این است که در فوتوسنتز ارجاع کننده و اوکسیدانت در نتیجه عملیه *photochemical* از انرژی نوری که توسط پگمنت‌های غشا جذب می‌گردند به میان می‌آید؛ بنابراین، فوتوسنتز فقط تا زمانی ادامه می‌یابد که یک منبع انرژی نوری موجود باشد. نباتات و بعضی باکتری‌ها با استفاده از آب بحیث ارجاع کننده کاربن دای اکساید، قادر به ذخیره مقادیر قابل ملاحظه انرژی نوری می‌باشند. درین پروسه اوکسیجن آزاد و مواد عضوی تولید می‌گردند. تنفس که در نتیجه آن اوکسیدشن انرژی‌تیک مواد عضوی توسط یک آخذة الکترونی مانند اوکسیجن صورت می‌گیرد، به اورگانیزم‌های دارای فوتوسنتز در عدم

موجودیت نور انرژی تهیه می‌نماید.

تغذی

مواد مغذی اوساط زرعیه باید حاوی تمام مواد ضروری برای سنتیز بیولوژیک اورگانیزم‌های جدید باشد. درین مبحث مواد مغذی نظر به عناصری که تهیه می‌نمایند تصنیف بندی گردیده اند.

منبع کاربن

طوریکه فوقاً تذکر یافت، نباتات و بعضی باکتری‌ها قادر اند تا از انرژی فوتوسنتتیک برای ارجاع کاربن دای اکساید در موجودیت آب استفاده نمایند. این اورگانیزم‌ها به گروه Autotroph تعلق می‌گیرند و عبارت از موجوداتی اند که برای نشونما به مواد عضوی ضرورت ندارند. نوع دیگر Autotroph ها عبارت از chemolithotroph می‌باشد و شامل اورگانیزم‌هایی اند که از مواد غیرعضوی مانند هایدروجن و یا thiosulfate بحیث ارجاع کننده و از کاربن دای اکساید بحیث منبع کاربن استفاده می‌نمایند.

Heterotroph ها برای نشونما به کاربن عضوی ضرورت دارند و کاربن عضوی باید به شکل قابل جذب آن در دسترس باشد. طور مثال نفتالین می‌تواند که کاربن و تمام انرژی لازم را برای نشونمای herotroph های تنفس کننده مهیا نماید، ولی تعداد کمی از اورگانیزم‌ها مراحل لازم میتابولیک برای استفاده از نفتالین را دارا می‌باشند. از جانب دیگر گلوکوز می‌تواند در نشونمای فرمتتی و تنفسی بسیاری اورگانیزم‌ها مساعدت نماید. مسئله عمده اینست که وسط زرعیه دارای مقادیر مناسب مواد برای مایکروبهای نشونما کننده باشد. وسط که برای نشونمای یک اورگانیزم مساعد است امکان دارد نشونمای اورگانیزم دیگری را نهی نماید.

کاربن دای اکساید برای یک تعداد تعاملات بیوسنتتیز لازم شمرده می‌شود. بسیاری اورگانیزم‌های تنفسی کاربن دای اکساید را بیش از حد مورد نیاز تولید می‌نمایند، در حالیکه تعداد دیگری در وسط زرعیه شان به یک منبع کاربن دای اکساید ضرورت دارند.

منبع نایتروجن

نایتروجن جزء عمده در ترکیب پروتین و نوکلئیک اسیدها بوده و تقریباً ۱۰٪ وزن خشک حشرات باکتریایی را تشکیل می‌دهد. نایتروجن امکان دارد از منابع مختلفه بدست آید و مایکرواورگانیزم‌ها نظر به توانمندی شان برای جذب نایتروجن از همدیگر متفاوت می‌باشند. حاصل نهایی تمام تعاملات برای استفاده از نایتروجن عبارت از شکل ارجاع شده عنصر نایتروجن یعنی آیون امونیم (NH_4^+) می‌باشد.

بسیاری مایکرواورگانیزمها قادر به ترکیب نایتريت (NO_3^-) و نایتريت (NO_2^-) با ارجاع آیون‌های فوق به امونیا (NH_3) می‌باشند. این تعاملات *assimilation* نظر به تعاملات که برای *dissimilation* نایتريت و نایتريت به کار می‌روند متفاوت می‌باشند. تعاملات *dissimilatory pathway* توسط اورگانیزم‌های که آیون‌های متذکره را به حیث آخذه‌های نهایی الکترونی در عملیه تنفس به کار می‌برند، مورد استفاده قرار می‌گیرد. این پروسه به نام *denitrification* یاد شده و محصول آن عبارت از گاز نایتروجن N_2 است که به فضای خارجی آزاد می‌گردد.

قابلیت جذب نایتروجن با ارجاع NH_3 که به نام *Nitrogen fixation* یاد می‌گردد وصف بالخاصه حشرات پروکاریوتیک بوده و تعداد نسبتاً کم باکتری‌ها این ظرفیت میتابولیک را دارا می‌باشند. این پروسه به مقادیر زیاد انرژی میتابولیکی ضرورت داشته به سهولت توسط اوکسیجن خنثی می‌گردد. ظرفیت تثبیت نایتروجن یا *Nitrogen fixation* در باکتری‌های مختلف النوع موجود بوده که چنین باکتری‌ها ستراتیژی‌های مختلفه بیوشیمیکی را برای حفظ انزایم‌های *Nitrogen fixing* از اوکسیجن، به کار می‌برند.

بسیاری مایکرواورگانیزم‌ها می‌توانند از NH_4 یا امونیم بحیث یگانه منبع نایتروجن استفاده نمایند و عده دیگر اورگانیزم‌ها قابلیت تولید امونیم را از امین‌های ($R-NH_2$) و یا امینواسیدها دارا می‌باشند. تولید امونیا در نتیجه *deamination* امینواسیدها به نام *ammonification* یاد می‌گردد. امونیا در نتیجه تعاملات بیوشیمیکی که *glutamate* و *glutamine* را در بر می‌گیرند در ترکیب مواد عضوی شامل می‌گردد.

منبع سلفر

همانند نایتروجن سلفر نیز در ترکیب بسیاری مواد عضوی حشرات شامل است. سلفر در ساختمان انواع کوانزایم‌ها شامل بوده و در زنجیرهای جانبی *cysteinyl* و *methionyl* پروتین‌ها نیز دریافت می‌شود. سلفر به شکل عنصر آن توسط نباتات و حیوانات استفاده شده نمی‌تواند. با آنهم بعضی باکتری‌های اوتوتروف می‌توانند آنرا به شکل سلفات $(SO_4)^2$ اوکسیدایز نمایند. اکثر مایکرواورگانیزم‌ها می‌توانند از سلفات بحیث یک منبع سلفر استفاده نمایند یعنی سلفات را به شکل هایدروجن سلفاید (H_2S) ارجاع نمایند. بعضی مایکرواورگانیزم‌ها می‌توانند هایدروجن سلفات را مستقیماً از وسط زرعیه جذب نمایند ولی این مرکب می‌تواند برای بسیاری اورگانیزم‌ها توکسیک باشد.

منبع فاسفورس

فاسفیت $(PO_4)^3$ در ترکیب *ATP*، نوکلئیک اسید، و کوانزایم‌های مانند *NAD*، *NADP* و

flavinها لازم شمرده می‌شود. علاوه بر بسیاری میتابولیت‌ها، شحمیات (phospholipid و lipid A)، اجزای تشکیل دهنده دیوار حجروی (teichoic acid)، بعضی پولی سکرایدهای کپسول و بعضی پروتئین‌ها دارای فاسفور می‌باشند. فاسفیت همیشه به شکل فاسفیت آزاد غیرعضوی جذب می‌گردد.

منابع منرال‌ها

برای پیشبرد فعالیت آنزیم‌ها به منرال‌های متعددی ضرورت است. آیون مگنیزیم $(Mg)^{++}$ و آیون آهن $(Fe)^{++}$ در مشتقات porphyrin نیز دریافت می‌گردند. مگنیزیم در مالیکول chlorophyll و آهن بحیث قسمتی از کوانزیم cytochrome‌ها و peroxidase‌ها موجود اند. مگنیزیم و آهن برای فعالیت نورمال و ثبات رایبوزوم‌ها ضروری شمرده می‌شود. آیون کلسیم به حیث جز متشکله دیوار حجروی باکتری‌های گرام مثبت لازم شمرده می‌شود، گرچه باکتری‌های گرام منفی به آن ضرورت ندارند. بسیاری اورگانیزم‌های آبی جهت نشونما به آیون سودیم ضرورت دارند. برای ایجاد یک وسط زرعیه برای کشت بسیاری مایکرواورگانیزم‌ها لازم است تا منابع پتاسیم، مگنیزیم، کلسیم، و آهن به شکل آیونیک آن یعنی $(K^+, Mg^{++}, Ca^{++}, Fe^{++})$ موجود باشند. بسیاری منرال‌های دیگر (مانند $Mn^{++}, Mo^{++}, Co^{++}, Cu^{++}$ و Zn^{++}) نیز لازم دانسته می‌شوند. منرال‌های متذکره در آب نل و یا به شکل ناخالص در سایر مرکبات موجود بوده می‌توانند.

فکتورهای نشونما (Growth factors)

فکتور نشونما عبارت از یک مرکب عضوی بوده که برای نشونمای حجره لازم دانسته شده ولی خود حجره قادر به سنتیز آن نمی‌باشد. بسیاری مایکرواورگانیزم‌ها در صورت موجودیت مواد مغذی که قبلاً ذکر شد قادر اند تا تمام ساختمانهای تشکیل دهنده ماکرومالیکول‌ها را سنتیز نمایند که عبارتند از: امینواسیدها؛ purine و pyrimidine‌ها (پیشقدم میتابولیکی نوکلئیک اسیدها)، کاربوهایدریت‌های اضافی (پیشقدم پولی سکرایدها) و اسیدهای شحمی و مرکبات isoprenoid. علاوه بر اورگانیزم‌های دارای حیات آزاد باید قادر به سنتیز مغلق ویتامین‌ها که بحیث پیشقدم کوانزیم‌ها فعالیت می‌نمایند، نیز باشد.

هر یک از مرکبات اساسی فوق در نتیجه سلسله‌های جداگانه تعاملات انزیماتیک سنتیز می‌گردند. هر آنزیم تحت کنترل یک gene خاص تولید می‌شود. زمانیکه یک اورگانیزم به gene mutation مواجه گردد که در نتیجه آن یکی از این آنزیم‌ها قادر به فعالیت نگردد زنجیر مربوطه شکسته و محصول نهایی بدست نمی‌آید. درینصورت اورگانیزم باید مغلق مربوطه را از محیط بدست آورد. این مغلق فکتور نشونما یا growth factor را برای اورگانیزم تشکیل می‌دهد. این نوع میوتیشن امکان دارد به سهولت در لابراتوار صورت گیرد.

انواع مختلفی از مایکروارگانیزم‌ها به صورت شان به فکتور نشونما از همدیگر متفاوت می‌باشند. معلق‌های مربوط به فکتور نشونما در تمام اورگانیزم‌ها دریافت شده و جزء اساسی شان را تشکیل می‌دهد. تفاوت در ضرورت مایکروارگانیزم‌ها اختلاف در قابلیت سنتتیز شان را منعکس می‌سازد. بعضی انواع ضرورت به فکتور نشونما ندارند، در حالیکه تعداد دیگری مانند بعضی لکتوباسیل‌ها در جریان تکامل تدریجی شان قابلیت سنتتیز 30-40 مرکب اساسی را از دست داده‌اند و بنابراین ضرورت دارند تا آنرا از محیط به دست آرند.

فکتورهای محیطی که بالای نشونما اثر دارند

یک وسط زرعیه مناسب باید حاوی تمام مواد مغذی لازم برای کشت مایکرواورگانیزم‌ها باشد و نیز فکتورهای از قبیل pH، حرارت و تهویه باید محتاطانه کنترل گردند. در یک وسط که بشکل مایع استعمال می‌شود؛ امکان دارد برای اهداف خاص با علاوه نمودن agar و یا silica gel به شکل gel در آورده شود. Agar عبارت از عصاره پولی سکراید الجی بحری بوده و طور بی نظیر برای کشت مایکروارگانیزم‌ها مناسب می‌باشد، زیرا در برابر فعالیت مایکروبی مقاوم بوده و در حرارت 100 درجه سانتی‌گرید منحل می‌گردد ولی تا زمانیکه در حرارت پائین‌تر از 45 درجه سانتی‌گرید قرار نگیرد به حالت gel در نمی‌آید. حجرات در وسط به حرارت 45 درجه سانتی‌گرید معلق گردیده و بزودی با سردی مواجه می‌گردد تا به شکل gel درآید، بدون آنکه به حجرات آسیبی برسد.

مواد مغذی

در صفحات قبلی وظیفه هر یک از مواد مغذی توضیح گردید و یک لیست مواد مناسب ارائه گردید. بصورت عموم، مواد ذیل باید موجود باشند:

۱- دونر و رسپتور هایدروجن: 2g/lit

۲- منبع کاربن: 1g/lit

۳- منبع نایتروجن: تقریباً 1g/lit

۴- منرالها: سلفر و فاسفورس هر یک در حدود 50mg/lit و Trace elements در حدود 0.1-1 mg/lit

۵- فکتور نشونما (growth factor): امینواسیدها، pyrimidine purine هر یک در حدود 50 mg/lit

۶- ویتامین‌ها: 0.1-1 mg/lit

برای مطالعه میتابولیزم مایکروبیها اکثراً لازم است تا یک وسط کاملاً مصنوعی آماده گردد که خواص اصلی و غلظت هر یک از اجزای ترکیبی بصورت واضح معلوم می‌باشد. در غیراینصورت استفاده از مواد طبیعی مانند عصاره خمیرمایه، پروتین هضم شده و یا مواد مشابه آن نهایت ارزان و ساده خواهد بود. بسیاری مایکروبیهای که بصورت آزاد زندگی می‌کنند در وسط حاوی عصاره خمیرمایه به بسیار خوبی نشونما خواهد نمود. انواع پرازیتیک امکان دارد مواد خاصی را ضرورت داشته باشند که فقط در خون و یا عصاره انساج حیوانی دریافت می‌شوند. اما مایکروبیهای پرازیتیک (مانند *Treponema pallidum*) وجود دارند که در خارج از عضویت نشونما کرده نمی‌توانند و یا فقط در داخل حجرات *eukaryotic* نشونما می‌نمایند (مانند *Chlamydia trachomatis*).

برای بسیاری اورگانیزمها یک مرکب ساده (مثلاً یک امینواسید) بحیث منبع انرژی، منبع کاربن، و منبع نایتروجن مورد استفاده قرار گرفته می‌تواند. تعداد دیگری ضرورت به یک مرکب جداگانه برای هر منبع فوق دارند. اگر مواد طبیعی در یک وسط غیرمصنوعی مواد مغذی را به مقادیر ناکافی داشته باشد، باید مواد فوق به وسط علاوه گردند.

غلظت آیون هایدروجن (pH)

بسیاری اورگانیزمها دارای محدوده کوچکی برای pH مطلوب می‌باشند. pH مطلوب باید بصورت تجربی برای هر نوع مایکرواورگانیزمها تعیین گردد. بسیاری اورگانیزمها در pH 6.0-8.0 به خوبی نشونما می‌کنند. با آنهم بعضی انواع (*acidophil* ها) به طرف pH 3.0 و سایرین یعنی (*alkalophil* ها) به pH 10.5 شدیداً متمایل می‌باشند.

مایکرواورگانیزمها pH داخلی شانرا به اساس اندازه pH خارجی تنظیم می‌نمایند. اسیدوفیل ها pH داخلی شانرا در حدود 6.5 با موجودیت pH خارجی 5.0 - 1.0 حفظ می‌نمایند. نوتروفیل ها pH داخلی شانرا حدود 7.5 در موجودیت pH خارجی 5.5-8.5 و الکلوفیل ها pH داخلی شانرا در حدود 9.5 در موجودیت pH خارجی 9.0-11.0 حفظ می‌نمایند. pH داخلی بواسطه *proton transport system* تنظیم می‌گردد. این سیستم در غشای سابتویلازمیک قرار داشته و مشتمل است بر *ATP-driven proton pump* /بتدایی و *Na⁺/H⁺ exchanger*. یک سیستم تبادل *K⁺/H⁺* نیز درین پروسه تنظیم pH در تترالوفیل ها مساعدت می‌نماید.

حرارت

انواع مختلفه مایکروبیها نظر به درجه حرارت مطلوب شان برای نشونما از همدیگر متفاوت می‌باشند: انواع *psychrophilic* در درجه حرارت پائین یعنی (15-20°C): انواع *mesophilic* در درجه

حرارت ($30-37^{\circ}\text{C}$) و بسیاری انواع *thermophilic* در درجه حرارت ($50-60^{\circ}\text{C}$) بخوبی نشونما می‌نمایند. بسیاری اورگانیزم‌ها *mesophilic* اند، درجه حرارت 30°C برای بسیاری مایکروبه‌های آزاد درجه حرارت مطلوب بوده و درجه حرارت عضویت میزبان برای حیوانات همزی خونگرم مطلوب شمرده می‌شود.

بلندترین درجه حرارت که توسط یک نوع خاص قابل تحمل می‌باشد، ارتباط نزدیک به ثبات عمومی حرارتی پروتئین‌هایی دارد که از عصاره حجرات متذکره بدست می‌آید. مایکرواورگانیزم‌ها همانند نباتات و حیوانات عکس‌العمل حرارتی (*heat-shock*) را دارند، که عکس‌العمل متذکره عبارت از سنتتیز گذری پروتئین‌های (*heat-shock*) در صورت مواجه شدن آنی به حرارت بلندتر از حرارت مطلوب می‌باشد. این پروتئین‌ها بصورت فوق‌العاده در مقابل حرارت مقاوم بوده و پروتئین‌های حجره را که در مقابل حرارت حساس اند ثبات می‌بخشد. (1)

ارتباط میان سرعت نشونما و حرارت در طرح Arrhenius نشان داده شده است. Arrhenius نشان داد که لوگاریتم سرعت تعامل کیمیاوی که به $(\log k)$ نشان داده شده است تابع خطی معکوس درجه حرارت ($1/T$) می‌باشد. فراتر از اثرات حرارت بالای نشونما، حرارت خیلی زیاد باعث کشتن مایکرواورگانیزم‌ها می‌گردد. درجه حرارت نهایت زیاد برای تعقیم مستحضرات مورد استفاده قرار می‌گیرد. درجه حرارت نهایت پائین نیز باعث مرگ حجرات مایکروبی می‌گردد، گرچه طور قابل اطمینان برای تعقیم مورد استفاده قرار گرفته نمی‌تواند. باکتری‌ها پدیده دیگری را از خود ظاهر می‌سازند به نام *cold shock* یاد می‌گردد و عبارت از کشتن حجرات با مواجه نمودن آنی به حرارت پائین می‌باشد. طور مثال با پائین آوردن درجه حرارت از 37°C به 5°C تقریباً ۹۰ فیصد حجرات *Escherichia coli* از بین می‌روند. یک تعداد مرکبات حجرات را از تبرد و یا *cold shock* حفاظت می‌نماید که از جمله *glycerol* و *dimethyl sulfoxide* بیشتر مورد استفاده دارند.

تنفس مایکرواورگانیزم‌ها

تنفس در باکتری‌ها یک پروسه مغلق است که با آزاد ساختن انرژی مورد نیاز جهت سنتتیز مرکبات عضوی همراه است که آزاد شدن انرژی در نتیجهٔ اوکسیدیشن مواد عضوی صورت می‌گیرد Oxidation مواد به طرق مختلف صورت می‌گیرد: به شکل مستقیم، غیر مستقیم و طریقهٔ انتقال الکترون‌ها.

- به شکل مستقیم یعنی مواجه شدن با گاز اوکسیجن (Hydrogenation)
- به شکل غیر مستقیم Dehydrogenation که در این نوع اوکسیدیشن مواد عضوی به

اشکال مختلف هایدروجن را آزاد می‌نمایند که البته این عملیه در اثر اشتراک آب صورت می‌گیرد، طوریکه مالیکول های آب به مواد اوکسیداز شونده وصل گردیده و بعداً هایدروجن آزاد می‌گردد. بنابراین گفته می‌توانیم که درین طریقه اوکسیدیشن مواد به اثر نصب اوکسیجن آب به آنها صورت می‌گیرد. هایدروجن که به اثر اوکسیدیشن مواد عضوی آزاد می‌گردد با محصولات دیگر که درین پروسه پدید می‌آیند یکجا می‌گردد. اغلب باکتری‌ها مانند فقاریه ها و نباتات جهت تنفس از اوکسیجن مالیکولی هوا استفاده کرده که در جریان تنفس مواد عضوی را به H_2O و CO_2 اوکسیداز می‌کنند.

- طریقه انتقال الکترون‌ها: این طریقه طوری است ماده که الکترون را می‌دهد اوکسیده شده و آنکه می‌گیرد، ارجاع می‌شود. انتقال هایدروجن از مواد به طرق مختلف صورت می‌گیرد، گیرنده هایدروجن می‌تواند اوکسیجن هوا باشد یا موادی که قابلیت ارجاع را دارند.

عامل Oxido – Reduction می‌تواند به شکل ذیل صورت گیرد:

طرز تولید انرژی در باکتری‌ها مختلف است، مثلاً عده ای از باکتری‌ها به مثل اورگانیزم‌های عالی جهت تنفس از اوکسیجن مالیکولی استفاده کرده و مواد عضوی را اوکسیداز می‌نمایند که این نوع مایکروب‌ها را مایکروب‌های هوازی یا Aerobic می‌نامند، در حالیکه عده دیگری از مایکروب‌ها در عدم موجودیت اوکسیجن مواد عضوی را اوکسیداز کرده که به نام Anaerobic یاد می‌شوند. البته در بین انواع ذکر شده مایکروب‌های حد وسط (از نظر تنفسی) نیز وجود دارند که ذیلاً تصنیف مکمل مایکروب‌ها نظر به تایپ تنفسی شان ذکر می‌گردد:

۱- **مایکروب‌های هوازی مطلق یا Obligatory Aerobic:** این مایکروب‌ها در یک

اتموسفیر شامل 20% اوکسیجن به خوبی رشد و نمو می‌کنند و از این جهت سطح اوساط زرعیه مایع و جامد محل مناسب برای کشت و رشد بعدی آنها است مانند: *Sarcina* و *Vibrio cholera*, *Mycobacterium Tuberculois*. این نوع مایکروب‌ها دارای انزایم‌های اند که توسط آن از مواد اوکسیده شده هایدروجن را گرفته و به اوکسیجن هوا انتقال می‌دهند.

۲- **مایکروب‌های هوازی جزئی یا Microaerophilic Microbes:** این نوع مایکروب‌ها

به مقدار خیلی کم اوکسیجن ضرورت دارند (تقریباً 1%) غلظت بلند اوکسیجن این

مایکروب‌ها را محو نه نموده بلکه نشونمای آن‌ها را توقف می‌دهند مانند Actinomycetes و Leptospirae.

۳- مایکروب‌های غیر هوازی اختیاری **Facultative Anaerobic**: این نوع مایکروب‌ها می‌توانند در موجودیت و یا عدم موجودیت اوکسیجن مالیکولی رشد و تکثر کنند که اغلب مایکروب‌های Pathogen و Saprophyte مربوط این دسته می‌باشند.

Capnophilic Microbes: این گروه از مایکروب‌ها جهت رشد و نشونمای خود به غلظت کم اوکسیجن و مقادیر زیاد از CO₂ نیاز دارند مانند Brucella suis.

۴- مایکروب‌های غیر هوازی مطلق **Obligatory Anaerobic Microbes**: برای این گروه از مایکروب‌ها اوکسیجن یکی از عوامل توقف دهنده رشد و نمو بوده و مضر می‌باشد مانند: Cl. Botulinum و Cl. Perferingens، Cl. Tetani.

فعالیت مایکروب‌ها تقریباً همیشه مربوط است به درجهٔ هوازی بودن مواد غذایی. ارتباط غذایی: اوساط غذایی ممکن است به طور اعظمی با هایدروجن اشباع شده باشند، یا اینکه با اوکسیجن، M. Clark پیشنهاد کرد که درجهٔ هوازی بودن وسط با لگاریتم فشار قسمی گاز هایدروجن ارائه شود که آنرا پتانسیل Oxido-reduction می‌نامند و معمولاً به RH₂ نشان داده می‌شود. (هایدروجن ارجاع شده) حدود این Potential از صفر الی 42.6 می‌باشد که این تمام درجات اشباع یک مایع را با O₂ و یا H₂ معین می‌سازد که ذیلاً مطالب فوق به ارتباط تنفس مایکروب‌ها توضیح می‌گردد:

اگر RH₂ معادل صفر باشد به این معنی است که اشباع محیط توسط اوکسیجن به حد اقل بوده در حالیکه توسط هایدروجن اعظمی می‌باشد و RH₂ معادل 42.6 اشباع اعظمی محیط را توسط اوکسیجن ارائه می‌کند که درینصورت اشباع محیط توسط هایدروجن در سطح اصغری قرار دارد رشد باکتری‌های هوازی از RH₂ معادل 20 - 14 و اضافه تر از آن و از مایکروب‌های Facultative Anaerob / از 0 - 20 و اضافه تر از آن مایکروب‌های Anaerobic / از 0 - 12 صورت می‌گیرد.

مایکرواورگانیزم‌های هوازی (Aerobic Microorganisms)

مایکرواورگانیزم‌های هوازی آنهایی اند که جهت تهیهٔ انرژی برای خود از کاربوهایدریت‌ها و دیگر مواد عضوی استفاده می‌کنند مانند Fungus ها Yeast و بعضی باکتری‌های دیگر. تعداد زیادی از باکتری‌های هوازی مواد عضوی را به طور کامل اوکسیدیشن نموده و گاز CO₂ را به حیث محصول نهایی استقلالاب مواد مذکور تولید می‌نمایند.

قوه ایونیک و فشار اسموتیک

فکتورهای دیگر از قبیل فشار اسموتیک و غلظت نمک نیز ممکن تا حدود کمتری کنترل گردند. برای بسیاری اورگانیزمها اوصاف اوساط عادی قناعت بخش اند ولی برای اشکال آبی و اورگانیزمهایی که به نشونما در محلول های قندی غلیظ تطابق یافته اند فکتورهای متذکره باید در نظر گرفته شوند. اورگانیزمهایی که به غلظت های بلند نمک ضرورت دارند به نام *halophilic* و آنهایی که به فشار بلند اسموتیک ضرورت دارند به نام *osmophilic* یاد می‌شوند.

اکثریت باکتری ها می‌توانند فشار اسموتیک و قدرت ایونیک خارجی زیادی را تحمل نمایند، زیرا چنین باکتری های قادر اند تا فشار اسموتیک و غلظت آیونیک داخلی شان را خود تنظیم نمایند: *Osmolarity* ذریعه ترانسپورت فعال ایون های K^+ بداخل حجره تنظیم می‌گردد؛ قوه ایونیک داخلی ذریعه اخراج پولی امین عضوی به نام *putrescine* که دارای چارج مثبت اند تنظیم می‌گردد. از آنجائیکه *putrescine* چارج های مثبت متعدد را در یک مالیکول انتقال می‌دهند، یک کاهش بزرگ در قوه ایونیک فقط مقادیر کمی از قوه اسموتیک را به مصرف می‌رساند.

میتوذهای کشت (Cultivation Methods)

دو پرابلم مورد ملاحظه قرار خواهد گرفت: انتخاب یک وسط مناسب و تجرید یک اورگانیزم باکتریایی به صورت کلچر خالص.

تخنیک مورد استفاده و وسط انتخاب شده نظر به نوعیت تحقیق فرق می‌نماید. طور عموم ممکن سه حالت ذیل موجود باشند:

۱- امکان دارد هدف از کلچر کشت حجرات یک نوع خاص باشد.

۲- امکان دارد هدف تعیین تعداد و انواع اورگانیزمهای موجود در مواد مورد مطالعه باشد.

۳- ممکن هدف، تجرید یک نوع خاص مایکرواورگانیزم از یک منبع طبیعی باشد.

الف: کشت حجرات با یک نوع خاص: مایکرواورگانیزمهای که از نظر میکروسکوپی در یک محیط طبیعی نشونما می‌نمایند امکان دارد نمودی شان بصورت کلچر خالص در وسط مصنوعی نهایت مشکل باشد. طور مثال کلچر انواع معین پرازیت ها هیچگاهی خارج از وجود میزبان بدست آمده نمی‌تواند. با وجود آنهم طور عموم اگر شرایط طبیعی که اورگانیزم در آن نشونما می‌نماید با دقت کامل فراهم گردند یک وسط مناسب بدست آمده می‌تواند. فکتورهای از قبیل *PH*، درجه حرارت و تهویه به سهولت و تنظیم گردیده می‌تواند، ولی تهیه مواد مغذی یک مشکل عمده شمرده می‌شود. نقش محیط حیه دارای اهمیت بوده و تحلیل آن مشکل می‌باشد. یک پرازیت ممکن به عصاره انساج میزبان

ضرورت داشته باشد و یک اورگانیزم آزاد ممکن به موادی ضرورت داشته باشد که توسط مایکرواورگانیزم دیگری که با آن زندگی اشتراکی دارد افزای می‌گردد. تجارب قابل ملاحظه‌ی می‌مکن برای تعیین نیازمندی‌های اورگانیزم لازم باشند و موفقیت در آن مربوط می‌باشد به تهیه منبع مناسب هر کتگوری از مواد مغذی که در آغاز این فصل تذکر داده شد.

ب. معاینه مایکروبیولوژیک مواد طبیعی: مواد طبیعی مورد معاینه امکان دارد حاوی *microenvironment* و یا محیط‌های کوچک دیگری باشد که هرکدام آن یک محیط زیست مناسب را برای انواع مختلفه اورگانیزم‌ها مهیا می‌سازد. قرار دادن یک نمونه مواد تحت شرایط معین باعث خواهد شد تا یک گروه خاص اورگانیزم‌ها تولید کالونی نموده و بسیاری انواع دیگر از نظر دور بمانند. به این دلیل معمولاً سمپل یا نمونه مواد تا حد ممکن با استفاده از اوساط و شرایط متنوع مورد نشونما قرار داده می‌شوند. اگر هدف این باشد تا اکثریت انواع اورگانیزم‌ها در مواد باید شناخته شوند غیرمعقول نخواهد بود که تحت ۶ الی ۸ نوع شرایط کلچری قرار داده شوند.

برای اینکه به هر نوع اورگانیزم موجود چانس نشونما داده شود، از وسط جامد استفاده به عمل می‌آید تا از ازدحام کالونی‌ها جلوگیری بعمل آید. درغیراینصورت، رقابت میان اورگانیزم‌ها باعث خواهد شد تا بعضی انواع از تشکل کالونی محروم گردند.

ج. تجرید یک نوع خاص مایکرواورگانیزم: اگر یک نمونه کوچک خاک با عملیه‌های مناسب مواجه گردد، در هر *microenvironment* یا محیط کوچک آن انواع مختلفه اورگانیزم‌ها نشونما خواهند نمود. از خاک بارور یا حاصلخیز (مرطوب، تهویه شده، غنی از منرالها و مواد عضوی) صدها و حتی هزاران نوع تجرید شده می‌تواند. این عملیه با انتخاب نوع معین صورت می‌گیرد. طور مثال یک گرم خاک در داخل یک فلاسک و یا وسط مایع که برای نوع مورد نظر اورگانیزم تهیه شده باشد قرار داده می‌شود، مثلاً *aerobic nitrogen fixer* برای (*azotobacter*). درینصورت وسط فاقد نایتروجن مرکب بوده و تهویه آن به درستی صورت می‌گیرد. اگر حجرات *azotobacter* در خاک موجود باشند، در چنین وسط بخوبی نشونما خواهند نمود. انواع که قادر به تثبیت نایتروجن نباشند فقط تا حدی نشونما خواهند نمود که خاک با نایتروجن تثبیت شده آغشته باشد. زمانیکه نشونمای کلچر بیشتر می‌گردد فیصدی *azotobacter* نیز طور قابل ملاحظه‌ی زیاد می‌یابد. بنا برین میتود فوق به نام *enrichment culture* یا وسط غنی شده یاد می‌گردد. انتقال یک نمونه از چنین کلچر به یک وسط تازه باعث غنای بیشتر *azotobacter* شده و پس از چندین دوره انتقال، کلچر در وسط غنی شده جامد در ظروف هموار (پلیت) قرار داده شده و کالونی‌های *azotobacter* تجرید می‌گردند.

وسط مایع به منظور رقابت و انتخاب انواع دلخواه استفاده می‌گردند حتی اگر تنها چند حجره واحد

نوع مورد نظر در بین میلیونها حجره در خاک موجود باشند. مفاد بیشتر از *natural enrichment* یا غنای طبیعی گرفته شده می‌تواند. طور مثال به منظور دریافت *kerosene oxidizer* خاک *oil-laden* یا چرب انتخاب می‌گردد، زیرا چنین وسط یک محیط غنی شده برای نوع متذکره می‌باشد. کلچر غنی شده عبارت از عملیه ایست که طی آن وسط عیناً مانند محیط زیست طبیعی برای مایکرواورگانیزم مورد نظر آماده می‌گردد. یک اصل عمده در تهیه چنین محیط قرار ذیل می‌باشد: اورگانیزم انتخاب شده از نوعی خواهد بود که تمام ایجابات تغذی آن برآورده گردیده بتوانند. طور مثال *azotobacter* در وسطی که حاوی نایتروجن عضوی باشد بهتر نشونما می‌نماید، ولی ایجابات حداقل نشونمایی آنرا موجودیت N_2 تشکیل می‌دهد. بنابراین اورگانیزم متذکره برای وسطی انتخاب می‌گردد که حاوی N_2 به حیث یگانه منبع نایتروجن باشد. اگر نایتروجن عضوی به وسط علاوه گردد، *azotobacter* برای آن انتخاب نگردیده بلکه اورگانیزم دیگری که حداقل نیازمندی آن نایتروجن عضوی باشد، انتخاب می‌گردد.

اگر یک اورگانیزم خاصی را در مواد طبیعی جستجو می‌نماییم بهتر خواهد بود که اورگانیزم دریافت شده در یک وسط تشخیص دهنده *differential medium* قرار داده شود. وسط تشخیص دهنده عبارت از وسطی است که در آن کالونی‌های یک نوع خاص مایکرواورگانیزم طور مشخص ظاهر می‌گردند. طور مثال کالونی‌های *E. coli* در وسط *agar* که حاوی رنگهای *eosin* و *methylene blue* باشند (*EMB agar*) به شکل درخشندگی قوس قزح ظاهر می‌گردند. در وسط *EMB agar* که دارای غلظت زیاد قند یک قیمته باشد اورگانیزم‌های فرمنت کننده قند نیز باعث تولید کالونی‌ها به رنگ سرخ خواهد شد. وسط تشخیص دهنده برای اهدافی از قبیل تشخیص موجودیت *enteric bacteria* در آب و یا شیر و موجودیت پتوجن‌های معین در نمونه‌های کلینیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

تجربید مایکرواورگانیزمها در کلچر خالص

به منظور مطالعه اوصاف اورگانیزم‌های مورد نظر لازم است تا کلچر آن بصورت خالص بدون موجودیت سایر انواع اورگانیزم‌ها بدست آید. برای این هدف باید یک حجره واحد را از سایر حجرات جدا نموده و به شکلی کلچر گردد که حجرات حاصله از آن نیز از هم مجزا قرار گیرند. به این منظور میتودهای مختلفی موجود اند:

الف. *Plating* یا قراردادن در پلیت‌ها: برعکس حجرات وسط مایع، حجرات در وسط جلاتینی به شکل غیرمتحرک قرار می‌گیرند. بنابراین اگر چند حجره در یک وسط جلاتینی قرار

گیرند، هر یک آن به داخل یک کالونی جداگانه نشونما خواهند نمود. ماده جلاتینی ایدآل که اکثراً برای اوساط مایکروبیولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرد عبارت از agar می‌باشد. Agar یک پولی سکراید اسیدی بوده از عصاره یک نوع خاص الجی های سرخ بدست می‌آید. یک suspension 2-1.5% آن در آب، به حرارت 100°C منحل گردیده و یک محلول شفاف را بدست می‌دهد که در حرارت 45°C دوباره شکل gel را بخود می‌گیرد. بنابراین یک محلول معقم agar در حرارت 50°C سرد ساخته شده، باکتری و یا سایر حجرات مایکروبی به آن علاوه شده و بعداً در حرارت 45°C سرد ساخته می‌شود تا شکل gel را اختیار نماید. (گرچه بسیاری حجرات مایکروبی در حرارت 50°C از بین می‌روند، سرعت کشته شدن مایکروبها درین درجه حرارت از نظر زمانی بسیار کم است). پس ازینکه شکل gel را به خود اختیار نمود agar برای بار دیگر مایع نمی‌گردد تا اینکه به حرارت بلندتر از 80°C مواجه نگردد. بدین ترتیب متعاقباً از یک درجه حرارت مساعد برای نموی کلچر مایکروبی استفاده صورت گرفته می‌تواند. در میتود افشاندن روی پلیت یک suspension حجرات با agar ذوب شده در حرارت 50°C یکجا گردیده و بداخل یک پتری دیش پاشیده می‌شود. زمانیکه agar دوباره جامد می‌گردد، حجرات در آن غیرمتحرک گردیده و بداخل کالونی ها نشونما می‌نمایند. اگر suspension حجرات بخوبی رقیق گردیده باشد، کالونی ها بخوبی از همدیگر جدا می‌گردند، به این ترتیب احتمال زیاد می‌رود که هر کالونی از یک حجره واحد مشتق گردیده باشد. باوجود آن برای تأیید این موضوع لازم است تا یک کالونی نوع مورد نظر با آب مواجه ساخته شده و بعداً در پلیت قرار داده شود. با تکرار این عمل برای چندین مرتبه کلچر خالص بدست خواهد آمد.

Suspension اولی به نوبه خود در یک پلیت agar ذریعه یک لوپ بصورت خطوط مستقیم کشیده می‌شود. با کشیدن خطوط بیشتر تعداد کمتر حجرات در لوپ باقی خواهند ماند. و بالاخره لوپ حجرات واحد را بالای agar جابجا خواهد نمود. بعداً پلیت در incubation قرار داده شده و کالونی هایی که بهتر جدا گردیده می‌توانند از آن گرفته می‌شوند. این کالونی ها با آب مواجه ساخته شده و دوباره بالای agar بشکل خطوط قرار داده می‌شوند. اگر یک suspension (نه فقط تعدادی از حجرات نشونما کننده از یک کالونی و یا یک خط) به شکل رگه یا خط تولید شوند، درینصورت این میتود به اندازه میتود pour-plate قابل اعتماد بوده و نیز سریعتر از آن می‌باشد.

ب. رقیق کردن: یک میتود کمتر قابل اطمینان می‌باشد. درین میتود suspension بصورت مسلسل رقیق می‌گردد و سمپل‌های از هر دوره رفاقت در بالای پلیت قرار داده می‌شود. اگر فقط چند نمونه یک رفاقت معین به نشونما آغاز نمایند احتمال می‌رود که این کلچرها از یک حجره واحد نشئت نموده باشند. این میتود مورد استعمال زیادی نداشته به استثنای حالاتیکه در آن میتود plating امکانپذیر نباشد. یکی از اوصاف نامطلوب این میتود آنست که فقط برای تجرید انواع غالب اورگانیزم‌ها در بین انواع مختلط مورد استفاده گرفته می‌تواند.

انزایم‌های مایکرواورگانیزم‌ها

تمام تعاملات بیوشیمییک که در یک اورگانیزم زنده بخاطر استقلاب مواد، نمو و انکشاف بعمل می‌آید با شرکت انزایم‌ها صورت می‌گیرد. انزایم‌ها موادی هستند که بحیث catalisator ها در فعل و انفعالات کیمیایی وارد عمل می‌شوند و در حجرات برای کمک و انجام اعمال حیاتی بوجود می‌آیند یا بعبارة دیگر انزایم‌ها کاتالیستهای بیولوژیک اند که توسط حجرات زنده تولید شده و ماهیتاً پروتینی اند، انزایم‌ها دارای وزن مالیکولی بلند هستند، انزایم‌ها از لحاظ ترکیب و نظر به ساختمان خود به دو گروه تقسیم می‌شوند:

۱- انزایم‌های یک جزئی که فقط از پروتین ساخته شده اند.

۲- انزایم‌های دو جزئی یا Protoid که از یک جزء یا قسمت پروتینی و یک جزء غیر پروتینی ساخته شده اند، که قسمت غیر پروتینی آنرا به نام گروه Prosthetic یاد می‌کنند.

دوام ارتباط قسمت پروستتیک با قسمت پروتینی در انزایم‌های دو جزئی مختلف بوده می‌تواند که گروه پروستتیک از قسمت پروتینی خود جدا شده و در ارتباط مؤقتی یک پروتین دیگر قرار گیرد که این گروه پروستتیک را به نام Co-Enzyme یاد می‌کنند. در انزایم‌های یک جزئی رول گروه پروستتیک را گروه‌های کیمیایی معین که در ترکیب انزایم‌ها وجود دارد بازی می‌کند که این گروه‌ها به نام مراکز فعال انزایم‌ها یاد می‌شوند مثلاً گروه SH و گروه OH حلقه امیدوول و غیره، انزایم‌ها دارای فعالیت بلند بوده که بمقایسه کاتالیزورهای غیر عضوی بی اندازه قوی و فعال اند مثلاً یک مالیکول یک انزایم در ظرف یک دقیقه می‌تواند ده‌ها هزار مالیکول Substrate سبسترات را به مواد مختلف تبدیل نماید.

خصوصیت عمده آنزایم‌ها اینست که هر آنزایم بالای مواد مختص به خود عمل کرده و در حضور مواد مخصوص به خود تحریک شده و فعالیت می‌کند و بقیه مواد را تماس نمی‌گیرد مثلاً آنزایم Lactase سبب تجزیه لکتوز به گلوکوز و گلکتوز شده و بالای دیگر مواد (کاربوهایدریت‌ها) اثر ندارد.

فعالیت یک آنزایم مربوط است به درجه حرارت محیط PH وسط، غلظت سبسترات و غلظت خود آنزایم، همچنین موجودیت بعضی مواد کیمیای در وسط بالای فعالیت آنزایم‌ها تاثیر دارد که بعضی از این مواد فعالیت آنزایم‌ها را بالا برده که به نام مواد Activator یاد می‌شوند. در جمله می‌توان از کاتیون‌های دو و لانسۀ از قبیل Mg, Ni, Mn, Ca نام برد برعکس بعضی مواد کیمیای دیگر سبب نهی فعالیت آنزایم‌ها شده یا اینکه فعالیت آنزایم‌ها را کاهش می‌دهند که به نام مواد Inhibitor یاد می‌شوند مانند نمک‌های فلزات ثقیله، انتی بیوتیک‌ها SH₂ و غیره... مواد Inhibitor مراکز فعال آنزایم‌ها یا اتم فلزات را که در ترکیب آنها وجود دارد تماس کرده و در نتیجه فعالیت آنزایم‌ها را فلج می‌کند، می‌دانیم که سیر بیوشیمیک استقلاب مواد در حجرات مایکرواورگانیزم توسط آنزایم‌ها تنظیم می‌شود از اینرو هر عاملی که بر فعالیت آنزایم‌ها اثر کند نتیجتاً بر فعالیت مایکرواورگانیزم‌ها تاثیر خواهد کرد.

هر مایکرواورگانیزم دارای کامپلکس از آنزایم‌های مختلفه می‌باشد که همین آنزایم‌ها فعالیت بیوشیمیک آنها را معین ساخته و هم نقش آنها را در سیکل مواد در طبیعت و در سیر فاسد شدن مواد غذایی تعیین می‌کند. با در نظر داشت چگونگی پیدایش آنزایم‌ها گروپ *Constitutive* و *Adaptive* آنها وجود دارد آنزایم‌های *Constitutive* عبارت از آنزایم‌های اساسی اند که به مسوولیت جن‌های مخصوص در داخل حجره مایکرواورگانیزم تولید می‌گردد در حالیکه آنزایم‌های سازگار یا *Adaptive* تنها در صورت موجودیت سبسترات معین و مخصوص در محیط تولید می‌شود یا بعبارۀ دیگر ترکیب اینوع آنزایم توسط سبسترات معین تحریک می‌شود، مثلاً اگر یک مایکرواورگانیزم در وط که حاوی قند مالتوز است کشت شود تحت این شرایط آنزایم‌ها را که مالتوز را تجزیه می‌کند ترکیب کرد، که متعاقب جذب و تحلیل آن بحیث منبع کاربن از آن استفاده می‌کند که البته همین مایکرواورگانیزم قبل از مواجه شدن به قند مالتوز این خصوصیت را نداشته است.

در حجرات باکتری‌ها تاثیر و نحوه عملکرد آنزایم موافقتاً بوجود می‌آیند به این معنی که اگر در یک حجره باکتری چند نوع آنزایم در عین زمان موجود باشد هر یک از این آنزایم‌ها مطابق به کیفیت و چگونگی مواد موجود در محیط یکی بعد دیگری وارد صحنه می‌گردند در عمل *Fermentation* در موقع لزوم سهم می‌گیرند.

انزایم که در قسمت‌های مختلف حجره باکتری موجود اند در *Mesosomes* در میتوکاندریون و در غشای سائتوپلازمیک.

بعضی از انزایم‌ها توسط حجره باکتری در وسط افراز می‌شوند که به نام *Exoenzymes* یاد می‌گردند که این انزایم‌ها رول عمده‌ئی در تهیه مواد غذایی، دخول آنها در حجره باکتری دارند زیرا این نوع انزایم‌ها تجزیه مواد پیچیده و مغلق مانند نشایسته و پروتین را به مالیکول‌های ساده به عهده داشته که متعاقب پارچه شدن این مواد می‌توانند داخل حجره باکتری شوند. همچنین نوع دیگری از انزایم وجود دارد که توسط باکتری در وسط افراز نشده بلکه توسط ساختمان‌های داخل حجروی *Adsorbed* یا تثبیت شده که به نام *Endoenzyme* یاد می‌شوند و در استقلال داخل حجروی مواد سهم می‌گیرند.

بعضی باکتری‌های مخصوص دارای مواد (انزایم خارج الحجروی) از قبیل *Coagulase*, *Ureas*, *Leukocidins*, *Collagenase*, *Hyalurenidase*, *Lecithinase*, *Hemolysins* می‌باشد. به طور مثال *Clostridium perfringens* آگروتوکسین (*Lecthinase*) تولید می‌نماید آنانیکه قابلیت تبدیل نمودن لیسیتین به فاسفوریل کولین و دای گلیسراید دارد نکروز عضلی از اثر عمل مشترک *Lecithinase*, *Collagenase* و *Mucinase* (*Hyaluronidase*) به میان می‌آید. *Mucinase* و *Collagenase* نسج استنادی عضلات را تجزیه نموده و *Lecithinase* لستین غشا و رشته‌های عضلاتی را منحل می‌نماید. *Hemolysis* در سیر انتانات *Anaerobic* از سبب انحلال *Lecitin* سترومای کریوات سرخ خون واقع می‌شود.

تظاهرات نکروتیک توکسین‌ها اهمیت زیاد برای توافق عامل مرضی دارد اولاً توکسین نسج فعال و زنده را برای مایکروب مرضی به یک سبسترات بی خطر تبدیل نموده ثانیاً نسج نکروتیک پرازیت را از تأثیرات عکس‌العمل‌های دفاعی عضویت نگه می‌دارد.

چرا ما توکسین‌ها را مطالعه می‌کنیم از آن جائیکه لوحه کلینیکی امراض انتانی ارتباط مستقیم به موجودیت کمپلکس توکسین‌ها و تأثیرات آن دارند بناً وقتیکه ما این کمپلکس توکسین را بشناسیم لوحه کلینیکی و تشخیص مرض را تعیین تداوی سببی مرض را اجرا نموده و بالاخره وخامت و اندازه مرض را پیشبینی کرده می‌توانیم.

میتود کشت باکتری‌های غیر هوازی

جهت کشت انایروب‌ها غلظت اوکسیجن در محیطی که باکتری در آن قرار دارد باید کاهش داده شود که به این منظور میتود‌های مختلف وجود دارد و ذیلاً توضیح می‌گردد:

۱- کشت توسط وخذه: این ساده ترین میتود جهت کشت انایروب ها است که مایکروب مورد نظر را بطور عمود در اوساط قندی اگر دار (Suger Agar) توسط وخذه به عمق وسط کشت می کنند.

۲- علاوه نمودن مواد ارجاع کننده در وسط: به این منظور اکثراً از وسط Kitt – Tarocci استفاده می شود که در ترکیب آن گلوکوز پنج فیصد با بویون، پارچه های گوشت و پارچه های تازه مواد عضوی گوشت کوفته شده وجود دارد که از جمله گلوکوز و یک قسمت از مواد عضوی قابلیت ارجاعی را دارند. طرز تهیه این وسط چنین است که قبل از استفاده بخاطر خارج ساختن اوکسیجن آنرا جوش می دهند و بعداً برای اینکه از تماس اوکسیجن اتمسفر محفوظ باشد سطح آنرا با واسلین و یا پارافین می پوشانند.

۳- محو هوا از محیط: با اخراج هوا از محیط، غلظت اوکسیجن نیز کاهش می یابد که با استفاده از میتود های میکابیکی (بوسیله Anaerostate یا مخراج الهوا) می توان به این هدف نایل شد.

۴- تعویض هوای محیط با دیگر گازات: به این منظور معمولاً از گاز هایدروجن استفاده می شود.

۵- محافظه میخانیکی وسط از اوکسیجن هوا: به این منظور موج ترین میتود (میتود Venial – Vion است. درین میتود از تیوپ های شیشه ای که دارای 30cm طول و 3 – 6mm قطر است کار می گیرند. طوریکه یک نهایت آنرا در تیوپ های مخصوص دیگر که Capillair tube نام دارد وصل نموده و نهایت دیگر آنرا با پنبه مسدود می نمایند، بعداً مواد تحت مطالعه را که قبلاً در Agar مذاب کشت مخلوط شده است در تیوب شیشه ئی بالا می کشند و انجام باز تیوب را به وسیله آتش مسدود می نمایند تیوپ را در ترموستات به حرارت 37°C گذاشته که با ظاهر شدن کالونی های سیاه رنگ در داخل تیوپ، از قسمت دلخواه شکستانده شده و بدینسان کلچر خالص باکتری های غیر هوازی بدست می آید.

۶- جذب اوکسیجن محیط بطرق کیمیاوی: به این منظور معمولاً از محلول قلوی پیروگالول (ده فیصد قلوی و بقیه Pyrogallol) استفاده می شود.

۷- میتود بیولوژیک جهت مهیا ساختن شرایط غیر هوازی: به این منظور ساده ترین روش،

Fortner می‌باشد بدین ترتیب که نصف پیتری دیش را بوسیله یک مایکروب هوازی معلوم و نصف دیگر آنرا با مواد مورد آزمایش (تحت مطالعه) که گمان می‌شود دارای مایکروبهای غیر هوازی است کشت می‌نمایند، البته وسط مورد نظر قبلاً توسط یک کارد معقم به دو حصه از هم جدا می‌شود بعد از کشت اطراف پیتری دیش را بوسیله موم مخصوص یا پارافین مستور می‌نمایند و در ترموستات می‌گذارند، در ابتدا مایکروبهای هوازی شروع به تکثیر نموده و تمام اوکسیجن محیط را مصرف می‌نمایند که در نتیجه شرایط رشد آنایروب‌ها مساعد می‌گردد.

اوساط زرعیه برای کشت غیر هوازی ها

برای کشت غیر هوازی‌ها اغلباً از اوساط ذیل استفاده می‌شود:

۱- وسط Kitt - Tarocci: برای تهیه این وسط غذائی کبد گاو و گوشت گاو و یا قطعات از پلاستتا را خورده، خورد پارچه نموده به مقدار سه چند آن بویون مغذی را که دارای PH 7.0 - 7.4 می‌باشد با آن یکجا نموده و برای 30 دقیقه جوش می‌دهند، بویون را فلتر نموده و پارچه‌های گوشت را (کبد و یا پلاستتا) در یک ظرف جالی می‌شویند و با کاغذ فلتر خشک می‌نمایند، بعداً به هر تیوب به مقدار 3-4 گرم از گوشت و یا کبد متذکره را علاوه نموده و به مقدار 7.8ml از بویون فلتر شده را به آن اضافه می‌کنند، تیوب را برای 30 دقیقه تحت فشار یک اتموسفیر تعقیم می‌نمایند که درینحالت حرارت اتوکلاو 121°C می‌باشد.

۲- Agar for Venial - Vion tube: در بویون مارتین گلوکوز یک یا دو فیصد را حل نموده و Agar را در آن علاوه می‌نمایند وسط غذائی متذکره به تیوب‌های مخصوص جا داده می‌شود (Capillary tube) وسط زرعیه دارای PH 7.4 می‌باشد که در حرارت مرطوب برای سه روز متوالی تعقیم می‌شود.

۳- Ferum sulfat agar یا Weelsenbleer agar: بالای 100ml از وسط Meat peptone agar 3% گلوکوز یک فیصد را در PH = 7.4 یکجا می‌کنند و آنرا حرارت می‌دهند در اثنای حرارت $10\text{ml}/60^{\circ}\text{C}$ از محلول 32% Na_2SO_3 از محلول 28% FeCl_3 را که با آب مقطر تهیه شده به آن علاوه می‌نمایند (محلول NaSO_3 به

حرارت مرطوب در ظرف یک ساعت تعقیم می‌کنند) وسط را تعقیم نه نموده و آنرا در ترموستات می‌گذارند. باکتری‌های غیر هوازی کالونی‌های سیاه رنگ را تولید می‌نمایند. (بخاطر تشکل FeS در وسط)

در صورت موجودیت Clostredium Perferingenes وسط بعد از 1-2 ساعت تغییر رنگ می‌دهد در حالیکه در انواع دیگر انایروب‌ها تشکل کالونی‌های سیاه رنگ سبز مایل بعد از 6-8 ساعت نمایان می‌شود.

انٹی بیوگرام یا حساسیت مایکروب‌ها به مقابل انٹی بیوتیک‌ها

مقدمه

- برای دلایل عمده ذیل حساسیت مایکروب‌ها به مقابل انٹی بیوتیک تعیین می‌شود:
- برای رهنمائی نمودن دوکتور معالج تا مناسب‌ترین انٹی بیوتیک را برای هر فرد از مریضان خود انتخاب نماید.
 - نگهداشت ثبت حساسیت مایکروب‌های یک جامعه و انتانات شفاخانه به مقابل انٹی بیوتیک‌ها و تغییراتی که به مرور زمان در آن رخ می‌دهد.
 - رهنمائی نمودن مسوولین پروگرام ملی تداوی کتگوری امراض بخصوص مانند انتانات حاد طرق تنفسی، اسهالات و امراضیکه توسط مقاربت جنسی انتقال می‌نمایند.
 - کشف تغییراتی که در نوع و توزیع مقاومت به مقابل انٹی بیوتیک‌ها در امراض که غیراز شفاخانه رخ می‌دهد.

این عملیه بالای تمام مایکروب‌هایی که قبلاً حساسیت آنها معلوم نشده و سبب انتاناتی می‌گردند که ایجاب کیموتراپی را می‌نمایند، باید اجرا شود.

تست حساسیت مایکروب‌ها قدرت انٹی بیوتیک را نشان می‌دهد که در لابراتوار تحت شرایط معیاری مانع نشونمای مایکروب می‌گردد. این نهی نشونما به دو طریقه ای رقیق سازی و انتشار تخمین می‌گردد.

در تست رقیق سازی، فعالیت انٹی بیوتیک طوری تخمین می‌گردد که غلظت‌ها مختلف انٹی بیوتیک را در وسط زرعیه ای مایع یا جامد می‌سازند و بعد مایکروب مورد نظر را در آن زرع

می‌کند. پایان‌ترین غلظت انتی‌بیوتیک که مانع نشونمای قابل دید مایکروب بعد از گذشت یک شب گردد به نام Minimal inhibitory Concentration (MIC) مایکروب یاد می‌گردد.

در تست انتشار اصول کیربی باور (Kirby Bauer) یک دیسک کاغذی را گرفته با یک مقدار انتی‌بیوتیک آنرا مغطوس (Impregnate) می‌سازند و بالای یک وسط Agar دار که در آن مایکروب مورد نظر بصورت متجانس زرع شده باشد می‌گذارند.

انتی‌بیوتیک از کاغذ بداخل وسط زرعیه انتشار می‌نماید. هر قدر که از مرکز دیسک دور شویم غلظت انتی‌بیوتیک کمتر شده می‌رود. بعد از گذاشتن به درجه ای حرارت 35°C برای 18 تا 24 ساعت دیده می‌شود که نشونمای مایکروب به شکل دایروی به دور دیسک نهی گردیده است. قطر این دایره، در بین دیگر عوامل، تابع حساسیت مایکروب به انتی‌بیوتیک دیسک می‌باشد. منطقه ای بزرگ نهی مترافق است یا حساسیت زیاد مایکروب به مقابل انتی‌بیوتیک منطقه ای متوسط نهی مترافق است با حساسیت متوسط آن و عدم منطقه ای نهی مترافق است به مقاومت مایکروب به مقابل انتی‌بیوتیک داخل دیسک کاغذی یک ارتباط تقریباً خطی بین لوگارتیم غلظت اصغری نهی (MIC) و قطر زون نهی شده که به این دو طریقه ای مختلف تعیین می‌گردد وجود دارد. اگر حساسیت مایکروب‌های مختلف به این دو طریقه تعیین گردد، می‌توان یک Regression Line را بدست آورد.

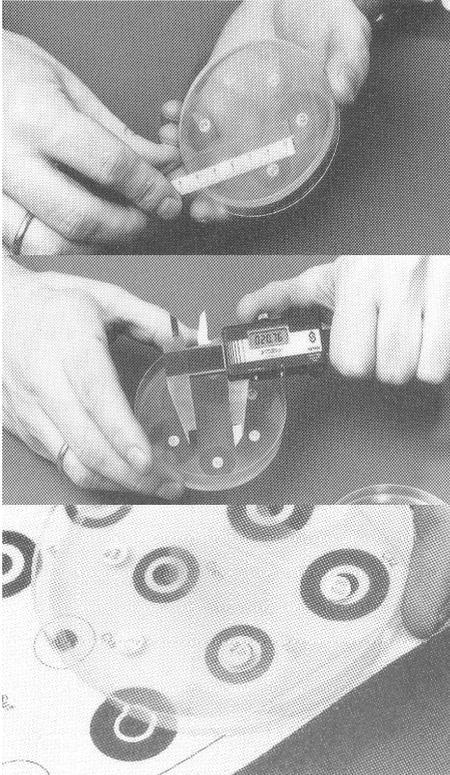
انتخاب وسط زرعیه برای تست انتشار (Diffusion Test) بسیار مهم می‌باشد، زیرا انتی‌بیوتیک در اوساط زرعیه ای مختلف بصورت متفاوت انتشار می‌کند. بعضی اوساط زرعیه می‌تواند موادی داشته باشد که فعالیت انتی‌بیوتیک را نهی کند مانند Sulfonamide و Trimethoprim. غلظت Agar، ضخامت وسط زرعیه و PH آن نیز عوامل مهم می‌باشند. اگر ضخامت وسط زرعیه کم باشد منطقه ای نهی بصورت کاذب بزرگ می‌باشد و اگر زیاد باشد منطقه ای نهی بصورت کاذب کوچک می‌باشد.

اعتماد بر تست حساسیت به مقابل انتی‌بیوتیک به انجام دادن تست به اصول ستاندر و کنترل کیفیت مناسب و درست آن تعلق دارد.

تعبیر تست حساسیت عادتاً به سه درجه داده می‌شود:

- حساس (S) اگر انتان توسط مایکروبی به وجود آمده باشد که احتمال دارد انتان با دادن

- مقدار یا Dosage عادی آن انتی بیوتیک شفا یاب گردد.
- متوسط (I) Intermediate که احتمال دارد انتان با مقدار بلند آن انتی بیوتیک جواب بدهد. یا وقتیکه انتان در جایی رخ داده باشد که غلظت انتی بیوتیک در آنجا زیاد گردد مانند طرق بولی.
 - مقاوم (R) Resistant که مایکروب به دادن انتی بیوتیک، صرف نظر از مقدار دادن



شکل ۲-۴ تست انتی بیوگرام و اندازه گیری قطر نواحی نهی شده مایکروب به مقابل انتی بیوتیک ها

انتی بیوتیک و محل انتان، جواب شاید ندهد.

نامگذاری حساس و مقاوم باکتری ها عموماً به سوبه ای غلظت انتی بیوتیک ارتباط دارد که در سیرم بدست آمده بتواند. انتی بیوتیک هائیکه از طریق گرده اطراح می شوند در ادرار غلظت آنها به کرات بیشتر از سیرم می گردد. مایکروب هائیکه از انتان طرق بولی تجرید می شوند و حساسیت آنها به اصول انتشار در "اگر" متوسط یا حتی مقاوم باشد می تواند در طرق بولی به همان انتی بیوتیک حساس باشد. به همین دلیل برای انتی بیوتیک که تنها برای تداوی انتان طرق بولی استعمال می گردند مانند Nitrofurantoin, Trimethoprim, Sulfonamide و Nalidixic Acid اندازه ای زون نهی شده ای آنها مطابق به غلظت آنها در ارار تعیین شده است.

تست حساسیت فعالیت انتی بیوتیک را به مقابل مایکروب‌ها در تحت شرایط لابراتوار

اندازه می نمایند، اما کنترل انتان را نزد هر مریض تضمین نمی تواند. جذب، انتشار در نسج، میتابولیزم، اطراح و سمیت انتی بیوتیک های مختلف متفاوت می باشد که قبل از توصیه ای انتی

بیوتیک باید مد نظر گرفته شود.

برای بعضی انتی بیوتیک‌ها فاصله بین غلظت مؤثر و غلظت سمی آن در خون بسیار کم است. در خون مریضانی که این انتی بیوتیک‌ها را می‌گیرند غلظت آنها باید شدیداً زیر نظارت گرفته شود، مخصوصاً اگر انتان شان شدید باشد و خود شان Dehydrated باشند و وظایف جگر یا گرده ای شان مختلف باشد.

دو سویه ای غلظت انتی بیوتیک اندازه می‌شود یکی غلظت اعظمی در سیرم که بعد از زرق بعدی از یک مدت کوتاه حاصل می‌شود و دیگر غلظت اصغری در سیرم که فقط پیش از زرق بعدی به آن می‌رسد.

اکثراً انتانات طرق بولی سفلی سلیم بوده حتی بدون تداوی می‌تواند خوب شود لذا انتی بیوتیک بسیار قیمتی یا سمی به ندرت ضروری می‌باشد و نباید یومیه راپور داده شود.

عبور انتی بیوتیک به داخل مایع نخاع شوکی (C.S.F) برای انتی بیوتیک‌های مختلف متفاوت می‌باشد. تنها انتی بیوتیک‌هایی که تا رسیدن به غلظت مؤثر در تداوی در داخل مایع نخاع شوکی عبور نموده بتواند باید راپور داده شود. (8)

Penetration of antibiotics into the CSF		
Good	Intermediate	Poor or none
Chloramphenicol	Pencillin G	Clindamycin
Sulphamide	Ampicillin	Vancomycin
Trimethoprim	Ceftriaxone	Tetracycline
Metronidazole	Cefuroxime	Erythromycin
Isoniazid	Cefotaxime	Flucytosine
Rifampicin	Methicillin	Cephalothin
Pyrazinamide	Ethambutol	
Ethionamide		
Amphotericin B		

زرع برای انتی بیوگرام می‌تواند از نمونه ای که از مریض گرفته می‌شود صورت گیرد که به نام تست حساسیت مستقیم یا direct susceptibility test یاد می‌شود. یا از زرع خالص مایکروب صورت می‌گیرد که به نام تست حساسیت غیر مستقیم یا indirect susceptibility test یاد می‌شود.

تست حساسیت مستقیم دارای مزایای ذیل می‌باشد:

- راپور دادن را سرعت می‌بخشد.
- تجرید نمودن باکتری‌ها را در یک زرع مخلوط آسان می‌سازد.
- تعداد کم از انواع مقاوم را شناسائی می‌کند.

مشکل عمده درین است که بدست آوردن زرع استاندارد برای تست حساسیت از نمونه‌ای مریض آسان نیست. اگر نموی مایکروب در زرع برای حساسیت مستقیم بسیار کم یا بسیار زیاد باشد، باید تست حساسیت تکرار شود و تخنیک استاندارد برای هر یک از انواع مایکروب‌ها استعمال گردد.

دیسک‌های تجارتمی برای تعیین انتی‌بیوگرام

هر دیسک تجارتمی که قطر و مقدار انتی‌بیوتیک مناسب داشته باشد می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. دیسک‌ها به 20°C - نگهداری شوند. دیسک‌هایی که مورد استفاده قرار می‌گیرند باید به 4 تا 8 درجه سانتی‌گراد گذاشته شوند. اما برای اینکه رطوبت بالای آن بصورت اصغری تشکیل گردد قبل از باز کردن گذاشته شود تا درجه‌ای حرارت اتاق را بگیرد.

تهیه‌ای دیسک انتی‌بیوگرام در لابراتوار

- ۱- از کاغذ فلتر یا کاغذ جاذب خوب دیسک‌ها به قطر 5 تا 6 میلی‌متر قطع می‌شود.
- ۲- بالای هر دیسک حرفی را بنویسید که محتویات انتی‌بیوتیک‌های مختلف را نشان بدهد.
- ۳- دیسک‌ها را برای یک ساعت به حرارت خشک به 160 درجه‌ای سانتی‌گراد تعقیم نمائید.
- ۴- طبق جدول ذیل محلولات رقیق انتی‌بیوتیک‌های مختلف را در محلول انتی‌بیوتیک بسازید:

Antibiotics	Dry substance per vial	Disk content	Dilution & added antibiotic solvent	Concentration in final dilution
Ampicillin	250 mg	10 μg	250 mg/10 ml, 25 mg/ml + 9 ml	
			2.5 mg /ml + 4 ml	500 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Penicillin G	100.000 IU	10 μg	60 mg/10 ml	

	60 mg		6 mg/ml + 1 ml	
			3 mg/ml + 5 ml	500 µg/ml
Ceftriaxone,	250 mg	30 µg	250 mg/10 ml	
Cephalothin			6x25 mg/ml + 9 ml	
			15 mg/ml + 9 ml	1500 µg/ml
Cefuroxime	750 mg	30 µg	750mg/10 ml	
			75 mg/ml + 4 ml	
			15 mg/ml + 9 ml	1500 µg/ml
Chloramphenicol	1g	30 µg	1g/10 ml	
			3x100mg/ml+7ml	
			30 mg/ml+ 9 ml	
			3mg/ml+1 ml	1500 µg/ml
Ciprofloxacin	40 mg	5 µg	400mg/10 ml	
			400mg/ml+9ml	
			4 mg/ml+ 3 ml	
			1mg/ml+3 ml	250 µg/ml
Clindamycin	300 mg	2 µg	300mg/3 ml	
			100mg/10ml	
			10 mg/10 ml	
			1 mg/10 ml	100 µg/ml
Erythromycin	100 mg	15 µg	100 mg/4 ml	

			3x25 mg/ml+ 7 ml	
			7.5 mg/ml+ 9 ml	750 µg/ml
Gentamyein	20 mg	10 µg	20 mg/10 ml	
			2 mg/ml+ 3 ml	500 µg/ml
Oxacillin	250 mg	7 µg	250 mg/10 ml	
			25 mg/ml+ 9 ml	
			2.5 mg/ml+ 9 ml	
	100.000 IU	10 µg	0.25 mg/ml+4ml	50 µg/ml
piperacillin	1 g	100 µg	1 g/10 ml,	
			100 mg/ml+ 1 ml	5 mg/ml
			50 mg /ml+ 9 ml	
Streptomycin	500 mg	10 µg	500 mg/10 ml	
			50 mg/ml+ 9 ml	
			5 mg/ml+ 9 ml	500 µg/ml
Sulfisoxazole	1 mg	300 µg	1 g/10 ml	
			3x100 mg/ml+ 7 ml	
			30 mg/ml+ 1 ml	15 µg/ml
Tetracycline	500 mg	30 µg	500mg/10 ml	
			3x50 mg/ml+ 7 ml	
			15 mg/ml+ 9 ml	1500 µg/ml

- ۵- بالای هر دیسک 20 مایکرولیتر از محلول رقیق شده ای آخری هر انتی بیوتیک را باندازید.
- ۶- دیسک ها را در یک قطی پتری انداخته در داخل انکیوپتور تا فردا آن ها را خشک کنید. سرپوش پتری دیش را قدری بلند بگذارید.
- ۷- دیسک ها را در یک بوتل انداخته لیبیل و تاریخ بزیند. سر بوتل باید خوب بسته باشد که هوا در آن داخل شده نتواند. برای نگهداری دراز مدت که از یک سال بیشتر نباشد به 20°C در فریزر آنرا نگهداری کنید.
- ۸- دیسک‌هاییکه از آن کار گرفته می‌شود تا یک هفته در یخچال نگهداری شده می‌تواند.
- ۹- بوتل دیسک ها را از فریزر یا یخچال یک تا دو ساعت پیشتر از استعمال بیرون بکشید تا درجه ای حرارت اتاق را قبل از باز کردن بگیرد. این کار مقدار رطوبت را که در بالای دیسک تراکم می‌کند به حد اصغری کاهش می‌دهد.
- کنترول کیفیت: هر Batch دیسک را بالای مایکروب‌های کنترول امتحان کنید که کار می‌دهد یا نه. پتوجن های هوازی که بالای *Mueller-Hinton agar* می‌رویند: تخنیک که در ذیل شرح داده شده اشاره ای است به *Kirby-Bauer method* که در هر جا میسر است و خوب به ثبوت رسیده است.

Mueller-Hinton agar

- از یک *Mueller-Hinton agar* کنترول کیفیت شده طبق توصیه ای کمپنی تولید کننده یک وسط زرعیه بسازید.
- در قطی پتری دیش به عمق 3-4 ملی متر آنرا بریزید. یک قطی پتری دیش 9 سانتی متره تقریباً 20 تا 25 ملی لیتر وسط زرعیه به کار دارد، در حالیکه یک قطی پتری دیش 14 سانتی متره به 60 ملی لیتر ضرورت دارد. پتری دیش را در یک سطح هموار گذاشته معطل شوید تا منجمد شود.
- پتری دیش را خشک نموده به 2-4 درجه ای سانتی گراد نگهداری کنید *PH* وسط به درجه ای حرارت اتاق باید 7.2 تا 7.4 باشد.

ستاندرد مکدریت (Turbidity standard)

برای اینکه معلق مایکروب را که زرع می‌نمایید عیار سازید، یک ستاندرد *barium sulphate turbidity standard* را باید بسازید.

اول محلولات ذیل را بسازید:

0.048 M BaCl ₂ solution	
BaCl ₂ , 2H ₂ O	1.175 g
Distilled water	100 ml
0.36 N H ₂ SO ₄ solution	
H ₂ SO ₄ , conc	1 ml
Distilled water	100ml

بعد محلولات ذیل را به هم یکجا بسازید.

0.048 M BaCl ₂	0.5 ml
0.36 N H ₂ SO ₄	99.5 ml

در تیوب‌ها در هر یک 5 ملی لیتر توزیع نموده سر آنها را با ستاپر رابری محکم کنید. قبل از استعمال تیوب را شدیداً شور بدهید. این استاندارد باید در تاریکی به درجه ای حرارت اتاق نگهداری شود و تا شش ماه نگهداری شده می‌تواند. (8)

عملیه

- از یک زرع یک شبه 4 تا 5 کالونی خوب جداگانه ای هم شکل را انتخاب کنید. نوک سوزن زرع را در قسمت بالائی کالونی تماس بدهید. در داخل آن باید سوزن نرود. در تیوبیکه در آن 5 ملی لیتر محلول 0.9 فیصد سودیم کلوراید باشد انتقال بدهید.
- مکدریت آنرا با مکدریت استاندارد مقایسه کنید با علاوه کردن مایکروب یا محلول نمک معقم مکدریت آنرا با مکدریت استاندارد برابر نمائید. برای اینکه نموی مایکروب‌ها متجانس باشد و کولونی‌ها تقریباً به تماس یکدیگر بیایند باید مکدریت خوب عیار شود.
- مایکروب را در Mueller Hinton agar plate ذیلاً زرع کنید:
 - دو قطره ای معلق مایکروب را در بالای Agar باندازید توسط Spreader شیشه ای آنرا طوری پخش کنید که تمام سطح Agar را بگیرد.
 - یک سواب معقم پنبه ای را در معلق مایکروب غوطه کنید. مایع اضافگی را با فشار دادن شدید پنبه به جدار تیوب و دور دادن آن از پنبه دور کنید. سواب را در تمام سطح Agar بمالید.

- سریوش قطعی پتری را بالای آن گذاشته برای 3 الی 5 دقیقه آنرا بگذارید تا قبل از گذاشتن دیسک انتی بیوتیک مایع اضافگی سطح توسط Agar جذب گردد.
- توسط یک فورسپس یا سوزن دیسک های انتی بیوتیک را اقلأ 24 ملی متر دور از یکدیگر در بالای Agar زرع شده بگذارید. در قطعی پتری های 9 سانتی متره بصورت اعظمی پنج دیسک (برای مایکروب‌های Fastidious چهار دیسک). اگر قطعی پتری های 14 سانتی متر استعمال شده باشد بصورت اعظمی 12 دیسک (برای مایکروب‌های Fastidious نه (9)

دیسک استعمال می‌گردد. وقتیکه یک دیسک در یکجا گذاشته می‌شود باید شور داده نه شود، زیرا به مجرد گذاشتن دیسک انتشار انتی بیوتیک شروع می‌شود.

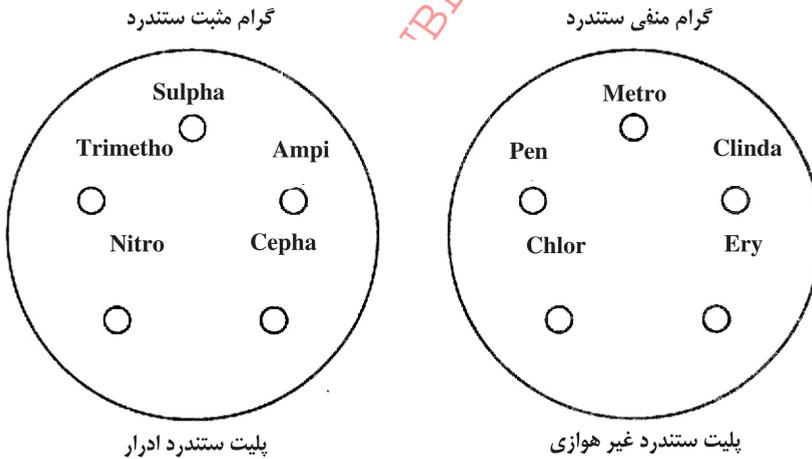
۶) قطی پتری ها را در انکیوبتور به 35 درجه ای سانتی گراد بگذارید. طول مدت آن ذیلاً به مایکروب‌های تحت امتحان تعلق دارد:

- *Staphylococci & Enterococci*: 24 hours
- *Haemophilus influenzae, Streptococcus, Pneumoniae & Neisseria gonorrhoeae*: 20-24 hours in 5-7% carbon dioxide or in a candle jar
- *All other species*: 16-18 hours

۷) اگر زرع درست صورت گرفته باشد بعد از 18 الی 24 ساعت کالونی‌ها به اندازه ای می‌شود که در بین آنها Agar محض قابل دید می‌باشد و تمام زون‌های نهی شده بصورت متحدالشکل دایروی می‌باشد. اگر نموی مایکروب‌ها بسیار ضخیم یا بسیار نازک باشد معاینه را تکرار کنید.

۸) قطر هر زون نهی شده (به شمول قطر دیسک) را به ملی متر اندازه نمائید و نتیجه را طبق جدول تعبیر نمائید.

۹) نتیجه را برای قطی پتری test و کنترل ثبت نمائید.

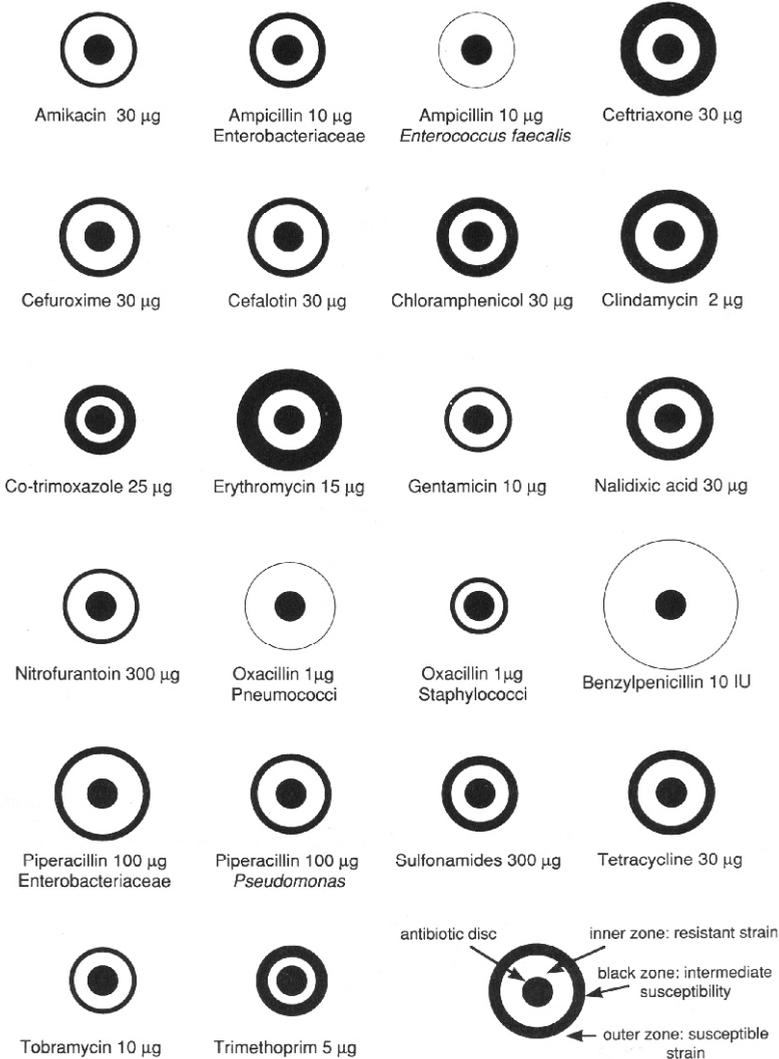


شکل ۲-۵

۱۰) بعد از گذاشتن در انکیوبتور با استفاده از یک خطکش قطر منطقه ای نهی شده را به ملی متر اندازه نمائید.

۱۱) بسیار کالونی‌های بزرگ که در داخل ناحیه ای نهی شده می‌روند باید دوباره زرع و شناسائی گردند و انتی بیوگرام آن دوباره تعیین شود. بعضی اوقات انواع مایکروب‌های *Protesu*

mirabilis and *P. vulgaris* می‌تواند در منطقه ای نهی شده گردش نمایند لکن هنوز هم حساس می‌باشند. با بعضی Batch های *Mueller – Hinton Agar* در منطقه ای نهی شده ای نادیده گرفته شود و تنها حاشیهٔ نموی ضخیم برای تعیین منطقه ای نهی شده گرفته شود. (۱۲) منطقه ای نهی شده را تعبیر نموده راپور مایکروب را حساس (S) متوسط (I) و مقاوم (R) بدهید.



اندازه نواحی ایکه توسط انتی بیوتیک ها نهی شده می‌توانند.

شکل ۲- ۶

Antibiotic or chemotherapeutic agent	Diameter of zone of inhibition (mm)			
	Disc potency	Resistant	Intermediate/moderately susceptible	Susceptible
amikacin	30 µg	≤ 14	15–16	≥ 17
ampicillin when testing:				
– Enterobacteriaceae	10 µg	≤ 13	14–16	≥ 17
– <i>Enterococcus faecalis</i>	10 µg	≤ 16	—	≥ 17
benzylpenicillin when testing staphylococci	10 IU	≤ 28	—	≥ 29
ceftriaxone	30 µg	≤ 13	14–20	≥ 21
cefuroxime sodium	30 µg	≤ 14	15–17	≥ 18
cefalotin	30 µg	≤ 14	15–17	≥ 18
chloramphenicol	30 µg	≤ 12	13–17	≥ 18
clindamycin	2 µg	≤ 14	15–20	≥ 21
co-trimoxazole	25 µg	≤ 10	11–15	≥ 16
erythromycin	15 µg	≤ 13	14–22	≥ 23
gentamicin	10 µg	≤ 12	13–14	≥ 15
nalidixic acid	30 µg	≤ 13	14–18	≥ 19
nitrofurantoin	300 µg	≤ 14	15–16	≥ 17
oxacillin when testing:				
– staphylococci	1 µg	≤ 10	11–12	≥ 13
– pneumococci	1 µg	≤ 19	—	≥ 20
piperacillin when testing:				
– Enterobacteriaceae	100 µg	≤ 17	18–20	≥ 21
– <i>Pseudomonas</i>	100 µg	≤ 14	15–17	≥ 18
sulfonamides	300 µg	≤ 12	13–16	≥ 17
tetracycline	30 µg	≤ 14	15–18	≥ 19
tobramycin	10 µg	≤ 12	13–14	≥ 15
trimethoprim	5 µg	≤ 10	11–15	≥ 16

شکل ۲-۷ اندازه نهی انتی بیوتیک ها به ملی متر

باکتری‌های آنایروبیک (*Anaerobic bacteria*)

امتحان حساسیت باکتری‌های آن‌ایروبیک توسط *disk diffusion method* تنها وقتی امکان پذیر است اگر قطر منطقه ای نهی شده بعد از 24 ساعت در انگیوبتور اندازه شود. حتی درین صورت *the agar and broth dilution method* بیشتر قابل اعتماد است و در تمام واقعاتیکه اتان شان وخیم و بحرانی است باید استعمال شود.

عملیه

- (۱) آنایروبییک‌هایی که به سرعت می‌رویند مانند *Bacteroids fragitis* و *Clostridium* در وسط *Mueller-Hinton* و باکتری‌های ایروبییک در وسط *Blood Agar* کشت می‌شوند تا بعد از 24 ساعت به اندازه کافی برویند.
- (۲) دیسک‌های کاغذی *Penicillin*، *Chloramphenicol*، *Metronidazole* و *Clindamycine* را بالای پتری دیش کشت شده بگذارید و آنرا در *Aneorobic Jar* به درجه حرارت 35°C بگذارید.
- (۳) قطر منطقه ای نهی شده را توسط خط کش یا *Calliper* به ملی متر اندازه کنید.
- (۴) مایکروب‌های آن آیروبیک تنها حساس (S) و مقاوم (R) راپور داده می‌شود. حساسیت بین البینی یا *intermediate* استعمال نمی‌شود.
- (۵) به منظور تعبیر نتایج قطر منطقه‌های نهی شده ذیلاً داده شده است:

Zone diameter in mm	Resistant	Sensitive
<i>Penicillin</i>	<19	>20
<i>Ampicillin</i>	<24	>25
<i>Cephalosporin</i>	<24	>25
<i>Piperacillin</i>	<29	>30
<i>Clindamycin</i>	<19	>20
<i>Chloramphenicol</i>	<34	>35
<i>Erythromycin</i>	<24	>25
<i>Tetracycline</i>	<29	>30
<i>Metronidazole</i>	<19	>20

Extended Spectrum β -lactamases (ESBLs) عبارت از انزایم‌هایی اند که توسط باسیل‌های گرام منفی تولید می‌شوند که قدرت غیر فعال ساختن انتی‌بیوتیک‌های β -Lactam را که دارای گروپ *Oxyimino* باشند دارند، مانند *Ceftizoxime*، *Ceftriaxone*، *Cefotaxime*، *Cefuroxime*، *Cefpirome* و *Ceftazidime*. اینها به نام *Spectrum Extended* یاد می‌شوند، زیرا یکتعداد زیاد انتی‌بیوتیک‌های β -Lactam را هایدرولیز می‌نمایند.

ESBLs توسط Plasmid از یک مایکروب بر مایکروب دیگر انتقال می‌نماید و عموماً در مایکروب‌هایی از قبیل *Klebsilla Pneumonia*، *E. Coli*، *Proteus Mirabilis* و سلمونیللا پیدا می‌شود.

توصیه می‌شود که تمام لابراتوارهای مایکروبیولوژی سریری تمام باکتری‌های انتریک گرام منفی را برای مقاومت به مقابل Cefpodoxime امتحان نمایند. اگر حساسیت آن به مقابل Cefpodoxime کم شده باشد تست برای تولید انزیم ESBL باید انجام شود. تمام انواع تولید کننده ESBL باید راپور داده شود که به مقابل تمام Penicillin ها و Cephalosporin ها مقاوم است به استثناء Cephamycin.

لابراتوار مایکروبیولوژی وقتیکه یک نوع مایکروب ESBL-producing را می‌یابد بصورت واضح به دوکتور معالج راپور بدهد و اهمات لازم گرفته شود تا جلو پخش آن به دیگر مریضان شفاخانه گرفته شود.

دو میتود تأیید کننده برای تولید ESBL عادتاً استعمال می‌شود:

- ۱- معاینه Synergy بین Cephalosporin و Clavulanic Acid (میتود Double Disc).
- ۲- مقایسه نمودن منطقه ای نهی شده ای، Cefazidime یا Cefpodoxime با یا بدون Clavulanic Acid (میتود Combined Disc).

میتود دیسک دو چند (Double Disc Method)

۱. از یک زرع خالص یک شبه بالای Mac Conkey agar چهارالی پنج کولونی را به یک تیوب دارای 0.9 فیصد سودیم کلوراید باشد انتقال بدهید و مکدریت معلق به مکدریت 0.5 Mcfarland standard برابر ساخته شود که با علاوه کردن مایکروب یا محلول نمک صورت می‌گیرد.

۲. یک سواب را در معلق مایکروب غوطه نموده مایع اضافگی را با فشار دادن پنبه ای سواب جدار تیوب بالاتر از مایع بر طرف نمائید. سواب را به تمام سطح وسط زرعیه Mueller Hinton Agar - بمالید و بعد آنرا برای خشک شدن بگذارید اما نه بیشتر از 15 دقیقه.

۳. دسک که دارای Amoxicillin - Clavulanic Acid (20+10 Mg) باشد و دیسک Cefazidime را به فاصله ای 25 تا 30 ملی متر بالای Agar بگذارید یک دیسکی که دارای

Cefotaxime یا *Cefpodoxime* باشد می‌تواند در مقابل دیسک *Amoxicilin + Clavulanic Acid* گذاشته شود.

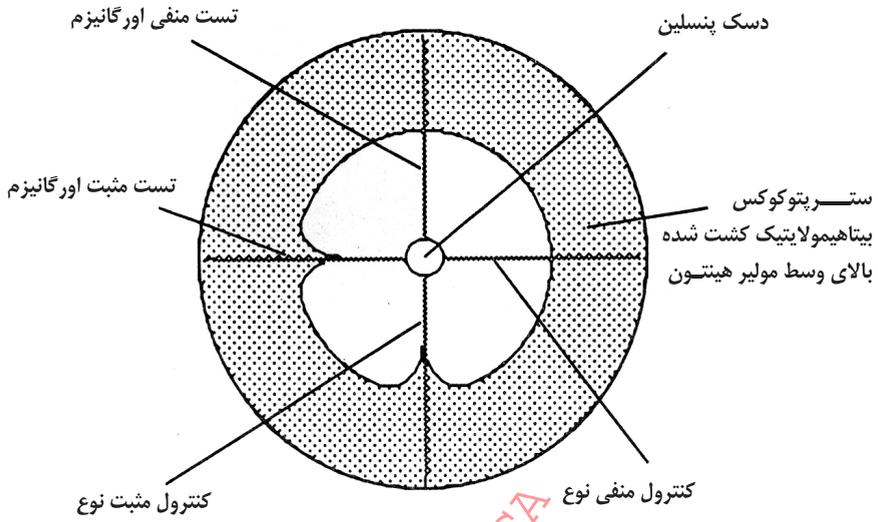
۴. پتری دیش تا فردا به 35 درجه سانتی‌گراد گذاشته می‌شود.

۵. اگر منطقه ای زهی شده *Cephalosporine* با علاوه شدن *Clavulanic Acid* توسعه یافته باشد از آن تولید *ESBL* استنباط می‌گردد.

ع. مایکروب‌هایی که *REM* و *SHVESBLs* تولید می‌نمایند با دیسک‌های *ceftazidime* *cefotaxime* و *cefpodoxime* نتیجه ای مثبت می‌دهند، در حالیکه آنهائیکه *انزایم CTX-M* تولید نموده اند تنها با دیسک‌های *cefotaxime* و *cefpodoxime* نتیجه ای مثبت می‌دهند. تولید کننده ای *AmpC* و اکثر تولید کنندگان فوق العاده ای *انزایم K1* همراهی تمام این سه دیسک نتیجه ای منفی می‌دهند.

Combined disc Method

۱. وسط *Mueller – Hinton agar* را مانند فوق کشت کنید. دو دیسک دارای *cefpodoxime* ($10 \mu\text{g}$) و *cefpodoxime + clavulanic acid* ($10 + 1 \mu\text{g}$) را به فاصله ای 24 ملی متر بالای آن بگذارید.
۲. پتری دیش را به 35 درجه ای سانتی‌گراد برای 16 الی 18 ساعت برای نموی *confluent* آنرا معاینه کنید.
۳. قطر منطقه ای زهی شده را به ملی متر اندازه نمائید.
۴. اگر منطقه ای زهی شده ای *cefpodoxime* با *Clavulanic Acid* به اندازه ای بیشتر از 5 ملی متر از منطقه ای زهی شده ای *cefpodoxime* بدون *clavulanic acid* بزرگتر باشد، مایکروب مذکور تولید کننده ای *انزایم ESBL* می‌باشد.
۵. این میتود با استفاده از *ESBL – producing Klebsiella* و تحقیق شد نتیجه داده *sensitivity* و *specificity* آن 100% بود.
- ع. *NCCLS* توصیه می‌نماید که منطقه ای زهی شده ای ($30 \mu\text{g}$) *ceftazidime* با منطقه ای زهی شده ($30 + 10 \mu\text{g}$) *Ceftazidime + Clavulanic Acid* باید مقایسه گردد.



شکل ۸-۲

© AAZEM PUBLICA

Book Name	Medical Microbiology I
Author	Prof. Dr. Obaidullah Obaid
Publisher	Kabul Medical University
Website	www.kmu.edu.af
Printing	Aazem Printing House, Kabul, Afghanistan / 0799572817
Number	2000
Published	2012
Download	www.ecampus-afghanistan.org

This publication was financed by the German Academic Exchange Service (DAAD) with funds from the German Federal Foreign Office.

Administrative and Technical support by Afghanic organization.

The contents and textual structure of this book have been developed by concerning author and relevant faculty and being responsible for it. Funding and supporting agencies are not holding any responsibilities.

If you want to publish your text books please contact us:
Dr. Yahya Wardak, Ministry of Higher Education, Kabul
Office: 0756014640
Email: wardak@afghanic.org



AZEM PUBLICATIONS

ISBN:

This book has been published 2000 copies in full agreement with the **author** and **Aazem Publications**.

All copy rights reserved by **Aazem Publications**

© AAZEM PUBLICATIONS

Message from the Ministry of Higher Education



In the history, book has played a very important role in gaining knowledge and science and it is the fundamental unit of educational curriculum which can also play an effective role in improving the quality of Higher Education. Therefore, keeping in mind the needs of the society and based on educational standards, new learning materials and textbooks should be published for the students.

I appreciate the efforts of the lecturers of Higher Education Institutions and I am very thankful to them who have worked for many years and have written or translated textbooks.

I also warmly welcome more lecturers to prepare textbooks in their respective fields. So, that they should be published and distributed among the students to take full advantage of them.

The Ministry of Higher Education has the responsibility to make available new and updated learning materials in order to better educate our students.

At the end, I am very grateful to the German Federal Foreign Office, the German Academic Exchange Service (DAAD) and all those institutions and people who have provided opportunities for publishing medical textbooks.

I am hopeful that this project should be continued and publish textbooks in other subjects too.

Sincerely,

Prof. Dr. Obaidullah Obaid
Minister of Higher Education

Kabul, 2012

© AAZEM PUBLICATIONS

Publishing of textbooks & support of medical colleges in Afghanistan

Honorable lecturers and dear students,

The lack of quality text books in the universities of Afghanistan is a serious issue, which is repeatedly challenging the students and teachers alike. To tackle this issue we have initiated the process of providing textbooks to the students of medicine. In the past two years we have successfully published and delivered copies of 60 different books to the medical colleges across the country.

The Afghan National Higher Education Strategy (2010-1014) states:

“Funds will be made ensured to encourage the writing and publication of text books in Dari and Pashto, especially in priority areas, to improve the quality of teaching and learning and give students access to state-of-the-art information. In the meantime, translation of English language textbooks and journals into Dari and Pashto is a major challenge for curriculum reform. Without this, it would not be possible for university students and faculty to acquire updated and accurate knowledge”

The medical colleges' students and lecturers in Afghanistan are facing multiple challenges. The out-dated method of lecture and no accessibility to update and new teaching materials are main problems. The students use low quality and cheap study materials (copied notes & papers), hence the Afghan students are deprived of modern knowledge and developments in their respective subjects. It is vital to compose and print the books that have been written by lecturers. Taking the critical situation of this war torn country into consideration, we need desperately capable and professional medical experts. Those, who can contribute in improving standard

of medical education and public health throughout Afghanistan, thus enough attention, should be given to the medical colleges.

For this reason, we have published 60 different medical textbooks from Nangarhar, Khost, Kandahar, Herat, Balkh & Kabul medical colleges. Currently we are working on to publish 60 more different medical textbooks, a sample of which is in your hand. It is to mention that all these books have been distributed among the medical colleges of the country free of cost.

As requested by the Ministry of Higher Education, the Afghan universities, lecturers & students they want to extend this project to non-medical subjects like (Science, Engineering, Agriculture, Economics & Literature) and it is reminded that we publish textbooks for different colleges of the country who are in need.

As stated that publishing medical textbooks is part of our program, we would like to focus on some other activities as following:

1. Publishing Medical Textbooks

This book in your hand is a sample of printed textbook. We would like to continue this project and to end the method of manual notes and papers. Based on the request of Higher Education Institutions, there is need to publish about 100 different textbooks each year.

2. Interactive and Multimedia Teaching

In the beginning of 2010, we were able to allocate multimedia projectors in the medical colleges of Balkh, Herat, Nangarhar, Khost & Kandahar. To improve learning environment the classrooms, conference rooms & laboratories should also be equipped with multimedia projectors.

3. Situational Analysis and Needs Assessment

A comprehensive need assessment and situation analysis is needed of the colleges to find out and evaluate the problems and future challenges. This would facilitate making a better academic environment and it would be a useful guide for administration and other developing projects.

4. College Libraries

New updated and standard textbooks in English language, journals and related materials for all important subjects based on international standards should be made available in the libraries of the colleges.

5. Laboratories

Each medical college should have well-equipped, well managed and fully functional laboratories for different fields.

6. Teaching Hospitals (University Hospitals)

Each medical college should have its own teaching hospital (University Hospital) or opportunities should be provided for medical students in other hospitals for practical sessions.

7. Strategic Plan

It would be very nice if each medical college has its own strategic plan according to the strategic plan of their related universities.

I would like to ask all the lecturers to write new textbooks, translate or revise their lecture notes or written books and share them with us to be published. We assure them quality composition, printing and free of cost distribution to the medical colleges.

I would like the students to encourage and assist their lecturers in this regard. We welcome any recommendations and suggestions for improvement.

We are very thankful to the German Federal Foreign Office & German Academic Exchange Service (DAAD) for providing funds for 90 different medical textbooks and the printing process for 50 of them are ongoing. I am also thankful to Dr. Salmaj Tural from J. Gutenberg University Mainz/Germany, Dieter Hampel member of Afghanic/Germany and Afghanic organization for their support in administrative & technical affairs.

I am especially grateful to GIZ (German Society for International Cooperation) and CIM (Centre for International Migration & Development) for providing working opportunities for me during the past two years in Afghanistan.

In Afghanistan, I would like cordially to thank His Excellency the Minister of Higher Education, Prof. Dr. Obaidullah Obaid, Academic Deputy Minister Prof. Mohammad Osman Babury and Deputy Minister for Administrative & Financial Affairs Associate Prof. Dr. Gul Hassan Walizai, the universities' chancellors and deans of the medical colleges for their cooperation and support for this project. I am also thankful to all those lecturers that encouraged us and gave all these books to be published.

At the end I appreciate the efforts of my colleagues Dr. M. Yousuf Mubarak, Abdul Munir Rahmanzai, Ahmad Fahim Habibi, Subhanullah and Hematullah in publishing books.

Dr Yahya Wardak
CIM-Expert at the Ministry of Higher Education, November, 2012
Karte 4, Kabul, Afghanistan
Office: 0756014640
Email: textbooks@afghanic.org
wardak@afghanic.org

ABSTRACT

Medical Microbiology is a basic subject which deals with different microorganisms that has medical importance. It has been taught in the Medicine, Dentistry, Nursing, Public Health, Allied Health, Technology and Pharmacy colleges.

The first volume of Medical Microbiology is prepared according to the curriculum of Kabul Medical University and has four sections and 9 chapters (Morphology and Physiology of Microorganisms, Normal Microbial Flora, Infections, Immunology, Genetic of Microbes, Antimicrobial Therapy and Systemic infections). It contains essential information about those microorganisms which can cause diseases inside the human body. In addition it is designed with pictures and diagrams.

Since infectious diseases are very common in Afghanistan, I strongly recommend the studying of this book for medical students, young doctors and medical technologists.

All efforts have gone into equipping each section of this book with required pictures, collecting all information from a valid reference.

At the end, I am also thankful to German Ministry of foreign affairs and DAAD for publishing this book.

Sincerely,

Prof. Dr Obaidullah Obaid
Minister of Higher Education and
Head of Microbiology Department,
Kabul Medical University

بیوگرافی مختصر پوهاند دوکتور عبیدالله عبید



پوهاند دوکتور عبیدالله عبید ولد عبدالوهاب خان در سال ۱۳۴۷ هجری شمسی در یک خانواده روشنفکر و مسلمان در شهر کابل تولد گردیده، پس از فراغت از پوهنچی ستوماتولوژی پوهنتون طبی کابل در سال ۱۳۶۹ به سویه ماستر، بعد از امتحان مؤفقاانه کادر علمی به صفت استاد در دیپارتمنت مایکروبیولوژی و پرازیتولوژی پوهنتون طبی کابل شامل که بعد از سال ۱۳۷۲ الی قوس ۱۳۸۹ به حیث شف این دیپارتمنت ایفای وظیفه کرده است.

از سال ۱۳۷۲ الی ۱۳۷۶ بر علاوه تدریس، به حیث مدیر عمومی تدریسی در پوهنتون طبی کابل، از سال ۱۳۸۱ الی ختم سال ۱۳۸۲ به حیث معاون امور محصلان پوهنتون طبی کابل، از سال ۱۳۸۳ الی سنبله سال ۱۳۸۴ به حیث مشاور رییس جمهور در امور اجتماعی و از سال ۱۳۸۴ الی سال ۱۳۸۹ به حیث رییس پوهنتون طبی کابل مصروف خدمت به اولاد وطن بود. در سال ۲۰۰۳ برای مدت چهار ماه جهت کسب آموزش میتودهای جدید درسی در پوهنتون لومالیندا ایالات متحده امریکا و در سال ۲۰۰۷ برای مدت سه ماه جهت کسب انکشاف مهارت‌های بین‌المللی در پوهنتون نبراسکا ایالات متحده امریکا به ادامه تحصیل پرداخته و از هردو پوهنتون سرتفکیت‌های مساعد و مؤفق به دست آورد.

موصوف برای مدت یکسال به حیث رییس بورد توقف توبرکلوز افغانستان فعالیت نموده و مدت یکسال و سه ماه به حیث سفیر کبیر و نماینده فوق‌العاده رییس جمهور افغانستان در جمهوری اسلامی ایران ایفای وظیفه کرده است.

وی وکیل منتخب مردم شهر کابل در لویه جرگه اضطراری و وکیل منتخب مردم شهر کابل در لویه جرگه تصویب قانون اساسی نیز بودند.

محترم پوهاند دوکتور عبیدالله عبید بعد از معرفی از سوی رییس جمهور کشور به حیث وزیر تحصیلات عالی با کسب ۱۹۹ رأی اعتماد از سوی اعضای پارلمان به حیث وزیر تحصیلات عالی تقرر حاصل نمودند.

مقدمه

خداوند عزوجل را سپاس بی‌پایان که بنده را توفیق عنایت فرمود تا تألیف کتاب درسی دست داشته را که از طرف دیپارتمنت مایکروبیولوژی با تأیید شورای علمی منحیث یک اشد ضرورت دیپارتمنت برای تدریس محصلان صنوف دوم پوهنحی‌های طب معالجبی، اطفال و منحیث اثر اصلی این جانب برای ترفیع رتبه علمی ام از رتبه پوهنوال به رتبه پوهاند براریم وظیفه سپرده شده بود، به پایان برسانم. از آنجائیکه موجودیت کتاب درسی در شرایط فعلی که دسترسی به مأخذ معتبر و وارد بودن به یکی از لسان‌های خارجی برای هر محصل مقدور نیست، ضروری پنداشته می‌شود تا دیپارتمنت جهت رفع این معضله کتاب درسی داشته باشد، تا استاد و محصل بتواند از آن جهت حل معضلات شان منحیث یک کتاب درسی استفاده نمایند. تاکنون دیپارتمنت مایکروبیولوژی کتاب مکملی که در هر دو سمستر تدریس شود نداشت، که از لکچر نوت‌ها استفاده می‌گردید. خوشبختانه به یاری ایزد متعال اینک کتاب مکمل درسی مضمون مایکروبیولوژی تهیه و به دسترس محصلان عزیز قرار داده می‌شود.

ما در جهان مملو از میکرواورگانیزم‌ها مختلفه زیست می‌نمائیم که بعضی از این میکروب‌ها برای انسان‌ها ایجاد بیماری می‌نمایند، که حتی حوادث ناگوار را که حیات مریضان را تهدید می‌نمایند، در قبال دارد. بناً دانستن مایکروبیولوژی طبی برای اهل طب از ضرورت‌های مهم به شمار می‌رود.

هویداست که انکشاف مایکروبیولوژی ارتباط ناگستنی با دیگر شعبات طبابت دارد و کشفیات در بخش‌های مختلفه علوم طب با تحولات و پیشرفت‌های در عرصه مایکروبیولوژی توأم می‌باشد. براساس این دست آورد، کتاب جدید مایکروبیولوژی مطابق به آخرین تحولات علم طب تحریر و تغییرات معاصر مدنظر گرفته شده است.

مطالب این کتاب مطابق مفردات جدید درسی محصلین پوهنتون طب کابل بوده و از طرف دیگر تجارب نشاندهنده آنست که امراض مختلف میکروبی نظر به شرایط محیطی و یا سایر معیارات در مناطق مختلف شیوع متفاوت داشته و ایجاب می‌نماید که در تحریر این کتاب به پتالوژی مملکت توجه خاص مبذول گردد، که این موضوع نیز در تحریر این کتاب در نظر گرفته شده است.

این کتاب حاوی چهار بخش که عبارت از، اساسات مایکروبیولوژی، باکتریولوژی، وایرولوژی و میکولوژی در سی و چهار فصل با داشتن تصاویر رنگه که خوبتر ذهن‌نشین محصلان عزیز می‌گردد، با استفاده از مأخذ جدید منجمله انترنیت به رشته تحریر در آمده و کوشش به عمل آمده تا در موارد عوامل مرضی، خصوصیات مایکروبیولوژیکی، پتوجنیزس، لوحه کلینیکی، تشخیص لابراتواری، تداوی و وقایه معلومات همه جانبه ارائه گردد.

مأخذ در متن به شکل تحریر گردیده، که صرف به داخل قوس نمبر مأخذ ذکر گردیده درحالیکه اشکال با مخفف ریفرینس (R) و نمبر ماخذ به داخل قوس نگاشته شده است.

از خوانندگان محترم این کتاب صمیمانه تقاضا می‌گردد تا کمبودی‌ها و کاستی‌های کتاب را به دیده اغماض نگریسته و نظریات اصلاحی خویش را به مؤلف ارسال دارند.

امیدوارم آرزوی را که بنده از زحمات و تلاش‌های شباروزی خود دارم و آن جز تربیه سالم اولاد وطن و اعتلای میهن عزیزم افغانستان نیست، بر آورده شده بتواند.

در خاتمه از رهنمائی‌های استادان محترم هر یک پوهاند دوکتور سید الف شاه "غضنفر"، پوهاند دوکتور محمد افضل "انور"، پوهاند دوکتور سید عبدالله "هاشمی" و پوهاند دوکتور حیات الله "حیات" ابراز سپاس و امتنان نموده و نیز از محترم داکتر اجمل "عازم" به پاس زحمات و اهتمام شان در ویرایش و طبع آن اظهار سپاس نمایم.

با احترام

پوهاند دوکتور عبیدالله "عبید" ©

تاریخچه مختصر علم مایکروبیولوژی

مایکرواورگانیزم‌ها پیشتر از سه قرن قبل کشف گردیده بودند اما الی اواسط قرن نوزدهم که مایکروبیولوژی در آن به علم تجربی مبدل گردید، معلومات کمی در مورد میکروب‌ها در دست بود. بعد از اواسط قرن نوزدهم، الی الحال، پیشرفت‌های فزاینده‌ی درین عرصه صورت گرفته که همچنان ادامه دارد.

حیوانات کوچک لیون هوک

انتونی لیون هوک، تجار هالندی، نخستین شخصی بود که مایکرواورگانیزم‌ها را مشاهده نمود. وی بصورت تفریحی میکروسکوپ‌های کوچک را می‌ساخت. بعد ازینکه از طریق عدسیه میکروسکوپ دستی خود مشاهدات انجام داد، وی عالم مخلوقات غیر مرئی را مشاهده نمود که نام آنها را حیوانات کوچک گذاشت. این حیوانات کوچک در هر جا موجود بودند، در قطرات آبی، در خاک و در نمونه‌های حاصله از خراشیدن دندان‌ها. وی در سال ۱۶۷۴ میلادی رسم‌های مفصلی را در مورد کشفیات خود به جمعیت شاهی لندن فرستاد. همه رسم‌ها و ۹ پایه میکروسکوپ از جمله ۵۰۰ میکروسکوپ‌های دست ساخته وی هنوز هم موجود اند. قوی‌ترین میکروسکوپ‌ی که توسط وی ساخته شده بود، دارای بزرگ‌نمایی به اندازه ۲۶۶ بود که می‌توانست باکتری‌های نسبتاً کوچک را به اندازه نقطه معمول در کلمات، نشان دهد. اما با در نظرداشت تفصیلات موجود در رسم‌های وی، می‌توان گفت که وی باید میکروسکوپ‌های قوی‌تری را ساخته باشد که مفقود گردیده اند.

البته وی اولین شخصی نبود که میکروسکوپ‌ها را بسازد اما وی میکروسکوپ‌های دستی بهتری ساخت و با مهارت بیشتر از آن استفاده به عمل آورد. وی با حسادت از میکروسکوپ خود که دارای عدسیه واحد بود، استفاده به عمل می‌آورد و میکروسکوپ‌های مرکب همان زمان را استعمال نکرد. وی از فروش میکروسکوپ‌های خود امتناع بعمل آورده و نیز دیگران را در مورد آن آموزش نداد. در نتیجه الی ۲۰۰ سال دیگر هم کسی نتوانست میکروسکوپ‌های قوی مانند وی تهیه نماید.

هوک و نظریه حجروی

زمانیکه لیون هوک رسم های خود را به جمعیت شاهی لندن فرستاد، رابرت هوک متصدی سامان آلات جمعیت بوده و با مایکروسکوپ مرکب تجارب خود را انجام میداد. آلات هوک می توانست ۳۰۰ الی ۵۰۰ مرتبه بزرگنمایی داشته باشد، اما تصاویر آن توسط حلقات ملونه نور تحت پوشش قرار می گرفت. بناءً نمی توانست موجودات کوچک چون باکتری ها را ببیند. اما وی کاغذ کارک را تحت مایکروسکوپ قرار داده و آنرا به نام حجرات مسمی نمود که مانند خانه زنبور به مشاهده می رسید. این کشف باعث به میان آمدن نظریه حجروی گردید که به اساس آن حجرات واحد اساسی و وظیفوی همه موجودات حیه دانسته شد.

تخلیق بنفسه (خودی)

در زمانی که لیون هوک مایکرواورگانیزمها را در هالند مشاهده می نمود عالم دیگری در ایتالیا حادثه مهم دیگری را کشف نمود: در سال ۱۶۶۵ میلادی، فرانسکو ریدی اثبات نمود که تخلیق خودی موجودات ماکروسکوپی ممکن نمی باشد. به عباره دیگر، موجودات زنده از مواد غیر حیه بوجود نمی آیند. وی تجربه خود را با جاره های مستور و غیر مستور گوشت انجام داد که کرم های گوشت صرف در بوتلی به میان آمد که سر آن باز بود و قابل تماس مگس قرار داشت. یعنی مگس ها با گوشت تماس حاصل نموده و در آن تخم گذاری می کردند. وی ثابت نمود که موجودات حیه صرف از موجودات حیه موجود قبلی، به میان می آیند. با آنهم مایکرواورگانیزمها بحیث استثنا این قانون تلقی می گردید. مایکروبها به سرعت و به تعداد زیاد بعد از مرگ نباتات یا حیوانات تظاهر می نمودند. آیا مایکروبها باعث تجزیه decomposition می گردند و یا اینکه decomposition باعث به میان آمدن مایکروبها می گردد؟ سوالی بود که هنوز به حل نیاز داشت.

نیدهام و سپالانزانی

مسئله تخلیق خودی برای هشتاد سال بصورت متنازع باقی مانده بود اما بعد از آن طرفداران نظریه تخلیق خودی غالب به نظر رسیدند. در سال ۱۷۴۵ میلادی، روحانی انگلیسی به نام جان نیدهام تجربه بی را جهت حل این منازعه پیشنهاد نمود. هر کس میدانست که جوش دادن

سبب مرگ مایکروب‌ها می‌گردد. بناءً وی broth مرغ را جوش داده و آنرا در فلاسک انداخته، و سرپوش فلاسک را مسدود می‌نمود. اگر مایکروب‌ها نمو میکردند، یگانه سبب آن تخلیق خودی بود. عملاً طی این تجربه مایکروب‌ها رشد نمودند. اما عالم ایتالوی به نام لازارو سپالانزانی به این تجربه اکتفا ننمود. وی معتقد بود که شاید مایکروب‌ها بعد از جوش دادن اما قبل از مسدود نمودن فلاسک مداخله نموده باشند. بناءً وی broth را در فلاسک انداخته، آنرا مسدود ساخت و هوای فلاسک را تخلیه نمود. بعداً آنرا جوش داد که مایکروب‌ها نمو نکردند. کسانی که برین دریافت انتقاد داشتند، معتقد بودند که این تجربه صرف اثبات نمود که در عدم موجودیت هوا تخلیق خودی صورت گرفته نمی‌تواند.

تجربه تاریخی پاستور

تنازع فوق الی صد سال دوام نمود. بالاخره اکادمی ساینس فرانسه در سال ۱۸۵۹ میزبانی مسابقه‌ی را به عهده گرفت که طی آن تیوری تخلیق خودی یا رد آن، باید اثبات می‌گردید. لویی پاستور که کیمیادان فرانسوی بود، وارد صحنه گردیده و از فلترهای باید استفاده می‌نمود که هوا را اجازه عبور داده اما مایکروب‌ها را اجازه عبور ندهد تا تیوری مبنی بر لزومیت هوا برای تخلیق خودی را فیصله نماید.

موصوف در معروفترین تجربه خود، broth گوشت را در فلاسک جوش داده و بعداً عنق فلاسک را تحت شعله آتش طویل و منحنی ساخت (که مانند عنق قازها شکل داشت). و بدین ترتیب محتوی فلاسک به هوا ارتباط داشت. زمانیکه وی تجربه خود را انجام داد، مایکروب‌ها رشد نمودند، اما وقتیکه موصوف فلاسک را طوری تغییر موقعیت داد که یک اندازه از محتوی آن با قسمت عنق در تماس گردید، بعد ازینکه فلاسک را بحالت اصلی خود گذاشت، broth دوباره به قسمت قاعده فلاسک برگشت نمود. بزودی دیده شد که محتوی فلاسک ابرآلود و مملو از مایکروب‌ها گردید. علت عدم تداخل مایکروب‌ها در حالت اولی به broth این بود که قوه جاذبه زمین باعث ته نشین شدن مایکروب‌های وارده از هوا در سطح سفلی قسمت عنق گردیده بود و زمانیکه با حرکت فلاسک محتوی آن به تماس این ناحیه در آمد باعث انتقال مایکروب‌ها از این ناحیه به قسمت تحتانی فلاسک گردیده که سبب رشد مایکروب‌ها گردید. بناءً وی اثبات نمود که تخلیق خودی مایکروب‌ها حتی در موجودیت هوا نیز صورت گرفته

نمی‌تواند و اینکه رشد مایکروب‌ها سبب تفسخ غذا و نیز نباتات و حیوانات مرده می‌گردد. مؤفقت پاستور قسمی به خوشبختی وی عطف شده می‌تواند چه علمای عدیده قبل از آن نتوانستند تخلیق خودی را رد نمایند، زیرا نمونه‌های آنان دارای اندوسپورهای مقاوم حرارت بودند که در مقابل حرارت مقاوم و توسط جوش دادن تخریب نمی‌شوند. مخصوصاً در تجاربی که از broth نباتی استفاده میشد، بیشتر به ناکامی مواجه می‌گردید، زیرا نباتات بیشتر دارای انواع باکتری‌های می‌باشند که سپورهای مقاوم حرارت را تولید می‌نمایند. Broth گوشت مانند تجربه پاستور به ندرت توسط اندوسپورها ملوث می‌گردد.

- تجربه ساده اما مهم و تاریخی پاستور حقایق ساینسی را در مایکروبیولوژی بر ملا ساخت:
- هیچ موجود زنده به شمول میکرواورگانیزم‌ها توسط تخلیق خودی بمیان آمده نمی‌تواند.
 - مایکرواورگانیزم‌ها در همه جا موجود می‌باشد به شمول هوا، گرد و خاک.
 - رشد مایکروب‌ها سبب تجزیه نباتات و حیوانات مرده و تخریب مواد غذایی می‌گردد.

تیوری مایکروبی امراض

بعد از اینکه تخلیق خودی مایکروب‌ها رد گردید، انقلابی در علم مایکروبیولوژی رخ داد. یعنی مایکروبیولوژی از یک علم مشاهدوی به علم تجربوی تبدیل گردید. ساینسدانان می‌توانستند مسایل مغلقی را مورد توجه قرار دهند. بدین ترتیب تیوری مایکروبی امراض به میان آمد. رابرت کوخ، طبیب آلمانی با استفاده از کارهای پاستور، اثبات نمود که نه تنها مایکروب‌ها سبب امراض می‌شوند، بلکه امراض بخصوص توسط مایکروب‌های معین به میان می‌آیند.

فرضیه کوخ

رابرت کوخ در سال ۱۸۷۶ مرض انتراکس را مطالعه می‌نمود. این مرض حیوانات و نیز انسانها را مصاب می‌سازد. وی دریافت که عامل سببی مرض در خون همه حیوانات مصاب به مرض قابل دریافت است. وی عامل سببی را کشت نموده (امروز به نام bacillus anthracis یاد می‌گردد) که بصورت خالص خارج از عضویت متن بدست آمد. وی بعداً حیوانات سالم را با

همان کلچر مرضی تزریق نموده که آن حیوانات نیز مانند حیوانات قبلی مصاب مرض گردیده و در خون آنها قابل دریافت بود. این چهار مرحله تیوری کوخ را تشکیل می دهد که حتی امروز هم قابل استفاده می باشند. به اساس این نظریه، مایکروب معینی عامل سببی مرض مشخصی می باشد. در ضمن مطالعه مرض انتراکس، رابرت کوخ تکنیک حصول و اجرای کشت خالص مایکروبها را نیز به میان آورد. در کلچر خالص صرف نوع واحد باکتری موجود می باشد. کلچرهای مختلط عبارت از کشت های اند که دارای انواع متعدد مایکروبی می باشند که نمونه های آن در طبیعت دیده می شود. اجرای تجارب بالای کشت های مختلط مشکل بوده و سبب اشتباهات می گردد اصلاً در گذشته ها همین کشت های مختلط بود که سبب به میان آمدن نظریه های خیالی در مورد دوران حیات مایکروبها گردیده بود. ساینسدانان به همین اساس توضیحات ارائه نمودند که چگونه باکتری با مرور زمان شکل و اوصاف خود را در کشت تغییر می دهد مثلاً از اشکال مدور به اشکال طولیل و حتی فنر مانند شکل خود را تغییر می دهد. در حقیقت این اشکال، نمایانگر انواع مختلف باکتری ها بود که در اوقات مختلف در وسط متباز می بود و ناشی از کلچرهای مختلط بود نه تغییر شکل یکنوع باکتری. فرضیه کوخ، حصول کلچر خالص و نیز معرفی ماده اگر توسط وی بحیث وسط کشت، تغییرات فوق العاده‌یی را در عرصه مایکروبیولوژی به میان آورد. از سال ۱۳۸۲ الی ۱۹۰۰ میلادی، تقریباً عوامل سببی همه امراضی که در آن زمان در اروپا معمول بود، کشف گردید مانند عامل سببی تایفس، دیزانتی، سفلیس، گونوریا، نومونیا و توبرکلوز که اخیرالذکر توسط شخص رابرت کوخ کشف گردید.



معافیت

در صورتیکه مایکروبهای معینی سبب امراض مشخص گردد، باید ممکن باشد تا امراض مایکروبی یا انتانی را کنترل نمود. برای این مأمول کافی بود تا عامل سببی مرض کنترل گردد بناءً مایکروبیولوژی در دو عرصه عمده پیشرفت نمود: اول، معافیت یا تحریک قابلیت خود عضویت تا با انتانات مقابله نماید و دوم، حفظ الصحه عامه تا پاکی و صفایی توسعه یافته و معروضیت به انتانات کاهش یابد.

از ازمه های قدیم هویدا بود که آنانی که یکبار به عده از امراض مصاب می شدند، برای بار دوم در مقابل همان امراض مقاوم می بودند. بعضی از تغییرات محافظوی در بدن رشد می نمود

یا به عباره دیگر مایکروب‌ها باعث تولید معافیت شده می‌توانست. تولید معافیت توسط مایکروب‌های باید صورت گیرد که میزان را در مقابل همان مایکروب معروض می‌سازد، اما شکل مایکروب تغییر یافته باشد و سبب تولید مرض نگردد.

شریت سازی هیس

رأبرت کوخ اهمیت اجرای کلچر خالص را درک نمود، اما تطبیق آن مشکل بود. وی در تیوری می دانست که اگر حجره واحد باکتری تجرید و در سطح جامد کشت گردد، سبب تولید مجتمع متشکل از همان مایکروب خواهد شد (کالونی‌ها). این کشت، خالص خواهد بود زیرا از نوع واحد حجره منشأ گرفته اند. همچنان وی می دانست که برای نموی مایکروبی برای مواد مغذی نیاز موجود است. بدین منظور وی از مواد مختلفه مانند توتیه کچالو یا جلاتین را به کار برد. جلاتین خوب نتیجه داد اما در درجه حرارت پائینتر از ۳۷ درجه سانتی گراد ذوب گردیده و نمی‌توانست درین درجه که برای کشت اکثریت مایکروب‌های مرضی مساعد است، جامد بماند. همسایه کوخ، خانم فرا هیس می‌باشد، برای این مشکل وی آگاه گردیده و از دستگاه شربت سازی ماده اگر را که محصول خزیه‌های آبی می‌باشد، برای وی فراهم نمود. زمانیکه این ماده با مواد مغذی مانند broth گوشت ترکیب شود، بسیار برای کشت مناسب است زیرا در حرارت پائین تر از صد درجه سانتی گراد جامد می‌ماند. بدین وسیله کوخ توانست که کشت‌های خالص را به دست آورد و تحول عمده در مایکروبیولوژی به وقوع پیوندد.

جنر و مرض چیچک

ادوارد جنر که طبیب انگلیسی بود، دریافت که شیردوشانی که بصورت طبیعی انتان نسبتاً خفیف به نام cowpox را کسب نموده بودند، در مقابل مرض مهلک و سؤشکل دهنده به نام small pox مصؤون بودند. وی در سال ۱۷۹۶ از آبله‌های موجود در دست سارا نیلمز مصاب به cowpox مایعی را اخذ و در بدن طفل هشت ساله یی تلقیح نمود طفل به مرض اخیر الذکر مصاب گردید بعداً جنر مواد منتن با small pox را در بدن عین طفل تلقیح نمود که سبب به میان آمدن هیچگونه عکس‌العملی نگردید. یعنی طفل در مقابل مرض چیچک معاف شده بود. کلمه واکسیناسیون نیز مشتقی از کلمه واکا (لاتین) یا گاو می‌باشد. بدین ترتیب مرض چیچک تحت کنترل در آمد. اما جنر معلومات کافی نداشت تا واکسیناسیون در مقابل سایر امراض انتانی نیز تهیه نماید.

واکسین‌های نخست

پاستور به اساس کارهای انجام یافته توسط کوخ و جنر، اصول عمومی را ترتیب نمود که چگونه واکسین‌ها (عواملی که سبب تولید معافیت می‌شوند اما نه مرض) ساخته شده می‌تواند. پاستور نیز مانند کوخ بالای انترکس کار می‌کرد. در اوایل دهه ۱۸۸۰ وی در مورد کولرای پرنده گان تجاربی را اجرا می‌نمود و دریافت که تزریق مایکروب ضعیف شده کولرا در مرغهای سالم سبب محافظت آنها در مقابل کولرای پرنده گان می‌شد. وی ازین اصل برای ترتیب واکسین انترکس و نیز در سال ۱۸۸۵ برای سگ دیوانه استفاده به عمل آورد. تقریباً در عین زمان دو شخص امریکایی به نام‌های دانیل سلمان و تیوبالد سمیت بصورت تجربوی وانمود ساختند که برعلاوه مایکروب‌های ضعیف شده می‌توان از مایکروب‌های کشته شده نیز استفاده بعمل آورد که این کشفیات سبب تولید واکسین عده زیادی از امراض انتانی گردید.

حفظ الصحه عمومی

با کشف واکسین‌ها حیات هزاران انسان نجات یافت اما با بهبود حفظ الصحه عمومی، هرچه بیشتر در حفظ حیات انسان‌ها کمک کرد. قبل از نظریه مایکروبی امراض، آب‌های کثیف معمولاً با آبهای آشامیدنی مخلوط می‌گردید که با بهبود شیوه‌ها و میتودهای دفع کثافات و تأمین آب پاک آشامیدنی از اپیدیمی‌های خطرناک کولرا و تب محرقه جلوگیری بعمل آمد. همچنان در عرصه تهیه و نگهداری مواد غذایی پیشرفت‌های به میان آمد که بالاخره پاستورایزیشن مثال آن است که با معروض نمودن کوتاه مدت مواد به حرارت، اکثریت مایکروب‌های مرضی از بین می‌روند، پاستور برای بار نخست این عملیه را جهت محافظت شراب از خراب شدن، اساس گذاشت. همچنان تیوری مایکروبی، سایر اقدامات محافظتی مانند شستن دست‌ها را تنبه نمود. حفظ الصحه عمومی بهتر، نه تنها سبب جلوگیری از مایکروب‌های مرضی می‌گردد، بلکه سبب تقویه مدافعه عضویت در مقابل امراض نیز می‌گردد.

مایکروبیولوژی امروزی

اواخر قرن نهم عصر طلائی مایکروبیولوژی محسوب می‌گردد زیرا تغییرات و کشفیات چنان به سرعت واقع شدند که در نتیجه حیات را بصورت دراماتیک تغییر داد. در قرن بیستم چنین تغییرات کمتر بود. بدین منظور به عرصه‌های کیموترابی، ایمونولوژی، وایرولوژی و جنیتیک انجنیرنگ بازنگری می‌نماییم:

کیموتراپی

عمده ترین پیشرفت قرن بیستم عبارت از کیموتراپی یا تداوی انتانات با مواد کیمیای بود. در قرن نهم نیز علما شیوه های برای جلوگیری انتانات بوجود آوردند اما نمی توانستند آنرا تداوی نمایند. طبیب آلمانی پاول ایهرلیچ به نام پدر کیموتراپی یاد می گردد، زیرا وی برای اولین بار نظریه سمیت انتخابی selective toxicity را به میان آورد. یعنی ادویه باید به مقابل انتانات توکسیک ولی در مقابل عضویت انسان نسبتاً غیر مضر باشد. وی گفت که ادویه عبارت از مرمی های جادویی هستند که می توانند مایکروبها را از بین ببرد. موصوف در سال ۱۹۰۸ میلادی اولین ادویه ضد مایکروبی را بر علیه عامل سببی سفلیس به میان آورد و نام آنرا salvarsan یا نجات دهنده گذاشت. الی بیست سال دیگر این یگانه دوی ضد مایکروبی کشف شده بود. بعد از این اولین فامیل عمده ادویه جات به نام sulfas کشف گردید که ابتدأً صرف به منظور رنگ آمیزی استعمال میشد و بعداً بالآخر تحقیقات کمپنی Farben آلمانی در دهه ۱۳۹۰ بحیث مواد کیموتراپی نیز استفاده گردیدند.

انتی بیوتیک ها مواد کیموتراپی طبیعی اند که نخستین آن به نام پنسیلین در سال ۱۹۲۹ توسط عالم سکاتلندی به نام الکساندر فلیمنگ کشف گردید. اما بنابر مشکلات تخنیکی در تصفیه آن الی یک دهه دیگر نیز استعمال کلینیکی نداشت. در دهه ۱۹۴۰ در جریان جنگ دوم جهانی وجوه مالی تولید پنسیلین بدست آمد که این ادویه استعمال و به نام ادویه حیرت انگیز یاد شد.

تب زایمانی

در اواسط قرن نهم، دخول به شفاخانه جهت ولادت خطرناک بود. تعداد زیادی از زنان اطفال صحتمندی به دنیا آورده اما خود به زودی به بیماری خطرناکی دچار می شدند که بالاخره از بین رفته و آرزوی بردن اطفال به خانه را بجا آورده نمی توانستند. امروز ما می دانیم که بیماری متذکره از باعث streptococcus pyogenes به میان آمده که نخست رحم را مبتلا و بعداً به تمام عضویت سرایت می نماید. اعراض آن تب، لرزه، هزیانات و بالاخره مرگ می باشد.

ایگناز سیمیل ویس در سال ۱۸۴۷ میلادی، طبیب شفاخانه ولادی ویانا بود. تعداد وفیات در زمان تصدی وی زیاد و نیز عجیب بود زیرا شفاخانه دو کلینیک ولادی داشت. در کلینیک اول محصلین مسؤول ولادت بوده و در دوم آن قابله ها موظف بودند. وفیات بصورت حیرت انگیز در

کلینیک اول زیاد بود. همه زنان ساعت ها در دهلیز انتظار می کشیدند و می خواستند به کلینیک دوم داخل گردند. موصوف ازین واقعه در تحیر افتاد و دریافت که انگشت یکتن از محصلین بریده شده و با عین اعراض تب زایمانی وفات نمود. وی دریافت که چون محصلین به تطبیقات اناتومی رفته بر اجساد کار می نمایند، ممکن عامل سببی تب زایمانی از اجساد توسط انگشت های محصلین انتقال یابد. وی همه محصلین را امر نمود تا بصورت منظم دستان خود را قبل از ورود به ولادت خانه با کلورین خوب بشویند. چون کلورین بوی اجساد را از بین می برد، وی فکر کرد که شاید مؤثر باشد، همینطور شد، کلورین عامل مرضی را از بین برده و فیصدی وفیات کلینیک اول مانند کلینیک دوم پائین آمد. اما همه وی را به استهزا گرفتند و تقریباً سه دهه بعدتر کوخ و پاستور دریافت های او را بصورت علمی توضیح داده اما افسوس که او تا آنوقت زنده مانده نتوانست و بصورت غیر معمول، از انتان سترپتوکوکال در سال ۱۸۶۴ فوت نمود.

ایمونولوژی

در ایام پاستور و کوخ، این علم جز از مایکروبیولوژی بوده که نقش آن صرف تهیه واکسین ها بر علیه امراض انتانی بود، درحالیکه این علم در قرن اخیر بسیار تکامل نموده است.

واپروولوژی

این علم در سال ۱۸۹۲ با کشف وایرس tobacco mosaic توسط عالم روسی به نام دیمیتری ایوانوسکی آغاز گردید. وی این عامل مرضی را با مطالعه مرض موزایک تنباکو دریافت نمود. وی جهت تشخیص خود، جوس حاصله از نباتات مبتلا به مرض را از فلتری عبور داد که حتی کوچکترین باکتری را اجازه دخول نمی داد. محصول فلتتر شده بازهم سبب تولید مرض گردید که وی عامل آنرا به نام وایرس های قابل فلتتر نامید. این عوامل در سالهای ۱۹۳۰ با کشف الکترون مایکروسکوپ، قابل رویت گردید.

انجیری جنیتیک

دو حقیقت عمده در مورد مایکروبها در نیمه دوم قرن بیستم کشف گردیده که اول آن مشابهت نزدیک میتابولیزم و مشخصات جنیتیک مایکرواورگانیزمها با حیوانات و نباتات بوده و دوم آن، مساعد بودن مایکرواورگانیزمها برای تحقیقات تجربی می باشد. مساعد بودن

باکتری‌ها برای تحقیقات در سهولت کشت و سرعت انقسام آن نهفته است. یعنی عده از باکتری‌ها به سرعت یعنی هر ۲۰ دقیقه بعد یکبار انقسام می‌نمایند که در مدت کوتاهی تعداد باکتری‌های موجود در یک لیتر مایع بیشتر از تعداد انسانان موجود در کره زمین می‌گردد. Genetic engineering یا Recombinant DNA technology عبارت از تخنیک است که طی آن مواد جنیتیک یا DNA از یک موجود بیرون کشیده شده، در آن تغییرات وارد می‌گردد و دوباره به اورگانیزم دیگری داخل می‌گردد تا اثرات خویش را وارد کند. DNA از هر اورگانیزم حاصل شده می‌تواند و DNA موجودات مختلف باهم ترکیب شده می‌تواند. اورگانیزمی که بیشتر به حیث میزبان به این منظور استفاده می‌شود، عبارت از E. Coli می‌باشد که حتی برای سنتیز انسولین انسانی بکار می‌رود. این ساحه بسیار وسیع و تا حال تحقیقات در آن جریان دارد.

زمان آینده

مایکروبیولوژی بحیث علم تجربوی کمتر از صد سال عمر دارد. عرصه‌های باکتریولوژی و وایرولوژی آن هنوز هم ضرورت به انکشاف دارد. مثلاً مشکلات عایده از مقاومت در مقابل انتی‌بیوتیک‌ها و یا ظهور انواع جدید وایرس‌ها در اثر تغییرات تدریجی، حالاتی اند که باید مورد توجه قرار گیرد. همچنان کنترل امراض انتانی مشکلی است که هنوز در راستا این علم قرار دارد عده از علما به سنتیز انتی‌بیوتیک‌های جدید و عده هم به تقویه سیستم معافیتی اصرار دارند؛ باید تحقیقات بیشتری صورت گیرد و آنهم با استفاده از Recombinant DNA technology.

عرصه دیگری که مستلزم توسعه است عبارت از مایکروبیولوژی محیطی می‌باشد. ما عمدتاً بر bioremediation یا تصفیه مواد کیمیاوی توکسیک توسط مایکرواورگانیزم‌ها تأکید داریم. بالاخره تعداد زیادی از میکروب‌ها هنوز کشف، نامگذاری یا طبقه بندی نشده‌اند، که تحقیقات در آن جریان دارد، شما هم می‌توانید به مثابه دوکتوران و محققین مایکروبیولوژی در حدود توان تان سهم خود را درین عرصه ایفا نمایید.

فصل اول

مورفولوژی مایکرواورگانیزمها

تعریف مایکروبیولوژی

مایکروبیولوژی از سه کلمه Micro به معنی کوچک و ذره بینی Bio حیه و Logous علم مشتق شده است و عبارت از علميست که کلیه خصوصیات و مشخصات مایکروباها را مورد مطالعه قرار می دهد.

شعبات مایکروبیولوژی

- ۱- مایکروبیولوژی طبی
- ۲- مایکروبیولوژی صنعتی
- ۳- مایکروبیولوژی غذایی
- ۴- مایکروبیولوژی خاک
- ۵- مایکروبیولوژی آب
- ۶- مایکروبیولوژی نباتات

I- مایکروبیولوژی طبی

عبارت از مطالعه عامل (کلیه خصوصیات و مشخصات) امراض انتانی (هم از باکتریایی، فنگسی وایرسی و پرازیتی) می باشد. مایکروبیولوژی طبی از شعبات ذیل تشکیل گردیده است:

- ۱- باکتریالوژی: علميست که خصوصیات و قابلیت مؤلدامرضی باکتریها را مطالعه می نماید.

- ۲- مایکولوژی: علم مطالعه فنگس‌ها را گویند.
- ۳- وایرولوژی: علم‌یست که تمام خصوصیات Virus ها را مورد مطالعه قرار می‌دهد.
- ۴- پرازیتولوژی: علم‌یست که پرازیت‌های را که نزد انسانها ایجاد بیماری می‌نماید مورد مطالعه قرار می‌دهد.
- ۵- ایمینولوژی: علم مطالعه معافیت و مقاومت عضویت در مقابل مایکروب‌ها را گویند.
- ۶- جنیتیک: علم‌یست که خصوصیات ارثی و اختلاف میان نسل‌های مایکروب‌ها را مورد مطالعه قرار می‌دهد.

اساسات بیولوژیک که در مایکروبیولوژی توضیح می‌گردند

بیشترین تنوع بیولوژیک در مایکرواورگانیزم‌ها موجود می‌باشد. این‌ها موجوداتی اند که با چشم مستقیماً قابل رویت نمی‌باشند. تحلیل مایکرواورگانیزم‌ها از نگاه شکل و فعالیت مثلاً مشخصات بیوشمیک و یا میکانیزم‌های جنیتیک می‌تواند در مورد حیات معلومات فراهم نماید. فرضیه ساینسی مفید باید اساسی را برای (generalization) یا تعمیم تشکیل دهد و تنوع مایکروبی عرصه‌یی را تشکیل می‌دهد که این چالش دوامدار در آن موجود می‌باشد. پیشگویی که نتیجه عملی ساینس را تشکیل می‌دهد، عبارت از دست‌آورد حاصله از یکجا نمودن تخنیک و تیوری می‌باشد. بیوشیمی و جنیتیک و سایر تحلیل مایکرواورگانیزم‌ها را تشکیل می‌دهند.

مایکروبیولوژی به نوبه خود حدود اصول ساینسی فوق را توسعه می‌بخشد. بیولوژیست‌ها ممکن رابطه متقابل را که طی آن همه جوانب مستفید می‌گردد، Mutualism بگویند. اصطلاح بیولوژیک mutualism عبارت از symbiosis می‌باشد که وابسته گی مداومی را میان اورگانیزم‌های مختلف تشکیل می‌دهد. در صورتی که اصلاً یک جانب از رابطه منتفع گردد، چنین رابطه به نام parasitism یاد می‌گردد. Parasitism رابطه است که در آن نفع اصلی توسط میزبان برای پرازیت مهیا می‌گردد. مثلاً باکتریها و وایرس‌های پتوجنیک، که اکثراً ضرورت می‌باشد تا شرایط نمویی وجود میزبان را جهت کشت آن در لابراتوار مهیا نماید. این ضرورت بعضاً مشکل بزرگی را برای محققین ایجاد می‌نماید.

اصطلاحات اخیرالذکر (Mutualism-symbiosis-parasitism) مربوط به علم Ecology

می‌باشد و اساسات بیولوژی محیطی در مایکروبیولوژی توضیح گردیده است. مایکرواورگانیزمها تابع تکامل تدریجی بوده‌اند. پروسه تکامل تدریجی (Evolution) در نتیجه انتخاب طبیعی یک عده اورگانیزمهای متنوع به‌میان آمده و نیز مهم می‌باشد تا معلق بودن تاریخ طبیعی مایکرواورگانیزمها را قبل از تصنیف مایکرواورگانیزمها در نظر گرفت. مایکرواورگانیزمها غیر متجانس‌ترین گروه مخلوقات زنده می‌باشند. در تصنیفات بیالوژیک، Eukaryotes که دارنده هسته غشا دار می‌باشد و Prokaryotes که DNA آن به‌صورت فزبکی از سایتوپلازم تفکیک نمی‌گردد، مشتمل می‌باشد. بعداً در متن توضیح خواهد شد که تفاوت‌های دیگری نیز میان Eukaryotes و Prokaryotes موجود می‌باشد. مثلاً Eukaryotes دارای جسامت نسبتاً بزرگتر بوده و حاوی اورگانیل‌های غشا دار مانند مایتوکاندریا می‌باشند.

مایکروبرهای Eukaryote به نام پروتستها یاد می‌گردد و پروتستها مشتمل بر Algae، Protozoa، Fungi و Slime Molds می‌باشند.

Eukaryotes و Prokaryotes اورگانیزمها‌اند؛ زیرا که همه انزایمهای لازم برای تکثیر را دارا بوده و وسایل بیولوژیک لازم برای تولید انرژی میتابولیک را حایز می‌باشند؛ اما وایرس‌ها چنین نمی‌باشند؛ زیرا که جهت اجرای فعالیت‌های لازمی فوق به حجره میزبان متکی‌اند.

وایرس‌ها

خواص جداگانه وایرس‌ها آن‌ها را از سایر موجودات زنده مجزا می‌سازد. وایرس‌ها گروپ‌های غیر متجانسی می‌باشند که جهت تکثیر خود به حجره میزبان متکی می‌باشند. می‌توان وایرس‌ها را استتاله‌های جنتیک میزبان دانست. تعاملات میان میزبان و وایرس بسیار وصفی می‌باشد و حدود بیولوژیک وایرس‌ها نشاندهنده ازدیاد در انواع حجرات ممکنه میزبان می‌باشند. وایرس‌ها با داشتن ستراتیژی‌های زیاد در عرصه تکثیر و حیات، تنوع بیشتر را به خود کسب می‌نمایند.

وایرس متشکل از یک مالیکول نوکلیک اسید (DNA یا RNA) بوده که در محفظه پروتینی یا کپسید قرار دارد. پروتین‌های کپسید دار که اکثراً گلایکوپروتین‌ها بوده وصفی بودن تعامل میان وایرس و حجره میزبان را معین می‌سازد. کپسید نوکلیک اسید را محفظه نموده و

اتصال و دخول وایرس را به حجره میزبان مساعد می‌سازد. بعد از دخول وایرس به حجرات، نوکلئیک اسید وایرس‌ها دستگاه انزایماتیک حجره میزبان را طوری تغییر می‌دهد تا فعالیت‌های مربوط به تکثیر وایرس را انجام دهند. در بعضی حالات معلومات جنیتیک ناشی از وایرس به حیث DNA در کروموزوم حجره میزبان جا گرفته و در حالات دیگر معلومات جنیتیک وایرس به حیث اساس تولید حجروی عمل نموده و منجر به تولید کاپی‌های از وایرس می‌گردد. در این پروسه DNA وایرس کاپی شده و پروتئین‌های مخصوص وایرس ساخته می‌شود. جهت اكمال رشد وایرس‌ها لازم است تا یونت‌های کوچک پروتئینی و نوکلئیک اسید با هم ترتیب گردیده و وایرس‌های کامل را به بار آورند. وایرس‌های متذکره بعداً وارد محیط خارج حجروی می‌گردند.

وایرس‌های مختلفه سبب منتن شدن عده زیادی از حیوانات و نباتات گردیده و نیز پروکاریوت‌ها و اقلاً یک نوع از الجی‌ها را مصاب می‌سازد. اجسام مشابه وایرس‌ها که معلوم می‌شود در خارج حجره انسانی نمی‌باشد، در داخل فتجی‌ها و نیز در چندین نوع الجی‌ها دریافت شده‌اند.

عده ای از امراض ساری نباتی توسط موجوداتی به نام *Viroids* به وجود می‌آید. این‌ها از مالیکول‌های *Single Stranded RNA* ساخته شده و به شکل ساختمان‌های میله مانند به نظر می‌رسند. *Viroid* کسپید نداشته و وزن مالیکولی آن میان ۷۵۰۰۰ الی ۱۰۰۰۰۰ می‌باشد. معلوم نشده که آیا موجودات اخیرالذکر در داخل حجرات باعث تشکل پروتئین می‌گردد. تکثیر حجرات *VIROID* از طریق *RNA Polymerase* متعلق به DNA صورت گرفته و تأثیر آن بالای همین انزایم ممکن باعث پتوجنیسیته *Viroids* گردد.

RNA وایرویدها در نهایت خود دارای *Inverted Repeated Base Sequences* می‌باشد که یک مشخصه *Retrovirus* و *Transposable Elements* ها می‌باشد. بنأ ممکن وایرویدها از *Transposable Elements* با حذف *Sequence* های داخلی به میان آمده باشد.

Scrapie که یک بیماری استحالوی سیستم عصب مرکزی گوسفندان می‌باشد، توسط عاملی به میان می‌آید که کمتر از ۵۰nm جسامت دارد و در مقابل نوکلیرها و سایر مواد غیر فعال کننده نوکلئیک اسیدها مقاوم بوده؛ اما توسط پروتئین‌ها و سایر مواد تعامل کننده با پروتئین‌ها غیر فعال می‌گردد. عامل انتانی آن به نام *Prion* یاد شده و با یک پروتئین مشخصی به صورت مشترک خالص *Purify* می‌گردد؛ اما موجودیت نوکلئیک اسید در داخل این موجود رد نگردیده است. جین کود دهنده برای تشکل *Prion* ها با استفاده از تخنیک‌های *Recombinant DNA* از دماغ موش لابراتواری به دست آمده است. جین متذکره و *m RNA* مربوطه آن در هردو حجرات سالم و حجرات منتن به *Scrapie* دیده می‌شود. سه نظریه در این مورد موجود است:

الف: Scrapie یک وایرس معمولی بوده که نوکلئیک اسید آن بسیار کوچک بوده و بناً کشف نشده است.

ب: عامل مرضی RNA کوچک بوده که با تمایل زیاد با پروتئین Prion یکجا شده و شکل پروتئین اخیرالذکر را به شکل مرضی تبدیل می‌نماید.

ج: پروتئین Prion به صورت خودی مرضی بوده و باعث تولید انزایم‌های می‌گردد که سبب تغییرات Post Translational می‌گردد که منتج به تبدیل شدن پروتئین نورمال به شکل مرضی Prion می‌گردد این نظریات در مورد عامل سببی امراض Creutzfeld Jakob و Kuru که امراض مشابه را در انسان‌ها تولید می‌نماید نیز تطبیق گردیده می‌تواند.

پروکاریوت‌ها

عمده ترین معیار تشخیص پروکاریوت‌ها سایز کوچک آنها می‌باشد یعنی در حدود یک میکرومتر جسامت دارند. همچنان غشای هستوی دیده نمی‌شود. DNA تقریباً همه باکتری‌ها حلقوی و در حدود یک ملی متر می‌باشد، همین مالیکول حلقوی عبارت از کروموزوم باکتری بوده و باید بیشتر از ۱۰۰۰ مرتبه قات گردد تا در داخل حجره پروکاریوت جاگزين گردیده بتواند. شواهد حاکی است که پیچیده شدن آن به صورت منظم بوده و بخش‌های معینه DNA باهم نزدیک می‌گردند. حصه به خصوص حجره که حاوی DNA است به نام Nucleoid یاد گردیده و توسط الکترون میکروسکوپ قابل ملاحظه می‌باشند. بناً منطقی نخواهد بود تا حکم صورت گیرد که تعیین سرحدات داخل حجروی که در Eukaryotes ذریعه غشأها صورت می‌گیرد، در پروکاریوت‌ها موجود نمی‌باشد. اصلاً در بعضی پروکاریوت‌ها ساختمان‌های احاطه شده با غشأها موجود می‌باشد، مانند: Chromotaphor ها در باکتری فوتوسنتتیک. تفاوت میان چنین ساختمان‌های احاطه شده در غشأهای پروکاریوت‌ها با ساختمان‌های معادل در ایوکاریوت‌ها در این است که غشأهای احاطه کننده بخش‌های مشخص حجره پروکاریوت‌ها عبارت از تمادی غشای حجروی آن می‌باشد.

تنوع پروکاریوت‌ها

سایز کوچک کروموزوم پروکاریوت‌ها باعث محدود شدن اندازه معلومات جنتیک موجود در آن می‌شود. اندازه تخمینی جین‌های پروکاریوت‌ها ۳۰۰۰ بوده که اکثرأ فعالیت‌های اساسی را به پیش می‌برند. مانند، تولید انرژی، سنتیز مایکرومالیکول‌ها و تکثر حجروی. پروکاریوت‌ها جین‌های کمی را دارا می‌باشد که تطابق فزیولوژیک این اورگانیزم را با محیط آن ممکن می‌سازد. پهنای محیط زیست

پروکاریوت‌ها بسیار وسیع می‌باشد و بناً گروه پروکاریوت‌ها یک عده موجودات غیر متجانس از نظر محیط زیست اند که هر کدام با محیط زیست تخصصی خود عادت نموده و بناً محیط زیست انفرادی آن بسیار محدود است.

ازدیاد تعداد محیط‌های زیست پروکاریوت‌ها با در نظر داشت ستراتژی‌های تولید انرژی میتابولیک آنها توضیح گردیده می‌تواند. نور آفتاب منبع اساسی حیات می‌باشد. بعضی پروکاریوت‌ها مثل باکتری‌های Purple بنفش که بدون تولید آکسیجن انرژی آفتاب را به انرژی میتابولیک تبدیل می‌نماید. باکتری سبز آبی Cyanobacteria اکسیجن تولید می‌نماید که در عدم موجودیت نور باعث تولید انرژی می‌گردد. اورگانیزم‌های ایروبیک مجبور اند جهت تولید انرژی از عملیه تنفس با اکسیجن استفاده نمایند. عده از اورگانیزم‌های غیر ایروبیک Electron Acceptor های غیر از اکسیجن را در تنفس به کار می‌برند. عده ای دیگر غیر ایروبیک‌ها عملیه‌های تخمیری را اجرا می‌نمایند. (۱)

تفاوت میان حجرات پروکاریوت و ایوکاریوت

مشخصات	حجرات پروکاریوت	حجرات ایوکاریوت
I- هسته		دارد
غشای هستوی	ندارد	دارد
هسته چه	ندارد	دارد
کروموزوم	یک عدد	زیاد
تقسیم میتوتیک	ندارد	دارد
II- سایتوپلازم	ندارد	دارد
Pinocytosis	ندارد	دارد
مایتوکاندریا	ندارد	دارد
رایبوزوم	ندارد	دارد
اجسام گلجی	ندارد	دارد
اندوپلازمیک ریتیکولم	ندارد	دارد
III- ترکیب کیمیاوی	ندارد	دارد
Steriol	ندارد	دارد
Muramic Acid	دارد	ندارد

تصنیف پروکاریوت‌ها

آموزش هر گروه از اورگانیزم‌ها مستلزم تصنیف آن می‌باشد. تصنیف مناسب طوری می‌باشد تا اورگانیزم‌های جدید سریعاً و دقیقاً در کتگوری مربوط خود قرار گرفته بتوانند تعیین کتگوری اورگانیزم باعث کمک در پیشگویی مشخصات می‌گردد که اورگانیزم آنرا با سایر موجودات مشتمل در همان کتگوری تشریح می‌نماید. در شفاخانه‌ها تصنیف مؤفقاانه انتان ممکن بهترین شیوه امحا آن باشد. تصنیف همچنان باعث دانستن روابط خوب میان اورگانیزم‌های مختلف گردد. مثلاً امحای انتان برای مدت زیادتر دوام خواهد نمود مشروط بر اینکه محل زیست آن توسط شکل غیر انتانی همان اورگانیزم اشغال گردد.

مثلاً داشتن DNA در تصنیف پروکاریوت‌ها رول ندارد؛ زیرا همه آنها DNA را دارا می‌باشند و نیز موجودیت یک پلازمید یا محدوده وسیع از میزبان‌ها در تصنیف مهم نمی‌باشد؛ زیرا در اورگانیزم‌های زیاد دیده شده و نیز ممکن بعضاً هیچ موجود نباشد. معیارات مفید ممکن ساختمانی، فزیولوژیک، بیوشمیک و یا جنتیک باشند. سپورها (ساختمان‌های به خصوص که حیات را در شرایط مشکل ممکن می‌سازد) برای تصنیف مهم اند. عده از باکتری‌ها با در نظر داشت قابلیت تخمر قندی آنها تصنیف می‌گردد. تلونین گرام برای تصنیف باکتری‌ها به دو گروه عمده مهم می‌باشد. از معیارات جنتیک به شکل روز افزون در تصنیف استفاده می‌گردد. عده زیادی از آزمایشات جنتیک توسط تکنالوژی DNA Recombinant به میان آمده و امروز ممکن است تا پروب‌های DNA ساخته شده و اورگانیزم‌های مختلفه را کشف نمود. مقایسه DNA جین‌ها منتج به توضیح ارتباط Phylogenetic میان پروکاریوت‌ها گردیده که بدین وسیله می‌توان حجرات مادری اورگانیزم‌ها را پیدا نمود.

باکتری‌ها و آرکیوباکتری‌ها (اشکال عمده پروکاریوت‌ها)

پروکاریوت‌ها مشتمل بر دو گروه می‌باشند که توجه زیاد به آن معطوف گردیده است؛ زیرا که آرکیوباکتری‌ها در لابراتوار به مشکل مطالعه گردیده می‌تواند. مثلاً عده از آرکیوباکتری‌ها در صورت تماس با آکسیجن از بین رفته و عده دیگر در درجه حرارت معادل با غلیان آب زنده‌گی می‌نمایند. با استفاده از بیولوژی مالیکولی می‌توان آرکیوباکتری‌ها را تصنیف نمود، میتانوجن‌ها با اجرای تنفس غیر هوازی سبب تولید میتان می‌گردد. هلوفیل‌ها به غلظت‌های بلند نمک برای زیست خود محتاج اند، ترمواسید و فیل‌ها نیازمند درجه حرارت و یا اسیدیته زیاد اند. این موجودات زنده با همدیگر خود بعضی اوصاف مشترک داشته که آنها را از سایر موجودات زنده

متمایز می‌سازد. موضوع پیچیده عبارت از موجودیت Introns در جین‌های پروکاریوت‌ها به مانند Eukaryotes می‌باشد. تأثیر قسمت‌های اخیرالذکر در جینها معلوم نمی‌باشد.

پروتستها

ایوکاریوت‌های یا هسته داران واقعی: عبارت از موجوداتی اند که اورگانیل‌های غشا دار، مایکروتوبول‌ها و مایکروفیلامینت‌ها داشته و ساختمان داخل حجروی آن نظر به پروکاریوت‌ها مغلقتر است.

ایوکاریوت‌ها مایکروبی به نام پروتست‌ها یاد شده و دارای چهار گروپ اند: الجی‌ها، پروتوزوا، فنجی‌ها و Slime Molds.

الجی‌ها

موجوداتی اند که اکسیجن را در اثر فوتوسنتیز تولید می‌نمایند. یک گروپ عمده آنها که باکتری‌های سبز آبی (Cyanobacteria) بوده، متعلق به پروکاریوت‌ها گردیده و بیشتر از این مربوط به این کلاس نمی‌گردند. یعنی الجی‌ها صرف اورگانیزم‌های ایوکاریوتیک فوتوسنتیتیک را تشکیل می‌دهد. همه الجی‌ها در غشا فوتوسنتیتیک کلوروپلاست حجروی خود دارای کلوروفیل می‌باشند. اکثریت الجی‌ها مایکرواورگانیزم‌های وحیدالحجروی بوده؛ اما سایرین آن ساختمان‌های بزرگ چندین حجروی اند. کپ‌های ناشی از الجی‌های نصواری چندین متر طولی بوده می‌تواند.

پروتوزوا

عبارت از پروتست‌های وحیدالحجروی غیر فوتوسنتیتیک بوده و شکل ابتدیی آن فلاجیل دار بوده که در اکثریت وجوهات مشابه الجی‌ها می‌باشد. ممکن اجداد آن الجی‌ها بوده که بعداً به هیتروتروف تبدیل گردیده اند. نیازمندیهای میتابولیک از طریق مواد عضوی بر آورده شده چنانچه در چندین حالات دیده شده که در لابراتوار در اثر میوتیشن یا در اثر تطابق با تغییرات محیطی اشکال بدون رنگ الجی‌ها به‌میان آمده است.

اشکال دیگر آن عبارت از سیلیا داران و اشکال آمیبیایی بوده و بالاخره اشکال مغلق و غیر متحرک آن به نام سپورزون‌ها یاد می‌گردد که دارای مرحله استراحت بوده یا سپوردار می‌باشند.

فنگس‌ها

فنگس‌ها گروه پروتست‌های غیر فوتوسنتتیک بوده که به شکل فیلامنتهای تشعبی و شبکوی (هایفا) رشد می‌نمایند که به نام مایسیلیوم شناخته می‌شود. گرچه هایفا دارای جدار می‌باشند؛ اما جدارهای آنان متتعب بوده و حرکت آزادانه هسته‌ها و سایتوپلازم ممکن می‌باشد. کتله فنگسی به صورت مجموعی Coenocyte (کتله چندین حجروی و دارنده سایتوپلازم متمادی) بوده که توسط یک سلسله تیوب‌های منشعب احاطه گردیده است. این تیوب‌ها که از پولی سکراید (مانند شیتین) ساخته شده مترادف دیوار حجروی می‌باشد. اشکال مایسیل دار به نام Mold یاد شده و تعداد کمی سبب تولید مایسیل نشده و به نام Yeast یاد می‌شود؛ اما آنها را می‌توان فنگس نامید؛ زیرا به شکل زوجی تکثیر نموده و دارای اشکال انتقالی می‌باشد. فنگس‌ها با اکتینومایست‌ها (باکتری‌های مایسیلی که به صورت سطحی مشابه فنگس‌ها می‌باشند) هیچ ربطی ندارد. فنگس‌ها ذیلاً تصنیف می‌گردند:

Ascomycotina (Ascomycetes), Zygomycotina (Phycomycetes)

Deutromycotina (Imperfect Fungi), Basidiomycotina (Basidiomycetes)

Slime Molds

این اورگانیزم‌ها در یک مرحله از دوران حیات خویش با داشتن یک کتله چندین حجروی بزرگ که به نام پلازمودیم Plasmodium یاد می‌گردد، متصف می‌باشند. پلازمودیم این موجودات معادل مایسیلیوم فنگس واقعی می‌باشد. هر دو Coenocytes اند. با این تفاوت که در فنگس‌های واقعی جریان نمودن سایتوپلازم محدود به شبکه منشعب تیوب‌های شیتینی بوده؛ اما در اورگانیزم‌های فوق الذکر سایتوپلازم در همه جهات جریان نموده می‌تواند. این عمل باعث می‌گردد تا پلازمودیم در جهات مواد غذایی که معمولاً باکتری است، در حرکت شود.

اشکال اساسی مایکروب‌ها

مایکروب‌ها اورگانیزم‌های کوچک و حیدالحجروی اند که اکثراً فاقد کلوروفیل می‌باشند و نظر به خواص بیولوژیک و تولید مثل توسط انقسام دوگانه این‌ها به حجرات Prokaryotic ارتباط می‌گیرند. جسامت مایکروب‌ها توسط مایکرومتر اندازه می‌گردد.

$$1 \text{ Micron } (\mu) = 10^{-3} \text{ mm} = 10^{-4} \text{ cm} = 10^{-6} \text{ m}$$

$$1 \text{ Milli Micron (m}\mu) \text{ Or Nanometer (nm)} = 10^{-6} \text{ mm} = 10^{-7} \text{ cm} = 10^{-9} \text{ m}$$

$$1 \text{ Angstrom units (1 A}^\circ) = 10^{-7} \text{ mm} = 10^{-8} \text{ cm} = 10^{-10} \text{ m}$$

این جسامت در مایکروبها متفاوت می باشد مثلاً کوکسایها یک مایکرون قطر دارند و Bacill ها از ۱۰ - ۲ مایکرون طول و از ۰.۵ - ۰.۲ مایکرون عرض دارند.

باید متذکر شد که شکل و جسامت باکتریها به صورت مطلق ثابت نبوده و اختلاف شکل در بسیاری انواع مایکروبها در اثر عوامل مختلف محیطی مانند اوساط ذریعه، مواد ضد مایکروب، مواد مرضی، پیر و جوان بودن مایکروبها به وجود می آید لکن خواص خصوصی خود را که ارثی می باشد در جریان عملیه تکامل محافظه می کند. (۱)

از نظر مورفولوژی باکتریها به اشکال ذیل دیده می شود:

I- باکتریهای دارای شکل مدور یا Spherie مانند Cocci.

Cocci از Kakkos که معنی مدور را می دهد گرفته شده است و به اساس موقعیت، پلان انقسام حجروی و اوصاف بیولوژیک به ۶ گروه ذیل تقسیم می شوند:

۱- Micrococcus: این کوکسها به صورت منفرد یا غیر منظم قرار می گیرند اینها

Saprophyte بوده در آب و هوا زنده گی می کنند مانند: Micro Coccus Agilis

۲- Diplo Coccus: این کوکسها به صورت حجره ای به تماس هم قرار گرفته و انقسام

شان به یک پلان صورت می گیرد مانند Meningo Cocci, Gonococci و

Pneumococci.

۳- هرگاه انقسام Coccusها به یک پلان صورت گیرد و Cocci شکل دانه تسبیح و یا

زنجیر را به طولهای مختلف اختیار کند به نام Streptococcus یاد می گردد.

۴- اگر Cocci به دو پلان افقی و عمودی انقسام نماید و گروه های چهارگانه را بسازد به

نام Tetracoccus یاد می گردد که این Cocci برای انسانها کمتر Pathogen اند.

۵- اگر Coccusها به چندین پلان (غیر منظم) انقسام نمایند شکل خوشه انگور را به خود

گرفته به نام Staphylococcus یاد می گردد.

۶- هرگاه انقسام Coccusها به سه پلان صورت گیرد و شکل پاکت های ۱۶-۸ حجره ای

و یا بیشتر را به خود بگیرد به نام Sarcina یاد می شود که یک Coccus غیر مرضی

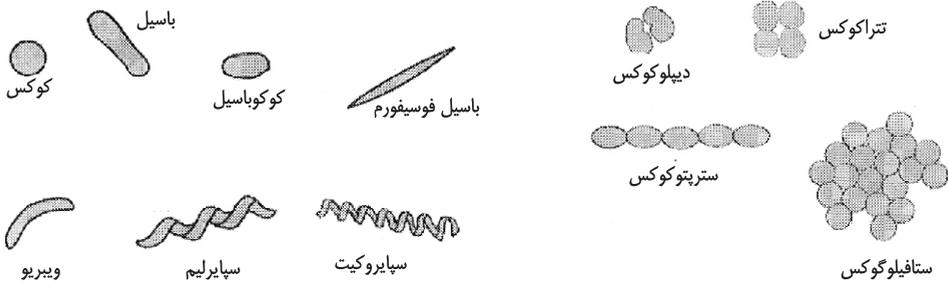
بوده و در ادرار موجود می‌باشد.

II- باکتری‌های شکل چوبک (Rodshape) که شامل Bacill ها و Clostridia می‌باشد. باکتری‌های چوبک مانند دارای اشکال مختلف اند بعضی از آنها دارای شکل کوتاه بوده مانند Francisella Tularencis در حالیکه انواع دیگر آن شکل طولانی دارد مانند Bacillus Anthracis و بعضی از انواع دیگر آنها دارای نهایت باریک می‌باشد مانند Fusobacter بعضی Bacill ها به شک جوره ای قرار می‌گیرد که آنرا به نام Diplobacill یاد می‌کنند مانند Bacteria Of Pneumonia.

بعضی از Bacteria ها شکل زنجیر مانند را می‌گیرد که به نام Strepto-bacill و یا Streptobacteria یاد می‌شود مانند Bacillus Anthracis بعضی از باکتری‌ها در یک نهایت خود تبارز می‌دشته باشند مانند Corynebacterium Diphtheriae و بعضی دیگر دارای شاخه های جانبی می‌باشد مانند Mycobacterium Tuberculosis و غیره.

III- شکل فنر مانند باکتری‌ها (Spiral Shape): اشکال فنر مانند به دو گروه Vibrio و Spirillum تقسیم می‌شوند.

۱- Vibrio ها، Bacteria های اند که تنها یک حلقه فنر مانند داشته و به شکل کامه و یا ویرگول به مشاهده می‌رسد مانند Vibrio Cholera. ۲- Spirillum ها باکتری‌های اند که دارای تعداد زیاد حلقه ها می‌باشند مانند Borella. Liptospira و Treporema



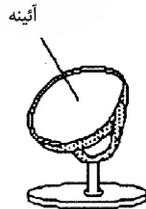
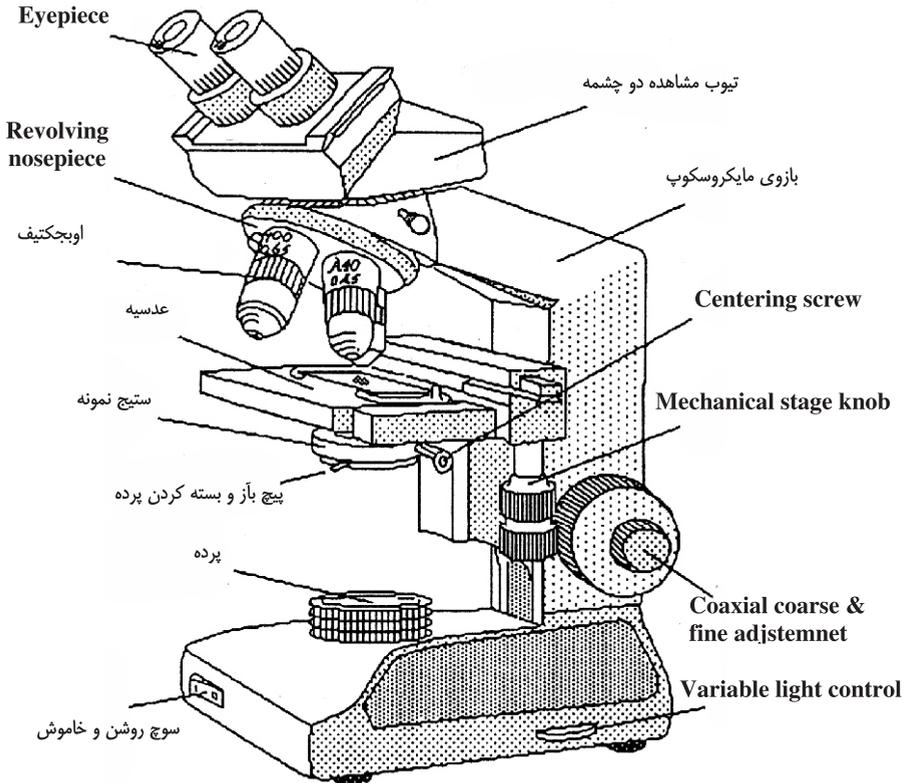
اشکال مختلف مایکروب‌ها

شکل ۱-۱

ساختمان حجروی

میتوذهای بصری

مایکروسکوپ نوری (لایت مایکروسکوپ): قدرت تشخیصیه مایکروسکوپ نوری تحت شرایط (مطلوب) تقریباً نصف طول موج نور مورد استفاده می‌باشد.



آئینه



عدسیه فاز کانترست

مایکروسکوپ دو چشمه (Rλ)

شکل ۱-۲

(قدرت تشخیصیه عبارت از فاصله ایست که در آن دو منبع نوری نقطوی که باید به شکل دو تصویر جداگانه مشاهده گردند از هم مجزا دیده شوند.) بناً در صورت استفاده از نور زرد که دارای طول موج ۰,۴ مایکرومتر باشد، کوچکترین قطر شی قابل تفکیک ۰,۲ مایکرومتر خواهد بود. بزرگنمایی مطلوب یک مایکروسکوپ عبارت از آن بزرگنمایی است که کوچکترین اجزای قابل تشخیص را مورد رویت قرار دهد. مایکروسکوپ هایی که در باکتریولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرند عموماً دارای عدسیه‌های اوبجکتیف به توان ۹۰ و عدسیه‌های عینی به توان ۱۰ می‌باشند، بناً نمونه مورد مطالعه را ۹۰۰ برابر بزرگتر نشان می‌دهد. به این ترتیب ذراتی که دارای قطر ۰,۲ مایکرومتر باشند به اندازه ۰,۲ ملی متر بزرگتر معلوم گردیده واضحاً قابل دید می‌گردند. بزرگنمایی بیشتر از آن قدرت تشخیصیه بهتر را در قسمت رویت جزئیات به میان نیاورده و حتی ساحه دید را کاهش می‌دهد.

تزئید بیشتر قدرت تشخیصیه فقط با استفاده از نور دارای طول موج کمتر از ۰,۲ مایکرومتر ممکن گردیده می‌تواند و در نتیجه اجزای که دارای قطر ۰,۱ مایکرومتر باشند قابل رویت می‌گردند. قیمت چنین مایکروسکوپ‌ها به نسبت استفاده از عدسیه‌های کوارتز و سیستم‌های فوتوگرافیک، فوق‌العاده بلند بوده و برای استفاده عمومی دارای مشکلات می‌باشد.

الکترون مایکروسکوپ

الکترون مایکروسکوپ با داشتن قدرت تشخیصیه عالی دانشمندان را قادر نموده تا ساختمان‌های حجرات Prokaryotic و Eukaryotic را با تفصیلات بیشتر مطالعه نمایند. این قدرت تشخیصیه عالی الکترون مایکروسکوپ در نتیجه این امر است که الکترون‌ها دارای طول موج کوتاه تر نظر به فوتون‌های نور سفید می‌باشند.

عموماً دو شکل الکترون مایکروسکوپ بیشتر معمول می‌باشند: Transmission Electron Microscope یا (TEM) که شباهت‌های زیادی با مایکروسکوپ نوری دارد و Scanning Electron Microscope یا (SEM).

TEM اولین نوع الکترون مایکروسکوپ بود و در آن از یک اشعه الکترونی استفاده به عمل می‌آید که از پستول (منبع) الکترون خارج گردیده و بعد از تعیین جهت آن توسط عدسیه‌های الکترومقناطیسی تراکم دهنده بالای یک مقطع نازک نمونه مورد نظر، فوکس می‌گردد. الکترون‌ها پس از الکترون مقناطیسی تراکم دهنده بالای یک مقطع نازک نمونه مورد نظر، فوکس می‌گردد. الکترون‌ها پس از

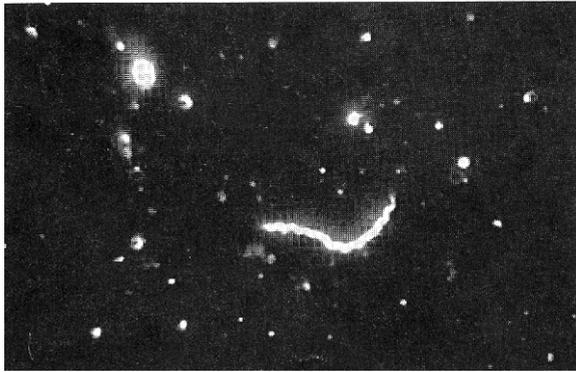
برخورد بالایی نمونه مورد آزمایش نظر به تعداد و کتله اتم‌ها به صورت نامساوی پراکنده می‌گردند. تعدادی از الکترون‌ها از نمونه عبور نموده و توسط عدسیه‌های اوبجکتیف الکترومقناطیسی یکجا و متمرکز می‌گردند و تصویر نمونه مورد معاینه به سیستم عدسیه‌های پروجکتور که باعث بزرگنمایی بیشتر می‌گردد ارائه می‌گردد. تصویر حاصله بالایی یک صفحه‌یی که در اثر اصابت الکترون‌ها روشن می‌شود، دیده می‌شود. این تصویر توسط فلم‌های فوتوگرافیک نیز ثبت گردیده می‌تواند. TEM اجزای را که از هم به اندازه ۰,۰۰۱ مایکرومتر جدا باشند تشخیص نموده می‌تواند. وایرس‌ها با داشتن قطر (۰,۰۰۱) الی (۰,۲) مایکرومتر به ساده‌گی تشخیص گردیده می‌توانند.

SEM نظر به TEM قدرت تشخیصی کمتر داشته؛ با آنهم بالخصوص برای دریافت تصویرهای سه بُعدی از موجودات مایکروسکوپیکی می‌باشد. الکترون‌ها توسط عدسیه‌ها بالایی یک نقطه کوچک متمرکز می‌گردند. در نتیجه عمل متقابل میان الکترون‌ها و نمونه مورد معاینه اشکال مختلفه تشعشعات از سطح نمونه آزاد می‌گردند (طور مثال الکترون‌های ثانوی). تشعشعات متذکره ذریعه آلات کشف کننده اختصاصی آن دریافت گردیده و پس از تقویه در بالایی صفحه تلویزیونی قابل رویت می‌باشد. یک تخنیک عمده در معاینه الکترون مایکروسکوپ استفاده از "سایه افگنی" می‌باشد. در اینصورت یک صفحه نازک فلزات ثقیله (مانند پلاتین) بالایی نمونه مورد معاینه گذاشته شده طوری که نمونه در مسیر اشعه آیون‌های فلزی در خلاء، قرار گیرد. اشعه به یک زاویه کوچک بالایی نمونه هدایت داده شده بناً یک "سایه" ساحه غیر پوشیده بالایی طرف مقابل به‌میان می‌آید. هر زمانی که یک اشعه الکترونی از ساحه عبور نماید، تصویر فلم به دست می‌آید و در نتیجه یک تصویر سه بُعدی حاصل می‌گردد.

تخنیک‌های عمده دیگری که در معاینات الکترون مایکروسکوپ استفاده می‌گردند عبارت از به کار برد مقطع‌های نهایت نازک مواد مغطوس شده، میتود منجمد نمودن نمونه‌ها که به کمک آن از انحراف نتایج که در استفاده از سایر طرزالعمل‌های خشک نمودن به‌میان می‌آید جلوگیری صورت گرفته می‌تواند و استفاده از تلوین منفی با استفاده از مواد متکاثف الکترونی از قبیل Phosphotungstic Acid و نمک‌های Uranyl می‌باشد. در صورت عدم استفاده از این نمک‌های فلزات، تباین لازم برای مطالعه جزئیات نمونه مورد معاینه به دست نخواهد آمد.

مایکروسکوپ ساحه‌تاریک

در مایکروسکوپی ساحه تاریک غالباً از عین مایکروسکوپ ساحه روشن استفاه صورت می‌گیرد. روشنایی مایکروسکوپ ساحه تاریک با به کاربرد کاندنسرهای خاصی به‌دست



شکل ۱-۳ معاینه ساحه تاریک (RV)

می‌آید که شعاع نور مستقیم را مانع گردیده و هم اشعه آئینه کنار خازن را به زاویه مایل منحرف می‌سازد. در نتیجه یک ساحه تاریک ایجاد گردیده که در آن کنارهای روشن نمونه مورد معاینه قابل ویت گردیده و زمانی به دست می‌آید که اشعه مایل از کنار نمونه به طرف اوبجکتیف های میکروسکوپ

منعکس می‌گردند. این تخنیک بالاخص برای مطالعه اورگانیزم‌های از قبیل *Treponema Pallidum* نهایت مؤثر می‌باشد این اورگانیزم یک *Spirochete* بوده و دارای قطر کمتر از ۰,۲ میکرومتر می‌باشد، بنابراین توسط نور مستقیم قابل رویت نمی‌باشد.

مایکروسکوپ فازی (Phase Microscope)

فاز مایکروسکوپ با استفاده از این حقیقت به‌میان آمده است که امواج نوری عبور کننده از اشیای شفاف مانند حجرات، نور به مشخصات موادی که از آن عبور می‌نمایند به فازهای متفاوت خارج می‌گردند. یک سیستم خاص بصری تفاوت های فاز را به تفاوت در کثافت تبدیل می‌نماید. در نتیجه بعضی ساختمان ها نظر به سایر ساختمان ها تاریک تر به نظر می‌رسند. خصوصیت عمده دیگر اینست که ساختمان‌های داخلی را در حجرات زنده قابل تشخیص می‌سازد. درحالیکه در میکروسکوپ های عادی مستحضرات باید به شکل کشته شده و یا تلوین شده مورد استفاده قرار گیرند.

اوتورادیوگرافی (Autoradiography)

اگر حجرات که در آنها اتوم های رادیو اکتیف به کار رفته باشند بالای یک سلاید تثبیت گردیده، با محلول فوتوگرافیک پوشانیده شده و در تاریکی برای مدت زمان مناسب نگهداری شوند، تشعشع که از محلات تجزیه رادیو اکتیف منتشر می‌گردند در بالای فلم ظهور شده، ظاهر می‌گردند. در صورتی که حجرات با تشعشع کننده ضعیف مانند Tritium نشانی گردند، تشعشع

قبل الذکر به اندازه کافی کوتاه گردیده و موقعیت مواد رادیو اکتیف را در حجره آشکار می‌سازد. پروسجیج Autoradiography بالخصوص برای تعقیب تضاعف DNA، با استفاده از Tritium-Labeled Thymidine مؤثر می‌باشد. یکی از اشکال دیگر این میتود که در آن از Probe های نشانی شده با Nucleic Acid استفاده می‌گردد به نام In Situ Hybridization یاد می‌گردد که برای دریافت نوکلیک اسیدهای وایرسی، باکتریایی و فنگسی در حجرات و انساج مستعمل می‌باشد.

ساختمان حجرات ایوکاریوتیک Eukaryotic

هسته (Nucleus)

هسته توسط یک غشایی محدود گردیده که با Endoplasmic Reticulum تمدادی دارد. غشای هستوی دارای قابلیت نفوذیه انتخابی می‌باشد و این قابلیت نفوذیه انتخابی به نسبت موجودیت منافذاتی است که تبادل مالیکول‌ها را میان هسته و سیتوپلازم اجازه می‌دهند. کروموزوم های حجرات Eukaryotic مشتمل بر Macromolecule های طویل DNA به شکل Helix مضاعف می‌باشند و توسط مایکروسکوپ نوری فقط زمانی قابل مشاهده می‌باشند که حجره در حالت تقسیم حجروی بوده و DNA به حد اعظم متراکم باشد، در سایر حالات کروموزوم‌ها متراکم نبوده و طوری مشاهده می‌گردند.

Macromolecule های DNA در حجرات Eukaryotic یا Eukaryotic DNA (Eukaryotic Macromolecule حاوی پروتین اساسی به نام Histone بوده که توسط رابطه های آیونیک با DNA وصل می‌گردند.

ساختمان های سیتوپلازمیک

سیتوپلازم حجرات Eukaryotic متصف به موجودیت Endoplasmic Reticulum، واکپوله‌ها (Vacuoles)، Plastid های دارنده قابلیت تکثیر خودی و Elaborate Cytoskeleton می‌باشند که اخیرالذکر مرکب از Microtubule ها، Microfilament ها و Intermediate Filament ها می‌باشند.

Endoplasmic Reticulum عبارت از یک شبکه Membrano-Bound Channels می‌باشد. در بعضی قسمت های اندوپلازمیک ریتیکولوم این غشاها توسط رایبوزوم‌ها پوش می‌گردند، پروتین‌هایی که در این رایبوزوم‌ها سنتیز می‌گردند از طریق این غشاً داخل کانال های اندوپلازمیک ریتیکولوم شده

و از طریق آن به دیگر قسمت های حجره منتقل می گردند. یک ساختمان مربوطه دیگر به نام جهاز گلجی یا Golgi Apparatus ویزیکول هایی را آزاد می کند که به غشای حجروی وصل گردیده و پروتئین های داخل کیسه را به محیط اطراف رها می سازد.

پلاستیدها مشتمل بر مایتوکاندریا ها که دارای سیستم تنفسی ترانسپورت الکترون (Respiratory Electron Transport System) می باشد و نیز Chloroplast (در اورگانیزم های فوتوسنتتیک) می باشد. پلاستیدها حاوی DNA مربوط خود می باشند که بعضی پروتئین های متشکله آنها (نه تمام پروتئین های مشتمل در آنها) را کود نموده و همچنان دارای T-RNA می باشد.

Cytoskeleton مشتمل بر رشته های Microtubule ها بوده که در وظایف غشای سائوپلازمیک و شکل حجره به همین گونه در Mitotic Spindle های و اجزای فلاجیل نقش دارند، همچنان دارای رشته های اکتین و میوزین حاوی Microfilament ها می باشند و میکانیزم حرکات امیوئید را فراهم می نمایند و بالاخره دارای Intermediate Filament ها می باشند که وظایف آن تا کنون دانسته نشده است.

طبقات سطحی (Surface Layers)

سائوپلازم توسط Plasma Membrane احاطه گردیده که مرکب از پروتئین و فسفولیپید می باشد و شباهت با غشای حجروی پروکاریوتیک دارد. بسیاری حشرات حیوانی طبقه سطحی دیگری ندارند؛ ولی حشرات نباتی دارای یک دیوار خارجی حجروی می باشند که مرکب از سلولوز می باشد. بسیاری مایکرواورگانیزم های Eukaryotic نیز دارای دیوار خارج حجروی می باشند که امکان دارد مرکب از پولی سکراید باشد مانند سلولوز و یا Chitin و یا ممکن مواد غیر عضوی باشد مانند سیلیکا در دیاتومها.

اورگانیل های حرکی (Motility Organelles)

بسیاری مایکرواورگانیزم های Eukaryotic دارای اورگانیل هایی می باشند که به نام فلاجیل (Flagella) و یا سیلیا (Cilia) یاد می گردند به وسیله حرکات موج مانند این اورگانیل ها حجره را قادر به حرکت در آب می سازد.

فلاجیل های Eukaryotic از ناحیه قطبی حجره منشه گرفته حالانکه سیلیا که نظر به فاجیل کوتاه تر می باشند دوردور حجره را احاطه می نمایند. فلاجیل و سیلیا هردو عین ساختمان اساسی و ترکیب کیمیایی را در حشرات Eukaryotic دارا می باشند. هردو متشکل از مایکروتوبول ها (Microtubules) می باشند که عبارت از استوانه های میان خالی پروتئینی بوده که از پروتئین به نام

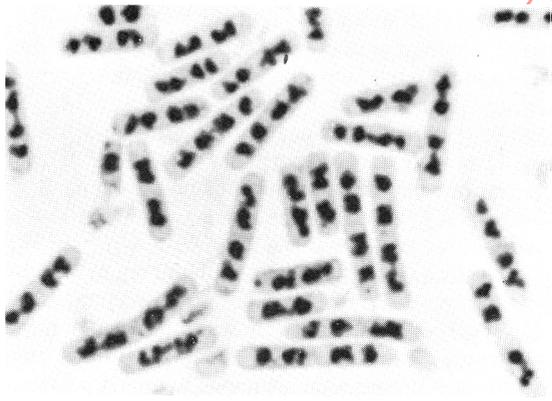
Tubulin تشکیل می‌گردند این مایکروتوبول‌ها توسط یک غشای احاطه می‌گردند. مایکروتوبول‌ها طوری ترتیب می‌گردند که به نام سیستم (۹ + ۲) یخاد می‌گردد، یعنی طوری ترتیب می‌یابند که ۹ جوهره مایکروتوبول محیطی توسط دو مایکروتوبول مرکزی احاطه می‌گردند.

ساختمان حجرات پروکاریوتیک (Prokaryotic)

حجره پروکاریوتیک از هر لحاظ نظر به حجره ایوکاریوتیک ساده تر می‌باشد یگانه استثنائاً این می‌باشد که لفاف حجروی آن نظر به حجره ایوکاریوتیک مغلق تر می‌باشد.

نوکلئوئید (Nucleoid)

نوکلئوئید (ساختمان مشابه هسته) در حجرات پروکاریوتیک معادل هسته حجرات ایوکاریوتیک بوده و توسط مایکروسکوپ نوری در مواد ملونه قابل رویت می‌باشد. این ساختمان Feulgen-Positive بوده و نشاندهنده موجودیت DNA در آن می‌باشد. DNA که چارچ



شکل ۱-۴ هسته‌های باسیل سیریس (R1)

منفی دارد، حد اقل طور قسمی توسط Polyamine های کوچک و ایون های مگنیزیم خنثی گردیده؛ ولی پروتین‌های هستون در باکتری‌ها موجود اند و احتمالاً نقش مشابه به هستون موجود در کروماتین های حجرات ایوکاریوتیک را بازی می‌نمایند.

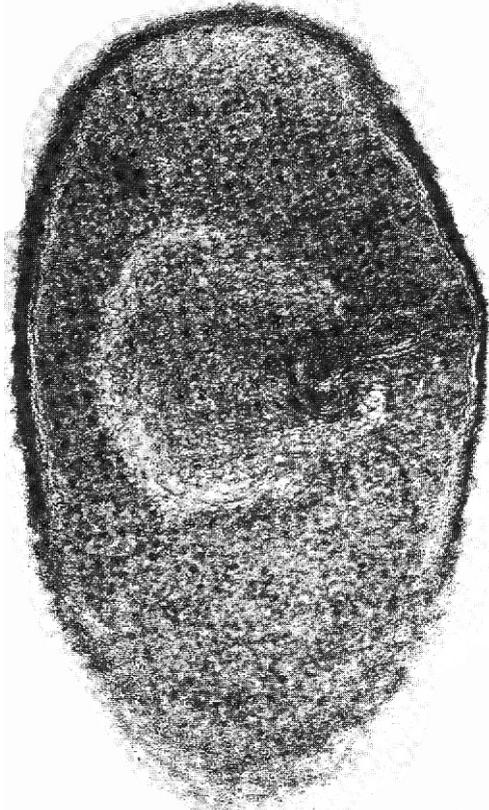
تصاویری که از الکترون

مایکروسکوپ به دست آمده اند (شکل ۱-۴) عدم موجودیت غشای هستوی و یک سیستم مایتوتیک را نشان می‌دهد. نواحی هستوی مملو از فیبریل های DNA می‌باشند.

از مدت طولانی بدینسو چنین دانسته شده که نوکلئوئید حجرات باکتریایی متشکل از یک مالیکول واحد طویل مدور با وزن مالیکولی تقریباً (3×10^9) می‌باشد و بنابر این چنین پنداشته شده می‌تواند که یک کروموزوم واحد Haploid به شکل باز و دارای طول تقریباً ۱mm باشد. تعداد کاپی‌های کروموزوم

در حجره نظر به اینکه حجره در کدام مرحله سیکل حجروی قرار دارد متفاوت می‌باشد با آنهم در صورت موجودیت چندین کاپی تمام آنان دارای عین شکل می‌باشند. اخیراً با استفاده از مطالعات جدید و با استفاده از میتود (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) که برای جدا کردن

مالیکول‌های بزرگ DNA و تشخیص انواع مدور و طویل مورد استفاده قرار می‌گیرد، اصطلاحاتی در این منظره کلاسیک کروموزوم حجروی به میان آمده‌اند. نتایج این مطالعات آشکار ساخت که بعضی پروکاریوت‌ها (مانند *Borrelia burgdorferi* عامل مرض Lyme) دارای کروموزوم خطی می‌باشند. کروموزوم‌های linear یا خطی همچنان در انواع مختلفه *streptomyces* نیز دریافت گردیده است.



الکترون مایکروگراف مقطع نازک *B. subtilis* که نشان دهنده تماس DNA با میوزوم می‌باشد. (R1)

شکل ۱-۵

نوکلئید بسیاری از حجرات باکتریایی در نتیجه لیز آهسته (gentle lyses) بعد از centrifugation جدا گردیده می‌تواند. ساختمان‌های جدا شده مشتمل بر DNA همراه با مقادیر کوچکت *RNA Polymerase* و ممکن بعضی پروتین‌های دیگر باشد. DNA باکتریایی که مستقیماً به کمک فلم حفاظتی الکترون مایکروسکوپ توسط لیز حجره در محلول نمکی

فزیولوژیک تجرید گردیده‌اند، به شکل ساختمان تسبیح مانند شبیه کروماتین حجرات ایوکاریوتیک مشاهده می‌گردند.

معاینه یک سلسله مقطع‌های باریک در حجرات باکتریایی توسط الکترون مایکروسکوپ نشان

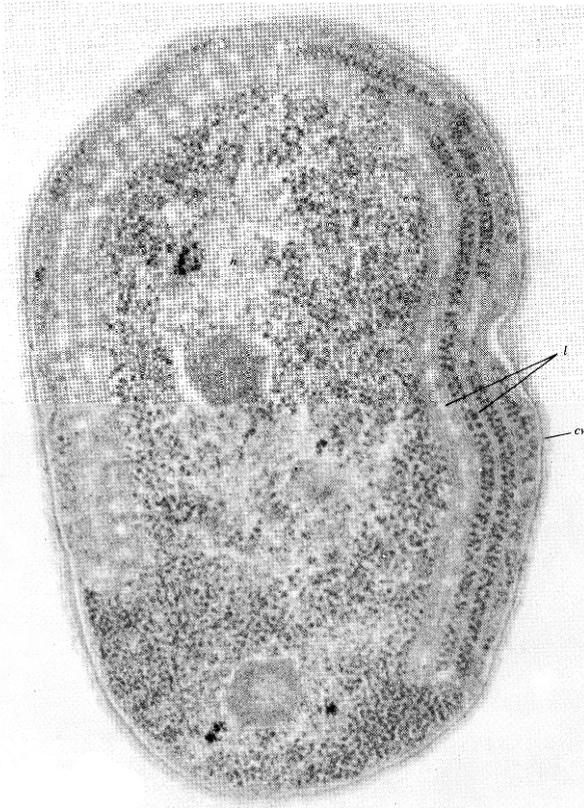
می‌دهد که DNA در یک نقطه با تغلف *invagination* غشای سائتوپلازمیک که به نام *mesosome* یاد می‌شود وصل می‌گردد (شکل 1-5) گمان می‌رود که این اتصال در جدا شدن دو کروموزوم خواهری که متعاقب تضاعف کروموزومی به‌میان می‌آید، نقش دارد.

ساختمان‌های سائتوپلازمیک

حجرات پروکاریوتیک فاقد پلاستیدهای مستقل از قبیل میتوکاندریا و کلوروپلاست می‌باشند و انزیم‌هایی *electron transport* در غشای سائتوپلازمیک قرار گرفته‌اند که به‌شکل ویزیکول‌های کروی و یا طبقات هموار صفحه‌مانند در تحت غشای حجروی مشاهده گردیده می‌توانند. در بعضی *cyanobacteria* ها (در سابق به نام الجی‌های سبز، آبی یاد می‌شدند) غشاهای فوتوسنتتیک اکثراً ساختمان‌های چند طبقوی را می‌سازند که به نام *thylakoid* ها یاد می‌گردد.

باکتری‌ها اکثراً مواد ذخیری را به‌شکل گرانول‌های غیر منحل نگهداری می‌نمایند که به‌شکل پولیمیرهای خنثی و از نظر اوسموتیک غیر فعال می‌باشند. زمانی که منبع نایتروجن، سلفر و یا فاسفورس محدود گردند و یا زمانی که PH پائین باشد، کاربن اضافی موجود در وسط توسط بعضی باکتری‌ها به پولیمیر *Poly-B. hydroxybutyric acid* و توسط باکتری‌های دیگر به پولیمیرهای مختلفه گلوکوز مانند نشایسته و گلیکوجن تبدیل می‌گردند. گرانول‌های فوق به‌هیچ‌منابع کاربن برای سنتیز پروتین و نوکلئیک اسید به کار می‌روند. به همین ترتیب، تعدادی از باکتری‌های فوتوسنتتیک *sulfide* را از H_2S اوکسیدایز نموده و در نتیجه گرانول‌های داخل حجروی دارنده عنصر سلفر را تولید می‌نمایند و بالاخره بسیاری باکتری‌ها گرانول‌های *polyphosphate* را در خود جمع نموده و ذخایر فاسفیت‌های غیر عضوی را می‌سازند که اخیرالذکر در سنتیز ATP مورد استفاده قرار گرفته می‌تواند. گرانول‌های فوق بعضاً به نام گرانول‌های *volutin* و یا گرانول‌های *metachromatic* یاد می‌گردند؛ زیرا با مواد ملونه آبی، به رنگ سرخ تلوین می‌گردند. این وصف، مشخصه عمده برای *corynebacteria* ها می‌باشد.

مایکروتوبول ها که مشخصه حجرات ایوکاریوتیک می باشد، بالعموم در حجرات پروکاریوتیک موجود نمی باشند با وجود آن در بعضی موارد توسط الکترون مایکروسکوپ ساختارهای در باکتری ها مشاهده می گردند که شباهت با مایکروتوبول ها دارد.



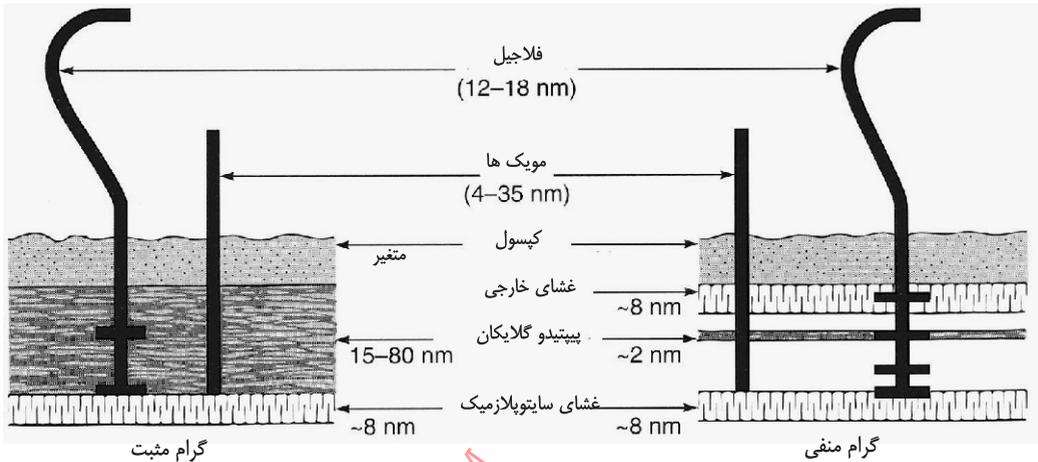
شکل ۱-۶ دیوار حجروی و ساحه هسته (R1)

گروپ های خاص و معین از باکتری ها دارای ویژگیول های احاطه شده توسط پروتین در protein-bound سایتوپلازم خود می باشند. که مشتمل اند بر واکيول های گازی که در باکتری های آبزی، شناوری آنها را کنترل می نمایند، carboxysome ها (دارای آنزیم ribulosebiphosphat e carboxylase بوده

که آنزیم عمده برای تثبیت CO_2 می باشد.) در بعضی باکتری های اوتوتروفیک و magnetosome ها (گرانول های membrane-bound iron) اند که باکتری را قادر به magnetotaxis می سازد (به معنی مهاجرت و یا تمایل حجره در رابطه با ساحه مقناطیسی زمین می باشد.)

لغاف حجروی (Cell Envelope)

طبقاتی که حجره پروکاریوتیک را احاطه می‌نمایند، مجموعاً به نام لغاف حجروی یاد می‌گردد. ساختمان و تشکیل لغاف حجروی در باکتری‌های گرام مثبت و گرام منفی متفاوت می‌باشد، در حقیقت همین تفاوت است که این دو اجتماع بزرگ باکتری‌ها را توصیف می‌نماید. دیاگرام‌های ساده شده دو نوع لغاف حجروی در (شکل ۱ - ۷) نشان داده شده است.



شکل ۱-۷ ترکیب لغاف حجروی مایکروب‌های گرام مثبت و گرام منفی (R1)

بسیاری باکتری‌ها در هر دو گروپ گرام مثبت و گرام منفی Eubacteria و Archeobacteria دارای شبکه پروتینی و یا گلابیکوپروتین Paracrystalline دو بُعدی (S-layer) را به حیث خارجی ترین بخش لغاف حجروی دارا می‌باشند. طبقات S-layer عمدتاً مرکب از یک نوع واحد مالیکولر می‌باشند. وظیفه این طبقات طور یقینی معلوم نیست، با آنهم در بعضی موارد چنین معلوم می‌گردد که حجره را از انزایم‌های تخریب کننده جدار حجروی، مهاجم Bdellovibrio bacteriophage (یک باکتری مهاجم) و از bacteriophage ها محافظه می‌نمایند. همچنان در بعضی انواع Archeobacteria ها شکل حجره را محافظه می‌نماید و نیز در التصاق حجره به طبقه اپیدرم میزبان رول دارد.

الف: The Gram-Positive Cell Envelope لغاف حجروی گرام مثبت: لغاف حجروی

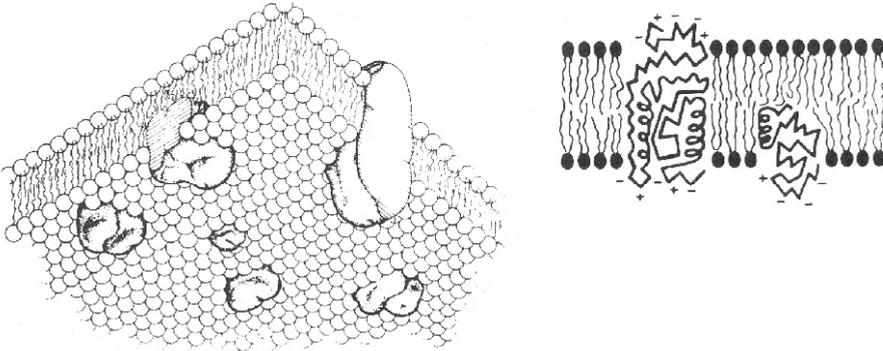
در حجرات گرام مثبت نسبتاً ساده تر بوده و متشکل از دو یا سه طبقه می‌باشد که عبارت از: غشای سایتوپلازمیک، طبقه ضخیم peptidoglycan و در بعضی باکتری‌ها یک طبقه خارجی که به نام capsule می‌باشد. ساختمان و وظیفه این طبقات ذیلاً تشریح می‌گردند.

ب: The Gram-Negative Cell Envelope لاف حجروی گرام منفی: دارای چندین طبقه و ساختمان نهایت مغلق می‌باشد. غشای سایتوپلازمیک که (در باکتری‌های گرام منفی به نام غشای داخلی یاد می‌گردد) توسط یک ورقه نازک peptidoglycan احاطه گردیده که اخیرالذکر توسط یک طبقه مغلق که به نام outer membrane یا غشای خارجی یاد می‌گردد تقویه می‌گردد. ممکن در خارجی ترین طبقه کپسول موجود باشد. فضای میان غشای داخلی و خارجی به نام periplasmic space یاد می‌گردد.

غشای سایتوپلازمیک (The Cytoplasmic Membrane)

الف: ساختمان: غشای سایتوپلازمیک در باکتری‌ها به نام غشای حجروی نیز یاد گردیده و توسط مایکروسکوپ الکترونیک در مقطع‌های نازک قابل رویت بوده این غشای عبارت از غشای واحد مرکب از فسفولیپیدها و پروتئین‌ها می‌باشد. شکل (۱-۸) نمونه تشکل غشای را تشریح می‌نماید. غشای حجرات پروکاریوتیک از حجرات ایوکاریوتیک بنابر عدم موجودیت sterol ها تفریق می‌گردد.

تغلفات پیچیده convoluted invaginations در غشای سایتوپلازمیک ساختمان‌های خاصی را به میان می‌آورد که به نام میوزوم‌ها یاد می‌شوند. میوزوم‌ها به دو نوع می‌باشند: میوزوم‌های جداری، که در تشکل دیوارهای حجروی در اثنای تقسیمات حجروی وظیفه دارد و نوع دیگر آن میوزوم‌های جانبی می‌باشد. کروموزوم‌های باکتری‌ها (DNA) به میوزوم‌های جداری وصل می‌باشند. تغلفات بیشتر غشای سایتوپلازمیک به طرف سایتوپلازم در باکتری‌هایی یافت می‌گردد که دارای سیستم‌های نهایت فعال ترانسپورت الکترونی باشند (طور مثال باکتری‌های فوتوسنتتیک و باکتری‌های تثبیت کننده نایتروجن)



شکل ۱-۸ مدل ساختمانی غشای حجروی (R1)

ب: وظیفه: وظایف عمده غشای سائتوپلازمیک عبارتند از:

- ۱- قابلیت نفوذ انتخابی و ترانسپورت مواد منحل.
- ۲- ترانسپورت الکترونی و oxidative phosphorylation در ایروبها.
- ۳- افراغ انزیمهای هایدرولازیک.
- ۴- در بر داشتن انزیمها و مالیکولهای ناقل (Carrier) که در بیوسنتز DNA، پولیمیرهای دیوار حجروی و لیپیدهای غشایی وظیفه دارد.
- ۵- در برداشتن رسپتورها و سایر پروتینهای chemotactic و سایر انواع سیستمهای transduction.

حد اقل 50 فیصد غشای سائتوپلازمیک باید به منظور نشونمای حجره به حالت نیمه مایع باشد. این هدف در حالات پائین بودن درجه حرارت پائین، با سنتیز و ترکیب اسیدهای شحمی غیر مشبوع به دست می آید.

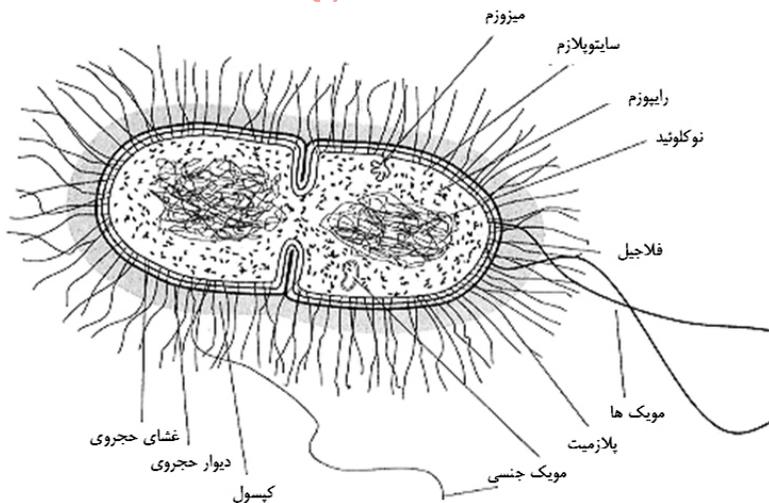
۱- **قابلیت نفوذ و انتقال:** غشای سائتوپلازمیک به حیث مانع قابلیت نفوذ (مواد منحل lipophobic به شکل غیر فعال از آن عبور نموده نمی تواند) و همچنان به حیث رابطه قابلیت نفوذیه وظیفه اجرای می نماید که در اخیرالذکر سیستمهای خاص پروتینی (permeases) انتشار غیر فعال مواد منحل خاص را تسهیل و یا (energy-dependent active transport) را بر علیه میلان غلظت catalyze می نمایند.

دو شکل سیستم انتقال فعال (ابتدایی و تالی) موجود است. در سیستمهای ابتدایی یا سیستم پمپها (Pumps) انرژی میتابولیک به منظور انتقال مواد منحل از طریق غشای بر علیه میلان غلظت آن مورد استفاده قرار می گیرد. در باکتریهای ایروبیکی پمپ عمده عبارت از Electron transport system می باشد که در آن انرژی حاصله از substrate oxidation جهت خارج

نمودن پروتون ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. پروتون های خارج شونده دوباره از طریق ATPase غشاً، داخل حجره می‌گردند، انرژی حاصله از این جریان آیونی توسط ATPase به منظور سنتیز ATP از ADP و فاسفیت های غیر عضوی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در باکتری های anaerobic که فاقد سیستم انتقال الکترون ها یا (Electron transport system) می‌باشند، عکس سیستم فوق صورت می‌گیرد، خروج پروتون ها توسط ATPase صورت می‌گیرد که در آن از انرژی حاصله از شکستن ATP به مصرف می‌رسد.

در سیستم های ثانوی، انرژی ذخیره شده در گرادیانت های کاتیون و انرژی پوتانشیل غشاً که در نتیجه پمپ ها به میان می‌آید برای انتقال فعال مواد منحل از قبیل امینو اسیدها و مواد قندی به داخل حجره مورد استفاده قرار می‌گیرد. این انتقال توسط سیستم co-transport انجام می‌پذیرد که در آن: انتقال دهنده به کتیون ها و مواد منحل وصل گردیده و هر دو را همزمان انتقال می‌دهد. از آنجائیکه گرادیانت کاتیون ها قویاً به طرف داخل متوجه می‌باشد، گرادیانت مختلط الکتروکیمیای مواد منحل را برعکس گرادیانت غلظت مربوط آن به طرف داخل حجره می‌کشاند.

همچنان حجره حاوی ناقلین پروتئینی مخصوص در غشای خود می‌باشد که انتشار بعضی مواد منحل را به طرف داخل و یا به خارج از حجره مساعدت می‌نماید. بنابر این، اگر حجره در وسطی قرار داده شود که در آن غلظت بلند گلیسیرول موجود باشد، می‌تواند گلیسیرول را ذریعه انتشار سهل (Facilitated diffusion) و بدون استفاده از منبع مزدوجه انرژی، به حالت تعادل نگهدارد.



شکل ۱-۹ ساختمان شیماتیک باکتری در حال انقسام

در باکتری‌های گرام منفی، انتقال بسیاری مواد مغذی ذریعه پروتئین‌های اتصالی خاص (*binding proteins*) که در فضای *Periplasmic* قرار دارند تسهیل می‌گردد. مواد مغذی ابتداءً به پروتئین‌های خاص چسبیده که ضریب *dissociation* آن به (10-7-10-6 mol/lit) می‌رسد و بعداً توسط پروتئین انتقال دهنده در غشای داخلی اخذ می‌گردد. این سیستم به نام *shock sensitive* یاد می‌گردد، به نسبت اینکه تغییرات غیر مترقبه اسموتیک (رقیق شدن ناگهانی محیط تعلیقی حجرات) باعث تخریب غشای خارجی گردیده و زمینه خروج پروتئین‌ها اتصالی (*binding proteins*) را مساعد می‌سازد.

علاوه بر انتقال حقیقی که در آن مواد منحل بدون تغییر شکل از طریق غشای عبور می‌نمایند، باکتری‌ها از عملیه استفاده می‌نمایند که به نام (*group translocation*) یا (*vectorial metabolism*) یاد می‌گردند، که بالای اخذ انواع معین مواد قندی مانند گلوکوز و مانوز مؤثر می‌باشد. در این عملیه مرکبات فوق در اثنای عملیه انتقال *phosphorylate* می‌گردند. این عملیه به باکتری‌ها اجازه می‌دهد تا منابع انرژی خود را ترویج، انتقال و میتابولیزم را طور مؤثر مورد استفاده قرار دهند. در این عملیه ابتداءً یک پروتئین انتقال دهنده غشایی در سایتوپلازم *phosphorylate* می‌گردد که در آن *phosphoenolpyruvate* به مصرف می‌رسد. این پروتئین *phosphorylate* شده بعداً به مواد قندی آزاد در غشای خارجی وصل گردیده و آنرا به سایتوپلازم داخل می‌نماید و بعداً به حیث قند فوسفیتدار آنرا آزاد می‌نماید. این سیستم‌های انتقال دهنده مواد قندی به نام سیستم‌های *phosphotransferase* یاد می‌گردد.

در *Escherichia coli*، انتقال آیون پتاسیم به منظور تنظیم فشار داخلی مورد استفاده قرار می‌گیرد. ازدیاد در فشار اوسموتیک خارجی در غلظت ثابت K^+ باعث فعال شدن *gene*‌های کود کننده برای پروتئین‌های انتقال دهنده K^+ می‌گردند و علاوه‌تاً فعالیت پروتئین‌های متذکره را ازدیاد می‌بخشد.

۲- انتقال الکترونی و *Oxidative phosphorylation* سایتوکرومها و سایر انزایمها و مرکبات مربوط به زنجیر تنفسی به شمول عده از *dehydrogenase*‌ها در غشای سایتوپلازمیک قرار دارند. بنابر این غشای سایتوپلازمیک باکتری‌ها شباهت وظیفوی به غشای میتوکاندریا داشته که همین ارتباط توسط بسیاری بیولوجست‌ها برای تقویه این تیوری به کار رفته است که میتوکاندریا از باکتری‌های *symbiotic* منشأ گرفته اند.

۳- اطراح اکزو انزایم‌های هایدرولازیمیک (*Hydrolytic exoenzymes*) تمام اورگانیزمها که

مواد مغذی خود را از پولیمرهای عضوی مکرراورگانیک مانند (پروتین‌ها، پولی سکرانیدها، لیپیدها) به دست می‌آورند. آنزیم‌های هایدرولازیک را اطراح می‌نمایند که پولیمرهای فوق را به واحدها کوچکتر تبدیل نموده و باعث عبور آنها از غشای سایتوپلازمیک می‌گردد. حیوانات بزرگتر چنین آنزیم‌ها را مستقیماً در لومن قنات هضمی اطراح می‌نمایند و باکتری‌ها گرام مثبت آنها مستقیماً در وسط خارجی و باکتری‌های گرام منفی در فضای *periplasmic* آنها فراغ می‌نمایند. بعضی باکتری‌های گرام منفی مانند *Serratia* و *Erwinia Pseudomonas* مقادیر زیادی از *Protease* ها، *Amylase* ها و *Pectinase* ها را به محیط خارج حجروی اطراح می‌نمایند. پروتین‌های اطراح شده در رایبوزوم‌های سایتوپلازمیک به شکل *Preprotein* ها ترکیب گردیده که یک سلسله اضافی 15-40 آمینواسید (معمولاً تقریباً 20 آمینواسید) در نهایت آمینو آن وصل می‌باشند. این سلسله رهنما و یا سگنال دهنده *leader sequence* در هماهنگی با پروتین‌های بالخاصه سایتوپلازم و یا غشای عمل نموده و در مراحل اولی پروسه سنتیز پولی پپتاید ها، رایبوزوم‌ها را به سطح داخلی غشای حجروی وصل می‌نماید. بعداً *translocation* در غشای که توسط سلسله "رهنما" آغاز گردیده صورت می‌گیرد، این مسأله روشن نیست که این عملیه همزمان با ازدیاد در طول زنجیر صورت می‌گیرد و یا اینکه در مراحل اخیر پروسه سنتیز به وقوع می‌پیوندد. سلسله رهنما به تعقیب *translocation* توسط (*membrane-bound leader peptidase*) شکسته و پروتین تکمیل شده در مرحله اخیر از غشای آزاد می‌گردد.

بسیاری باکتری‌های پتوجن آنزیم‌ها (مانند *Ig Al protease*) و توکسین‌هایی را (مانند توکسین کولرا) به یک میکانیزم مشابه فوق اطراح می‌نمایند که فکتورهای مهم *virulence* می‌باشند.

۴- **وظایف بیوسنتتیک:** غشای سایتوپلازمیک ناحیه انتقال دهنده لیپیدها می‌باشد که بالای آن واحدها دیوار حجروی تراکم نموده به همین ترتیب آنزیم‌های بیوسنتیز دیوار حجروی را دارا می‌باشند. آنزیم‌های سنتیز *phospholipid* ها نیز در غشای سایتوپلازمیک قرار دارند. بالاخره، بعضی پروتین‌های (*DNA replicating complex*) در بالای غشای موجود می‌باشند، که احتمالاً در میوزوم‌های جداری که *DNA* متصل آن بوده، قرار داشته باشد.

۵- **سیستم‌های Chemotactic:** جذب کننده‌ها و دفع کننده‌ها بالای آخذه‌های خاص در غشای سایتوپلازمیک وصل می‌گردند. حد اقل 20 آخذه مختلفه شیمورسپتور‌ها در غشای *E. coli* قرار دارند، که بعضی از آنها در مراحل اول پروسه انتقال وظیفه دارند.

ج: مواد ضد باکتریایی که بالای دیوار حجروی اثر دارند: مواد ضد عفونی که دارای گروپ های *lipophilic* و *hydrophilic* می باشند، باعث پاره نمودن غشاهای سائتوپلازمیک و در نتیجه مرگ حجره می گردد. یک گروپ انتی بیوتیک ها، یعنی *polymyxin* ها متشکل از پیپتاید های سکلیک ضد عفونی می باشند که غشاهایی دارند *phosphotidyl ethanolamine* را طور انتخابی تخریب می نمایند. ماده اخیرالذکر یک جزء عمده غشای باکتریایی می باشد. تعدادی از انتی بیوتیک ها طور بالخاصه وظایف بیوسنتتیک غشای سائتوپلازمیک را مختل می سازند طور مثال *novobiocin* و *nalidixic acid* سنتیز *DNA* را نهی نموده، علاوهً *novobiocin* سنتیز *teichoic acid* را نهی می نماید.

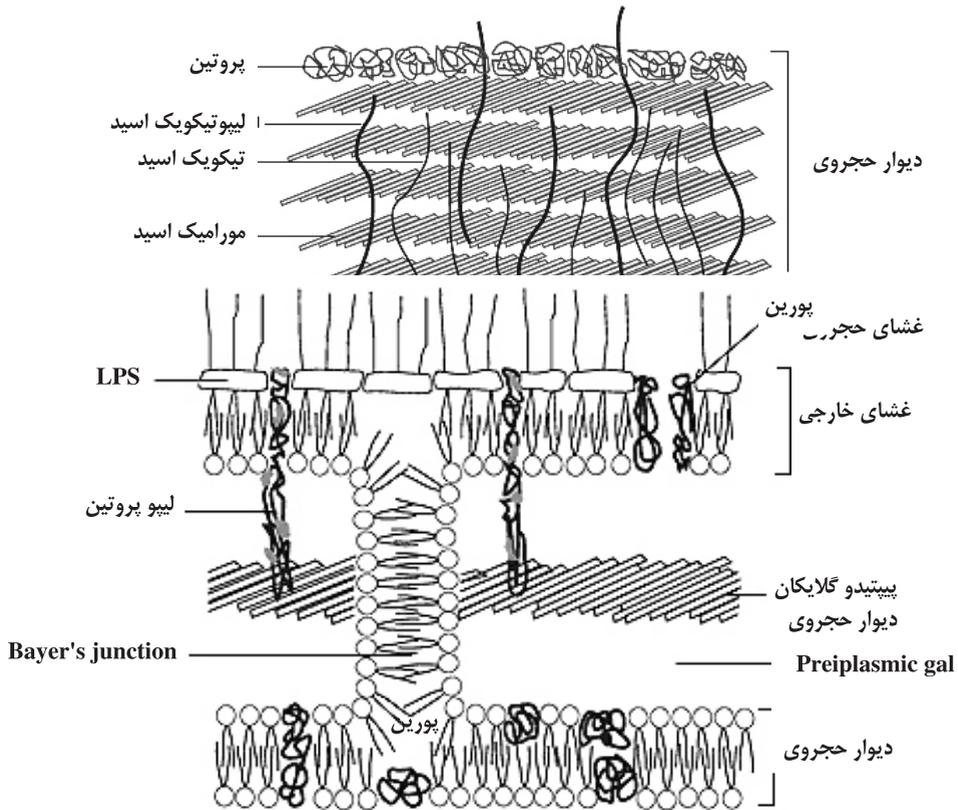
گروپ سوم مواد *membrane-active* عبارت از *ionophore* ها می باشند، مرکبات فوق زمینه انتشار سریع کتیون های معین را از طریق غشاً مساعد می سازد. طور مثال *Valinomycin* طور مشخص انتقال آیون های پوتاسیم را مساعدت می نماید. بعضی مرکبات *ionophore* ذریعه تشکل منفذهای *hydrophilic* در غشاً عمل می نمایند و تعداد دیگر به حیث انتقال دهنده گان آیون های منحل در شحم عمل نموده و از غشاً داخل و خارج می گردند. آیونفورها می توانند حجره را از بین ببرند و علت آن از بین بردن پتانسیل غشاً می باشد که برای عملیه *oxidative phosphorylation* و سایر پروسه های مربوط به غشاً لازم می باشند. مرکبات فوق تأثیر انتخابی بالای باکتری ها نداشته و بالای غشای تمام انواع حجرات عمل نموده می توانند.

دیوار حجروی

طبقات لاف حجروی میان غشای سائتوپلازمیک و کپسول مجموعاً به نام "دیوار حجروی" یاد می گردند. در باکتری های گرام مثبت، دیوار حجروی عمدتاً متشکل از *peptidoglycan* و *teichoic acid* ها بوده؛ ولی در باکتری های گرام منفی، دیوار حجروی مشتمل بر *peptidoglycan* و غشای خارجی می باشد.

فشار اسموتیک داخلی در بسیاری باکتری ها در نتیجه تراکم مواد منحل توسط انتقال فعال آن، (بین 5 الی 20 اتموسفیر) تفاوت می نماید. در بسیاری محیط ها، این فشار برای انفجار حجره کفایت می نماید، ولی بنا بر موجودیت قوت و استحکام فوق العاده دیوار حجروی این عمل صورت گرفته نمی تواند. دیوار حجروی باکتری ها قدرت فوق را از یک طبقه ای حاصل می نماید که متشکل از مواد به نام *murein*، *mucopeptide* و یا *peptidoglycan* (تمام اسامی مترادف هم اند) می باشند. ساختمان *peptidoglycan* ذیلاً تشریح می گردد.

باکتری‌ها نظر به عکس‌العمل‌شان در مقابل تلوین گرام، به دو گروپ گرام مثبت و گرام منفی تقسیم می‌شوند. تلوین فوق به نام هستولوجست Christian Gram مسمی گردیده است، نامبرده پروسیجر تلوین تشخیصی فوق را حین معاینه باکتری‌ها در انساج منتن کشف نمود. در این تلوین ابتدا حجات توسط crystal violet و iodine تلوین گردیده و بعداً با اسیتون یا الکل شسته می‌شود. در مرحله اخیرالذکر باکتری‌های گرام منفی بیرنگ گردیده؛ ولی باکتری‌های گرام مثبت رنگ خود را حفظ می‌نمایند.

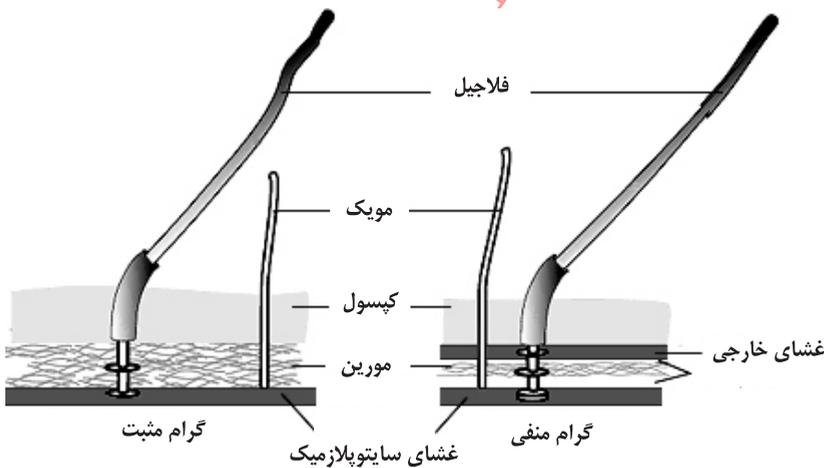


شکل ۱-۱۰

اختلاف میان باکتری‌های گرام مثبت و گرام منفی نشان داده است که این اختلاف در دیوار حجروی وجود دارد: حجات گرام مثبت نیز توسط اسیتون یا الکل بیرنگ گردیده

می‌توانند، مشروط بر اینکه دیوار حجروی آنها پس از مرحله تلوین و قبل از مرحله شستشو بر طرف گردیده باشد. باوجود اینکه ترکیب کیمیای دیوارهای گرام مثبت و گرام منفی حال به خوبی دانسته شده است؛ ولی با آنها علت اینکه دیوار گرام مثبت چگونه خروج رنگ را مانع می‌گردد، فهمیده نشده است.

دیوار حجروی علاوه بر اینکه باعث حفاظت فشار اوسموتیک حجره می‌گردد، نقش اساسی را در تقسیمات حجروی بازی می‌نماید و به همین ترتیب به حیث اساس بیوسنتیز حجره فعالیت می‌کند. شاخص‌های عمده انتیجینیک سطح حجره در طبقات مختلفه دیوار آن قرار داشته و یک مرکب به نام lipopolysaccharide در حجرات گرام منفی مسؤؤل فعالیت endotoxin های غیر وصفی باکتری‌های گرام منفی می‌باشد. طور عموم دیوار حجروی قابلیت نفوذیه غیر انتخابی داشته با آنها یک طبقه دیوار گرام منفی یعنی غشای خارجی آن عبور مالیکول‌های بزرگ را مانع می‌گردد.



شکل ۱- ۱۱

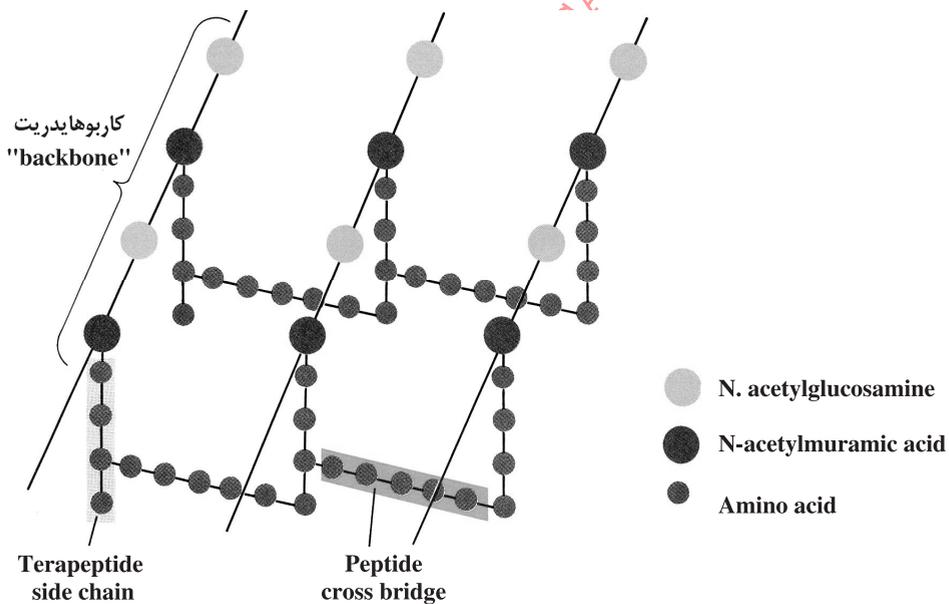
وظایف دیوار حجروی

- ۱- به باکتری‌ها شکل می‌دهد و یا شکل ظاهری حجره باکتری را تعیین می‌نماید.
- ۲- ساختمان‌های داخل حجره باکتری را محافظه می‌نماید.

۳- در انقسام حجروی نقش دارد.

۴- مقاومت را به مقابل عوامل محیطی که متوجه حجره باکتری است به وجود می آورد.

الف: طبقه پپتیدوگلاایکان Peptidoglycan layer: پپتیدوگلاایکان یک پولیمر مغلق بوده که از نظر تشریحی متشکل از سه قسمت می باشد: اساس (ستون فقرات) که مرکب از N-acetylglucosamine و N-acetylmuramic acid به شکل متبادل می باشد، یک ست زنجیره‌های جانبی یکسان tetrapeptide ها که به N-acetylmuramic acid وصل می باشند و یک ست پل های اتصالی Peptide های یکسان می باشد. (شکل ۱-۱۲) در بسیاری دیواره‌های حجروی گرام منفی، پل های اتصالی مشتمل بر یک رابطه مستقیم پپتاید میان diaminopimelic acid (DAP) و گروه carboxyl در D-alanine نهایت دومی زنجیر می باشد.



شکل ۱-۱۲ ساختمان کیمیای پپتیدوگلاایکان

با آنهم، زنجیره‌های جانبی tetrapeptide تمام انواع دارای تظاهرات عمده مشابه می باشند. بسیاری دارای L-alanine در موقعیت 1 (متصل به diaminopimelic acid) و یا D-glutamate

D-glutamate تعویضی در موقعیت 2 و *D-alanine* در موقعیت 4 می‌باشد. موقعیت 3 بیش از همه متغیر می‌باشد. طوریکه بسیاری باکتری‌های گرام منفی دارای *diaminopimelic acid* در این موقعیت بوده که به آن مرکبات لایوپروتین دیوار حجروی وصل می‌باشد که ذیلاً توضیح می‌گردد. باکتری‌های گرام مثبت دارای *L-lysine diaminopimelic acid* و یا سایر *L-aminoacid* ها در موقعیت 3 بوده می‌توانند.

diaminopimelic acid یک عنصر مختص برای دیوار حجروی پروکاریوتیک بوده و پیشقدم *Lysine* در بیوسنتز باکتری برای امینو اسید فوق می‌باشد. *Mutant* های باکتری‌ها که قبل از *diaminopimelic acid* در پروسه *biosynthetic pathway* نهی می‌گردند، در صورت فراهم نمودن *diaminopimelic acid* دوباره به نموی نورمال خود دوام می‌دهند؛ اما اگر تنها *L-lysine* فراهم گردد، لیز صورت می‌گیرد و با وجود نموی نارمل قادر به تشکیل *peptidoglycan* جدید در دیوار حجروی نمی‌باشند.

این مسأله که زنجیرهای *peptidoglycan* طور متقابل وصل می‌باشند به این مفهوم است که هر طبقه *peptidoglycan* یک مالیکول بزرگ واحد می‌باشد. در باکتری‌های گرام مثبت، به تعداد 40 ورق پپتیدوگلایکان می‌باشند که تقریباً 50 فیصد مواد دیوار حجروی را تشکیل می‌دهند. در باکتری‌های گرام منفی طوری معلوم می‌گردد که فقط 1-2 ورق وجود داشته باشند که 5-10 فیصد مواد دیوار حجروی را تشکیل می‌دهند. باکتری‌ها نظر به ساختمان دیوار حجروی شکل می‌گیرند که این موضوع در خصوص انواع خاص باکتری‌ها مشخص می‌باشد.

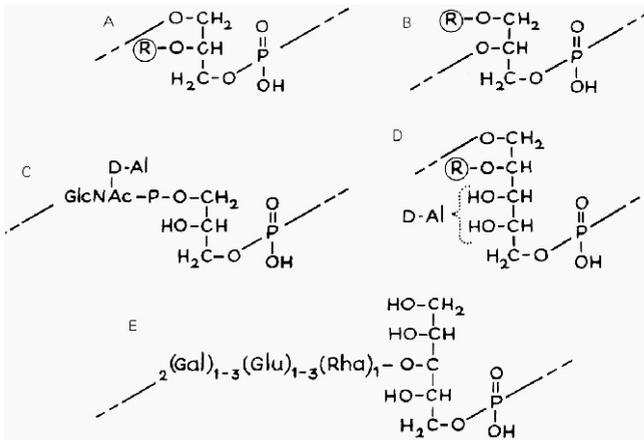
چندین گروه پروکاریوتیک ها، که مجموعاً به نام *archaeobacteria* یاد می‌گردند، فاقد طبقه *peptidoglycan* می‌باشند. در بعضی انواع این گروه یک پولیمیر مشابه موجود می‌باشد که مشتمل بر قندهای *N-acetyl* و سه *L-aminoacid* می‌باشند. این گروه فاقد *muramic acid* و *D-amino acid* ها می‌باشند. در سایر آرکیوباکتری‌ها در عوض یک طبقه غیر پروتینی موجود است. این اورگانیزم‌ها در قسمت لیپیدها و RNA نیز تفاوت‌هایی را نشان می‌دهند.

ب: اجزای خاص دیوار حجروی گرام مثبت: اکثر دیوارهای گرام مثبت، مقادیر قابل ملاحظه اسیدهای *teichoic* و *teichuronic* را دارا می‌باشند که تقریباً 50 فیصد وزن خشک دیوار حجروی و 10 فیصد وزن خشک تمام حجره را احتوا می‌نماید. بر علاوه بعضی دیوارهای گرام مثبت مالیکول‌های پولی سکراید را دارا بوده می‌توانند.

1- *teichoic acid* و *teichuronic acid* عبارت از پولیمیرهای منحل در آب بوده که حاوی *glycerol* و *ribitol* می‌باشند و توسط رابطه‌های *phosphodiester* وصل می‌گردند و

یک یا بیشتر امینو اسید و یا قند را دارا می‌باشند (شکل 1-13) دو نوع *teichoic acid* موجود اند: *teichoic acid* دیواری که توسط روابط کوولانت با *peptidoglycan* وصل می‌باشند و *teichoic acid* غشایی (*lipoteichoic acid*) که توسط روابط کوولانت به گلایکولپیدهای غشا وصل بوده و در میزوزومها تراکم می‌نمایند. بعضی انواع *teichoic acid* غشایی می‌باشند.

اسیدهای *teichoic* آنتی‌جینهای مهم سطحی باکتریهای گرام مثبت دارند آنها را تشکیل می‌دهد و اثرات انتی‌بادی‌ها بالای آنان حاکی بر این است که اسیدهای فوق در سطح خارجی طبقه *peptidoglycan* قرار دارند؛ ولی فعالیت اسیدهای فوق با هضم قسمی پپتیدوگلاایکان



از دید می‌یابد، بنای نتیجه‌گیری می‌گردد که قسمت اعظم *teichoic acid* ممکن بین غشای سائتوپلازمیک و طبقه پپتیدوگلاایکان موجود بوده و از طریق منفذها در

شکل ۱-۱۳ واحدهای تکراری تیکوئیک اسید

طبقه اخیرالذکر، در جهت خارج حجره امتداد یابد. در *pneumococcus* ها (*streptococcus pneumoniae*) اسیدهای *teichoic* شاخص‌های آنتی‌جینیک را حمل می‌نمایند که به نام *Forssman antigen* یاد می‌گردند. در *streptococcus pyogenes* اسید *lipoteichoic* با *M-protein* مرتبط می‌باشند که از غشای حجروی از طریق طبقه پپتیدوگلاایکان تبارز می‌نماید. مالیکول طولیل *M-protein* همراه با *lipoteichoic acid* مایکروفیبریل‌های را می‌سازند که اتصال *S. Pyogene* را به حجرات حیوانی مساعدت می‌نماید.

واحدها متکرر ممکن گلیسیرول باشند که به واسطه رابط‌های 1/3 و یا 1/2 وصل می‌باشند و یا واحدها معلقتر دیگری باشند که در آن گلیسیرول و یا *ribitol* با بقایای قندی

مانند گلوکوز، گلکتوز و یا *N-acetylglucosamine* یکجا می‌باشند. این زنجیره‌ها ممکن 30 و یا بیشتر واحد متکرر را به شکل طولانی در خود داشته باشند، گرچه زنجیره‌های دارای 10 و یا کمتر واحد نیز معمول می‌باشند.

بسیاری *teichoic acid* ها دارای مقادیر زیاد *D-alanine* می‌باشند که اکثراً در موقعیت‌های 2 و 3 و 2 و 3 گلیسرول و یا موقعیت 3 و یا 4 *ribitol* وصل می‌باشند؛ اما *D-alanine* در بعضی از اشکال مغلق تر *teichoic acid* ها به یکی از بقایای قندی وصل می‌باشند. علاوه بر *D-alanine* مرکباتی دیگری از قبیل گلوکوز، گلکتوز، *N-acetylglucosamine* و *acetylgalactose amine* و یا *succinate* ها نیز ممکن به گروه‌های آزاد هایدروکسیل *D-alanine* و *glycerol* و *ribitol* وصل باشند. ممکن بیشتر از یک نوع مرکب قندی علاوه بر *D-alanine* در نوع واحد مایکروبی موجود باشد در صورت فوق این مسأله ثابت نگردیده که آیا قندهای مختلفه در عین مالیکول *teichoic acid* قرار دارند و یا در مالیکول‌های دیگر. ترکیب *teichoic acid* که توسط یک نوع معین باکتری ساخته می‌شود نظر به ترکیب وسط نشونمایی متفاوت بوده می‌تواند. وظیفه *teichoic acid* ها تا هنوز هم مورد مباحثه می‌باشد. *Teichoic acid* ها آیون مگنیزیم را با خود وصل نموده که ممکن نقشی را در رسانیدن آیون فوق به حجره داشته باشد. همچنان نقشی را در وظایف نورمال پاکت حجروی دارا می‌باشند، بنابر این تعویض *choline* با *ethanolamine* در تیکوئیک اسید *Pneumococcus* ها باعث مقاومت حجره در مقابل *autolysis* و عدم توانمندی آن برای اخذ *DNA transformation* می‌گردد. تیکوئیک اسیدهای غشایی ممکن به حثت یک اتصال دیوار به غشای حجروی مربوطه وظیفه اجرا نماید.

اسیدهای *tichuronic* عبارت از پولیمیرهای مشابه بوده؛ ولی واحدها متکرر اسیدهای قندی مانند (*N-acetylmanosuronic* و یا *D-glucosuronic acid*) را به عوض فسفوریک اسید در خود دارند. مرکبات فوق در صورت محدود بودن فوسفات به عوض تیکوئیک اسید سنتتیز می‌گردند.

۲- پولی سکرایدها: هایدرولیز دیوار در انواع معین باکتری‌های گرام مثبت باعث حصول قندهای خنثی مانند *glucosamine*، *galactose*، *arabinose*، *mannose* و قندهای اسیدی مانند *glucuronic acid* و *mannuronic acid* می‌گردد. ممکن این قندها در واحدها فرعی پولی سکرایدها در دیوار حجروی وجود داشته باشند با وجود آنهم کشف این مسأله که اسیدهای تیکوئیک و تیکورونیک ممکن دارای انواع مختلفه قندها باشند باعث گردیده که منشأ این قندها نامعلوم باقی بمانند.

ج: مرکبات خاص دیواره‌های حجروی گرام منفی: دیواره حجروی گرام منفی دارای سه مرکب می‌باشد که خارج از طبقه پیپتیدوگلاایکان قرار داشته و عبارتند از: لایپوپروتین، غشای خارجی و لیبوپولی سکراید می‌باشد.

۱- *lipoprotein*: مالیکول‌های لایپوپروتین غیر معمول سبب اتصال غشای خارجی و طبقات پیپتیدوگلاایکان می‌باشند. لایپوپروتین دارای ۵۷ امینو اسید می‌باشند، که نمایانگر تکرار یک سلسله مرکب از ۱۵ امینو اسید می‌باشد و توسط روابط پیپتایدی به *diaminopimelic acid* موجود در زنجیرهای جانبی *tetrapeptide peptidoglycan* وصل می‌باشد. مرکبات شحمی، مشتمل بر *diglyceride thioether* می‌باشند که به *cysteine* نهایی آن وصل می‌باشد و به صورت غیر کووالانت به غشای خارجی تثبیت می‌گردد. لایپوپروتین از نظر تعداد زیادترین پروتین در حجرات گرام منفی می‌باشد (معادل به ۷۰۰۰۰۰ مالیکول در یک حجره). وظیفه آن (با در نظر داشت میوتانت ها که فاقد آن می‌باشند) عبارت از تثبیت غشای خارجی و اتصال آن بالای طبقه پیپتیدوگلاایکان می‌باشد.

۲- غشای خارجی: غشای خارجی یک ساختمان دو طبقه یی می‌باشد: ورقه داخلی آن از نظر ترکیب شباهت به غشای سائتوپلازمیک دارد حالانکه فوسفولیپیدهای ورقه خارجی با مالیکول‌های لیبوپولی سکراید (LPS) تعویض گردیده اند. در نتیجه ورقه های این غشای غیر متناظر گردیده و خواص این دو طبقه به طور قابل ملاحظه از غشاهای بیولوژیک مشابه آن مانند غشای سائتوپلازمیک، متمایز می‌گردد.

توانایی غشای خارجی در رابطه با عدم اجازه دخول به مالیکول‌های هایدروفوبیک از جمله خواص غیر معمول غشاهای بیولوژیک بوده و حجره را (در صورت *enteric bacteria* ها) از نمک های صفراوی محافظه می‌نماید. نظر به ماهیت شحمی آن غشای خارجی مالیکول‌های هایدروفیلیک را نیز اجازه دخول به حجره نمی‌دهند. با وجود آنهم، غشای خارجی دارای کانال های بالخاصه می‌باشند که مشتمل بر مالیکول‌های پروتینی به نام *porin* ها می‌باشند که دیفوجن غیر فعال مرکبات هایدروفیلیک با وزن مالیکولی پائین را اجازه می‌دهد این مرکبات مشتمل بر قندها، امینو اسیدها و آیون های معین می‌باشد. مالیکول‌های بزرگ انتی بیوتیک غشای خارجی را نسبتاً به آهسته گی می‌شگافند که این موضوع حاکی بر مقاومت نسبتاً بیشتر باکتری‌های گرام مثبت در مقابل انتی بیوتیک ها می‌باشد. قابلیت نفوذیه غشای خارجی نظر به یک نوع گرام منفی به نوع دیگر آن وسیعاً متفاوت می‌باشد. به گونه مثال: *Pseudomonas aeruginosa* در برابر مرکبات *antibacterial* شدیداً مقاوم می‌باشد و غشای خارجی آن

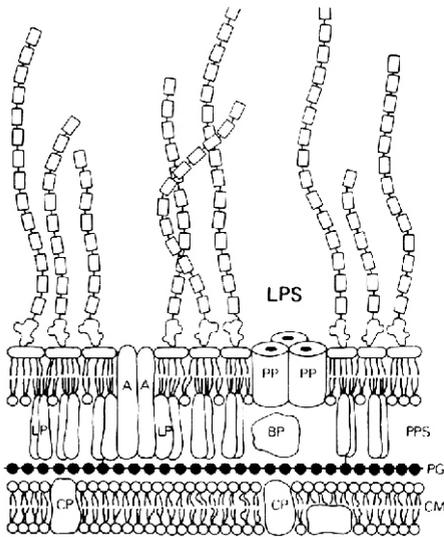
نسبت به *E. coli* تقریباً 100 مرتابه قابلیت نفوذیه کمتر دارد. پروتئین‌های عمده غشای خارجی که به اساس *gene* های کود کننده آن نامگذاری شده اند، نظر به عدم موجودیت آن در میوتانت ها و نظر به تجاربی که در آن پروتئین‌های خالص به شکل غشاهای مصنوعی دوباره ترکیب می‌گردند، به چندین کتگوری تقسیم می‌گردند. به گونه مثال پورین ها که مثال آن *OmpC*، *D* و *F* و *PhoE* در *E. coli* و *Salmonella typhimurium* است از جمله پروتئین‌های *trimeric* بوده که هر دو طرف غشای خارجی را تنقب می‌نمایند. این‌ها منفذهای نسبتاً غیر وصفی را تشکیل داده که انتشار آزاد مواد منحل هایدروفیلیک کوچک را از طریق غشا اجازه می‌دهند. پورین ها در انواع مختلف دارای حدود دفع سازی متفاوت می‌باشند که از وزن مالیکولی 600 در *E. coli* الی بیشتر از 300 در *P. aeruginosa* تفاوت می‌نماید.

اجزای گروه دوم از پروتئین‌های غشای خارجی که در بسیاری موارد به پورین ها شباهت دارند نمونه آن *LamB* و *Tsx* می‌باشد. *LamB* یک پورین قابل تحریک بوده و رسپتور برای باکتریوفاز *lambda* می‌باشد و مسؤؤل انتشار مالتوز و *maltodextrin* ها از غشا می‌باشد. *Tsx* رسپتور برای باکتریوفاز T6 بوده و مسؤؤل انتشار *nucleoside* ها و بعضی امینواسیدها می‌باشد. بر علاوه *LamB* عبور مواد منحله دیگر را نیز اجازه می‌دهد و نشاندهنده عمل متقابل مواد منحله با نواحی مخصوصه در *channel* می‌باشد.

پروتئین *OmpA* در غشای خارجی بسیار وافر می‌باشد. پروتئین فوق به حیث رسپتور برای چندین باکتریوفاز فعالیت نموده و نیز در تثبیت غشای خارجی بالای طبقه *peptidoglycan* سهیم می‌باشد. علاوه مویک *pilus* جنسی در *F-mediated bacterial conjugation* می‌باشد.

غشای خارجی همچنان دارای یک ست پروتئین‌های کمتر وافر بوده که در انتقال مالیکول‌های خاص، مانند *Vit B12* و منعلق *ironsiderophore* سهیم می‌باشند. اینان وابستگی زیادی به مرکبات (مورد انتقال) شان نشان داده و احتمالاً مانند سیستم های کلاسیک انتقال در غشای داخلی (سایتوپلازمیک) فعالیت دارند. جهت اجرای وظیفه مناسب این پروتئین‌ها، ایجاب می‌نماید تا انرژی را با پروتئینی به نام *TonB* بدست آورد. سایر پروتئین‌های اضافی کوچک مشتمل بر تعداد محدودی از آنزیم ها به شمول فوسفولیپازها و پروتيازها می‌باشد به همینگونه بعضی پروتئین‌های *penicillin-binding* در آن مشتمل می‌باشند.

توپولوژی پروتین‌های عمده غشای خارجی، به اساس مطالعه و تحلیلات روابط متقابل و ارتباط وظیفوی در (شکل 1-14) نشان داده شده است. غشای خارجی به هردو یعنی طبقه *murein* و غشای سائیتوپلازمیک وصل می‌باشد. ارتباط با طبقه میورین اساساً توسط لایوپروتین غشای خارجی تأمین می‌گردد. تقریباً یک برسه مالیکول‌های لایوپروتین توسط روابط کوولانت با میورین وصل بوده و در نگهداری این دو ساختمان با همدیگر مساعدت می‌نمایند. یک اتحاد غیرکوولانت بعضی پورین‌ها با طبقه میورین نقش کمتری در ارتباط دادن طبقه خارجی با این ساختمانها دارد. پروتین‌های غشای خارجی در رایبوزوم‌های متصل با سطح سائیتوپلازمیک غشای داخلی سنتز می‌یابد و اینکه چگونه پروتین‌های متذکره به غشای خارجی می‌رسند تا اکنون فهمیده نشده است، ولی درینمورد چنین پیشنهاد می‌گردد که انتقال در نواحی چسبیدگی میان غشای سائیتوپلازمیک و غشای خارجی صورت می‌گیرد، که این مسأله توسط الکترون مایکروسکوب بخوبی مشاهده گردیده می‌تواند. نواحی یا زون‌های متذکره به اساس اسم کاشف آن به نام "*Bayer junctions*" نیز یاد می‌گردند در حجره *E. coli* تقریباً 200 *junction* متذکره وجود دارد.



شکل ۱-۱۴ ساختمان مالیکولی غشای

خارجی باکتری گرام منفی

۳- *dipolysaccharide (LPS)*

لیپوپولی سکراید در دیوار حجروی گرام منفی مشتمل بر لیپید مغلقی به نام لیپید A می‌باشد که به آن یک پولی سکراید که متشکل از یک هسته و یک سلسله نهایی یونتهای متکرر اند وصل می‌باشد.

لیپید A متشکل از واحدهای *phosphorylated glucosamine disaccharide* بوده که به آن

یکتعداد زنجیرهای طویل اسیدهای شحمی وصل می‌باشند. β -hydroxymyristic acid که یک

اسید شحمی C14 می‌باشد دائماً درین شحم موجود بوده و مشخصه آن می‌باشد، سایر

اسیدهای شحمی همراه با گروپ های تعویضی در فوسفیت آنها، نظر به نوع باکتری متفاوت می‌باشند.

هسته پولی سکراید در تمام انواع باکتری گرام منفی که دارای LPS باشند باهم مشابه اند. با آنهم هر نوع دارای یک واحد اختصاصی متکرر می‌باشند. یونتهای متکرر اکثراً trisaccharide های خطی و یا tetra or pentasaccharide های منشعب می‌باشند.

مالیکول های LPS منفی به صورت غیر کوولانت توسط کتیون های دو ولانسه اتصال متقابل می یابند؛ این مسئله باعث ثبات دادن به غشأ گردیده و مانع یی را در مقابل مالیکول های هایدروفوبیک به میان می آورند. برطرف نمودن کتیون های دو ولانسه توسط chelat ها و یا بیجانموندن توسط انتی بیوتیک های پولی کتیونیک، غشای خارجی را برای مالیکول های بزرگ هایدروفوبیک قابل نفوذ می سازد.

LPS که برای حیوانات نهایت توکسیک می باشد، در باکتری های گرام منفی به نام endotoxin یاد می گردد زیرا به سطح حجره قویاً چسبیده و فقط در صورتی آزاد می گردند که حجره lyse گردد. هرگاه LPS به لیپید A و پولی سکراید تجزیه گردد، تمام toxicity آن مربوط به اول الذکر می باشد. به عبارت دیگر پولی سکراید ممثل انتیجینیک عمده سطح حجروی می باشد و به نام O antigen یاد می گردد. خصوصیت انتیجینیک به یونتهای متکرر نهاییات نسبت داده می شود که با ساختن یک طبقه هایدروفیلیک پولی سکرایدها دورادور حجره را احاطه می نمایند. تعداد ممکنه انواع انتیجینیک نهایت زیاد بوده؛ تنها در Salmonella این تعداد بیش از 1000 تثبیت گردیده است.

LPS توسط روابط هایدروفوبیک به غشای خارجی وصل می گردند. LPS در غشای سایتوپلازمیک سنتیز گردیده و به موقعیت نهایی آن انتقال داده می شود. موجودیت LPS برای فعالیت بسیاری پروتین های غشایی لازم می باشند.

تمام باکتری های گرام منفی دارای LPS غشای خارجی مرکب از تعداد متفاوت واحداث متکرر Oligosaccharide نمی باشند؛ گلایکولیپیدهای غشای خارجی باکتری ها که در سطح مخاط جا می گیرند (طور مثال Haemophilus N. gonorrhoeae Neisseria meningitides Influenza Haemophilus Ducreyi) دارای گلایکان های نسبتاً کوتاه و منشعب می باشند. این گلایکولیپیدهای کوچکتر با ساختمانهای "R-type" LPS فاقد O antigen قابل مقایسه بوده که توسط میوتانت های باکتری های انتریک مانند E. Coli تولید می گردد. با وجود آن ساختمان های آن بیشتر به glycosphinolipid های غشای حجروی پستانداران

شباهت داشته، که بهتر است به نام lipooligosaccharide ها (LOS) مسمی گردند. این مالیکول ها ساختمان انتیجینیک خیلی متفاوت داشته و حتی در عین strain واحد تفاوت های ساختمانی را نشان می دهند.

LOS یک فکتور مهم ویرولانسی می باشد. Epitop هایی در LOS تشخیص گردیده اند که ساختمان حجره میزبان را تقلید نموده و در نتیجه قادر می گردند که از عکس العمل معافیته در میزبان فرار نمایند. بعضی LOS (طور مثال در *N. Gonorrhoeae*، *N. Meningitidis* و *H. Ducreyi*) در نهایت خود دارای *N-acetyl-lactosamine* ($\text{Gal}\beta 1-$) *4-GlcNAc* می باشند که از نظر immunochemical شباهت به پیشقدم antigen کریوات سرخ انسانها دارد. در موجودیت انزایم باکتریایی به نام *sialyltransferase* و مرکبات مربوط به میزبان و یا باکتریا (*Monophospho N-acetylneuraminic acid, CMP-NANA*)، بقایای *N-acetyl-lactosamine* سیلایل دار (*sialylated*) می گردد. این *sialylation* که به صورت *invivo* صورت می گیرد زمینه تقلید مالیکولی انتیجن میزبان را به اورگانیزم مهیا و ماسک بیولوژیکی را تهیه می دارد که فکر می گردد *sialic acid* آنرا فراهم می نماید.

۱- فضای *periplasmic* فضا میان غشای داخلی و خارجی به نام *periplasmic space* یاد می گردد که مشتمل بر طبقه *murein* و یک محلول پروتینی *gel* مانند می باشد. فضای پیریپلازمیک تقریباً 20-40 فیصد حجم حجره را احتوا می نماید که قابل ملاحظه می باشد. پروتین های پیریپلازمیک مشتمل اند بر *protein* هایی اتصال با مرکبات خاص (طور مثال، امینواسیدها، قند، ویتامین ها و آیون ها)، انزایم های هایدرولایتیک (طور مثال، *alkaline phosphatase* و *5'-nucleotidase*) می باشند که مرکبات غیرقابل انتقال را به مرکبات قابل انتقال می شکنند، و نیز دارای انزایم های *detoxifying* مانند β -*lactamase* و *aminoglycoside-phosphorylase* می باشند که انتی بیوتیک های معین را غیرفعال می سازند. پیریپلازم همچنان دارای پولیمیر های منشعب و متکاتف *D-glucose* می باشند، که از 8 الی 10 یونت طویل می باشد و طور متفاوت با گلیسیرول فوسفات و *phosphatidylethanolamine* تعویض می گردند. بعضی از آنها حاوی ایستر های *O-succinyl* می باشند. این اولیگوسکرایدهای غشایی نقش مهمی را در *osmoregulation* بازی می نمایند، زیرا حشرات کشت شده در اوساط با *osmolarity* پائین، سنتیز مرکبات فوق را 16 مرتبه از دیاد می بخشد.

د: انزایم‌هاییکه بالای دیوار حجروی حمله می‌نمایند: رابطه β 1-4 در ستون فقرات پپتیدوگلاایکان توسط انزایم lysozyme هایدرولیز می‌گردد. انزایم متذکره در افزایشات حیوانات (اشک، لعاب دهن، افزایشات انفی) و به همین‌گونه در سفیدی تخم مرغ موجود است. باکتری‌های گرام مثبت که توسط lysozyme در محیط با فشار اسموتیک پائین مواجه گردد، لیز می‌شود؛ اما در صورتیکه فشار اسموتیک وسط بلند برده شود تا با فشار اسموتیک داخل حجره در حالت تعادل قرار گیرند، proplast های آزاد رها می‌گردند. غشای خارجی حجرات گرام منفی را در مقابل lysozyme محافظه نموده مگر اینکه توسط مرکبات مانند ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) که یک chelating agent می‌باشد از هم گسیخته شود؛ در وسط متعادل آزوتیک حجراتیکه با EDTA-lysozyme مواجه می‌گردند spheroplast ها را تشکیل می‌دهند که هنوز هم بقایای دیوار گرام منفی مغلق را به شمول غشای خارجی دارا می‌باشند.

باکتری‌ها خود دارای یکتعداد autolysin می‌باشد که عبارت اند از انزایم‌های هایدرولایتیک که بالای پپتیدوگلاایکان‌ها حمله می‌نمایند، به شمول گلاایکوسیدها، امیازها، و پپتیدازها. انزایم‌های متذکره احتمالاً وظیفه اساسی را در نمو و انقسام حجره بازی می‌نماید؛ ولی این فعالیت‌ها در زمان انحلال حجرات مرده یا اوتولیز بیشتر ظاهر می‌گردد.

علاوتاً انزایم‌هاییکه باعث تخریب دیوار حجروی می‌گردند در حجراتی دریافت می‌شوند که تمام باکتری را بلع می‌نمایند مانند پرتوزوا و حجرات فگوسیت حیوانات تکامل یافته تر.

ه: نشونمای دیوار حجروی: با ازدیاد کتله پرتوبلاست‌ها، دیوار حجروی با اتصال واحداث جدیدالتشکیل در طبقات مختلفه دیوار حجروی، طولیتر می‌گردد. در streptococc ها، اتصال به طبقه اساسی دارنده انتیجن در ناحیه استوایی دیوار حجروی اخذ موقع می‌نماید؛ در بعضی باکتری‌های گرام منفی چنین گمان می‌رود که پروسه اتصال طور تصادفی پیش می‌رود، گرچه اتصال موضعی که توسط بیجا شدن سریع و یا تغییر و تبدیل عین منظر به‌میان آمده می‌تواند. در E. coli، نشونمای چوکات غشای خارجی منحصراً در قطب‌های حجره صورت می‌گیرند، که اجزای بالخاصه مانند فگورسپتورها و permease ها به‌صورت تصادفی در این چوکات داخل می‌گردند. چنین گمان می‌رود که طبقه پپتیدوگلاایکان E. coli توسط اتصالات موضعی تصادفی نشونما می‌نماید. در Bacillus subtilis تجارب pulse-chase نشان داده اند که پپتیدوگلاایکان و اسیدهای تیکوتیک به شکل بلاک‌های موجود می‌باشند، و کمتر از 12 ناحیه در یک حجره واحد برای دخول مواد جدیدالتشکیل موجود اند.

و: پرتوبلاست‌ها، سفیروپلاست‌ها و L-form‌ها: اگر در اثر فکتورهای خارجی دیوار حجروی باکتری‌های گرام مثبت کاملاً تخریب گردد (تخریب murein توسط lysozyme و نهی سنتتیز آن

توسط پنسلین) و همچنان باکتری‌ها در وسطی گذاشته شود که فشار اسموتیک آن پایینتر از فشار اسموتیک داخل حجره باکتری‌ها باشد. در اینصورت باکتری‌ها به lysis معروض خواهد شد. اگر باکتری در محیطی گذاشته شود که فشار اسموتیک آن مساوی به فشار اسموتیک داخل حجره باکتری باشد در اینصورت باکتری به lysis مواجه نشده و حجره به وجود می‌آید که به نام protoplast یاد می‌گردد.

اگر دیوار حجروی باکتری‌های گرام منفی در اثر فکتورهای خارجی قسملاً تخریب گردد و باکتری در وسطی گذاشته شود که فشار اسموتیک آن پایینتر از فشار اسموتیک داخل حجره باکتری باشد در اینصورت باکتری به lysis مواجه می‌شود درحالیکه اگر باکتری در وسطی قرار داده شود که فشار اسموتیک آن معادل (Isotonic) باشد در اینصورت حجره به lysis معروض نشده از شکل بیضوی و چوبک مانند به شکل مدور در می‌آید که به نام spheroplast یاد می‌گردد.

اگر چنین حجرات قادر به نشوونما و انقسام باشند، در اینصورت به نام L. form یاد می‌گردند. نام L از انستیتوت lister در لندن گرفته شده است. کلچر L. form ها مشکل بوده و اکثراً وسطی را ایجاب می‌نمایند که توسط agar جامد گردیده و دارای فشار اسموتیک مناسب باشند. L. form ها توسط پنسلیلین نظر به lysozyme به سهولت تولید گردیده که این موضوع عطف به ضرورت بر بقایای پپتیدوگلاایکان می‌نماید.

بعضی اشکال L. form ها با برطرف نمودن محرک به شکل نورمال باسیلی اعاده گردیده می‌توانند. بنابراین قادر به این می‌گردند تا سنتیز نورمال دیوار حجروی را از سر بگیرند. با وجود آن سایر انواع ثابت داشته و هرگز اعاده نمی‌گردند. فکتوریکه ظرفیت اعاده باکتری را تعیین می‌نماید ممکن موجودیت بقایای پپتیدوگلاایکان باشند، که بطور نورمال در بیوسنتیز خود بحیث پیشقدم عمل می‌نمایند. بعضی انواع باکتری‌ها به صورت خودبخودی باعث تولید L. form می‌گردند. تشکل L. form با وساطت دوابی و یا بشکل خودبه خودی باعث ایجاد انتانات مزمن در میزبان می‌گردند و اورگانیزمها با نشان دادن مقاومت در اعضای دفاعی وجود جاگزین می‌گردند. از آنجاییکه انتانات L. form در برابر تداوی انتی بیوتیک نسبتاً مقاوم می‌باشند، مشکلات خاصی را در مقابل شیموتراپی به میان می‌آورند. اعاده حالت شان به شکل باسیلی باعث عود انتان گردیده می‌تواند.

کپسول و Glycocalyx

کپسول قسمت خارجی دیوار حجروی مایکرواورگانیزمها را احاطه می‌نماید. تمام باکتری‌ها دارای مواد کپسولی می‌باشند؛ ولی در نزد بعضی انواع آنها مواد کپسولی زیاد متراکم بوده و یک قشر ضخیم را می‌سازد که به سهولت و به طور واضح به مشاهده می‌رسد. مثلاً Klebsiella

اما در بعضی باکتری‌ها کپسول عبارت از یک قشر نازک بوده که توسط الکترون مایکروسکوپ دیده می‌شود مثلاً Streptococci.

بسیاری باکتری‌ها حین نمو در محیط طبیعی مقادیر بزرگ پولیمیرهای خارج حجروی را سنتتیز می‌نمایند. (به استثنای کپسول poly-D-glutamic acid در Bacillus anthracis)، مواد خارج حجروی پولی سکراید می‌باشند. زمانیکه پولیمیرها یک طبقه متکاثف و واضح را درآورد حجره می‌سازند، به نام کپسول یاد می‌گردد و زمانیکه یک شبکه سست فیبریل‌ها را تشکیل دهد که به خارج از حجره تمديد یافته باشند، به نام glycocalyx یاد می‌گردد. در برخی موارد کتلات پولیمیر طوری تشکیل می‌گردد که به نظر می‌رسد کاملاً از حجره جدا گردیده ولی حجره در آن محبوس گردیده است، در چنین موارد پولیمیرهای خارج حجروی به حیث یک طبقه ساده (slime layer) عطف می‌گردند. پولیمیرهای خارج الحجروی توسط انزایم‌هایی سنتتیز می‌گردند که بالای سطح حجره باکتریایی قرار دارند. طور مثال Sterptococcus mutans از دو انزایم glucosyl transferase و fructosyl transferase برای سنتتیز زنجیرهای طویل دکستران (poly-D-glucose) و لیوان‌ها (poly-D-fructose) استفاده می‌نمایند (یعنی homopolymer ها).

پولیمیرهای که حاوی بیشتر از یک نوع مونوسکراید باشند به نام heteropolymer ها یاد می‌گردند.

کپسول در متهاجم بودن باکتری‌های پتوجن کمک نموده، حجات encapsulated از هایدرولیز مصوون می‌باشند مگر اینکه انتی بادی‌های کپسولی آنها احاطه نماید. گلایکوکالکس در چسپیدن باکتری به سطوح محیطی به شمول حجات نباتی و میزبان حیوانی نقش بازی می‌نماید. طور مثال ظرفیت چسپندگی شدید S. Mutans به مینای دندان، به گلایکوکلکس نسبت داده می‌شود. حجات باکتریایی عین نوع و یا سایر انواع بداخل گلایکوکلکس محبوس می‌گردد، که طبقه یی به نام پلک را بالای سطح دندان تشکیل می‌دهند، تولیدات اسیدی که توسط این باکتری‌ها افزاز می‌گردد باعث caries دندان می‌گردد.

وظایف کپسول

۱- محافظه باکتری‌ها از علیه Phagocytosis.

۲- محافظه باکتری‌ها از تأثیرات انتی بادی‌ها.

۳- محافظه باکتری‌ها از تأثیرات Bactriophage.

۴- باکتری‌ها را از خشک شدن محافظه می‌کند.

۵- در تعیین type باکتری‌ها کمک می‌کند.

۶- قدرت Virulence دارد.

فلاجیل Flagella

الف: ساختمان: فلاجیل باکتریایی ساختمان‌های رشته مانند اند که مرکب از پروتین بوده و دارای قطر $12-30\mu\text{m}$ می‌باشند. ساختمان‌های فوق ارگانهای تحرکی برای اورگانیزم‌های دارنده آن می‌باشد. فلاجیل دارای نهایت و قاعده می‌باشد. فلاجیل منشأ خود را از اجسام مدور (Basal Granul) که در داخل دیوار حجروی موقعیت دارند می‌گیرد.

به اساس تعداد و موقعیت فلاجیل در حجره باکتری، باکتری‌های فلاجیل دار را به چهار گروه ذیل تقسیم می‌نمایند:

۱- باکتری‌های Monotrichus: باکتری‌های که در یک نهایت خود صرف یک عدد فلاجیل دارند مانند *Vibrio cholera*.

۲- باکتری‌های Lophotrichus: عبارت از باکتری‌های اند که در یک نهایت خود چند عدد فلاجیل دارند مانند *Pseudomonase*.

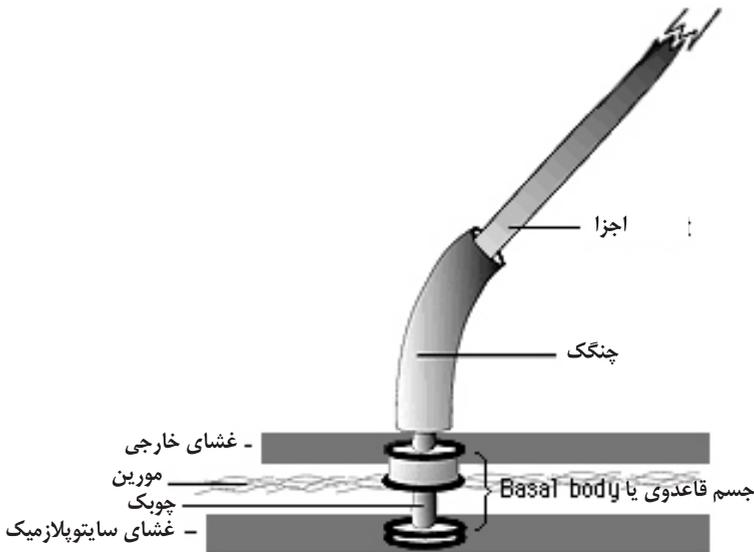
۳- باکتری‌های Peritrichus: عبارت از باکتری‌های اند که در تمام سطح خود دارای فلاجیل اند. مانند *Salmonella typhi*.

۴- باکتری‌های Amphotrichus: عبارت از آن نوع باکتری‌های اند که در هر دو نهایت خود یک یا چندین عدد فلاجیل دارند مانند *Spirillum Volutance*.

فلاجیل باکتریایی متشکل از چندین هزار مالیکول‌های پروتین متشکله می‌باشند که به نام flagellin یاد می‌گردد. در بعضی انواع (مثلاً *Compylobacter*)، فلاجیل مرکب از دو نوع فلاجیلین می‌باشند؛ ولی در اکثر انواع نوع واحد دریافت شده است. فلاجیل در نتیجه تراکم واحدهات آن به شکل فنر مانند یا helical به میان می‌آید. اگر فلاجیل بوسیله تکان میخانیکی برداشته شوند، به زودی در نتیجه سنتیز، تراکم، و بیرون آوردن واحدهات فلاجیلین، فلاجیل جدید تشکیل نموده و در ظرف 3-6 دقیقه تحرک دوباره اعاده می‌گردد. ساختمان اساسی فلاجیلین

احتمالاً در انواع مختلفه باکتری‌ها از هم متفاوت می‌باشند. پروتئین‌های فوق شدیداً آنتی‌جینیک بوده (H.antigens) و بعضی عکس العمل‌های معافیتی بر علیه اتانات به این پروتئین‌ها مربوط می‌باشد.

فلاجیل توسط یک ساختمان مغلق که متشکل از یک چنگک و یا یک قاعده می‌باشد به حجره باکتریایی التصاق می‌نماید. چنگک ساختمان کوتاه منحنی مانند بوده و طوری معلوم می‌گردد که بحیث یک مفصل عمومی میان motor که در قاعده موجود است و خود فلاجیل عمل می‌نماید. Basal body یا قاعده یک ست حلقه‌ها را دارا می‌باشد که یک جوهره در باکتری‌های گرام مثبت و دو جوهره در باکتری‌های گرام منفی می‌باشند. ساختمان الکترون مایکروسکوب و دی‌گرام‌های تشریحی در ساختمان‌های گرام منفی نشان داده شده است. حلقه‌های P و L در حجرات گرام مثبت موجود نمی‌باشند. طی مطالعات جنی‌تیک ساختمان مغلق فلاجیل آشکار گردیده که بیش از 40 جین مؤلد در قسمت تجمع و وظایف آن دخیل می‌باشند.



شکل ۱-۱۵ ساختمان فلاجیل

ب: وظیفه: فلاجیل‌های باکتریایی چرخنده‌های نیمه جامد فنری بوده که حجره به آن به صورت حرکی چرخش می‌دهد. این چرخش ذریعه جریان یافتن پروتون‌ها بطرف حجره به اساس میلان (گرادیانت) تولید شده توسط پروتون پمپ‌های اساسی به میان می‌آید؛ در عدم موجودیت منبع انرژی میتابولیک این قدرت توسط قوه محرکه پروتونی که توسط آیونفورها تولید می‌گردد به دست می‌آید. باکتری‌هایی که در محیط الکالین زندگی می‌نمایند (alkalophile ها) این انرژی را بیشتر از گرادیانت آیون سوئیم برای تأمین تحرکیت فلاجیل، بدست می‌آورد تا از گرادیانت پروتون.

تمام اجزای مربوط به موتور فلاجیل در لفاف حجروی موجود اند. فلاجیل‌هایی که به لفاف حجروی مجزا و سربسته وصل باشند، تا زمانی فعالیت می‌نمایند که مرکبات تنفسی در وسط موجود و یا گرادیانت پروتون به طور تصنعی ایجاد گردیده باشد.

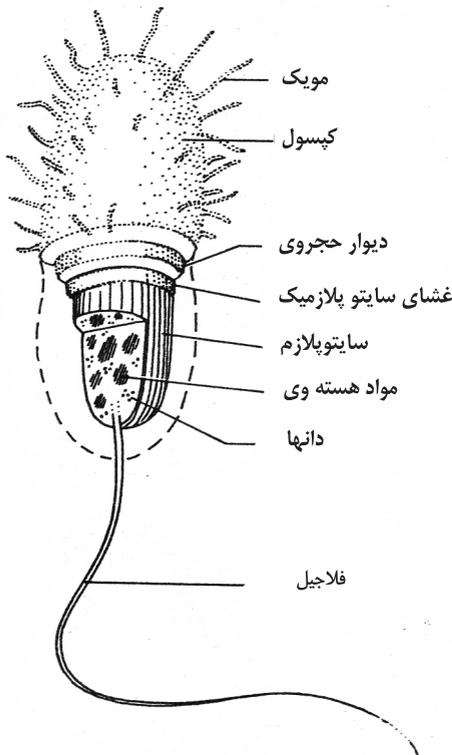
هر زمانیکه یک باکتری peritrichous شنا می‌نماید، فلاجیل آن طوری باهم یکجا می‌گردند که یک بندل خلفی را تشکیل داده و با دورهای مخالف عقربه ساعت، حجره را به طرف مقابل به یک خط مستقیم می‌رانند. در خلال وقفه‌ها، فلاجیل سمت حرکت را تغییر داده و بطور آنی از هم جدا می‌گردند و در نتیجه باعث توقف حجره گردیده و به طرف یک سمت جدید که به صورت اتفاقی تعیین می‌گردد، شنا را از سر می‌گیرد. این خاصیت باعث می‌گردد که chemotaxis به میان آید یعنی حرکت مایکروب به طرف مواد کیمیاوی یا حرکت خالص حجره بطرف منبع می‌باشد. موجودیت جاذب کیمیاوی (مانند قند و یا یک آمینواسید) به کمک آخذه‌هایی محسوس می‌گردد که در غشای حجروی موقعیت دارند (در بسیاری انواع، عین آخذه در انتقال مالیکول‌ها از طریق غشأ سهیم اند). حجره باکتریایی برای تشخیص گرادیانت‌های کیمیاوی ساحوی ناقدر تلقی می‌گردد (یعنی گرادیانت‌های موجود میان دو قطب را نمی‌توانند کشف نمایند)، ولی تجارب نشان داده که حجره می‌تواند قادر به تشخیص گرادیانت‌های زمانی باشد، یعنی غلظت‌های را که زمان دور شدن حجره از منبع جاذب کاهش می‌یابد و زمان نزدیک شدن حجره به جاذب ازدیاد می‌یابد، تشخیص نموده می‌تواند. بعضی مرکبات به عوض جاذب بودن بحیث دافع فعالیت می‌نمایند. یکی از میخانیکیت‌هاییکه ذریعه آن حجرات به مواد جاذب و یا دافع عکس‌العمل نشان می‌دهند عبارت عملیه‌های cGMP-mediated methylation و demethylation پروتین‌های خاص در غشأ می‌باشد. مواد جاذب باعث

نهی مؤقتی demethylation این پروتین‌ها گردیده در حالیکه مواد دافع باعث تحریک demethylation پروتین‌های متذکره می‌گردد.

میخانیکیت که بواسطه آن تغییری در خاصیت حجره در عکس العمل با یک تغییر در محیط به میان می‌آید به نام sensory transduction یاد می‌گردد. Sensory transduction نه تنها مسؤول chemotaxis می‌باشد؛ بلکه همچنان مسؤول aerotaxis نیز می‌باشد (حرکت بسوی غلظت مطلوب اکسیجن)، phototaxis (حرکت باکتری فوتوسنتتیک بطرف نور) و electron acceptor taxis (حرکت باکتریای تنفسی بطرف اکسپتورهای الکترونی بدیل از قبیل nitrate و fumerate) می‌باشد. درین سه نوع رسپتورها، مانند chemotaxis حرکت خالص توسط تنظیم عکس العمل حرکی صورت می‌گیرد.

(Fimbriae) Pili

بسیاری باکتری‌های گرام منفی دارای ضمایم سطحی سخت می‌باشند که به نام pili (کلمه لاتین به نام موی) و یا fimbriae ("fringes") (L می‌باشند. ساختمان‌های متذکره نظر به فلاجیل کوتاه تر و باریکتر بوده؛ و همانند فلاجیل متشکل از واحداث فرعی پروتینی به نام pilinها می‌باشند. بعضی pili دارای یک نوع واحد pilin بوده و در سایرین بیشتر از یک نوع pilin موجود می‌باشند. پروتین‌های کوچک که در بالای سطح pili قرار دارند، مسؤول اتصال آن اند. دو نوع pili موجود اند: pili معمولی که در چسپیدن باکتری‌های همزی symbiont به حجره میزبان نقش دارد؛ و pili جنسی که



شکل ۱-۱۶ دیاگرام مقطعی باکتریا

مسئول یکجا نمودن حجرات donor و recipient در پروسه conjugation باکتریایی می‌باشد. Pili در (شکل ۱ - ۱۶) ارائه گردیده که در آن pili جنسی توسط ذرات فاژ پوشیده شده که برای آن منحنیت رسپتورهای خاص فعالیت می‌نمایند. مالیکول های pilin به شکل فنرمانند ترتیب یافته و یک سلندر مستقیم را تشکیل می‌دهند که قادر به چرخش نبوده و فاقد قاعده کامل می‌باشد.

Virulence باکتری های معین پتوجن نه تنها مربوط تولید توکسین می‌باشد؛ بلکه "colonization antigens" نیز در آن رول دارد. و چنین دریافت گردیده که انتیجن های متذکره عبارت از pili های معمولی و مسئول تامین خاصیت چسپندگی می‌باشند. در اشکال E.coli enteropathogenic هر دو خاصیت یعنی تولید توکسین و انتیجن های (pili) colonization از نقطه نظر جنیتیک توسط پلازمیدهای قابل انتقال تعیین می‌گردند.

در یک گروه coccus های گرام مثبت یعنی streptococc ها، fimbriae محل انتیجن عمده سطحی یعنی M protein می‌باشد. Lipoteichoic acid مترافق با این fimbria ها مسئول چسپیدن گروه streptococc A ها به حجرات اپیتیل میزبان می‌باشد.

Pili در باکتریای مختلفه از نقطه نظر انتیجینیک از همدیگر متمایز بوده که باعث تشکل انتی بادی در میزبان می‌گردند. انتی بادی ها در مقابل pili یک نوع باکتری باعث جلوگیری از اتصال نوع دیگر نخواهد گردید. بعضی باکتریها مثلاً gonorrhoeae، قادر اند تا pili با انتیجینهای متفاوت را تولید نماید (دگرگونی انتیجینیک) و بنابراین در موجودیت انتی بادی ها در مقابل انواع قبلی pili، نیز می‌توانند به حجرات اتصال یابند.

اندوسپور ها (Endospores)

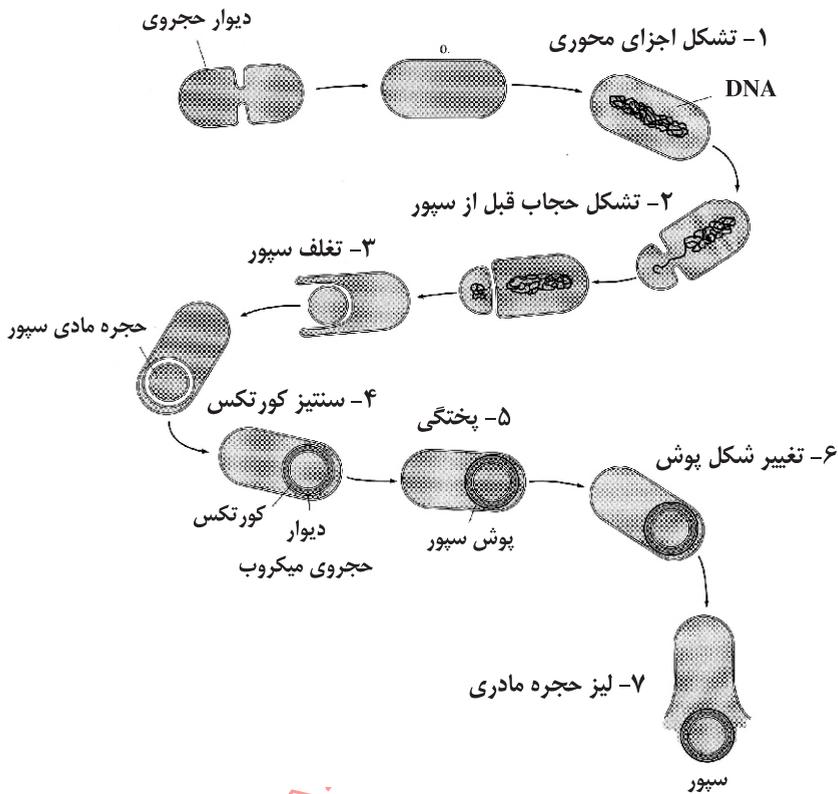
باکتری های چندین جنس قادر به تشکل endospore می‌باشند. دو نوع بسیار معمول آن قرار ذیل اند: rod های گرام مثبت، که شامل باسیل های جنس ایروبییک اجباری و clostridium جنس انیروبییک اجباری می‌باشند و coccus های گرام مثبت sporosarcina و احتمالاً عامل ریکیتسیایی Q-fever، Coxiella burnetii می‌باشند. اورگانیزم‌های فوق در عکس العمل با شرایط محیطی یک سلسله تغییراتی را از خود نشان می‌دهند طوریکه: در شرایط فقدان غذایی هر حجره یک سپور واحد داخلی را می‌سازد که در صورت اوتولیز حجره مادری،

آزاد می‌گردد. سپور یک حجره در حال استراحت بوده که در مقابل خشکی، حرارت و مواد کیمیای شدیداً مقاوم می‌باشد، در صورت مساعد شدن شرایط غذایی دوباره فعال گردیده و سپور یک حجره واحد نباتی vegetative را تولید می‌نماید و یا به عباره دیگر سپور ها عبارت از اجسام مدور یا بیضوی اند که در داخل حجره باکتری تشکیل گردیده که از جمله خصوصیت ارثی بعضی از مایکرواورگانیزم‌ها محسوب شده که در مرحله معین از تکامل حیاتی مایکرواورگانیزم‌ها صورت گرفته باعث مقاومت و قدرت حیاتی بیشتر شان به مقابل حوادث خارجی می‌گردد.

الف: تولید سپور (Sporulation):

پروسه تولید سپور زمانی آغاز می‌گردد که شرایط غذایی نامساعد گردد، فقدان منابع نایتروجن یا کاربن (و یا هر دو) عامل عمده شمرده می‌شود. تولید سپور به صورت کتلوی در کلچرهای واقع می‌گردد که مرحله نشونما را به نسبت این فقدان پایان داده اند. تولید سپور در بر گیرنده تولید تعداد زیادی ساختمان ها، انزایم ها و میتابولیت های جدید و از بین رفتن بسیاری اجزای نباتی حجره می‌باشد. این تغییرات یک پروسه واقعی تفریق پذیری را نشان می‌دهد: یک سلسله جین‌هایی که تولیدات آنها شکل و ترکیب نهایی سپور را تعیین می‌نمایند فعال گردیده و در عین حال سلسله دیگر جین‌ها که مسؤول وظایف نباتی حجره می‌باشند غیرفعال می‌گردد. این تغییرات باعث دگرگون نمودن خصوصیت ترانسکریپشن RNA polymerase گردیده، که بواسطه یکجاشدن پروتین اساسی پولیمیر با یکی از پروتین‌های promoter- specific که به نام فکتور سگما یاد می‌شود صورت می‌گیرد. فکتورهای مختلفه سگما در جریان نشونمای نباتی و تولید سپور تولید می‌گردند.

سلسله تولید سپور بسیار مغلق می‌باشد: تفریق پذیری حجره نباتی B subtilis به یک endospore تقریباً 7 ساعت را در شرایط لابراتوار در بر می‌گیرد. درین پروسه وقایع مختلفه مورفولوژیک و کیمیای طی مراحل متوالی صورت می‌گیرند. هفت مرحله مختلفه تشخیص گردیده اند. در جریان پروسه بعضی باکتری ها انتی بیوتیک های پیتایدی را آزاد می‌سازند که ممکن در تنظیم sporogenesis نقش داشته باشند.



شکل ۱- ۱۷ مراحل تشکیل سپور

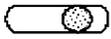
از نظر مورفولوژی تولید سپور با تولید یک filament قاعدوی آغاز می‌گردد (شکل ۱- ۱۷) این پروسه با قات شدن غشای بطرف داخل آغاز شده و یک ساختمان مضاعف غشایی را به میان می‌آورد که سطوح آن شباهت به سطح سنتیز کننده دیوار حجروی لفاف حجروی دارد. نقاط نمونکننده طور پیشرونده بطرف قطب حجره پیش رفته و سپور در حال انکشاف را احاطه می‌نماید. این دو غشای سپور بعداً در سنتیز فعال طبقات خاص حصه می‌گیرند که لفاف حجروی را تشکیل می‌دهند. دیوار سپور و کورتکس میان غشاهای مقابل هم قرار دارند. *coat* و *exosporium* در خارج از غشاهای مقابل قرار دارند. در سایتوپلازم جدید تشکیل و یا *core* بسیاری انزایم‌های نباتی حجرات کاهش یافته و توسط یک سیت از اجزای تشکیل دهنده خاص سپور تعویض می‌گردند. سپور ها از نظر موقعیت خود در حجره *bacill* به اشکال ذیل تصدیف می‌گردد:



۱- سپورهایی که موقعیت مرکزی دارند مانند *baullus anthracis*



۲- سپور هایی که موقعیت نهایی دارند مانند *clastridium tetani*



۳- سپورهایی که موقعیت تحت نهایی دارند مانند *clostridium botulinum*

ب: خصوصیات اندوسپور

۱- کور (Core): عبارت از پروتوبلاست سپور می باشد. که دارای یک هسته کامل (کروموزومها)، تمام اجزای مربوط به جهاز سنتز پروتین و سیستم تولید انرژی ذریعه عملیه *glycolysis* می باشد. سائتوکروم ها حتی در انواع ایروبییک کمبود می باشند، که سپورهایی این انواع متکی به *Electron transport pathway* مختصر حاوی *flavoprotein* ها می باشد. یکعده انزایمهای حجرات نباتی طور مقداری ازدیاد می یابد (مثلاً *alanine recemase*) و یک عده انزایمهای بالخاصه (مثلاً *dipicolinic acid synthetase*) تشکیل می یابند. انرژی لازم برای نشونما به غرض *ATP* به شکل *3-phosphoglycerate* ذخیره می گردد.

مقاومت سپورها در مقابل حرارت قسملاً به نسبت حالت *dehydrate* آنها و قسملاً به نسبت موجودیت مقادیر زیاد *calcium dipicolinate* (5-15% وزن خشک سپور) می باشد، که اخیرالذکر در *lysine biosynthetic pathway* از یک میانجی به میان می آید. به طرق که تا هنوز بخوبی دانسته نشده اند، خصوصیات متذکره باعث ثبات به انزایمهای سپور می گردند، که اکثریت آنها زمانیکه از حجره به شکل محلول تجزید گردند در مقابل حرارت به صورت نورمال غیر مقاوم می باشد.

۲- دیوار سپور: داخلی ترین طبقه ایکه غشای داخلی سپور را احاطه می نماید به نام دیوار سپور یاد می گردد. که دارای پپتیدوگلاایکان نورمال بوده و به دیوار حجروی حجرات نباتی نشونما کننده تبدیل می شود.

۳- کورتکس *cortex* ضخیم ترین طبقه لفاف سپور می باشد. که دارای یک شکل غیرمعمول پپتیدوگلاایکان می باشد و حاوی رابطه های متقابل کمتر نظر به پپتیدوگلاایکان دیوار حجروی می باشد. پپتیدوگلاایکان کورتکس در مقابل *lysozyme* نهایت حساس بوده، که اوتولیز آن در نشونمای سپور نقش دارد.

۴- پوش یا *coat* از یکنوع پروتین کراتین مانند ترکیب گردیده که دارای تعداد زیاد رابطه های *disulfide* داخل مالیکولی می باشند. خاصیت غیرقابل نفوذیه این طبقه باعث می گردد که سپور در مقابل مواد کیمیایی ضد باکتریایی مقاومت نسبی نشان دهد.

۵- *Exosporium*: اگزوسپوریوم عبارت از یک غشای لیپوپروتینی دارای یک اندازه کاربوهایدريت می‌باشد.

• فعالیت: بسیاری اندوسپورها قادر نیستند تا بعد از تشکل به صورت فوری به فعالیت آغاز نمایند، ولی پس از استراحت چند روزه و یا فعال شدن برای بار اول در یک وسط غنی مغذی پس از تخریب پوش سپور توسط یکی از عوامل می‌توانند به شکل فعال در آیند. از جمله عاملین که بالای سپور به صورت دراماتیک غلبه حاصل می‌نمایند یکی حرارت، تخریش، اسیدی بودن و مرکبات دارنده گروپ های آزاد *sulphydryl* می‌باشند.

• *Initiation*: پس از فعال شدن در صورت مساعد بودن شرایط محیطی سپور *germination* را آغاز می‌نماید. انواع مختلفه آخذه هایی را دارند که قادر به تفکیک سنگنال های وسط مغذی می‌باشند، بنا برین، در یک نوع آغاز فعالیت توسط *L-alanine* و در نوع دیگر توسط *adenosine* تحریک می‌گردند. اتصال به *effector* باعث فعال شدن یک نوع *autolysin* گردیده که به سرعت پپتیدوگلائیکان کورتکس را می‌شکند. آب گرفته شده و *calcium dipicolinate* آزاد ساخته می‌شود، و یکتعداد دیگر مواد متشکله سپور توسط انزایم‌های هایدرولازینیک شکستنده می‌شوند.

• *Outgrowth*: تجزیه کورتکس و طبقات خارجی باعث به میان آمدن یک حجره جدید نباتی می‌گردد که مشتمل بر پروتوپلاست سپور با دیوار احاطه کننده آن می‌باشد. یک دوره بیوسنتز فعال طی می‌گردد که با انقسام حجروی خاتمه می‌یابد این دوره به نام *outgrowth* یاد می‌گردد. *Outgrowth* موجودیت تمام مواد مغذی اساسی برای نشونمای حجره را ایجاب می‌نماید.



تلوین Staining

مواد ملونه با پروتوپلازم باکتریایی طور کیمیای ترکیب می‌گردند، در صورتیکه قبلاً زنده باشد، پروسه تلوین باعث مرگ آن می‌گردد. ازینرو این پروسه دارای اثر بوده و ممکن تغییرات مصنوعی *artifact* را سبب شود.

مواد ملونه ایکه بیشتر معمول اند عبارت از نمک ها می‌باشند. مواد ملونه قلعوی متشکل از یک کتیون رنگه و یک انیون بیرنگ می‌باشد (طور مثال *methylene blue+ chloride*): مواد ملونه اسیدی برعکس آن می‌باشند (طور مثال *sodium+ eosinate*). حجرات باکتریایی از نقطه نظر داشتن اسیدهای هستوی غنی می‌باشند این نوکلئیک اسیدها حامل چارج منفی به

شکل گروپ های فوسفات می‌باشند که با چارج های مثبت رنگهای قلوی ترکیب می‌گردند. رنگهای اسیدی حجرات باکتریایی را تلوین نمی‌کنند و بنابراین برای تلوین مواد محیطی یا اطراف باکتری به کار می‌روند که باعث تولید یک رنگ متباین می‌گردد. رنگهای قلوی حجرات باکتریایی را طور همسان تلوین می‌نمایند مگر اینکه RNA سایتوپلازمیک قبلاً به تخریب مواجه گردیده باشد. تخنیک های خاص تلوین به کار می‌روند تا بوسیله آن فلاجیل، کپسول، دیوار حجروی، غشای حجروی، گرانول ها، هسته و سپور متمایز گردند.

تلوین گرام Gram stain

تلوین گرام در سال 1884 میلادی توسط Hans cristian Gram مایکروبیولوژیست دنمارکی به‌میان آمد و به اساس این تلوین تمام مایکرواورگانیزم‌ها به دو گروپ Gram positive و Gram negative تقسیم می‌شوند علت این واکنش ارتباط به ساختمان کیمیایی دیوار حجروی دارد. دیوار حجروی باکتری‌های گرام منفی مقدار بیشتر لیپید را احتوا نموده و مقدار کمپلکس murien آن کم می‌باشد و همچنان ضخامت آن از دیوار حجروی باکتری‌های گرام مثبت کمتر است (ضخامت دیوار حجروی باکتری‌های گرام مثبت $100-500 \text{ \AA}$ ، درحالیکه این دیوار در باکتری‌های گرام منفی $100-150 \text{ \AA}$ می‌باشد) الکل غلیظ دیوار حجروی باکتری‌های گرام منفی را حل نموده یا تغییر ساختمان می‌دهد در نتیجه فرار Complex کرسنال Gension Violet را از حجره میسر ساخته در نتیجه باکتری‌های گرام منفی رنگ Carbol fuchsin را به خود گرفته و به رنگ سرخ دیده می‌شود.

تلوین Acid-Fast

باکتری های acid-fast عبارت از آن نوع باکتری می‌باشند که رنگ carbol fuchsin (fuchsin قلوی در محلول فینول - الکل - آب منحل می‌گردد) را حتی بعد از مواجه شدن با ماده بیرنگ کننده هایدروکلوریک اسید الکل حفظ می‌کنند. ابتداء سمیر حجرات یک سلاید در محلول carbol fuchsin مغطوس شده و بعداً با بخار حرارت مواجه ساخته می‌شود. به تعقیب آن عملیه بیرنگ سازی توسط acid-alcohol بالای آن تطبیق می‌گردد و بالاخره یک رنگ مخالف (آبی یا سبز) به آن علاوه می‌گردد. باکتری‌های acid-fast (مایکوباکتری‌ها و بعضی

انواع actinomycete های مربوطه) رنگ سرخ را به خود اختیار می کنند و بقیه رنگ مخالف را به خود می گیرند.

تهیه، تثبیت و تلوین سمیر

توسط یک قلم الماس بالای یک سلاید مایکروسکوپ یک دایره به قطر ۱,۲ تا ۱,۵ سانتیمتر رسم کشیده و نمره ای لابراتوار را در قسمت تباشیری آن می نویسیم، سلاید را پاک نموده بالای شعله آتش قرار می دهیم. نمونه را به صورت متجانس در دایره هموار نموده، احتیاط می نماییم که دست را به شدت شور ندهیم که می تواند سبب تولید ابروسول (aerosol) گردد. مایعات مخاطی مانند مایع بین پلورا، حبن و غیره را سانتریفیوژ نموده مایع بالائی آن دور می شود. رسوب آن با یک قطره ای آخری آن مخلوط می گردد، یک لوپ ازین مخلوط در بین دایره هموار می گردد.

مواد قیچی توسط یک لوپ معقم بسیار نازک در دایره هموار می گردد یا در داخل دایره با یک لوپ آب مقطر به شکل Emulsion آورده شده در آن هموار می شود.

سواب ها به بسیار ملایمت در قسمت وسط سلاید لول داده می شود، سلایدی که با غوطه کردن در الکل و شعله قبلاً ضد عفونی شده باشد. انسان باید محتاط باشد و سواب را بالای سلاید کش نکند، زیرا این کار حجات را تخریب می کند. بگذارید سلاید در هوا خشک شود یا برای زود خشک شدن زیر چراغ آنرا بگذارید.

وقتیکه سلاید به صورت مکمل خشک گردید با دو یا سه مرتبه به سرعت گذشتاندن از داخل شعله ای چراغ Bunsen آنرا با حرارت تثبیت کنید. از حرارت دادن زیاد خودداری کنید، زیرا این کار باعث نتیجه ای غلط تلوین Gram و تغییر شکل حجات می گردد. بگذارید که سلاید سرد شود.

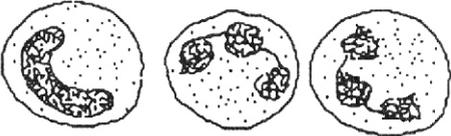
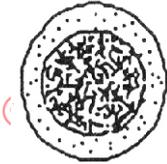
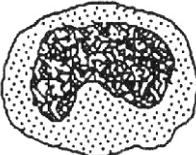
طریقه تلوین با میتیلین بلو (Methylene Blue Staining Method)

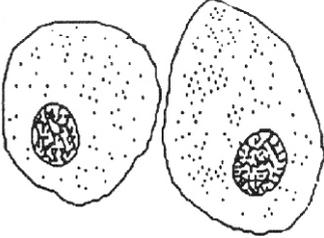
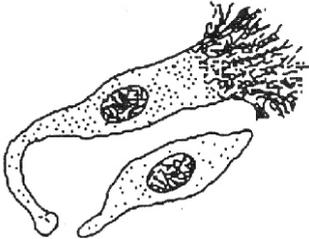
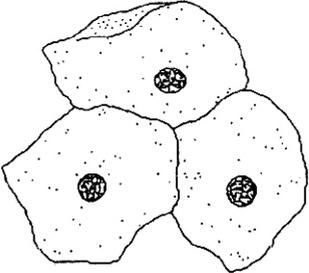
- ۱- بعد از تثبیت بالای سلاید مقدار کافی محلول رنگ میتیلین بلو (D113) باندازید.
- ۲- بگذارید که رنگ برای ۱ تا 3 دقیقه عمل نماید.
- ۳- رنگ را از بالای سلاید دور ساخته سلاید را به ملایمت طوری در آب بشوئید که عقب سلاید به طرف جریان ملایم آب باشد.

۴- عقب سلاید را با کاغذ جاذب پاک نموده در Rack آنرا بگذارید تا آب آن جریان نموده در هوا خشک شود.

۵- توسط اوبجکتیف Oil Immersion سلاید را معاینه کنید.

۶- در راپور موجودیت و تعداد حجرات قیحی را و باکتری‌ها را که آیا نادر اند یا به تعداد کم و یا بسیار زیاد یا متوسط موجود اند ذکر نمائید. همچنان شکل آنها را که به شکل Rods یا Cocci اند راپور بدهید.

<p>نوع حجره Cell type</p>	<p>خواص ساختمانی Morphological Characteristics</p>
<p>گرانولوسیت‌ها The granulocyte</p> 	<p>جسامت: 12-16 میکرومتر هسته: در شکل جوان به شکل U و در شکل پخته پارچه - پارچه می‌باشد. تعداد پارچه‌ها از 2 تا 5 بوده که با تارهای نازک باهم وصل می‌باشند.</p>
<p>لمفوسیت‌ها The lymphocyte</p> 	<p>نوع بزرگ: جسامت: 12-16 میکرومتر سایتوپلازم. هسته: مدور با کمی فرو رفتگی نوع کوچک: جسامت 9-12 میکرومتر سایتوپلازم هسته مدور</p>
<p>مونوسیت یا ماکروفاژ The monocyte or macrophage</p> 	<p>جسامت: 15-18 میکرومتر سایتوپلازم هسته</p>

<p>حجرات اپیتل انتقالی Transitional epithelial cells</p> 	<p>جسامت: 18-45 میکرومتر شکل: ناک مانند یا دوک چوب مانند. می‌تواند مدور دم دار باشد. سایتوپلازم: هسته: نسبتاً کوچک، بیضوی یا مدور</p>
<p>حجرات اپیتل تیوبولر Tubular epithelial cells</p> 	<p>جسامت: 18-32 میکرومتر شکل: طویل دوک مانند چوب مانند یا مکعبی بعضی اوقات Ciliated یا with brush border سایتوپلازم هسته: بیضوی</p>
<p>حجرات اپیتل هموار Squamous epithelial cells</p> 	<p>جسامت: 22-45 میکرومتر شکل: بزرگ، هموار، زاویه دار، می‌تواند قات شود، حتی به شکل سیگار شود. سایتوپلازم: فراوان هسته کوچک و مدور</p>

طریقه تلونین گرام (Gram Staining Method)

۱- بعد از تثبیت توسط حرارت بالای سلاید مقدار کافی گرام کریستال ویولیت Gram's

crystal Violet (D109) برای یک دقیقه بریزید.

۲- سلاید را توسط آب بشوئید طوری که پشت سلاید را به مقابل یک جریان آب ملایم

بگیرید.

- ۳- تمام آب را چپه کنید و سلاید را با گرام آیودین (Logul) (D110) برای یک دقیقه بپوشانید.
 - ۴- محلول آئودین را با آب بشوئید طوری که عقب سلاید را بمقابل یک جریان ملایم آب بگیرید.
 - ۵- رنگ سلاید را توسط الکل به (مدت 20 تا 30 ثانیه بریدیا توسط چند قطره اسیتون به مدت 2 تا 3 ثانیه) و فوراً توسط یک جریان ملایم آب سلاید را بشوئید.
 - ۶- سلاید را با محلول رقیق Carbol fuchsin stain (D107) بپوشانید. بعد از یک دقیقه سلاید را توسط آب بشوئید طوری که عقب سلاید را به مقابل یک جریان ملایم آب بگیرید.
 - ۷- عقب سلاید را توسط کاغذ جاذب خشک کنید و بالای Rack آنرا بگذارید تا در هوا خشک شود.
 - ۸- توسط اوبجکتیف قوه ای ضعیف تمام سلاید را معاینه کنید و مناسبترین جای سلاید را برای معاینه توسط اوبجکتیف ایل ایمرشن انتخاب کنید.
- بنفش تیره باکتری‌های گرام مثبت Gram Positive bacteria
 سرخ باکتری‌های گرام منفی Gram Negative bacteria
 سایتوپلازم سرخ خفیف، هسته سرخ تیره حشرات قیچی Pus Cells
 سایتوپلازم سرخ خفیف، هسته سرخ تیره حشرات اپیتل Epithelial Cells
 بنفش تیره حشرات خمیر مایه Yeasts
- طریقه تلوین البرتس (Albert's Staining Method)**
- ۱- بعد از تثبیت با حرارت مقدار کافی Albert's stain (D104) برای ۳ تا ۵ دقیقه بالای سلاید باندازید.
 - ۲- سلاید را با آب بشوئید طوری که پشت سلاید به طرف یک جریان ملایم آب قرار داشته باشد.
 - ۳- آب را دور نموده بالای سلاید مقدار کافی (Gram's iodine 110) باندازید و بگذارید برای یک دقیقه تعامل نماید.
 - ۴- سلاید را با آب بشوئید طوری که پشت سلاید به طرف یک جریان ملایم آب باشد. پشت سلاید را همراهی کاغذ جاذب پاک نموده بگذارید در هوا خشک شود.
 - ۵- سلاید را توسط اوبجکتیف ایل ایمرشن معاینه کنید.

نتیجه

حجرات باکتری‌ها	سبز
خط‌های عرضانی حجرات باکتری	آبی - سبز
گرانول‌های میتاکروماتیک	نصواری سیاه تیره

تلوین Acid - Fast

باکتری‌های acid-fast عبارت از آن نوع باکتری می‌باشند که رنگ carbolfuchsin (fuchsin) قلوی در محلول فینول - الکل - آب منحل می‌گردد) راحتی بعد از مواجه شدن با ماده بیرنگ کنند.

هایدروکلوریک اسید الکل را حفظ می‌کنند. ابتدا سمیر حجرات یک سلاید در محلول carbolfuchsin مغطوس شده و بعداً با بخار حرارت مواجه ساخته می‌شود. به تعقیب آن عملیه بیرنگ سازی توسط acid-alcohol بالای آن تطبیق می‌گردد، و بالاخره یک رنگ مخالف (آبی یا سبز) به آن علاوه می‌گردد.

باکتری‌های acid-fast (مایکوباکتری‌ها و بعضی انواع actinomycete های مربوطه) رنگ سرخ را به خود اختیار می‌کنند و بقیه رنگ مخالف را به خود می‌گیرند.

طریقه تلوین سرد زیل نیلسن (Cold Ziehl- Neelsen Staining Method)

۱- بعد از تثبیت با حرارت یک کاغذ فلتر را که کمی خوردتر از سلاید باشد بالای سلاید بگذارید که smear را بیوشاند.

۲- بالای سلاید به اندازه کافی Cold Ziehl- Neelsen Stain (D115) برای سه دقیقه باندازید.

۳- کاغذ فلتر را برداشته سلاید را با آب طوری بشوئید که عقب سلاید به طرف جریان ملایم آب باشد.

۴- رنگ سلاید را تا رنگ گلابی خفیف توسط acid alcohol (D 48) زایل نمائید. از یک طرف سلاید گرفته آنرا بالا و پائین نمائید تا بیشتر رنگ از آن جدا نه شود. این کار برای یک smear ضخیم به طور اوسط تقریباً سه دقیقه را در بر می‌گیرد. زایل نمودن رنگ به صورت مکمل ضروری است تا نتیجه مثبت کاذب نیاید.

۵- اسید الکل را طوری بشوئید که عقب سلاید به طرف جریان ملایم آب باشد.

۶- برای یک دقیقه سلاید را با Malachite-green (D 112) تلوین نمائید.

۷- سلاید را آبکش نموده عقب سلاید را توسط کاغذ جاذب پاک کرده در هوا خشک کنید.

نتیجه

باسیل‌های اسید فاست سرخ روشن
 باسیل‌های غیر اسید فاست سبز تاریک

طریقه تلوین گیمزا (Giemsa Staining Method)

۱. سمیر (Smear) خشک شده را برای 2 تا 3 دقیقه با methanol پوشانیده و بعد آنرا بگذارید تا در هوا خشک شود. به این صورت سمیر تثبیت می‌گردد.

۲. محلول Giemsa stain (D 108) را با buffered water, pH 7.2 (D 58) ذیلاً رقیق نمائید:

برای C. trachomatis 40:1 یعنی یک ملی لیتر رنگ گیمزا 40 ملی لیتر بفر.

برای پرازیت‌های خون 10:4 یعنی 4 ملی لیتر رنگ گیمزا 40 ملی لیتر بفر.

۳. محلول رقیق شده ای گیمزا را بالای سلاید در یک staining جار باندازید تا سمیر را بپوشاند.

۳. سمیر را در داخل رنگ قرار ذیل بگذارید:

C. trachomatis را برای 1.5 تا 2 ساعت و پرازیت‌های خون را برای 25 تا 30 دقیقه.

۴. ستینینگ جار را در لگن دستشوئی گذاشته و آب نل را بالای آن جاری سازید تا کف آن از جار سر ریزه کند. این کار باعث می‌شود تا گرانول‌های رنگ در بالای سمیر رسوب نکند.

۵. سلاید را در جار "jar" در آب نل بشوئید، پشت آنرا با کاغذ جاذب پاک کرده در Rack آنرا بگذارید تا در هوا خشک شود.

۶. تلوین را با استفاده از اوبجکتیف قوه ای ضعیف مایکروسکوپ چک نموده بعد با اوبجکتیف آیل ایمرشن معاینه کنید.

Bacteria shape شکل باکتری‌ها	Gram reaction تعامل گرام	Morphology ساختمان	Genus جنس
	Gram + گرام مثبت	Cocci in clusters کوکس‌های خوشه‌ای	Staphylococci
	Gram + گرام مثبت	Cocci in chains کوکس‌های زنجیری	Streptococci
	Gram + گرام مثبت	Oval diplococci with or without capsules دیلوکوک‌های بیضوی	Pneumococci
	Gram – گرام منفی	Diplococci	Neisseria
	Gram + گرام مثبت	Diphtheroids (like Chinese letters) دیفترئوید مانند حروف چینی	Corynebacterium
	Gram + گرام مثبت	Branching chains زنجیرهای شاخه‌دار	Lactobacillus
	Gram + گرام مثبت	Rods with spores چوبک باسپور	Bacillus
	Gram + گرام مثبت	Rods with terminal or sub terminal spores چوبکها با اسپورهای نهائی یا در وسط	Clostridium
	Gram + گرام مثبت	True branching rods چوبک‌های شاخه‌دار حقیقی	Actinomyces
	Gram – گرام منفی	Uniform rods of various length & thickness	Enterobacteria ceae & other genus
	Gram – گرام منفی	Spindle-shaped rods چوبک‌های دوک‌مانند	Fusobacterium

	Gram – گرام منفی	Comma-shaped rods چوبک های به شکل کامه	Vibrio
	Gram + گرام مثبت	Budding yeasts خمیر مایه جوانه زده	Candida & other yeasts

تلوین منفی (Negative Staining)

این عملیه مشتمل بر تلوین محیط یا اطراف توسط یک رنگ اسیدی می‌باشد که حجرات را به شکل بیرنگ نمایان می‌سازد. معمولاً رنگ سیاه nitrosin مورد استفاده قرار می‌گیرد. ازین میتود برای تلوین حجرات و یا ساختمانهایی مورد استفاده قرار می‌گیرد که طور مستقیم تلوین آنها مشکل باشد.

تلوین فلاجیل

فلاجیل ها ساختمانهای بسیار باریک اند (دارای قطر 12-30µm) و بوسیله مایکروسکوپ نوری قابل رویت نمی‌باشند. با وجود آن، موجودیت و ترتیب آنها با مواجه ساختن حجرات با سسپنشن کلوئیدی بی ثبات نمک های tanic acid واضح می‌گردد. با بکار برد عملیه متذکره رسوب زیاد بالای دیوار حجروی و فلاجیل به میان می‌آید. بدین ترتیب قطر ظاهری فلاجیل به اندازه یی ازدیاد می‌یابد که با تطبیق تلوین fuchsin قوی در تحت مایکروسکوب نوری قابل مشاهده می‌گردد.

در باکتری های peritrichous، فلاجیلها حین حرکت به شکل بندل ها در می‌آیند، این بندل ها به اندازه کافی ضخامت داشته و مشاهده آن تحت مایکروسکوب ساحه تاریک و phase contrast صورت گرفته می‌تواند.

تلوین کپسول

توسط عملیه تلوین منفی و یا معادل آن به مشاهده می‌رسد. یکی از میتودهای تلوین کپسول عبارت از (Welch Method) می‌باشد که در آن از محلول crystal violet استفاده شده و به تعقیب آن با محلول copper sulfate شستشو می‌گردد. محلول اخیرالذکر برای از بین بردن رنگ اضافی بکار می‌رود زیرا شستن با آب باعث منحل کردن کپسول خواهد شد. علاوه‌تاً نمک مس به اطراف نیز رنگ می‌دهد که بالتیجه حجره و محیط اطراف آن رنگ آبی تیره را به خود اختیار نموده در حالیکه کپسول دارای رنگ آبی خفیف تر خواهد بود.

تلوین هسته

هسته‌ها توسط رنگ feulgen که مختص به DNA می‌باشد قابل تلوین می‌باشند.

تلوین سپور

سپورها اکثر اوقات در حجره تلوین ناشده به شکل اجسام روشن داخل حجروی و در حجره تلوین شده به شکل یک ساحه بیرنگ به مشاهده می‌رسند. دیوار سپور نسبتاً طور نسبی غیرقابل نفوذیه می‌باشد؛ ولی رنگ‌هایی موجود اند که با حرارت دادن مستحضر، قادر به نفوذ در آن می‌گردند. عین قابلیت غیرقابل نفوذیه بعداً در قسمت جلوگیری از بیرنگ ساختن سپور حین مواجه کردن آن با الکل نقش دارد در حالیکه با عین میتود حجرات نباتی بیرنگ ساخته شده و بالاخره با رنگ مخالف تلوین گردیده می‌تواند. سپورها معمولاً با رنگ‌های malachite green و یا carbolfuchsin تلوین می‌گردند.

تغییرات مورفولوژیک حین نشونما

انقسام حجروی

به صورت عموم، باکتری‌ها ذریعه عملیه انقسام دوگانه تکثر می‌نمایند. متعاقب طویل شدن حجره، یک غشای مستعرض حجروی تشکل و بعداً دیوار جدید حجروی را به میان می‌آورد. در باکتری‌ها، غشای مستعرض و دیوار جدیدالتشکیل از طبقات خارجی به طرف داخل نشونما نموده درین پروسه میوزوم‌های جداری طور صمیمی اشتراک دارند. هسته که قبل از انقسام دوچند گردیده است، به صورت مساویانه به دو حجره دختری تقسیم می‌گردد.

اگرچه باکتری‌ها فاقد دوک میتوتیک یا (mitotic spindle) اند، ولی غشای مستعرض به نحوی تشکل می‌یابد که کروموزوم‌ای تشکیل شده در اثر chromosomal replication را از همدیگر جدا می‌سازد. این پروسه با التصاق کروموزوم‌ها به غشای حجروی تکمیل می‌گردد. مطابق به یک مودل، اتمام یک سیکل DNA replication سنتیز فعال غشا را در بین نواحی التصاق دو کروموزوم دختری به میان می‌آورد که بوسیله نموی غشای مستعرض به طرف داخل از هم جدا می‌گردند. ذخیره مواد در دیوار حجروی جدیدالتشکیل ادامه یافته و منتج به طویل شدن و بالاخره تضاعف لفاف حجروی می‌گردد.

دسته بندی حجره

اگر حجرات بعد از انقسام موقتاً باهم چسبیده باقی بمانند، دسته بندی ها با مشخصات معین به میان می آیند. مطابق به پلان انقسام و دفعات انقسام که در آن حجرات باهم چسبیده باقی می مانند، اشکال ذیل در coccus ها حاصل می گردند: زنجیری (ستریپتوکوکس)، جوهره یی (نوموکوکس)، بندل های مکعبی (sarcinae) و یا پلک های هموار. Rod ها ممکن جوهره ها و یا زنجیرها را تشکیل دهند.

متعاقب انشقاق در بعضی باکتری ها حرکات خاص پس از انشقاق صورت می گیرند. طور مثال حرکت شلاق مانند یا whipping حجرات را به موقعیت های موازی در می آورند؛ انقسام مکرر و حرکات شلاق مانند منتج به خصوصیت ترکیب pallisading در باسیل های دیفتتری می گردد.

تغییرات در سیکل حیاتی

در جریان انکشاف باکتری از شکل ساکن به شکل محرک، یکتعداد تغییرات معین قابل رویت به میان می آیند. حجرات تمایل به بزرگ شدن داشته، گرانول ها را از دست داده و پروتوپلازم با مواد ملونه قلوی رنگ تاریک تر را به خود می گیرد. زمانیکه نشونما دوباره آهسته گردد، تغییرات مخالف به صورت تدریجی به میان می آیند. بالاخره، در کلچرهای کهنه حجراتی دریافت می گردند که دارای مورفولوژی غیرمعمول می باشند این اشکال به نام involution forms یاد می گردند. چنین حجرات دارای فلامنت ها، جوانه ها، حجرات شاخوی بوده که اکثر شان زنده نمی باشند.

تصنيف باکتری ها

تعريفات: تصنيف، نامگذاری و تشخیص عبارت از سه عرصه مجزا، ولی باهم مرتبط در علم تکسانومی می باشند. تصنيف عبارت از تنظيم اورگانیزم‌ها به اساس شباهت ها و روابط به داخل گروپ های توکسانومیک می باشد. تصنيف اورگانیزم‌های پروکاریوتیک مانند باکتریها مستلزم معلوماتی می باشد که به صورت تجربوی و نیز بشکل نظری به دست آید، زیرا مشخصات بیوشمیک، فزیولوژیک، جنتیک و مورفولوژیک اکثراً برای توضیح کافی گروپ های توکسانومیک لازم می باشند. نامگذاری عبارت از تعیین نام اورگانیزم‌ها به اساس قواعد بین

المللی و در مطابقت با مشخصات همان اورگانیزم می‌باشد. تشخیص عبارت از استفاده عملی از تصنیف جهت نیل به اهداف ذیل می‌باشد:

- ۱- تجرید و تفکیک اورگانیزم‌های مطلوب از غیر مطلوب
- ۲- تصدیق و تأیید خواص اورگانیزم در کشت و یا در حالات کلینیکی
- ۳- تجرید و تشخیص عوامل سببی امراض. هدف اخیر الذکر ممکن تعیین تداوی انتخابی را جهت محو اورگانیزم مساعد سازد. عملیه تشخیص صرف بعد از تصنیف مناسب یک گروه ممکن می‌باشد.

معیارات تصنیف باکتری

معیارات مناسب برای تصنیف باکتری مشتمل بر عده زیادی از مشخصات ذکر شده در فوق می‌باشد. معلومات مفیدی را می‌توان ذریعه معاینه مایکروسکوپی و مشاهده شکل حجره و موجودیت و یا عدم موجودیت ساختمانهای بخصوص مانند سپور و فلاجیل فراهم نمود. پروسیجرهای تلوین مانند تلوین گرام در مورد ماهیت حجره معلوماتی مفیدی ارایه نموده می‌تواند. عده از باکتریها سبب تولید صباغات وصفی گردیده و عده دیگر به اساس انزایم‌های خارج الحجروی خود تشخیص می‌گردد. فعالیت این پروتین‌ها را اکثراً می‌توان به شکل ساحات شفاف در اطراف کالونیهای که در موجودیت مواد غیر قابل حل روئیده باشد، دریافت نمود. (مثلاً هیمولیز در وسط اگر که حاوی حجرات سرخ خون باشد). تعاملات متصالبه ایمنونولوژیک می‌تواند در مورد ساختمان‌های سطحی مشابه در باکتریهای متفاوت معلومات دهد. تست‌های مانند تست اوکسیداز که در آن از *electron acceptor* مصنوعی استفاده به عمل می‌آید، جهت تفکیک اورگانیزم‌ها به اساس موجودیت انزایم تنفسی (*cytochrome C*) استعمال می‌گردد. تست‌های ساده بیوشمیک می‌تواند در مورد موجودیت فعالیت‌های مشخص میتابولیک معلومات موثق دهد. معیارات تعیین موفقانه گروه باکتریهای مرتبط با هم، مشتمل بر اندازه گیری حساسیت آنها در مقابل آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد.

همه مشخصات قبل الذکر توسط جین‌های اورگانیزم‌های مورد معاینه به صورت مستقیم و یا غیر مستقیم تعیین می‌گردد. انکشافات و پیشرفت‌های در عرصه بیولوژی مالیکولی ممکن می‌سازد تا مرتبط بودن جین‌های انواع مختلفه باکتری‌ها را مورد تحقیق قرار دهیم.

اهمیت معیارات توکسانومیک بستگی به گروه مورد معاینه دارد. مشخصاتی که در اعضای یک گروه به صورت مشترک موجود باشد، برای تفکیک اعضای آن مفید نمی‌باشد، اما می‌توان گروه را توسط آن تعریف نمود، (مثلاً همه ستافیلوکوک‌ها انزایم کتلاز را تولید می‌نمایند.) علاوتاً بی‌ثباتی

جنیتیک می‌تواند سبب تغییرپذیری زیادی در عده‌ای از اورگانیزم‌ها گردد، مثلاً جین‌های مقاومت در مقابل انتی‌بیوتیک‌ها و یا جین‌های کودکننده آنزیم‌ها توسط پلازمیدها انتقال یافته می‌تواند. (پلازمید عبارت از عناصر جنیتیک خارج از کروموزوم بوده که میان باکتری‌های غیر مرتبط تبادل‌گرددیده می‌تواند). اکثریت معیارات تصنیف به اساس نمودی مایکرواورگانیزم‌ها در لابراتوار استوار می‌باشد. بعضاً اورگانیزم‌های پتوجن مانده *treponema* در لابراتوار نمی‌رویند و در چنین حالات معاینات نوکلئیک اسیدها ممکن مفید باشد.

سیستم‌های تشخیص و تصنیف

کلیدها

کلیدها باکتری‌ها را به شیوه‌ی تنظیم می‌نماید که تشخیص مؤثر اورگانیزم‌ها را ممکن می‌سازد. یک سیستم تشخیصیه آیدیال باید کمترین مشخصات لازم برای تشخیص درست را در بر داشته باشد. گروه‌ها به اساس موجودیت (+) و یا عدم موجودیت (-) مشخصات تشخیصیه به گروه‌های فرعی تقسیم می‌گردد. ادامه پروسه با استفاده از مشخصات مختلفه محققین را قادر می‌سازد تا کوچکترین گروه فرعی مشتمل بر اورگانیزم مورد مطالعه را دریافت نماید. در مراحل ابتدایی ممکن گروه‌های فرعی تشکیل‌گردد که از نظر جنیتیک با هم مرتبط نباشد. مثلاً باکتری‌های که صباغ سرخ را تولید می‌نماید، گروهی را تشکیل می‌نمایند که باکتری‌های بسیار متفاوت مانند *Serratia marcescens* و باکتری فوتوستنتیتیک بنفش در آن شامل می‌باشد. دو نوع متذکره باکتری‌ها اشکال متفاوت داشته و به دو شکل کاملاً متفاوت میتابولیزم انرژی متکی می‌باشند. با آنهم تعیین مقدماتی گروه‌های باکتری مفید می‌باشد زیرا محققین را کمک می‌نماید تا با شناسایی کلچرهای دارنده صباغ سرخ جستجو خود را به چند نوع معین مایکروبی محدود سازد.

توکسانومی عددی

توکسانومی عددی یا کمیوتری در دهه ۱۹۶۰ مروج گردید. از تشخیص کمیوتری برای ساختن تست‌های تشخیصیه که در آن انواع کلینیکی مایکروب‌ها از طریق کودهای عددی و یا سیستم‌های probabilistic تشخیص می‌گردد، استفاده به عمل می‌آید.

تصنیف فایلوژنیک (Phylogentic classification)

Phylogentic classification عبارت از اندازه‌گیری *genetic divergence* در فایلم‌های مختلفه می‌باشد. ارتباط نزدیک phylogentic میان دو اورگانیزم وانمودکننده موجودیت اجداد مشترک

میان شان می‌باشد و معلومات حاصله از فوسیل‌ها چنین نظریات را در خصوص اکثریت نباتات و حیوانات آسان ساخته است. اما چنین معلومات در مورد باکتریها موجود نمی‌باشد.

خواص جنیتیک باکتریها تبادلۀ بعضی از جین‌ها را میان اورگانیزم‌های دارنده پیوند ضعیف، ممکن ساخته است. علاوهً تکثیر باکتریها تقریباً در همه موارد بشکل vegetative بوده و میکانیزم‌های تبادلۀ جنیتیک آنها نادراً زمینه تبادلۀ حصص بزرگ از جینوم آنها را مساعد می‌سازد. بنأ مفهوم نوع species در پروکاریوت‌ها و ایوکاریوت‌ها کاملاً متفاوت است. نوع باکتریایی عبارت از گروهی از باکتریها است که مشخصات معینی میان آنها مشترک بوده و عموماً مشابهت نزدیک باهم دیگر دارند. توکسانومیست‌ها می‌توانند نوع باکتریایی را به biotypes تصنیف نمایند و می‌توانند species شامل در genera را کلاستر نمایند. جدول ذیل طبقات معمول توکسانومیک را نشان می‌دهد؛ اما عمدتاً صرف از نوع، جینس و خانواده استفاده به عمل می‌آید.

تفاوت قابل ملاحظه جنیتیک میان باکتری‌ها موجود می‌باشد و DNA باکتریها تفاوت کسب می‌نمایند؛ اما جین‌های سازنده رایبوزوم‌ها نسبتاً ثابت تر بوده و به سرعت کمتری تفاوت کسب نموده اند که در مطالعه و کشف باکتریها مفید می‌باشد.

توضیح کتگوریها و گروه‌های عمده باکتری‌ها

دو گروه عمده باکتریها موجود می‌باشد: eubacteria و archeobacteria. شکل معمولتر باکتری را تشکیل می‌دهد در حالیکه archeobacteria باعث تولید پپتیدوگلاایکان نمی‌گردد که یک تفاوت عمده را میان این دو نشان می‌دهد. همچنان archeobacteria در شرایط غیر معمول زنده‌گی می‌نمایند مانند درجه حرارت بسیار بلند، نمک زیاد و یا PH بسیار پائین. علاوهً این‌ها تعاملات غیر معمول میتابولیک را اجرا می‌نمایند مانند تشکیل میتان. (C)

ایوباکتری‌های گرام منفی که دیوار حجروی دارند

این گروه غیر متجانس بوده که دارای لفاف حجروی مغلق بوده و شکل حجروی آن مدور، بیضوی، راد‌های مستقیم و تاب خورده، فنری و یا میله مانند می‌باشد. بعضی اشکال دارای کپسول بوده و تکثیر بشکل انقسام دوگانه می‌باشد اما بعضاً با جوانه زدن هم صورت گرفته می‌تواند. Myxobacteria می‌تواند myxospore و fruiting bodies را به‌میان آورد. در صورتیکه حرکت موجود باشد، ذریعه فلاجیل و یا لغزیدن صورت می‌گیرد. اعضا این گروه ممکن فوتوتروپیک و یا غیر فوتوتروپیک بوده و مشتمل بر اشکال هوازی، غیر هوازی، غیر هوازی اختیاری و microaerphilic می‌باشد. بعضی از اعضای آن پرازیت‌های مطلق داخل حجروی می‌باشد.

ایوباکتری‌های گرام مثبت که دیوار حجروی دارند

اکثراً دیوار حجروی این اورگانیزم‌ها به صورت گرام مثبت تلومین می‌گردد. حجرات ممکن مدور، میله مانند و یا چوبک‌ها باشد. چوبک‌ها و میله‌ها ممکن غیر منشعب و یا هم منشعب باشند. تکثیر عموماً توسط انقسام دوگانه بوده و بعضی اشکال سپور تولید می‌نمایند (*endospores*). این اورگانیزم‌ها عموماً *chemosynthetic heterotrophs* بوده و مشتمل بر انواع هوازی، غیر هوازی و غیر هوازی اختیاری می‌باشند. این گروه شامل بر باکتری‌های ساده دارای سپور و بدون سپور بوده و نیز انواع پیچیده و مغلق که عبارت از اکتینومایسیت‌ها و انواع مشابه آن می‌باشند، در آن شامل است.

Eubacteria های فاقد دیوار حجروی

این اورگانیزم‌ها به صورت معمول *mycoplasma* نامیده شده و مشتمل بر کلاس *mollicutes* می‌باشند. این‌ها مواد پیشقدم *peptidoglycan* را ساخته و توسط غشا پلازمایی احاطه گردیده‌اند. اورگانیزم‌های متذکره مشابه اشکال *L* بوده اما مایکوپلازما نمی‌توانند مانند اشکال *L* دوباره به شکل غشا دار تبدیل گردد. علاوه‌تاً هیچ تشابه جنیتهیک میان مایکوپلازما و اشکال *L* وجود ندارد. شش *genera* در مایکوپلازما موجود بوده که صرف دو آن برای انسانها پتوجن می‌باشند. این اورگانیزم‌ها بسیار *pleomorphic* بوده و اندازه آن متفاوت بوده که بعضی آن حتی قابل فلتر می‌باشد (0.2 میکرومتر). تکثیر ذریعه جوانه زدن، *fragmentation*، انقسام دوگانه و یا به صورت ترکیب از میتودهای فوق می‌باشد. اکثراً مستلزم اوساط مغلق بوده که کالونی‌های وصفی *fried egg* را تشکیل می‌دهد. یکی از مشخصات ویژه آن نیاز به کولسترول برای نمو می‌باشد.

Archeobacteria ها

این اورگانیزم‌ها اغلباً در شرایط غیر معمول زیست نموده بعضاً بشکل همزیستی در طرق هضمی حیوانات موجود می‌باشند. این‌ها مشتمل بر اورگانیزم‌های ایروبییک، غیر ایروبییک و غیرایروبییک اختیاری بوده و به شکل *chemolithotroph heterotroph* و یا *facultative heterotroph* می‌باشند. بعضی از انواع آن *mesophiles* بوده درحالیکه انواع دیگر در درجه حرارت بلندتر از ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد نمو می‌نمایند. انواع اخیرالذکر عادت به زیست نمودن در درجه‌های حرارت بسیار زیاد را کسب نموده که به نام *hyperthermophilic* یاد می‌شود و انزایم‌های موجود در حجرات شان نسبت به انزایم‌های حجرات میزوفیلیک باثبات تر می‌باشند. بعضی از این انزایم‌های باثبات مانند *DNA polymerase* / *Thermus aquaticus* بخش عمده از میتودهایی *amplification* را تشکیل می‌دهد، مانند عملیه *PCR*. تفاوت میان *archeobacteria* و *Eubacteria* را می‌توان توسط عدم

موجودیت دیوار حجروی peptidoglycan موجودیت شحمیات isoprenoid diether و یا diglycerol tetra ether و موجودیت RNA بخصوص، نشان داد. همچنان archaeobacteria عده ای از تشابهات مالیکولی با eukaryotes دارند. حجرات آن ممکن مختلف الشكل باشند و اشکال مدور، فنری، هموار یا میله مانند، دیده شده می‌تواند. شکل وحیدالحجروی و چندین حجروی در میله ها و یا به شکل تجمعات نیز دیده شده می‌تواند. تکثر به صورت انقسام دوگانه، جوانه زدن، constriction، fragmentation و یا میکانیزم‌های نامعلوم صورت گرفته می‌تواند.

Subtyping و استفاده از آن

در بعضی حالات مثلاً در اپیدیمی‌ها لازم است تا strains یک نوع را از هم تفکیک نمود و یا اینکه یک سترین معین را تشخیص نمود. این عملیه به نام تعیین تایپ‌های فرعی (subtyping) یاد می‌گردد. درین عملیه از مشخصات باکتریایی استفاده بعمل می‌آید که تشخیص مفصلتر از نوع را ممکن سازد. جهت متمر بودن کار در همه عملیه‌های subtyping لازم است تا مایکروب‌های مشتمل در واقعات را از مایکروب‌های غیر مشتمل تفکیک نمود. حسب معمول subtyping ذریعه biotyping، serotyping، تست‌های حساسیت مقابل انتی بیوتیک‌ها، bacteriophage typing و bacteriocine typing صورت می‌گیرد. مثلاً به اساس تفاوت‌های انتیجینیک در انتیجن LPS O بیشتر از 130 سیروگروپ ویریبوکولرا کشف گردیده اند، اما صرف اشکال O1 و O139 در کولرای اپیدیمیک و پاندمیک نقش دارد. در اشکال اخیر سترین‌های که سبب تولید توکسین می‌گردد، virulent می‌باشد، مثلاً شکل O1.

nontoxicogenic V. cholera با کولرای اپیدیمیک ارتباط نداشته و از specimen‌های محیطی، مواد غذایی و از مریضان مصاب به اسهالات sporadic تجرید گردیده است.

مواجه شدن با عامل سببی که از یک منبع واحد انتانی منشأ می‌گیرد، در تعداد زیادی از وقوعات انتانات نقش دارد. عموماً می‌توان گفت که این عوامل سببی یا مایکرواورگانیزم‌های مرضی clonal می‌باشد یعنی از یک حجره واحد مادری منشأ گرفته و زاده همان حجره می‌باشد و بدینصورت در همه موارد از نظر جنییتی یکسان اند. بنابراین می‌توان گفت که subtyping نقشی مهمی در تشخیص مایکرواورگانیزم‌ها دارد. پیشرفت‌های اخیر در عرصه بیوتکنالوژی توانمندی ما را در subtype نمودن مایکرواورگانیزم‌ها بسیار زیاد ساخته است. تکنالوژی hybridoma منتج به ساختار انتی بادی‌های monoclonal در مقابل انتیجینهای سطح حجرات گردیده است. میتودهای molecular typing قدرت تشخیصیه سیستم‌های subtyping را ازدیاد بخشیده و اثرات قابل ملاحظه بر اپیدیمولوژی انتانات

داشته است. این شیوه در مقابل مواد معین حساس می‌باشد مثلاً میتود‌های برای تشخیص *dipopolysaccharide* میتودهای تشخیص پروتئینها و میتودهای تشخیصیه نوکلئیک اسید. تحلیل و مطالعه LPS ذریعه *Sodium Dedecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) در باکتریهای گرام منفی به ساده‌گی اجرا شده می‌تواند.

Multi Locus Enzyme Electrophoresis (MLEE) نیز برای مایکرواورگانیزم‌های پتوجن مورد استفاده قرار گرفته است. با استفاده ازین میتود علما در مرکز کنترل امراض CDC توانسته‌اند تا دریافت نمایند که سیروتایپ *O157:H7 E. Coli* را که در وقوعات *hemorrhagic colitis* و *Hemolytic uremic syndrome* نقش دارد، از یک clone که در امریکایی شمالی به صورت گسترده موجود است، تولد گردیده‌اند.

انکشافات و پیشرفتهایی حاصله که در عرصه تجزیه، تسلسل و *amplification* نوکلئیک اسیدها به میان آمده، منتج به میان آمدن سیستم‌های *subtyping* به اساس نوکلئیک اسیدها می‌گردد که مشتمل‌اند بر *pulse field gel electrophoresis* *ribotyping* *plasma profile analysis* و *PCR amplification* و *nucleic acid sequence analysis*

شیوه‌های تشخیص مایکرواورگانیزم‌ها بدون زرع آن

تعداد تخمینی مایکروب‌های کشت ناشده واضح نمی‌باشد؛ اما معلومات اخیر نشان می‌دهد که بسیار زیاد است. تشخیص مایکروب‌ها تا این اواخر مستلزم کشت و حصول کلچر خالص و بعداً اجرا معاینات فزیولوژیک و بیوشمیک می‌باشد. علما از مدت زیادی در مورد مایکروب‌های غیر قابل زرع معلومات داشتند و فعلاً از شیوه کار می‌گیرند که با کمک PCR و با استفاده از rRNA می‌توان مایکروب‌ها را تشخیص نمود. از این شیوه برای کشف و تشخیص یک نوع از اکتینوماپسیت‌ها استفاده شده که *whipple disease rod shape bacterium* است و پیشنهاد گردیده تا به نام *Tropheryma whippelli* مسمی شود. عامل سببی *bacillary angiomatosis* تشخیص گردیده و نام آن *Bartonella henselae* می‌باشد و نیز به اثبات رسیده که *pneumocystis carinii* از جمله فنگس‌ها می‌باشد.

تصنيف سيستم پنج Kingdome

تا به قرن نهم همه اورگانیزم‌ها به دو کنگدم نباتات و حیوانات تقسیم شده بودند. در سال 1866 کنگدم سومی (protista) توسط Haeckel پیشنهاد شده که همه مایکرواورگانیزم‌ها را در بردارد.

تصنيف پنج کنگدم که در 1969 توسط Whittaker پیشنهاد گردیده قرار ذیل است:

Monera (Prokaryote, Uni cellular)

Protista (Eukarote, Uni cellular)

Fungi (Eukaryote, Uni or Multi cellular)

Plantae (Eukaryote, Multi cellular)

Animalia (Eukaryote, Multi cellular)

تصنيف پروکاریوتها با استفاده از سیستم Bergeys در طبابت این امکان را میسر می‌سازد تا اورگانیزم‌های مؤلدامرضی را تشخیص و در قسمت تطبیق ادویه فارمکولوژیک خیلی کمک می‌رساند، همچنان زمینه را مساعد می‌سازد تا Strain های جدید کشف گردند و در لست مایکرواورگانیزم‌ها گنجانیده شوند.

Bergey's Manual بار اول در 1932 چاپ شده و در 1984 بار دوم به چاپ رسیده بود. در January 1980 کمیته بین المللی باکتریولوژی یک لست نامگذاری باکتری هایی را تهیه نمود که در آن 2500 نوع باکتری و 10000 نام جا داده شده بود همچنان نام های حذف شده دوباره در آن شامل گردیده. Prokaryote ها به صورت عموم در دو کتگوری Archeobacteria و Eubacteria تقسیم گردیده است که باکتری های مؤلدامرض برای انسان در گروپ Eubacteria تصنيف گردیده است.

اصطلاحاتی که در نامگذاری بین المللی استعمال می‌شوند، قرار ذیل اند:

۱- Kingdom: به نام عالم یاد گردیده که قبلاً ۵ کنگدم تشریح گردیده.

۲- Class: گروپ مایکرواورگانیزم است که آخر نام کلاس به cetes ختم می‌شود مانند

Actinomycetes.

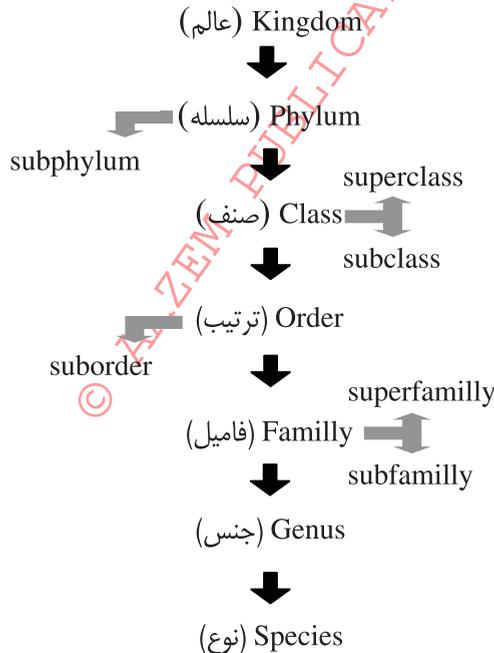
۳- ORDER: کوچکتر از کلاس بوده و در آخر کلمه آن در نگارش ales نوشته می‌شود مانند Actinomycetales.

۴- Family: کوچکتر از ORDER بوده و آخر آن به حروف aceae ختم می‌شود مانند Actinomycetaceae.

۵- Genus: نشاندهنده یک بخش از یک فامیل است و معمولاً نام کاشف آن با کلمه لاتین نوشته می‌شود مانند Nocardia.

۶- Species: عبارت از یک نوع از genus است که به شکل لقب و یا وصف نوشته می‌شود مانند: Albus, Aureus, Asteroides.

۷- Strain: عین نوع است مگر با بعضی خصوصیات خاص.



فصل دوم

فزیولوژی مایکرواورگانیزم‌ها

I- ترکیب بیوشیمیکی حجره باکتری

اساس ترکیب کیمیای حجره باکتری‌ها را عناصر عمده کیمیای از قبیل نایتروجن، کاربن، هایدروجن و اکسیجن که دارای منشأ عضوی اند تشکیل می‌دهد، مثلاً ۸-۱۵٪ وزن خشک باکتری‌ها را نایتروجن و ۴۵-۵۵٪ آنرا کاربن می‌سازد. بطور کل و بخاطر سهولت مطالعه مواد سازنده حجره باکتری را بدو قسمت مایع و جامد تقسیم می‌نمایند:

۱- **قسمت مایع (آب):** آب قسمت عمده حجره باکتری را تشکیل داده که در سایتوپلازم انواع مختلفه باکتری‌ها یک حجم متغیر از ۷۵-۸۵٪ را احتوا می‌کند، مثلاً در *Escherichia coli* و در کورینه باکتریم دیفتیری و ویبریو کولرا ۸۵٪ حجم شانرا آب می‌سازد و در باکتری‌های کپسول دار این فیصدی به نود می‌رسد. آب در حجره باکتری بصورت آزاد و یا در ترکیب با دیگر اجزای ساختمانی باکتری یافت می‌شود، آب ترکیبی جزء ساختمانی سایتوپلازم بوده و نه می‌تواند محلل باشد در حالیکه آب آزاد در حجره باکتری پراکنده بوده و یک حالت کلئیدل را بوجود می‌آورد و مانند منبع یون‌های هایدروجن و هایدروکسیل عمل می‌کند همچنین آب آزاد رول عمده‌یی در پرورسه هایدرولیز مواد دارد که طور مثال می‌توان از تجزیه پروتین‌ها، لپیدها که بخاطر یکجا شدن آنها با آب آزاد صورت می‌گیرد، نام برد.

۲- **قسمت جامد یا Dry Matter عضوی، غیر عضوی:** قسمت جامد مواد سازنده حجره باکتری‌ها شامل مواد عضوی و غیر عضوی است.

- ا- مواد غیر عضوی (مواد معدنی): فاسفور، سلفر، سودیم، مگنیزیوم پوتاشیم، کلسیوم، سلیکان، آهن، کلورین و عناصر کمیاب کیمیاوی از قبیل مولبدنیم، کوبالت، برون، منگانیز، Zinc و مس از جمله مواد معدنی موجود در ساختمان حجره باکتری‌ها بوده که 2-14% وزن خشک کتله مایکروبی کشت شده در اوساط غذائی استاندارد را می‌سازد.
- ب- مواد عضوی: قسمت عضوی ماده خشک باکتری‌ها شامل پروتین‌ها، کاربوهایدریت‌ها، لیپیدها، نوکلئیک اسیدها و دیگر ترکیبات می‌باشد.
- پروتین‌ها: پروتین‌ها قسمت عمده ماده خشک باکتری‌ها را می‌سازد، این ماده در سایتوپلازم، هسته، غشای سایتوپلازمیک و در دیگر ساختمان‌های حجره باکتری موجود است، پروتین در حجره باکتری معمولاً به اشکال نکلیوپروتین و لیپوپروتین موجود است.
 - کاربوهایدریت‌ها: کاربوهایدریت‌ها و الکول‌های پولی‌الکول‌ها 10-28% وزن خشک باکتری‌ها را می‌سازد که شکل عمده موجودیت کاربوهایدریت‌ها در حجره باکتری ترکیب پولی‌سکراید یک آنست که بطور آزاد و یا به حالت ترکیب با پروتین‌ها و لیپید در دیوار حجره و در کپسول باکتری‌ها وجود دارد. قابل یادآوری است که در سایتوپلازم بسیاری از باکتری‌ها مقادیر نسبتاً زیادی Inclusion های کیمیاوی مشابه گلیکوژن و یا نشایسته وجود دارد.
 - لیپیدها: باکتری‌های که از خود ذخیره شحمی دارند و گرانول‌های شحمی را تولید می‌کند 40% وزن خشک شانرا لیپیدها می‌سازد ولی آنچه باکتری‌های که ذخیره شحمی ندارند و نمی‌توانند گرانول‌های شحمی را تولید نمایند 10% وزن خشک شان را لیپیدها می‌سازند. شحم در حجره باکتری به اشکال آزاد، خنثی و ترکیبی موجود می‌باشد که 26-28% شحم موجود در حجره باکتری را شحم آزاد تشکیل می‌دهد، در حالیکه مقدار شحم ترکیبی زیاد بوده و در جدار باکتری موقعیت دارد که با تأمین قابلیت نفوذیه جدار باکتری مقابل مواد غذائی در تغذی باکتری سهم می‌گیرد.
 - نوکلئیک اسید: مقدار نوکلئیک اسید در حجره باکتری مربوط به نوع باکتری و چگونگی ترکیب وسط غذائی می‌باشد که 10-13% ماده خشک باکتری‌ها را می‌سازد مقدار R.N.A معمولاً در حدود 10% و از D.N.A 3-4% می‌باشد.

II- میکانیسم تغذی باکتری‌ها و تصنیف آنها مطابق به تایپ تغذی شان

تبادلۀ دائمی مواد و ترکیبات با محیط ماحول یک خاصیت ذاتی تمام موجودات زنده است، منجمله باکتری‌ها در جریان فعالیت های حیاتی باکتری شرایط معین لازمست که مهمتر از همه موجودیت مواد غذائی است که با استفاده از آن ها انرژی مورد نیاز خود را حاصل نموده و اجزای ساختمانی خود را سنتیز می‌نمایند.

نفوذ مواد غذائی به داخل حجره باکتری به سه طریقۀ صورت می‌گیرد:

۱- **انتشار ساده یا Simple diffusion**: عبارت از نفوذ غیر اختصاص مواد به حجره باکتری است. درین پروسه حجم مالیکولی مواد اهمیت زیاد داشته و سرعت آن نهایت ضعیف است، در جریان این عملیۀ محصولات Lipophilic موجود در کپسول و Cell wall باکتری رول ارزنده دارد.

۲- **انتشار سهیل یا Easeing Diffusion**: جهت اجرای این پروسه موجودیت انتقال دهنده های مخصوص (Massengers) در سایتوپلازم حجره باکتری که خواص مواد محیط حجره باکتری را به سایتوپلازم می رساند ضروری است. درین طریقۀ مصرف انرژی کم بوده و سرعت آن مربوط به غلظت و تجمع مواد محیط باکتری است.

۳- **انتقال فعال یا Active transportation**: آوانیکه غلظت مواد غذائی در داخل حجره باکتری نسبت به محیط آن بلند برود، باکتری‌ها با استفاده ازین میکانیسم تغذی بقیه مواد غذائی موجود در محیط را اخذ می‌نمایند که درینحالت غلظت مواد غذائی در داخل حجره باکتری صد ها مرتبه بلندتر از غلظت آن در محیط می‌باشد و در پیشبرد این پروسه انتقال دهنده های مخصوص که ماهیتاً آنزیم بوده و به نام Permease یاد می‌شود سهم می‌گیرند در Active transportation مصرف انرژی زیاد است.

تصنیف باکتری‌ها نظر به تایپ تغذی شان

باکتری‌ها مطابق به تایپ تغذی شان به دو گروپ Autotrophic و Heterotrophic تقسیم می‌شوند.

۱- **باکتری‌های Autotroph**: آن دسته از باکتری‌های اند که عمل فوتوسنتیز و شیموسنتیز را انجام می‌دهند و قادر اند که از مرکبات غیر عضوی مواد عضوی را تهیه کنند، این

باکتری‌ها به مرکبات عضوی کاربن ضرورت نداشته و نمی‌توانند آنها را جذب کنند، بلکه اجزای ساختمانی خود را بوسیله جذب آب و مرکبات ساده نایتروجن دار (امونیاک و نمکها آن و نمک Nitric Acid) تشکیل می‌نمایند.

۲- **باکتری‌های Heterotroph:** باکتری‌های اند که جهت تغذی خود را به کاربن عضوی مانند قندها و اسیتون، به امینواسیدها، اسیدهای شحمی، مرکبات مختلفه نایتروجن (نیترات ها و امونیاک) و به مواد غیرعضوی مانند Ca, Fe, K, Mg و حتی به ویتامین‌ها ضرورت دارند.

باکتری‌های هتروتروف به نوبه خود به دو گروه Parasite ها و Sprophyte ها تقسیم

می‌شوند:

- ا- سپروفایت‌ها: باکتری‌های اند که با استفاده از مواد عضوی محیط ماحول خود زندگی می‌کنند که اکثریت باکتری‌های موجود در کره ارض مربوط به سپروفایت‌ها است، باکتری‌های Non - Pathogen شامل این گروه می‌باشند.
- ب- پرازیت‌ها: درین گروه تعداد کمی از باکتری‌ها شامل بوده که در جریان رشد و تکامل تدریجی خود به حیات طفیلی عادت می‌گیرند و برای تغذیه و تأمین حیات خود به مواد عضوی به خصوص به پروتین حیوانی نیاز دارند. باکتری‌های مؤلدامراض یا Pathogen شامل این گروه می‌باشند.

گرچه نمی‌توان هتروتروف را به دو گروه دیگر یعنی پرازیت‌ها و سپروفایت‌ها تقسیم نمود اما با آنها تا کنون کدام نوع دیگری در بین این دو گروه حایل نشده است به دلایل ذیل نمی‌توان مرز تفریقی را بین پرازیت‌ها و سپروفایت‌ها مشخص کرد:

- ۱) پرازیت‌ها بعد از خارج شدن از اورگانیزم زنده می‌تواند، در اوساط غذایی که حاوی مواد غذایی عضوی باشند حیات به سر برند.
- ۲) بعضی از مایکروب‌ها Pathogen برای انسان، می‌توانند در محیط سپروفایت باشند.
- ۳) بعضی از مایکروب‌های سپروفایت در شرایط نامساعد می‌توانند بیماری‌های مختلف را برای انسان و حیوان تولید کنند.
- ۴) همچنانیکه اشاره شد، نایتروجن و مرکبات آن نقش عمده ای در تغذی باکتری‌ها ایفا

می‌نماید که اینک بر حسب تایپ استفاده باکتری‌ها از نایتروجن، تصنیف آنها بیان می‌گردد:

- مایکروبهایی که نایتروجن را از هوا می‌گیرند.
- مایکروبهایی که از ترکیبات معدنی نایتروجن استفاده می‌نمایند.
- مایکروبهایی که در مجاورت یک امینواسید و یا مخلوطی از آنها رشد و نمو میکنند.
- مایکروبهایی که در اوساط غذائی پروتین دار کشت می‌شوند.

برعلاوه، تصنیف عمدهٔ دیگری بر حسب قدرت باکتری‌ها در سنتیز مرکبات مغلق و بیچیده موجود است که ذیلاً ارائه می‌گردد:

- ۱- باکتری‌های که کاربن را از CO_2 و نایتروجن را از مرکبات غیر عضوی فراهم می‌کنند، اینها شامل اتوتروف‌های اندک که قابلیت فوتوسنتیز را دارند و بوسیلهٔ اوکسیدیشن ساده مرکبات غیر عضوی انرژی مورد نیاز خود را تهیه می‌کنند.
- ۲- باکتری‌های که کاربن را از مرکبات عضوی و نایتروجن را از مرکبات غیر عضوی گرفته و انرژی تهیه می‌کنند که اغلب سپروفایت‌ها درین زمره اند.
- ۳- باکتری‌های که کاربن و انرژی را از مواد عضوی و نایتروجن را از امینو اسید تهیه می‌کند.
- ۴- باکتری‌های که کاربن را از مرکبات عضوی و نایتروجن را از کمپلکس امینواسیدها جذب کرده و انرژی تهیه می‌کنند که در ضمن به یک یا چند ویتامین هم ضرورت دارند.

اوساط غذائی و تهیهٔ آن‌ها

هدف از استعمال اوساط غذائی تهیهٔ کلچر خالص باکتری‌ها از مواد و محصولات مختلفهٔ است که در ضمن تجرید و تکثیر ژرم مطالعه خصوصیات مایکروب و معرفت با محصولات خود مایکروب را امکان پذیر می‌سازد.

پایه و اساس کار مایکروبیولوژی مربوط به اوساط غذائی بوده و اکثر اوقات کیفیت و چگونگی این اوساط نتیجهٔ امور تحقیقاتی را معین می‌سازد. در ترکیب اوساط غذائی مواد اورگانوجنیزس که جهت ساختن سایتوپلازم لازم است وجود دارد که معمولاً شامل Peptone یا (عصاره گوشت یا Meat Extract، محصولات بیولوژیکی یا مواد صنعتی مشابه آنها که مواد

متذکره حاوی مواد Organogenes که در قالب مالیکول های بزرگ است، می باشد. اوساط غذائی ماهیتاً مواد و عناصر چون کاربن، نایتروجن، هایدروجن، اوکسیجن، مرکبات غیر عضوی که دارای پتاسیم، سودیم، کلسیم، کلورین، آهن، مگنیزیم و همچنین یکتعداد مایکروالیمنت ها از قبیل کوبالت، آیودین، منتریم، برون، مولبدینوم و مس را دارا می باشند. همچنین باکتری ها بر علاوه مواد فوق به عوامل رشد دهنده نیازمند اند که رول این مواد معادل نقش ویتامین ها در حیوانات می باشد. این مواد که دارای منشأ حیوانی یا نباتی اند و در ترکیب خود نوکلئیک اسید، Panthotin و ویتامین های مختلفه A، B و C را دارند. قسمی باید در ساختار اوساط غذائی ترکیب شوند که بتوانند از طرف باکتری ها مورد استفاده قرار گیرند. مواد غذائی توسط باکتری ها تنها در نتیجه تعامل اوساط اخذ می گردد، زیرا حساسیت غشای حجروی باکتری ها مقابل تغییرات PH وسط نهایت حساس بوده و حساسیت غشا نظر به PH وسط تغییر می یابد نظر به اینکه مایکرووب های مختلفه جهت رشد، نمو و تکثر خود به اوساط غذائی مختلفه ضرورت دارند لذا وسط Universal یا یکسان برای تمام باکتری ها وجود ندارد. در تهیه یک وسط غذائی باید نکات ذیل مراعات شود:

- ۱- اوساط غذائی باید حاوی تمام مواد باشد که برای مایکرووب ضروری است.
- ۲- تعامل PH وسط باید مطابق به حساسیت غشای حجروی هر مایکرووب عیار گردد.
- ۳- وسط غذائی باید مرطوب باشد، زیرا میدانیم که مایکرواورگانیزم ها مطابق به قوانین آسموزس و دیفیوژن تغذیه می کند.
- ۴- وسط غذائی باید ایزوتونیک Isotonic باشد.
- ۵- وسط غذائی باید معقم باشد تا بتوان کلچر خالص مایکرووب را حاصل نمود.

تصنیف اوساط غذائی

اوساط غذائی نظر به حالت فیزیکی ترکیب، چگونگی طبیعی و مصنوعی پیدایش و بالاخره نظر به مفهوم و کارایی باکتریولوژیک آنها تصنیف می شوند.

۱- نظر به حالت: از این لحاظ سه نوع وسط غذائی وجود دارد: مایع، جامد خشک و یا پودری. در پراتیک روزانه اوساط غذائی جامد را از Agar و یا ژلاتین تهیه می کنند (Agar از یک نوع نبات بحری بدست می آید) زیرا Agar در آب به ۸۰ - ۸۶ درجه سانتی

گراد ذوب شده و در حرارت ۳۷ - ۴۰ درجه سانتی گراد دوباره شکل جامد را به خود می‌گیرد. با استفاده از اوساط اگر دار می‌توان تمام باکتری‌های پتوجن را پرورش داد، زیرا حرارت اعظمی Optimum برای این نوع مایکروب‌ها معادل درجه حرارت طبیعی عضویت انسان است. امروز در بخش صنایع طبیعی اوساط غذائی خشک (پودری) کانسرو شده را می‌سازند که در ترکیب آنها تمام مواد ضرورت جهت رشد و تکثیر باکتری‌ها شامل است، طرز استفاده از این اوساط چنین است که اولاً آنرا در آب حل نموده و جوش می‌دهند و بعداً آنرا در تیوپ‌ها و پتری دیش‌ها جا می‌دهند. این نوع اوساط غذائی برای مدت دو سال قابل استفاده می‌باشد، تهیه این اوساط با این سهولت و ترکیب غنی آن، امکان آنرا به محققین می‌دهد تا ازین اوساط در لابراتوارهای مایکروبیولوژی در محلات مختلف استفاده نمایند (زمین - بحر - فضا).

۲- نظر به ترکیب: با در نظر داشت ترکیب اوساط غذائی دو نوع آنرا می‌توان معین کرد، دو نوع ساده و مغلق موجود بوده در جمله اوساط غذائی ساده می‌توان از Meat broth، Peptone water و Meat Water نام برد. اوساط که شامل دو یا چندین نوع وسط غذائی ساده باشد در جمله اوساط غذائی مغلق کتگوری می‌شوند.

۳- نظر به چگونگی پیدایش و موجودیت شان: دو گروه طبیعی و مصنوعی از هم تفریق می‌شوند. Blood Agar، سیروم حیوانی، شیر، پارچه‌های کچالو، جزء اوساط غذائی طبیعی و اوساط که چگونگی ترکیب آنها معلوم است جزء اوساط غذائی مصنوعی بشمار می‌روند.

۴- نظر به مفهوم و کارائی باکتریولوژیک: اوساط غذائی نظر به مفهوم و کارائی باکتریولوژیک در لابراتوار به اوساط غذائی عمومی و خصوصی تقسیم می‌گردند. Meat broth، Meat peptone broth و اوساط غذائی که در اساس خود از آنها تهیه گردیده‌اند. در کتگوری اوساط غذائی عمومی تصنیف می‌شوند (به شمول اشکال جامد آنها)، اوساط غذائی عمومی، به نوبه خود به اوساط غذائی Elective و تشخیص تفریقی (Differential Diagnostic) تقسیم می‌شوند.

الف: اوساط غذائی Selective: این اوساط با چنین ترکیبی تهیه می‌گردند که زمینه رشد یک یا چند باکتری را با مهیا ساختن شرایط Optimum برای آنها تأمین می‌کند. درین نوع

اوساط باکتری‌های مختلفه را می‌توان کشت کرد ولی قبل از همه آن باکتری رشد می‌کند که وسط برای آنها انتخابی Selective باشد و سایر باکتری‌ها یا اینکه اصلاً نمو ننموده و یا اینکه خیلی ضعیف نمو می‌کنند. این نوع اوساط برای انواع میکروب‌های که مورد توجه طبیبان قرار دارد، استعمال می‌شوند که البته خیلی شدید و سریع نسبت به سایر میکروب‌های همراه خود می‌رویند.

ب: اوساط Differential Diagnostic تشخیص تفریقی: با در نظر داشت مفهوم این اوساط بازهم انواع ذیل آنها قابل تفریق است:

- اوساط پروتین دار: عبارت از اوساط اند که جهت معلوم نمودن فعالیت Proteolytic باکتری‌ها به کار می‌روند که حاوی مواد پروتینی در ترکیب خود اند مانند شیر، جلاتین و Meat peptone.
- سیروم خون: اوساط که برای تشخیص فعالیت هیمولایتیکی باکتری‌ها به کار می‌روند مثلاً Blood Agar.
- مواد کیمیایی: اوساط که در ترکیب خود دارای چنان مواد کیمیایی اند که برای عده ای از باکتری‌ها منحیث مواد غذائی بوده درحالی‌که باکتری‌های دیگر نمی‌توانند از آن استفاده نمایند.
- ارجاعی: اوساط که فعالیت Reductive یا ارجاعی باکتری‌ها در آن معین می‌گردد.
- عمل تخمیری انزایم‌ها: اوساط که جهت تحقیق و پیدا نمودن انزایم‌های متعلقه هر باکتری و مشخص نمودن عمل تخمیری آنها به کار می‌روند.

میتود های تعقیم اوساط غذائی

تعقیم اوساط غذائی به میتود ها و روش های مختلفه صورت می‌گیرد ولی در تعقیم هر وسط غذائی بایست اجزای ترکیب دهنده آن جدا در نظر گرفته شود که ذیلاً چگونگی تعقیم اوساط غذائی توضیح می‌گردد:

- ۱- اوساط Agar دار و Synthetic اگر در ترکیب خود پروتین طبیعی نداشته باشند به حرارت ۱۱۵ - ۱۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ - ۲۰ دقیقه در Autoclave تعقیم می‌شوند.

۲- اوساط که در ترکیب خود کاربن و شیر دارند (Lactose) به حرارت 100°C در موجودیت رطوبت (بخار) به مدت ۳۰ دقیقه برای دو مرتبه و یا به حرارت 112°C درجهٔ سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو برای دو مرتبه تعقیم می‌شوند.

۳- اوساط که در ترکیب خود مواد پروتینی از قبیل سیروم خون، Ascites و مواد پروتینی اند به میتود Filtration و یا Tendalization تعقیم می‌شوند. طرز العمل در میتود اخیرالذکر چنان است که وسط به حرارت $80 - 70^{\circ}\text{C}$ برای یکساعت در سه روز متوالی تعقیم می‌شوند.

۴- اوساط که در ترکیب خود مواد پروتین طبیعی دارند به میتود Filtration تعقیم می‌شوند. اوساط غذائی تعقیم شده بعد از تعقیم بایست کنترل شوند که به این منظور آنها را ترموستات به حرارت 37°C می‌گذارند طوری که اوساط غذائی تعقیم شده در اتوکلاو را مدت 24h و اوساط غذائی تعقیم شده توسط بخار را مدت 72h در ترموستات محفوظ نگهدارند.

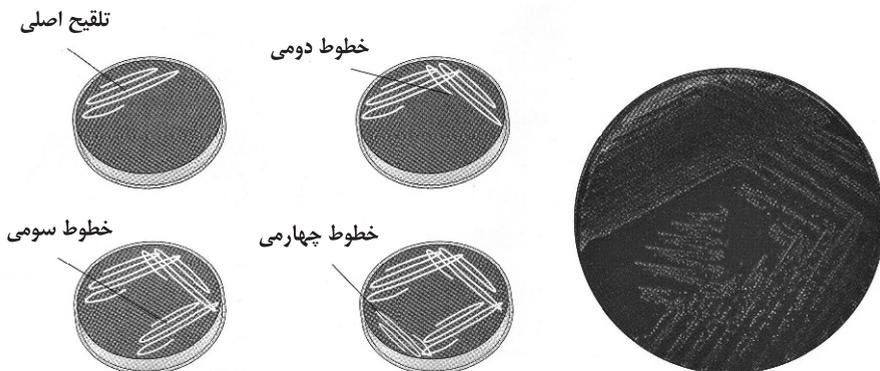
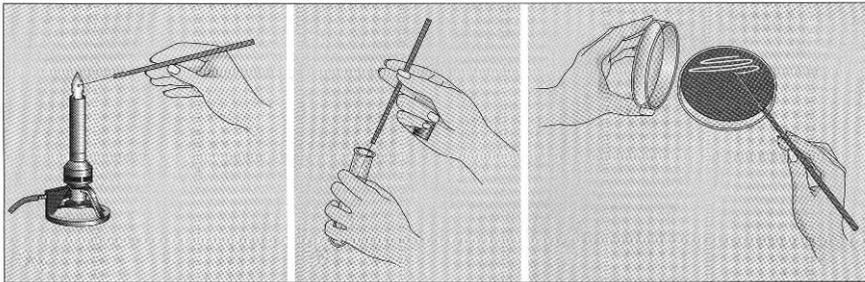
تخنیک کشت باکتری‌ها در اوساط غذائی

مواد که در اوساط غذائی کشت می‌شوند متعدد اند، کلچر باکتریائی، آب، مواد زمینی افزادات و محصولات مختلفهٔ انسان‌ها (ادرار، مواد غایطه، قی آسی‌ها، بلغم) محصولات حیوانی، پارچه‌های اجساد... و غیره می‌توانند به حیث مواد کشت شونده استعمال شوند. در پراتیک روزانه جهت کشت باکتری‌ها اکثراً از لوپ باکتریایی استفاده می‌شود. کشت باکتری‌ها مستلزم یکسلسله حرکات و مانورهای ماهرانه است که توسط انگشتان دست اجرا می‌شود (Manipulation) که البته تمام این حرکات و مانورها باید در مجاورت منبع حرارت (شعله چراغ الکولی) صورت گیرد.

جهت کشت باکتری‌ها در لابراتوار چنین عمل می‌کنیم:

- ۱- قبل از اخذ مواد لوپ عموداً داخل شعله چراغ قرار داده می‌شود تا تعقیم گردد.
- ۲- دو تیوب که در یکی از آنها کلچر کهنه باکتریایی وجود دارد و دیگر آن که هنوز بکلی معقم و تازه است طوری با دست چپ اخذ می‌شوند که نهایت مطلوبه آنها آزاد، باشد.
- ۳- لوپ معقم مانند قلم با دست راست اخذ شده و نهایت آزاد تیوب‌ها با دور نمودن پنبه از آن در مجاورت شعله چراغ باز می‌گردد.

- ۴- به وسیلهٔ لوپ از تیوب که حاوی کلچر کهنه باکتریایی است طوری مواد اخذ می‌گردد که در جدار تیوب تماس نه نماید و این مواد در تیوب دیگر که حاوی وسط (معقم striel) غذائی تازه است و به کلی معقم می‌باشد، جا داده می‌شود.
- ۵- نهایت باز تیوب‌ها در مجاورت آتش به وسیلهٔ پنبه مسدود می‌گردد.
- ۶- لوپ مجدداً تعقیم می‌گردد.
- ۷- در تیوب که جدیداً مواد کشت شده، تاریخ اجرای کلچر، نام کلچر کهنه و اسم اجرا کننده با قلم رنگه نوشته شده و تیوب در ترموستات اقلاناً برای ۲۴ ساعت نگهداری می‌شود.



کشت مایکروب‌ها به میتود خطوط

شکل ۱-۲

ترموستات Thermostat

جهت رشد و تکثیر باکتری‌ها شرایط مساعد حرارتی لازم است که برای انواع مختلفه باکتری‌ها مختلف است، جدول ذیل تقسیمات باکتری‌ها را نظر به حرارت Optimum شان نشان می‌دهد:

	Minimum	Optimum	Maximum
Psychrophilic	0 °c	15-20 °c	30-35 °c
Mesophilic	10 °c	30-37 °c	40-45 °c
Thermophilic	35 °c	50-60 °c	70-75 °c

باکتری‌های Pathogen تماماً مربوط به گروه Mesophilic می‌باشد که حرارت مساعد جهت رشد و تکثیر شان معادل به حرارت نارمل وجود انسان یعنی 37°C است. بخاطر تأمین حرارت مساعد جهت رشد و تکثیر باکتری‌ها از ترموستات استفاده می‌شود. که حرارت اعظمی Optimum را برای هر باکتری بصورت دائمی آماده نموده می‌تواند.

جدار ترموستات از دو لایه یا طبقه ساخته شده است که آب یا هوا در بین آن موجود بوده و توسط یک منبع حرارت (گاز یا برق) گرم می‌شوند، دروازه ترموستات بایست که بطور محکم بسته شود در سرپوش ترموستات Thermameter ترمامیتر و سوراخ‌های تهویه موجود است. در لابراتوارهای بزرگ از ترموستات‌های بزرگ که مانند یک اتاق اند و تماماً مجهز می‌باشند. استفاده می‌گردد کلچر باکتری‌ها را مدت 24h در ترموستات جا می‌دهند که این مدت ازدیاد اعظمی باکتری‌های Pathogen را تأمین می‌نماید.

نمو، ابقاً، حیات و مرگ مایکرواورگانیزمها

زنده ماندن مایکرواورگانیزمها در محیط طبیعی

تعداد مایکرواورگانیزمها در بیوسفیر تقریباً ثابت می‌باشد یعنی نمو و تکثیر مایکروب‌ها در موازنه با مرگ مایکروب‌ها قرار دارد. زنده ماندن یک گروه از مایکروب‌ها در محیط قسملاً به رقابت موفقانه برای دریافت مواد غذایی و نگهداشت ذخیره‌ی یک عده از حشرات زنده حین مواجه شدن به قلت مواد غذایی، مربوط می‌باشد. اکثریت معلومات در مورد فزیولوژی مایکروب‌ها از مطالعه حشرات تجرید شده در لابراتوار که تحت شرایط آیدیال نمو می‌کنند، بدست آمده است. اما باید خاطر نشان ساخت که

اکثریت مایکروب‌ها در محیط طبیعی ممکن به قلت مواد غذایی دچار گردیده و بناً وادار به رقابت برای دریافت مواد غذایی گردد که این حادثه باعث تفاوت مشخصات فزیولوژیک مایکروب در شرایط طبیعی از شرایط لابراتوار گردیده می‌تواند. همچنان باید دانسته شود که محل زیست مایکروبی خالی به زودی توسط مایکروب‌های دیگری مملو می‌گردد و بدین لحاظ برنامه‌های که در آن مایکروب‌های پتوجن صرف از محل زیست آنها تصفیه می‌گردد، نظر به میتود‌های که در آن در محل زیست مایکروب پتوجن مایکروب‌های غیرپتوجن به صورت تعویضی جاگزین می‌گردد، کمتر موفق دانسته می‌شود.

نمو

نمو عبارت از تزايد منظم در مجموعه اجزای متشکله یک اورگانیزم می‌باشد. بناً ازدیاد در سایز و اندازه که به تعقیب داخل شدن آب و یا ذخیره شدن شحمیات و یا پولی سکراید‌ها به وقوع می‌پیوندد، نمودی واقعی دانسته نمی‌شود. تکثر حجروی پدیده است که در نتیجه نمودی حجره به وقوع می‌پیوندد.

اندازه غلظت مایکروبی *Microbial concentrations*

غلظت مایکروبی به اساس غلظت حجرات (تعداد حجرات زنده فی واحد حجم کلچر) و یا به اساس غلظت کتله زنده *biomass* (وزن خشک حجرات فی واحد حجم کلچر) تعیین می‌گردد. این دو پارامتر همیشه معادل نمی‌باشند. در مطالعه جنتیک حجرات غلظت حجرات مهم است تا اندازه گردد اما در مطالعه بیوشیمی و یا تغذی حجرات غلظت بایومس مهم می‌باشد. غلظت حجرات از شمارش حجرات زنده بدست می‌آید اما در بسیاری موارد جهت سهولت کار از مکردریت کلچر که با شیوه‌های فوتوالکتریک اندازه می‌گردد، به حیث معیار غلظت حجرات استفاده به عمل می‌آید. همچنان اندازه گیری سهل غلظت بایومس توسط اندازه گیری مقدار یکی از اجزای متشکله حجره مانند پروتین و یا اندازه گیری حجم حجراتی که از *suspension* ته نشین گردیده اند، صورت می‌گیرد.

تکثر و نمودی مایکرواورگانیزم‌ها

نمو و تکثر باکتری‌ها در اوساط غذایی جامد:

نمودی باکتری‌ها عبارت از ازدیاد حجم سایتوپلازم آنها است که متعاقب سنتیز مواد حجروی صورت می‌گیرد. باکتری‌ها با سپری نمودن مراحل مختلف انکشاف می‌یابد که معمولاً حجره جدید باکتریایی (حجرهٔ دختر) نسبت به حجره مادری خود کوچکتر می‌باشد،

حجرات دختری به نوبه خود نمو می‌کنند و بزرگ می‌شوند که اینحالت را Physiological Gigantisme می‌نامند. افزایش تعداد باکتری‌ها که در نتیجه فعالیت خود آنها صورت می‌گیرد عبارت از تکثر یا تولید مثل باکتری‌ها می‌باشد، تکثر باکتری‌ها بوسیله تقسیم ساده عرضی یا Simple Transvers Division و تکثر اولیه یا تکثر نباتی Vegetative Reproduction در سطوح مختلف صورت می‌گیرد و در نتیجه اشکال مختلفه از حجرات مانند خوشه ئی، زنجیری و جوهره ئی... بوجود می‌آید همچنان مایکرواورگانیزم‌ها بوسیله جوانه زدن، ایجاد شگاف در رشته های سیگمانته، تشکیل حجرات مشابه سپور به وسیله Conidia های متحرک و بالاخره بوسیله Conjugation تولید مثل می‌نماید که حادثه اخیرالذکر تولید مثل جنسی نزد باکتری‌ها قبول شده است.

تقسیم عرضی باکتری‌ها تنها یک پروسه ساده انقسام یک حجره مادری به دو حجره مشابه دختری نبوده بلکه تقسیم عوامل مستقل و جداگانه یک حجره مادری است به حجرات دختری یا به عباره دیگر تجرید مداوم حجرات کوچک دختری است از یک حجره بزرگ مادری چنانچه نگاشته شد این حجرات دختری به نوبه خود بزرگ می‌شوند و بعد از رشد و انکشاف همچنان انقسام می‌یابند که البته بعد از چند بار Generation از بین می‌روند.

سرعت تقسیمات حجروی در باکتری‌ها مختلف بوده و مربوط به نوع باکتری، سن شرایط کشت اوساط غذایی، درجه حرارت و غیره می‌باشد که در صورت موجودیت شرایط مساعد بعضی از باکتری‌ها می‌توانند بعد از هر ۲۰ - ۳۰ دقیقه تکثر کنند. افزایش تعداد حجرات جدید باکتری‌ها مطابق به دفعات Yeneve یا مدت انقسام قرار ذیل محاسبه می‌گردد:

1	2	4	8	16	32	-----	N	تعداد حجرات
0	1	2	3	4	5	-----	n	مدت انقسام

بعد از n مرتبه تکثر تعداد مجموعی حجرات مساوی به N خواهد بود یعنی $N = 2n$ (البته بعد از ختم Generation اول) به این معنی که اگر در یک وسط غذایی صرف یک باکتری موجود باشد و 30 Generatime دقیقه باشد (هر 30 دقیقه بعد، نسل جدید به میان می‌آید). تعداد مجموعی باکتری‌ها بعد از 24 ساعت مساوی است به: $N = 248$ زیرا $n = 48$ است در صورتیکه تقسیمات حجره باکتری در هر 20 دقیقه صورت گیرد.

تکثر باکتری‌ها توسط بعضی از عوامل مانند تجمع مواد Toxic، تغییرات PH وسط، اتمام مواد غذائی و غیره محدود می‌گردد.

در اوساط غذائی جامد باکتری‌ها به اثر تکثر ایجاد کالونی می‌نماید و کالونی عبارت از مجتمع مایکروبی است که متعاقب تکثر مایکروب در سطح اوساط غذائی بعد از کشت بوجود می‌آید. از لحاظ شکل و حجم این کالونی‌ها از هم فرق داشته و توسط رشته‌های Cytoplasmic به هم مرتبط اند، اشکال کالونی‌ها مختلف بوده می‌تواند به شکل کروی، درختی، ستاره‌یی و یا Rosette – Shaped باشد، همچنین اشکال مستقیم و دانه دار آنها نیز دیده می‌شود، حاشیه کالونی‌ها می‌شود که منظم و یا اینکه غیر منظم و دندان دار باشد، کالونی‌ها ممکن است مطح، محدب، گنبدی، و یا حفره دار بوده و سطح آنها لشم (S. Form) و یا اینکه درشت (R. Form) باشد. کالونی‌ها از لحاظ سایز خود به چهار گروپ تقسیم می‌شوند: کالونی‌های بزرگ به قطر 4 – 5mm، کالونی‌های متوسط به قطر 2 – 4mm، کالونی‌های کوچک به قطر 1 – 2mm و بالاخره کالونی‌های کوچکتر یا رشد نکرده به قطر کمتر از 1mm. همچنین کالونی‌ها از نظر رنگ، کثافت و قوام خود از هم فرق دارند که انواع مختلفی آنها از قبیل کالونی‌های مکدر شفاف، خشک، مرطوب، رنگه و بی رنگ موجود است.

نمو و تکثر باکتری‌ها در اوساط غذائی مایع

مراحل نمویی مایکروب‌ها که در وسط کلچر مایع مطالعه می‌گردد، شش مرحله می‌باشد. این مراحل ذیلاً توضیح می‌گردد:

A- مرحله نموی بطی Lag phase: این مرحله عبارت از زمانی است که حجرات در آن به محیط زیست جدید خود را عیار می‌سازند. انزایم‌ها و سایر مواد استقلابی سنتتیز گردیده و تا حدی که برای آغاز نمو لازم باشند، ذخیره می‌گردد. در صورتیکه حجرات از یک وسط به وسط دیگر کاملاً متفاوت و غیر قابل زیست انتقال یابند، ممکن که مرحله نموی بطی برای مدت زیادی دوام نماید تا اشکال mutant مایکروب به میان آید و زمینه را برای ازدیاد تعداد خود مساعد سازد.

B- عبارت از یک مرحله کوتاه بین مرحله A و C می‌باشد.

C- Exponential phase: در جریان این مرحله باکتری‌ها به شکل ثابت ازدیاد می‌یابند. مواد حجروی جدید به یک نسبت ثابت سنتتیز گردیده و کتله حجرات به شکل

exponential ازدیاد می‌یابد. این مرحله الی وقوع یکی از دو حوادث ادامه دارد: یا اینکه یک یا بیشتر مواد مغذی در وسط به اتمام رسیده و یا اینکه تولیدات میتابولیک توکسیک تجمع یافته و مانع نمو می‌گردد. برای اورگانیزم‌های ایروبییک مواد غذایی که معمولاً محدود می‌گردد، عبارت از اوکسیجن می‌باشد. زمانیکه غلظت حجرات به 10^7 حجره فی ملی لیتر می‌رسد، نمو حجرات از سبب قلت اوکسیجن بطی می‌گردد مگر اینکه اوکسیجن به میتود های agitation و یا bubbling در وسط داخل ساخته شود اما زمانیکه تعداد حجرات باکتریایی به $5 \times 10^9 - 4$ حجره فی ملی لیتر برسد، دیفوژن اوکسیجن نمی‌تواند تقاضا وسط را در هیچگونه شرایط تکافو نماید و بناً نمو بطی می‌گردد.

D- عبارت از یک مرحله گذار به مرحله E می‌باشد.

E- مرحله ساکن اعظمی maximum stationary phase: اختتام مواد غذایی و یا تجمع مواد توکسیک بالاخره باعث می‌گردد تا نمو کاملاً توقف یابد اما اکثراً یک عده کم از حجرات درین مرحله از بین رفته و در مقابل حجرات جدید از طریق نمو و انقسام آنرا تعویض می‌نمایند. در صورتیکه چنین واقع گردد، تعداد مجموعی حجرات ازدیاد یافته در حالیکه تعداد حجرات زنده ثابت می‌ماند.

F- مرحله مرگ و یا مرحله تنقیص: بعد از اختتام مرحله ساکن اعظمی که طول آن نظر به اورگانیزم و نظر به شرایط کشت متفاوت می‌باشد، میزان مرگ حجرات ازدیاد یافته تا اینکه به یک سرعت ثابت برسد. اکثراً بعد از اینکه اکثریت حجرات از بین بروند، میزان مرگ کاهش یافته که بدینگونه یک عده از حجرات زنده برای ماه‌ها و یا حتی سالها می‌توانند زنده بمانند. چنین زنده ماندن در بعضی حالات وانمود کننده تعویض حجرات می‌باشد یعنی یک عده از حجرات با استفاده از مواد غذایی حاصله از حجرات مرده و لیز شده، نمو می‌نمایند.

نگهداشت حجرات در مرحله exponential

حجرات را می‌توان با انتقال مکرر به اوساط مشابه تازه در مرحله نمو exponential نگهداری نمود. برای این هدف دو آله اوتومات ساخته شده است که عبارتند از: chemostat & turbidostat

تعریف و اندازه مرگ حجرات

مفهوم مرگ حجرات:

مرگ حجرات مایکروبی به معنی از دست دادن دائمی قابلیت تکثیر (نمو و انقسام) می‌باشد. از نظر پرکتیک مرگ حجرات با کشت حجرات در وسط جامد تثبیت می‌شود. در صورتیکه یک حجره قابلیت تشکیل کالونی را در همه اوساط از دست داده باشد، حجره مرده پنداشته می‌شود. واضح است که اعتماد بالای این تست به انتخاب وسط و شرایط بستگی دارد. مثلاً کشت که در یک وسط 99 در صد حجرات را مرده وانمود سازد، ممکن در وسط دیگری 100 فیصد حجرات را زنده نشان دهد. علاوه بر این نمی‌توان عده محدود از حجرات زنده یک سمپل بزرگ کلینیکی را در کشت مستقیم دریافت نمود زیرا مایع موجود در همان سمپل ممکن خود سبب نهی نموی مایکروبی گردد. در چنین حالات باید که نخست سمپل مورد نظر در وسط مایع رقیق گردد تا به نموی حجرات زنده زمینه را مساعد سازد.

تعیین اندازه نموی مایکروبی

طرق مختلفی برای اندازه گیری نموی مایکروبی موجود است. در عده از میتود ها تعداد حجرات مایکروبی اندازه می‌گردد، حالانکه در میتود های دیگر کتله مجموعی تجمع مایکروبی محاسبه می‌گردد. کتله مجموعی مایکروب‌ها نیز مستقیماً متناسب به تعداد حجرات آن می‌باشد. تعداد حجرات مایکروبی در یک تجمع باکتری طوری حساب می‌گردد که تعداد حجرات موجود در فی ملی لیتر مایع یا فی گرام مواد جامد اندازه می‌گردد. از آنجائیکه تجمعات مایکروبی معمولاً بسیار بزرگ هستند، اکثریت میتود های شمارش تعداد حجرات بر اساس شمارش مستقیم یا غیر مستقیم نمونه های کوچک استوار می‌باشد که بدین ترتیب در مرحله بعدی می‌توان اندازه تمام تجمع مایکروبی را محاسبه نمود. فرض کنید که در یک بر میلیونم حصه شیر ترش شده هفتاد حجره باکتری را دریافت گردید، پس در فی ملی لیتر آن باید هفتاد میلیون حجره موجود باشد.

مشکل میتود اخیرالذکر این است که نمی‌توانیم یک بر میلیونم حصه یک ملی لیتر مایع یا گرام غذا را تعیین نمائیم. بناً باید از میتود غیر مستقیم استفاده بعمل آید، یعنی از رقیق سازی مسلسل استفاده بعمل می‌آوریم. مثلاً اگر یک ملی لیتر شیر متذکره را به نودو نو ملی لیتر آب خلط نمائیم، تعداد باکتری در محلول حاصله صد مرتبه نظر به محلول اصلی کمتر خواهد بود، هر قدر این عملیه رقیق سازی را ادامه دهیم، به همان اندازه تعداد باکتری متناسباً کمتر می‌شوند که بالاخره می‌توان تعداد حجرات موجود را نیز محاسبه نمود. در مواد جامد مانند غذا می‌توان یک حصه آنرا با ۹ حصه آب مخلوط نمود و بعداً توسط pipette می‌توان عملیه رقیق سازی را بیشتر ادامه داد و بالاخره تعداد حجرات آنرا محاسبه نمود.

شمارش حجرات در plates

معروفترین شیوه اندازه گیری تعداد حجرات باکتری عبارت از میتود شمارش در پلیت یا Plate count می‌باشد. مفاد مهم این شیوه عبارت از شمارش حجرات زنده می‌باشد اما این شیوه حد اقل ۲۴ ساعت را در بر می‌گیرد، زیرا طی این زمان کالونی‌های قابل رویت باکتری‌ها تشکیل گردد. مثلاً در شمارش حجرات باکتری که به منظور کنترل کیفیت شیر اجرا می‌گردد، نباید نمونه مورد نظر در مدت طولی معاینه گردد.

Plate count به این فرضیه استوار می‌باشد که هر حجره باکتری در نتیجه انقسام باعث بروز یک کالونی می‌گردد. همچنان فرض می‌گردد که نمونه مورد کشت متجانس بوده و حجرات به شکل باهم چسبیده یا پاغنده‌ها موجود نمی‌باشند.

زمانیکه plate count اجرا می‌گردد، مهم است تا تعداد محدودی از کالونی‌ها در پلیت بوجود آیند، زیرا در صورت وجود کالونی‌های بسیار زیاد، عده از کالونی‌ها باهم بسیار نزدیک روئیده و حتی عده از کالونی‌ها هیچ نمی‌رویند و ممکن نیست تا شمارش آن صورت گیرد. عموماً پلیت‌های حاوی ۲۵ الی ۲۵۰ کالونی قابل شمارش می‌باشند. جهت حصول اطمینان از اینکه تعداد کالونی‌های پلیت در همین حدود خواهد بود، نمونه باید چندین بار رقیق ساخته شود که به نام رقیق‌سازی مسلسل serial dilution یاد می‌گردد.

رقیق‌سازی مسلسل

اگر فرض گردد که یک نمونه مایکروبی دارای ده هزار حجره فی ملی لیتر می‌باشد. اگر یک ملی لیتر ازین نمونه کشت گردد، به اساس تیوری در بطری دیش متوسط ده هزار کالونی بوجود می‌آیند. این تعداد قابل شمارش نمی‌باشد. اگر یک ملی لیتر نمونه متذکره با ۹ ملی لیتر آب مقطر یکجا ساخته شود، در هر ملی لیتر آن یکهزار حجره وجود خواهد داشت که در صورت کشت در پلیت هنوز هم یکهزار کالونی بوجود خواهد آمد که غیر قابل شمارش می‌باشد. اما اگر یک بار دیگر هم یک ملی لیتر محلول حاصله با ۹ ملی لیتر آب مقطر مخلوط گردد، سبب به میان آمدن محلولی می‌گردد که هر ملی لیتر آن صد حجره می‌باشد. چنین محلول اگر به اندازه یک ملی لیتر در وسط کشت گردد، سبب به میان آمدن ۱۰۰ کالونی ممکنه در پلیت می‌گردد که قابل شمارش می‌باشد.

میتود ریخت در پلیت و هموار نمودن در پلیت

شمارش در پلیت به یکی ازین دو میتود صورت می‌گیرد. در میتود ریخت، باید نخست نمونه مورد نظر را که حسب دلخواه رقیق شده باشد، به اندازه یک ملی لیتر یا حتی ۰٫۱ ملی لیتر در

داخل دیش یا پلیت جاگزین می‌گردد. بعداً ماده اگر مایع شده را که درجه حرارت آن ۵۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد، بالای آن علاوه می‌گردد. پلیت را آهسته تکان داده تا محتوی مایکروبی به خوبی داخل ماده اگر پراکنده گردد. اما در این میتود بعضی باکتری‌های حساس در مقابل حرارت تلف می‌شوند و در صورتیکه وسط برای مایکروب انتخابی باشد، برای تشخیص مایکروب دیدن اوصاف کالونی مانند رنگ آن نیز مهم می‌باشد. چون درینصورت باکتری‌ها عمدتاً در قسمت متوسط وسط قرار دارند، بنابر تشخیص آن ممکن مشکل باشد. جهت جلوگیری از این مشکلات، از میتود دوم یعنی از میتود هموار نمودن استفاده بعمل می‌آید. درین میتود نخست اگر مایع شده در وسط ریخته می‌شود. بعد از سرد شدن، نمونه مایکروبی به اندازه یک ملی لیتر یا ۰٫۱ ملی لیتر توسط میله مخصوص و معقم شیشه‌یی بالای سطح ماده اگر هموار می‌گردد. درین میتود کالونی‌ها در سطح وسط قرار گرفته و از تماس آن با اعماق ماده اگر که حرارت آن بلند است، جلوگیری بعمل می‌آید.

فلتریشن

در صورتیکه تعداد باکتری‌ها بسیار کم باشد، مانند جهیل‌ها و دریا‌های نسبتاً معقم، می‌توان تعداد باکتری‌ها موجود در آن را با میتود فلتریشن تعیین نمود. صد ملی لیتر یا بیشتر آب را از غشای فلتری که منافذ آن برای عبور باکتری کافی نباشد، عبور داده می‌شود. بدین ترتیب، باکتری‌ها از فلتر عبور نتوانسته و بالای سطح فلتر نگهداری می‌گردد. این فلتر منبسط به پلیت حاوی اگر مغذی منتقل که در آن کالونی‌های ناشی از باکتری‌های موجود در سطح فلتر می‌رویند. این میتود عمدتاً در خصوص باکتری‌های *coli form* اجرا می‌گردد. باکتری‌های متذکره در آب نشان دهنده ملوئیت آب یا غذا با مواد غایبه می‌باشد. کالونی‌های این مایکروب زمانی وصفی می‌باشند که در اوساط مغذی تفریقی کشت گردد.

میتود MPN یا Most Probable Number Method

این میتود دیگر برای تعیین تعداد باکتری می‌باشد که یک میتود احصائیبوی می‌باشد. درین میتود چنان پنداشته می‌شود که اگر یک نمونه برای چندین مراتبه بصورت متواتر رقیق ساخته شود، بالاخره تعداد آن به حدی کم می‌گردد که قابل کشت در وسط نمی‌باشد. پس هر قدر مراتب رقیق‌سازی الی سرحد عدم قابلیت کشت زیاد باشد، به همان اندازه غلظت مایکروبی در نمونه اصلی زیاد می‌باشد. این یک میتود تخمینی می‌باشد که ۹۵٪ قابل اطمینان است.

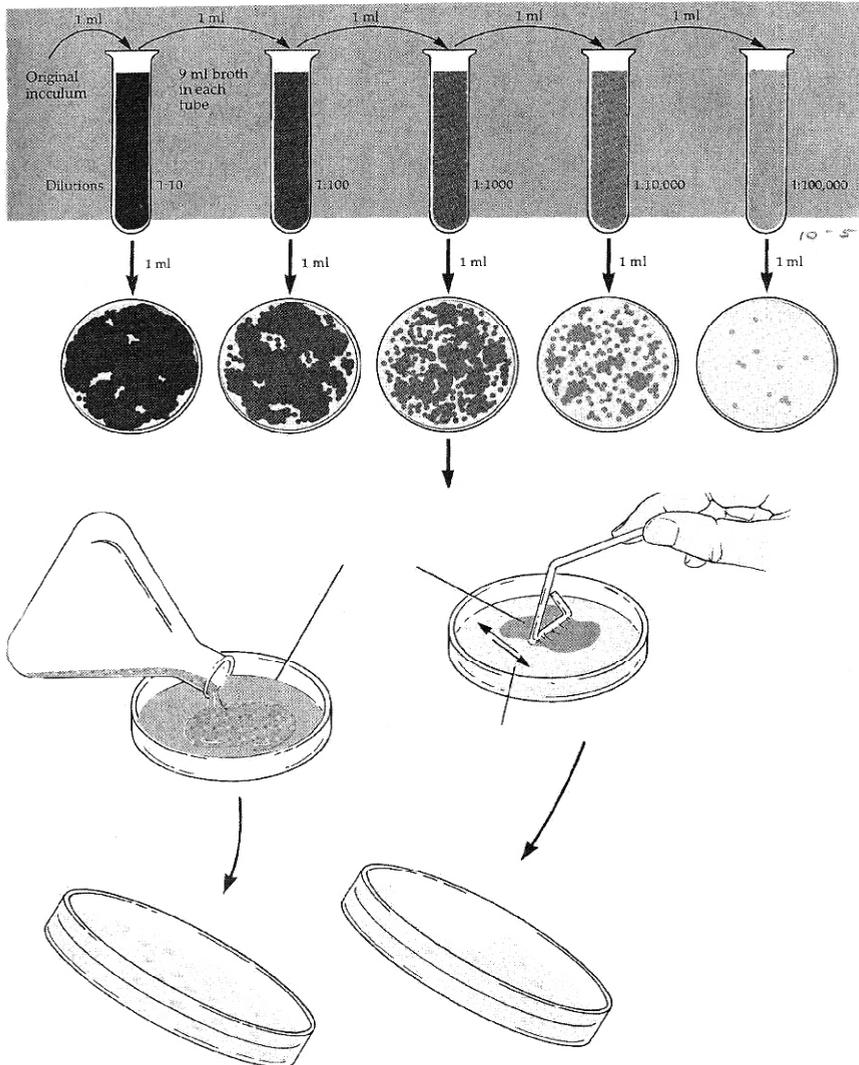
میتود رویت مستقیم تحت مایکروسکوپ

درین شیوه اندازه معین از نمونه مورد نظر بالای یک قسمت مشخص از ساحه سلاید مایکروسکوپ قرار داده شده، تلوین گردیده و بعداً مشاهده می‌شود. مثلاً برای تعیین تعداد باکتری شیر، ۰,۰۱ ملی لیتر از نمونه اخذ و در یک سانتی مربع ساحه سلاید که قبلاً نشانی گردیده، هموار می‌گردد. بعداً ذریعه مایکروسکوپ دیده شده، تعداد حجرات در هر ساحه دید محاسبه و اوسط آن تعیین می‌گردد. چون وسعت ساحه دید هر آئینه اوبجکتیف مایکروسکوپ قابل تعیین است، بناً گفته می‌توانیم که ساحه دید به چه اندازه وسعت دارد. در صورتی که وسعت ساحه دید معلوم باشد، اوسط تعداد حجرات فی ساحه دید را بر همین ساحه تقسیم می‌نمایند. عدد حاصله مساوی است به تعداد حجرات باکتری موجود در سلاید فی ملی متر مربع ساحه سلاید می‌باشد. اگر به شیوه فوق تعداد حجرات فی ملی متر مربع محاسبه گردد، به آسانی می‌توان تعداد حجرات را در سانتی مربع نشانی شده سلاید نیز تعیین کنیم که به این صورت گفته می‌توانیم که ۰,۰۱ ملی لیتر نمونه به چه اندازه حجرات را احتوا می‌کند. در میتود رویت مستقیم مایکروسکوپی از سلاید های مخصوص به نام *Petroff Hausser counter* نیز استفاده می‌شود که در سلاید های آن فرو رفته گی های کم عمق موجود می‌باشد حجم معین از محلول باکتری بالای آن انداخته می‌شود. بعداً کورسلاید که دارای مربعات با وسعت معین می‌باشد، پوشیده شده که بعد از تعیین تعداد حجرات فی مربع، می‌توان آنرا به ضریب معینه ضرب نموده تعداد مجموعی حجرات را بدست آورد. همچنان آلات برقی تعیین کننده تعداد حجرات در محلول ها موجود می‌باشد. مفیدیت این میتود (رویت مستقیم یا محاسبه آلات برقی) عبارت از محاسبه سریع بوده که مانند طرق دیگر مستلزم مدت زمان زیاد نمی‌باشد، اما درین میتود حجرات زنده و حجرات غیر زنده تفریق شده نمی‌تواند و نیز در میتود رویت مستقیم، حجرات متحرک بخوبی اندازه شده نمی‌تواند.

میتود های غیر مستقیم برای تعیین تعداد حجرات مایکروبی همیشه لازم نیست تا تعداد حجرات بصورت مستقیم محاسبه گردد، بلکه در ساینس و صنعت، از میتود های آتی غیر مستقیم نیز استفاده بعمل می‌آید:

Turbidity (مکدریت): در عده از تجارب اندازه نمودن مکدریت محلول جهت تخمین تعداد حجرات کافی می‌باشد. یعنی هر قدر تعداد حجرات زیاد باشد، به همان اندازه محلول بیشتر مکدر یا ابر مانند می‌گردد. درین شیوه از آله به نام کالوریمتر یا سپکتوفوتومتر استفاده می‌گردد. آله متذکره دارای آخذه یی برای روشنی می‌باشد. ابتداً سمپل مورد نظر در بین منبع نور و آله قرار داده شده هر قدر که مکدریت محلول زیاد باشد، به همان اندازه نور جذب گردیده و مانع مواصلت نور به آخذه کالوری متر

می‌گردد. که بدین صورت تعداد حجرات را می‌توان اندازه نمود. این میتود برای اندازه‌گیری ملوثیت مایعات با مواد مفید نیست زیرا تعداد مایکروب‌ها درینصورت معمولاً بسیار کم بوده که قابل کشف توسط این میتود نمی‌باشند، یعنی حد اقل ده الی صد میلیون حجره باید فی ملی لیتر محلول موجود باشد، تا توسط کالوری متر کشف گردد.



شکل ۲-۲

فعالیت میتابولیک: این میتود با اندازه نمودن محصولات استقلابی میکروب‌ها تطبیق می‌گردد. مثلاً اسیدها یا کاربن دای اکساید با ازدیاد تعداد باکتری‌ها، بیشتر تولید گردیده و بنأ افزایش در اندازه آن نشان دهنده ازدیاد در تعداد باکتری‌ها می‌باشد. بگونه مثال می‌توان گفت که باکتری شیر اکسیجن مصرف می‌نماید. ماده *methylene blue* به محلول آن علاوه و بعداً محلول در تیوب دارای سرپوش محکم قرار داده می‌شود. چون ماده متذکره در موجودیت اکسیجن رنگ آبی داشته و در عدم آن، فاقد رنگ است، بنأ هر قدر تعداد باکتری زیاد گردد، به همان اندازه رنگ تیوب کمتر می‌گردد. این میتود غیر دقیق بوده در لابراتورهای تجربی مورد استفاده قرار گرفته اما برای مقاصد تجارتي عمدتاً استعمال ندارد.

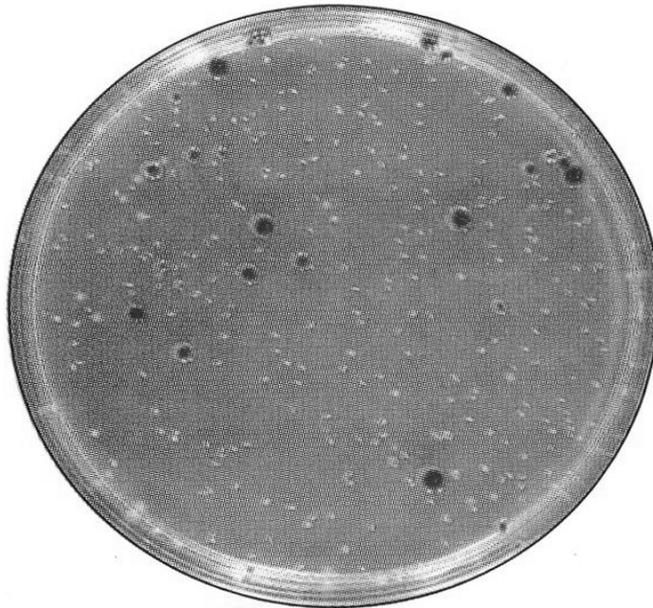
وزن خشک: نموی بعضی از ارگان‌های میله مانند *molds* را به مشکل می‌توان با میتود های قبیل الذکر اندازه نمود. در فنگس‌ها میتود *plate count* نمی‌تواند ازدیاد در *biomass* را اندازه نماید و در عوض اندازه سپورهای غیر زوجی را نشان می‌دهد که مورد قناعت نمی‌باشد، بنأ با استفاده از میتود اندازه گیری وزن خشک، فنگس‌ها ابتدا از سایر مواد توسط فلاتر مخصوص جدا، در بوتل توزین قرار داده می‌شود. بعداً توسط آله خشک کننده، آب آن خارج می‌گردد که وزن خشک آن بدست می‌آید. عین میتود را می‌توان در خصوص باکتری‌ها نیز به کار برد، که در بین صورت باکتری‌ها توسط *centrifugation* از سایر مواد جدا ساخته می‌شوند.

اوصاف کشت باکتری‌ها

تعریف: خصوصیات و چگونگی رشد باکتری‌ها در اوساط غذایی، اوصاف کشت باکتری‌ها نامیده می‌شود.

در اوساط غذایی جامد حجم کالونی‌ها (بزرگ، متوسط، کوچک و کوچکتر)، شکل (کروی، مستقیم و غیره)، رنگ (بنفش، سفید، لیمویی، طلایی، سیاه و غیره)، کثافت و بالاخره مشخصات کنار و سطح کالونی (*S-Form & R-Form*) در نظر گرفته می‌شود، در حالیکه در اوساط غذایی مایع موجودیت مکدریت و تجانس آن در نظر گرفته می‌شود.

اوصاف کلچری باکتری‌ها در اوساط غذایی مربوط است به نوع هر باکتری، درجه حرارت، شرایط کشت، PH وسط غذایی مخصوصاً مربوط است به درجه رشد باکتری در وسط غذایی.



شکل ۲-۳ اوصاف کشت مایکروب‌ها

میتود حصول کلچر خالص باکتری‌های Aerobic یا هوازی

حصول کلچر خالص و تجرید نوع معین از باکتری اساس امور باکتریولوژی است، زیرا در پراکتیک روزانه بیش از همه به موادی برمیکوریم که باکتری‌های مختلفی را در خود دارند و این مأمول که نوع باکتری بصورت مشخص تعیین شود و مشخصات آن مطالعه شود صرف زمانی میسر است که باکتری مورد نظر بطور خالص تجرید شده حصول گردد.

اولین و عمده ترین گام در مطالعه مواد که حاوی باکتری‌های مختلف النوع اند این است که کالونی‌های جداگانه هر باکتری بطور خالص بدست آید تا بعداً آزمایشات بیوشیمیک و دیگر تست‌های لابراتواری نزد هر باکتری بطور جداگانه صورت گیرد.

که در نتیجه با در نظر داشت مایکروب که با سیروم خون مخلوط باشد و اجرای تست‌های سیرولوژیک، بیولوژیک و الرژیک نوع باکتری بطور یقینی تشخیص می‌گردد که در لابراتوار جهت حصول کالونی‌های جداگانه هر باکتری از اوساط Agar دار در Petri - Dish ها و Tube ها استفاده می‌گردد.

میتود Drigalsky

جهت بدست آوردن کلچر خالص باکتری‌ها از کشت باکتری‌ها در اوساط غذائی جامد استفاده می‌گردد طوری‌که مواد تحت مطالعه در اوساط غذائی بصورت خطوط کوچک کشت شده بعداً ۱۸۰ درجه پطری دیش دور داده شده و مجدداً در قسمت دیگری از ظرف به عین میتود کشت صورت می‌گیرد، درین میتود که به میتود Drigalsky معروف است مواد به تدریج به مصرف رسیده و باکتری‌ها در خطوط مختلف و به گروپ‌های مختلف می‌روند. (شکل ۲ - ۱)

میتود Shukewitch

ازین میتود جهت حصول کلچر خالص باکتری‌های متحرک مثلاً Clostridium. Tetani و Proteus Vulgaris استفاده می‌شود طوری‌که مواد در قسمت تحتانی تیوب جا داده شده که بعد از گذشت ۱۲ - ۱۸ ساعت باکتری‌های مذکور در سطح تیوب (Slant) می‌رویند که به سهولت می‌توان کلچر خالص آنرا بدست آورد. در حالیکه دیگر باکتری‌ها نمی‌توانند به سطح تیوب برسند.

کشت مایکرواورگانیزم‌ها

کشت یا Cultivation عبارت از پرورش تکثیر اورگانیزم‌ها ذریعه فراهم نمودن شرایط مساعد محیطی می‌باشد. مایکرواورگانیزم‌های تکثیرکننده باعث بوجود آوردن مایکرواورگانیزم‌های همانند خود شده و نیازمند به عناصر لازم برای ترکیب کیمیاوی آنها می‌باشد. مواد مغذی باید عناصر فوق را به اشکال قابل دسترس میتابولیکی در خود داشته باشند. علاوتاً اورگانیزم‌ها برای سنتیز ماکرومالیکولها و نگهداشت غلظت‌های کیمیاوی لازم در غشاً، به انرژی میتابولیکی ضرورت دارند. فکتورهایی که باید حین نشونما در وسط زرعیه کنترل گردند شامل مواد مغذی، pH، درجه حرارت، تهویه، غلظت مواد نمکی و قوه ایونیک محیط می‌باشند.

ایجابات نشونما

بیشترین وزن خشک مایکرواورگانیزم‌ها را مواد عضوی از قبیل کاربن، هایدروجن، نایتروجن، اکسیجن، فاسفورس و سلفر تشکیل می‌دهد. علاوه برآن آیون‌های غیرعضوی مانند پتاسیم،

سودیم، آهن، مگنیزیم، کلسیم، و کلوراید برای ایجاد سهولت در کتالایز انزیماتیک (Enzymatic catalysis) و حفظ میلان غلظت کیمیاوی در امتداد غشای حجروی لازم اند. اکثراً مواد عضوی از ماکرومالیکول‌هایی متشکل اند که توسط (anhydride bonds) با هم وصل اند. سنتیز آنهایدارید باند ضرورت به انرژی کیمیاوی دارد. انرژی متذکره از دو رابطه phosphodiester در ATP حاصل می‌گردد. انرژی اضافی که برای حفظ ترکیب ثابت سایتوپلازمیک حین نشونما در محیط کیمیاوی متغیر خارج حجروی ضرور است از *proton motive force* یا نیروی محرک پروتون حاصل می‌گردد. *Proton motive force* عبارت از انرژی پتانسیل است که در نتیجه انتقال پروتون‌ها از بین غشا حاصل می‌گردد. در *eukaryote* ها غشا قسمتی از مایتوکاندریا و یا کلوروپلاست بوده می‌تواند. در *prokaryote* ها غشا عبارت از غشای سایتوپلازمیک حجره می‌باشد.

نیروی محرک پروتون یک تفاوت میلان الکتروکیمیاوی بوده و متشکل از دو جز می‌باشد: تفاوت در pH (غلظت آیون هایدروجن) و تفاوت در چارج آیونیک. چارج قسمت خارجی غشاً نظر به قسمت داخلی غشاً آن بیشتر مثبت می‌باشد. تفاوت بین چارج باعث می‌گردد که حین دخول پروتون به سایتوپلازم از طریق غشاً انرژی آزاد گردد. انرژی آزاد شده در قسمت حرکت حجره، حفظ میلانهای مالیکولی و آیونیک در بین غشاً و سنتیز روابط آنهایدارید در ATP و یا همه این اهداف مورد استفاده قرار می‌گیرد. برعکس حجراتی که دارای یک منبع ATP باشد، امکان دارد از انرژی روابط آنهایدارید برای ایجاد نیروی محرک پروتون استفاده نماید که این به نوبه خود در قسمت تحرکیت حجره و حفظ میلانهای کیمیاوی آن مورد استفاده قرار گرفته می‌تواند.

یک اورگانیزم برای نشونما به عناصر عضوی و تمام آیون‌های لازم برای انرژی و کتالایز ضرورت دارد. علاوه‌تاً باید یک منبع انرژی برای ایجاد نیروی محرک پروتون و سنتیز ماکرومالیکول‌ها موجود باشد. مایکرواورگانیزم‌ها نظر به ضروریات تغذیوی و منابع انرژی میتابولیک باهم تفاوت‌های زیادی دارند.

منابع انرژی میتابولیک

سه میکانیزم عمده‌ایکه برای تولید انرژی میتابولیک استفاده می‌گردند عبارت از *fermentation*، *photosynthesis* و *respiration* می‌باشند. حد اقل یکی از میکانیزم‌های فوق باید برای نشونمای

یک اورگانیزم به کار برده شوند.

تخمیر (Fermentation)

تشکل ATP در تخمیر توأم با انتقال الکترون‌ها نمی‌باشد. تخمیر متصف است با *substrate phosphorylation* که عبارت از یک پروسه انزیماتیک بوده و در آن رابطه *pyrophosphate* بواسطه یک میانجی میتابولیک *phosphorylate* شده مستقیماً به ADP/انتقال می‌یابد. این میانجی‌های *phosphorylate* شده توسط ترتیب دوباره مواد *fermentable* مانند گلوکوز، لکتوز و یا *arginine* تشکیل می‌گردند. از آنجائیکه تخمیر با تغییر در حالت اوکسیدشن یا ریدکشن مواد قابل تخمیر توأم نمی‌باشد، ترکیب عناصر در تولیدات تخمیر باید با مواد فوق یکسان باشند. طور مثال تخمیر یک مالیکول گلوکوز $C_6H_{12}O_6$ در عملیه *Embden Meyerhof pathway* منتج به حصول دو رابطه پایروفاسفیت در ATP و تولید دو مالیکول لکتیک اسید $C_3H_6O_3$ می‌گردد.

تنفس (Respiration)

تنفس مشابه به یکجا شدن یک پروسه وابسته به انرژی با خروج چارج از یک *battery* می‌باشد. ارجاع کیمیای یک اوکسیدانت (*electron acceptor*) از طریق یک سلسله خاص ناقلین الکترونها در غشاً باعث ایجاد نیروی محرک پروتون در غشای باکتری می‌گردد. ارجاع کننده (*electron donor*) امکان دارد عضوی و یا غیرعضوی باشد؛ طور مثال لکتیک اسید منحیث ارجاع کننده برای بعضی اورگانیزم‌ها و گاز هایدروجن منحیث ارجاع کننده برای سایر اورگانیزم‌ها فعالیت می‌نماید. اوکسیجن گازی (O_2) غالباً بحیث اوکسیدانت فعالیت نموده ولی اوکسیدانت‌های بدیل که توسط بعضی اورگانیزم‌ها استفاده می‌گردند شامل CO_2 ، SO_4 و NO_3 می‌باشند.

فوتوسنتز (Photosynthesis)

فوتوسنتز مشابه به تنفس بوده که در آن ارجاع یک اوکسیدانت از طریق سلسله خاص ناقلین الکترونها باعث ایجاد نیروی محرک الکترون می‌گردد. تفاوت میان دو پروسه فوق در این است که در فوتوسنتز ارجاع کننده و اوکسیدانت در نتیجه عملیه *photochemical* از انرژی نوری که توسط پگمنت‌های غشا جذب می‌گردند به میان می‌آید؛ بنابراین، فوتوسنتز فقط تا زمانی ادامه می‌یابد که یک منبع انرژی نوری موجود باشد. نباتات و بعضی باکتری‌ها با استفاده از آب بحیث ارجاع کننده کاربن دای اکساید، قادر به ذخیره مقادیر قابل ملاحظه انرژی نوری می‌باشد. درین پروسه اوکسیجن آزاد و مواد عضوی تولید می‌گردند. تنفس که در نتیجه آن اوکسیدشن انرژی‌تیک مواد عضوی توسط یک آخذة الکترونی مانند اوکسیجن صورت می‌گیرد، به اورگانیزم‌های دارای فوتوسنتز در عدم

موجودیت نور انرژی تهیه می‌نماید.

تغذی

مواد مغذی اوساط زرعیه باید حاوی تمام مواد ضروری برای سنتیز بیولوژیک اورگانیزم‌های جدید باشد. درین مبحث مواد مغذی نظر به عناصری که تهیه می‌نمایند تصنیف بندی گردیده اند.

منبع کاربن

طوریکه فوقاً تذکر یافت، نباتات و بعضی باکتری‌ها قادر اند تا از انرژی فوتوسنتتیک برای ارجاع کاربن دای اکساید در موجودیت آب استفاده نمایند. این اورگانیزم‌ها به گروپ Autotroph تعلق می‌گیرند و عبارت از موجوداتی اند که برای نشونما به مواد عضوی ضرورت ندارند. نوع دیگر Autotroph ها عبارت از chemolithroph می‌باشد و شامل اورگانیزم‌هایی اند که از مواد غیرعضوی مانند هایدروجن و یا thiosulfate بحیث ارجاع کننده و از کاربن دای اکساید بحیث منبع کاربن استفاده می‌نمایند.

Heterotroph ها برای نشونما به کاربن عضوی ضرورت دارند و کاربن عضوی باید به شکل قابل جذب آن در دسترس باشد. طور مثال نفتالین می‌تواند که کاربن و تمام انرژی لازم را برای نشونمای herotroph های تنفس کننده مهیا نماید، ولی تعداد کمی از اورگانیزم‌ها مراحل لازم میتابولیک برای استفاده از نفتالین را دارا می‌باشند. از جانب دیگر گلوکوز می‌تواند در نشونمای فرمتتی و تنفسی بسیاری اورگانیزم‌ها مساعدت نماید. مسئله عمده اینست که وسط زرعیه دارای مقادیر مناسب مواد برای مایکروبهای نشونما کننده باشد. وسط که برای نشونمای یک اورگانیزم مساعد است امکان دارد نشونمای اورگانیزم دیگری را نهی نماید.

کاربن دای اکساید برای یک تعداد تعاملات بیوسنتتیز لازم شمرده می‌شود. بسیاری اورگانیزم‌های تنفسی کاربن دای اکساید را بیش از حد مورد نیاز تولید می‌نمایند، در حالیکه تعداد دیگری در وسط زرعیه شان به یک منبع کاربن دای اکساید ضرورت دارند.

منبع نایتروجن

نایتروجن جزء عمده در ترکیب پروتین و نوکلئیک اسیدها بوده و تقریباً ۱۰٪ وزن خشک حشرات باکتریایی را تشکیل می‌دهد. نایتروجن امکان دارد از منابع مختلفه بدست آید و مایکرواورگانیزم‌ها نظر به توانمندی شان برای جذب نایتروجن از همدیگر متفاوت می‌باشند. حاصل نهایی تمام تعاملات برای استفاده از نایتروجن عبارت از شکل ارجاع شده عنصر نایتروجن یعنی آیون امونیم (NH_4^+) می‌باشد.

بسیاری مایکرواورگانیزمها قادر به ترکیب نایتريت (NO_3^-) و نایتريت (NO_2^-) با ارجاع آیون‌های فوق به امونیا (NH_3) می‌باشند. این تعاملات *assimilation* نظر به تعاملات که برای *dissimilation* نایتريت و نایتريت به کار می‌روند متفاوت می‌باشند. تعاملات *dissimilatory pathway* توسط اورگانیزم‌های که آیون‌های متذکره را به حیث آخذه‌های نهایی الکترونی در عملیه تنفس به کار می‌برند، مورد استفاده قرار می‌گیرد. این پروسه به نام *denitrification* یاد شده و محصول آن عبارت از گاز نایتروجن N_2 است که به فضای خارجی آزاد می‌گردد.

قابلیت جذب نایتروجن با ارجاع NH_3 که به نام *Nitrogen fixation* یاد می‌گردد وصف بالخاصه حشرات پروکاریوتیک بوده و تعداد نسبتاً کم باکتری‌ها این ظرفیت میتابولیک را دارا می‌باشند. این پروسه به مقادیر زیاد انرژی میتابولیکی ضرورت داشته به سهولت توسط اوکسیجن خنثی می‌گردد. ظرفیت تثبیت نایتروجن یا *Nitrogen fixation* در باکتری‌های مختلف النوع موجود بوده که چنین باکتری‌ها ستراتیژی‌های مختلفه بیوشیمیکی را برای حفظ انزایم‌های *Nitrogen fixing* از اوکسیجن، به کار می‌برند.

بسیاری مایکرواورگانیزم‌ها می‌توانند از NH_4 یا امونیم بحیث یگانه منبع نایتروجن استفاده نمایند و عده دیگر اورگانیزم‌ها قابلیت تولید امونیم را از امین‌های ($R-NH_2$) و یا امینواسیدها دارا می‌باشند. تولید امونیا در نتیجه *deamination* امینواسیدها به نام *ammonification* یاد می‌گردد. امونیا در نتیجه تعاملات بیوشیمیکی که *glutamate* و *glutamine* را در بر می‌گیرند در ترکیب مواد عضوی شامل می‌گردد.

منبع سلفر

همانند نایتروجن سلفر نیز در ترکیب بسیاری مواد عضوی حشرات شامل است. سلفر در ساختمان انواع کوانزایم‌ها شامل بوده و در زنجیرهای جانبی *cysteinyl* و *methionyl* پروتین‌ها نیز دریافت می‌شود. سلفر به شکل عنصر آن توسط نباتات و حیوانات استفاده شده نمی‌تواند. با آنهم بعضی باکتری‌های اوتوتروف می‌توانند آنرا به شکل سلفات $(SO_4)^2$ اوکسیدایز نمایند. اکثر مایکرواورگانیزم‌ها می‌توانند از سلفات بحیث یک منبع سلفر استفاده نمایند یعنی سلفات را به شکل هایدروجن سلفاید (H_2S) ارجاع نمایند. بعضی مایکرواورگانیزم‌ها می‌توانند هایدروجن سلفات را مستقیماً از وسط زرعیه جذب نمایند ولی این مرکب می‌تواند برای بسیاری اورگانیزم‌ها توکسیک باشد.

منبع فاسفورس

فاسفیت $(PO_4)^3$ در ترکیب *ATP*، نوکلئیک اسید، و کوانزایم‌های مانند *NAD*، *NADP* و

flavinها لازم شمرده می‌شود. علاوه بر بسیاری میتابولیت‌ها، شحمیات (phospholipid و lipid A)، اجزای تشکیل دهنده دیوار حجروی (teichoic acid)، بعضی پولی سکرایدهای کپسول و بعضی پروتئین‌ها دارای فاسفور می‌باشند. فاسفیت همیشه به شکل فاسفیت آزاد غیرعضوی جذب می‌گردد.

منابع منرال‌ها

برای پیشبرد فعالیت آنزایم‌ها به منرال‌های متعددی ضرورت است. آیون مگنیزیم $(Mg)^{++}$ و آیون آهن $(Fe)^{++}$ در مشتقات porphyrin نیز دریافت می‌گردند. مگنیزیم در مالیکول chlorophyll و آهن بحیث قسمتی از کوانزایم cytochrome‌ها و peroxidase‌ها موجود اند. مگنیزیم و آهن برای فعالیت نورمال و ثبات رایبوزوم‌ها ضروری شمرده می‌شود. آیون کلسیم به حیث جز متشکله دیوار حجروی باکتری‌های گرام مثبت لازم شمرده می‌شود، گرچه باکتری‌های گرام منفی به آن ضرورت ندارند. بسیاری اورگانیزم‌های آبی جهت نشونما به آیون سودیم ضرورت دارند. برای ایجاد یک وسط زرعیه برای کشت بسیاری مایکرواورگانیزم‌ها لازم است تا منابع پتاسیم، مگنیزیم، کلسیم، و آهن به شکل آیونیک آن یعنی $(K^+, Mg^{++}, Ca^{++}, Fe^{++})$ موجود باشند. بسیاری منرال‌های دیگر (مانند $Mn^{++}, Mo^{++}, Co^{++}, Cu^{++}$ و Zn^{++}) نیز لازم دانسته می‌شوند. منرال‌های متذکره در آب نل و یا به شکل ناخالص در سایر مرکبات موجود بوده می‌توانند.

فکتورهای نشونما (Growth factors)

فکتور نشونما عبارت از یک مرکب عضوی بوده که برای نشونمای حجره لازم دانسته شده ولی خود حجره قادر به سنتیز آن نمی‌باشد. بسیاری مایکرواورگانیزم‌ها در صورت موجودیت مواد مغذی که قبلاً ذکر شد قادر اند تا تمام ساختمانهای تشکیل دهنده ماکرومالیکول‌ها را سنتیز نمایند که عبارتند از: امینواسیدها؛ purine و pyrimidine‌ها (پیشقدم میتابولیکی نوکلئیک اسیدها)، کاربوهایدریت‌های اضافی (پیشقدم پولی سکرایدها) و اسیدهای شحمی و مرکبات isoprenoid. علاوه بر اورگانیزم‌های دارای حیات آزاد باید قادر به سنتیز مغلق ویتامین‌ها که بحیث پیشقدم کوانزایم‌ها فعالیت می‌نمایند، نیز باشد.

هر یک از مرکبات اساسی فوق در نتیجه سلسله‌های جداگانه تعاملات انزایماتیک سنتیز می‌گردند. هر آنزایم تحت کنترل یک gene خاص تولید می‌شود. زمانیکه یک اورگانیزم به gene mutation مواجه گردد که در نتیجه آن یکی از این آنزایم‌ها قادر به فعالیت نگردد زنجیر مربوطه شکسته و محصول نهایی بدست نمی‌آید. درینصورت اورگانیزم باید مغلق مربوطه را از محیط بدست آورد. این مغلق فکتور نشونما یا growth factor را برای اورگانیزم تشکیل می‌دهد. این نوع میوتیشن امکان دارد به سهولت در لابراتوار صورت گیرد.

انواع مختلفی از مایکروارگانیسم‌ها به صورت شان به فکتور نشونما از همدیگر متفاوت می‌باشند. معلق‌های مربوط به فکتور نشونما در تمام اورگانیزم‌ها دریافت شده و جزء اساسی شان را تشکیل می‌دهد. تفاوت در ضرورت مایکروارگانیسم‌ها اختلاف در قابلیت سنتتیز شان را منعکس می‌سازد. بعضی انواع ضرورت به فکتور نشونما ندارند، در حالیکه تعداد دیگری مانند بعضی لکتوباسیل‌ها در جریان تکامل تدریجی شان قابلیت سنتتیز 30-40 مرکب اساسی را از دست داده‌اند و بنابراین ضرورت دارند تا آنرا از محیط به دست آرند.

فکتورهای محیطی که بالای نشونما اثر دارند

یک وسط زرعیه مناسب باید حاوی تمام مواد مغذی لازم برای کشت مایکرواورگانیزم‌ها باشد و نیز فکتورهای از قبیل pH، حرارت و تهویه باید محتاطانه کنترل گردند. در یک وسط که بشکل مایع استعمال می‌شود؛ امکان دارد برای اهداف خاص با علاوه نمودن agar و یا silica gel به شکل gel در آورده شود. Agar عبارت از عصاره پولی سکراید الجی بحری بوده و طور بی نظیر برای کشت مایکروارگانیسم‌ها مناسب می‌باشد، زیرا در برابر فعالیت مایکروبی مقاوم بوده و در حرارت 100 درجه سانتی‌گرید منحل می‌گردد ولی تا زمانیکه در حرارت پائین‌تر از 45 درجه سانتی‌گرید قرار نگیرد به حالت gel در نمی‌آید. حجرات در وسط به حرارت 45 درجه سانتی‌گرید معلق گردیده و بزودی با سردی مواجه می‌گردد تا به شکل gel درآید، بدون آنکه به حجرات آسیبی برسد.

مواد مغذی

در صفحات قبلی وظیفه هر یک از مواد مغذی توضیح گردید و یک لیست مواد مناسب ارائه گردید. بصورت عموم، مواد ذیل باید موجود باشند:

۱- دونر و رسپتور هایدروجن: 2g/lit

۲- منبع کاربن: 1g/lit

۳- منبع نایتروجن: تقریباً 1g/lit

۴- منرالها: سلفر و فاسفورس هر یک در حدود 50mg/lit و Trace elements در حدود 0.1-1 mg/lit

۵- فکتور نشونما (growth factor): امینواسیدها، pyrimidine purine هر یک در حدود 50 mg/lit

۶- ویتامین‌ها: 0.1-1 mg/lit

برای مطالعه میتابولیزم مایکروبیها اکثراً لازم است تا یک وسط کاملاً مصنوعی آماده گردد که خواص اصلی و غلظت هر یک از اجزای ترکیبی بصورت واضح معلوم می‌باشد. در غیراینصورت استفاده از مواد طبیعی مانند عصاره خمیرمایه، پروتین هضم شده و یا مواد مشابه آن نهایت ارزان و ساده خواهد بود. بسیاری مایکروبیهای که بصورت آزاد زندگی می‌کنند در وسط حاوی عصاره خمیرمایه به بسیار خوبی نشونما خواهد نمود. انواع پرازیتیک امکان دارد مواد خاصی را ضرورت داشته باشند که فقط در خون و یا عصاره انساج حیوانی دریافت می‌شوند. اما مایکروبیهای پرازیتیک (مانند *Treponema pallidum*) وجود دارند که در خارج از عضویت نشونما کرده نمی‌توانند و یا فقط در داخل حجرات *eukaryotic* نشونما می‌نمایند (مانند *Chlamydia trachomatis*).

برای بسیاری اورگانیزمها یک مرکب ساده (مثلاً یک امینواسید) بحیث منبع انرژی، منبع کاربن، و منبع نایتروجن مورد استفاده قرار گرفته می‌تواند. تعداد دیگری ضرورت به یک مرکب جداگانه برای هر منبع فوق دارند. اگر مواد طبیعی در یک وسط غیرمصنوعی مواد مغذی را به مقادیر ناکافی داشته باشد، باید مواد فوق به وسط علاوه گردند.

غلظت آیون هاییدروجن (pH)

بسیاری اورگانیزمها دارای محدوده کوچکی برای pH مطلوب می‌باشند. pH مطلوب باید بصورت تجربی برای هر نوع مایکرواورگانیزمها تعیین گردد. بسیاری اورگانیزمها در pH 6.0-8.0 به خوبی نشونما می‌کنند. با آنهم بعضی انواع (*acidophil* ها) به طرف pH 3.0 و سایرین یعنی (*alkalophil* ها) به pH 10.5 شدیداً متمایل می‌باشند.

مایکرواورگانیزمها pH داخلی شانرا به اساس اندازه pH خارجی تنظیم می‌نمایند. اسیدوفیل ها pH داخلی شانرا در حدود 6.5 با موجودیت pH خارجی 5.0 - 1.0 حفظ می‌نمایند. نوتروفیل ها pH داخلی شانرا حدود 7.5 در موجودیت pH خارجی 5.5-8.5 و الکلوفیل ها pH داخلی شانرا در حدود 9.5 در موجودیت pH خارجی 9.0-11.0 حفظ می‌نمایند. pH داخلی بواسطه *proton transport system* تنظیم می‌گردد. این سیستم در غشای سابتوپلازمیک قرار داشته و مشتمل است بر *ATP-driven proton pump* /بتدایی و *Na⁺/H⁺ exchanger*. یک سیستم تبادل *K⁺/H⁺* نیز درین پروسه تنظیم pH در تترالوفیل ها مساعدت می‌نماید.

حرارت

انواع مختلفه مایکروبیها نظر به درجه حرارت مطلوب شان برای نشونما از همدیگر متفاوت می‌باشند: انواع *psychrophilic* در درجه حرارت پائین یعنی (15-20°C): انواع *mesophilic* در درجه

حرارت ($30-37^{\circ}\text{C}$) و بسیاری انواع *thermophilic* در درجه حرارت ($50-60^{\circ}\text{C}$) بخوبی نشونما می‌نمایند. بسیاری اورگانیزم‌ها *mesophilic* اند، درجه حرارت 30°C برای بسیاری مایکروبه‌های آزاد درجه حرارت مطلوب بوده و درجه حرارت عضویت میزبان برای حیوانات همزی خونگرم مطلوب شمرده می‌شود.

بلندترین درجه حرارت که توسط یک نوع خاص قابل تحمل می‌باشد، ارتباط نزدیک به ثبات عمومی حرارتی پروتئین‌هایی دارد که از عصاره حجرات متذکره بدست می‌آید. مایکرواورگانیزم‌ها همانند نباتات و حیوانات عکس‌العمل حرارتی (*heat-shock*) را دارند، که عکس‌العمل متذکره عبارت از سنتتیز گذری پروتئین‌های (*heat-shock*) در صورت مواجه شدن آنی به حرارت بلندتر از حرارت مطلوب می‌باشد. این پروتئین‌ها بصورت فوق‌العاده در مقابل حرارت مقاوم بوده و پروتئین‌های حجره را که در مقابل حرارت حساس اند ثبات می‌بخشد. (1)

ارتباط میان سرعت نشونما و حرارت در طرح Arrhenius نشان داده شده است. Arrhenius نشان داد که لوگاریتم سرعت تعامل کیمیاوی که به $(\log k)$ نشان داده شده است تابع خطی معکوس درجه حرارت ($1/T$) می‌باشد. فراتر از اثرات حرارت بالای نشونما، حرارت خیلی زیاد باعث کشتن مایکرواورگانیزم‌ها می‌گردد. درجه حرارت نهایت زیاد برای تعقیم مستحضرات مورد استفاده قرار می‌گیرد. درجه حرارت نهایت پائین نیز باعث مرگ حجرات مایکروبی می‌گردد، گرچه طور قابل اطمینان برای تعقیم مورد استفاده قرار گرفته نمی‌تواند. باکتری‌ها پدیده دیگری را از خود ظاهر می‌سازند به نام *cold shock* یاد می‌گردد و عبارت از کشتن حجرات با مواجه نمودن آنی به حرارت پائین می‌باشد. طور مثال با پائین آوردن درجه حرارت از 37°C به 5°C تقریباً ۹۰ فیصد حجرات *Escherichia coli* از بین می‌روند. یک تعداد مرکبات حجرات را از تبرد و یا *cold shock* حفاظت می‌نماید که از جمله *glycerol* و *dimethyl sulfoxide* بیشتر مورد استفاده دارند.

تنفس مایکرواورگانیزم‌ها

تنفس در باکتری‌ها یک پروسه مغلق است که با آزاد ساختن انرژی مورد نیاز جهت سنتتیز مرکبات عضوی همراه است که آزاد شدن انرژی در نتیجهٔ اوکسیدیشن مواد عضوی صورت می‌گیرد Oxidation مواد به طرق مختلف صورت می‌گیرد: به شکل مستقیم، غیر مستقیم و طریقهٔ انتقال الکترون‌ها.

- به شکل مستقیم یعنی مواجه شدن با گاز اوکسیجن (Hydrogenation)
- به شکل غیر مستقیم Dehydrogenation که در این نوع اوکسیدیشن مواد عضوی به

اشکال مختلف هایدروجن را آزاد می‌نمایند که البته این عملیه در اثر اشتراک آب صورت می‌گیرد، طوریکه مالیکول های آب به مواد اوکسیداز شونده وصل گردیده و بعداً هایدروجن آزاد می‌گردد. بنابراین گفته می‌توانیم که درین طریقه اوکسیدیشن مواد به اثر نصب اوکسیجن آب به آنها صورت می‌گیرد. هایدروجن که به اثر اوکسیدیشن مواد عضوی آزاد می‌گردد با محصولات دیگر که درین پروسه پدید می‌آیند یکجا می‌گردد. اغلب باکتری‌ها مانند فقاریه ها و نباتات جهت تنفس از اوکسیجن مالیکولی هوا استفاده کرده که در جریان تنفس مواد عضوی را به H_2O و CO_2 اوکسیداز می‌کنند.

- طریقه انتقال الکترون‌ها: این طریقه طوری است ماده که الکترون را می‌دهد اوکسیده شده و آنکه می‌گیرد، ارجاع می‌شود. انتقال هایدروجن از مواد به طرق مختلف صورت می‌گیرد، گیرنده هایدروجن می‌تواند اوکسیجن هوا باشد یا موادی که قابلیت ارجاع را دارند.

عامل Oxido – Reduction می‌تواند به شکل ذیل صورت گیرد:

طرز تولید انرژی در باکتری‌ها مختلف است، مثلاً عده ای از باکتری‌ها به مثل اورگانیزم‌های عالی جهت تنفس از اوکسیجن مالیکولی استفاده کرده و مواد عضوی را اوکسیداز می‌نمایند که این نوع مایکروب‌ها را مایکروب‌های هوازی یا Aerobic می‌نامند، در حالیکه عده دیگری از مایکروب‌ها در عدم موجودیت اوکسیجن مواد عضوی را اوکسیداز کرده که به نام Anaerobic یاد می‌شوند. البته در بین انواع ذکر شده مایکروب‌های حد وسط (از نظر تنفسی) نیز وجود دارند که ذیلاً تصنیف مکمل مایکروب‌ها نظر به تایپ تنفسی شان ذکر می‌گردد:

۱- **مایکروب‌های هوازی مطلق یا Obligatory Aerobic:** این مایکروب‌ها در یک اتموسفیر شامل 20% اوکسیجن به خوبی رشد و نمو می‌کنند و از این جهت سطح اوساط زرعیه مایع و جامد محل مناسب برای کشت و رشد بعدی آنها است مانند: *Sarcina* و *Vibrio cholera*, *Mycobacterium Tuberculois*. این نوع مایکروب‌ها دارای انزایم‌های اند که توسط آن از مواد اوکسیده شده هایدروجن را گرفته و به اوکسیجن هوا انتقال می‌دهند.

۲- **مایکروب‌های هوازی جزئی یا Microaerophilic Microbes:** این نوع مایکروب‌ها به مقدار خیلی کم اوکسیجن ضرورت دارند (تقریباً 1%) غلظت بلند اوکسیجن این

مایکروب‌ها را محو نه نموده بلکه نشونمای آن‌ها را توقف می‌دهند مانند Actinomycetes و Leptospirae.

۳- مایکروب‌های غیر هوازی اختیاری **Facultative Anaerobic**: این نوع مایکروب‌ها می‌توانند در موجودیت و یا عدم موجودیت اوکسیجن مالیکولی رشد و تکثر کنند که اغلب مایکروب‌های Pathogen و Saprophyte مربوط این دسته می‌باشند.

Capnophilic Microbes: این گروه از مایکروب‌ها جهت رشد و نشونمای خود به غلظت کم اوکسیجن و مقادیر زیاد از CO₂ نیاز دارند مانند Brucella suis.

۴- مایکروب‌های غیر هوازی مطلق **Obligatory Anaerobic Microbes**: برای این گروه از مایکروب‌ها اوکسیجن یکی از عوامل توقف دهنده رشد و نمو بوده و مضر می‌باشد مانند: Cl. Botulinum و Cl. Perferingens، Cl. Tetani.

فعالیت مایکروب‌ها تقریباً همیشه مربوط است به درجهٔ هوازی بودن مواد غذایی. ارتباط غذایی: اوساط غذایی ممکن است به طور اعظمی با هایدروجن اشباع شده باشند، یا اینکه با اوکسیجن، M. Clark پیشنهاد کرد که درجهٔ هوازی بودن وسط با لگاریتم فشار قسمی گاز هایدروجن ارائه شود که آنرا پتانسیل Oxido-reduction می‌نامند و معمولاً به RH₂ نشان داده می‌شود. (هایدروجن ارجاع شده) حدود این Potential از صفر الی 42.6 می‌باشد که این تمام درجات اشباع یک مایع را با O₂ و یا H₂ معین می‌سازد که ذیلاً مطالب فوق به ارتباط تنفس مایکروب‌ها توضیح می‌گردد:

اگر RH₂ معادل صفر باشد به این معنی است که اشباع محیط توسط اوکسیجن به حد اقل بوده در حالیکه توسط هایدروجن اعظمی می‌باشد و RH₂ معادل 42.6 اشباع اعظمی محیط را توسط اوکسیجن ارائه می‌کند که درینصورت اشباع محیط توسط هایدروجن در سطح اصغری قرار دارد رشد باکتری‌های هوازی از RH₂ معادل 20 - 14 و اضافه تر از آن و از مایکروب‌های Facultative Anaerob / از 0 - 20 و اضافه تر از آن مایکروب‌های Anaerobic / از 0 - 12 صورت می‌گیرد.

مایکرواورگانیزم‌های هوازی (Aerobic Microorganisms)

مایکرواورگانیزم‌های هوازی آنهایی اند که جهت تهیهٔ انرژی برای خود از کاربوهایدریت‌ها و دیگر مواد عضوی استفاده می‌کنند مانند Fungus ها Yeast و بعضی باکتری‌های دیگر. تعداد زیادی از باکتری‌های هوازی مواد عضوی را به طور کامل اوکسیدیشن نموده و گاز CO₂ را به حیث محصول نهایی استقلال مواد مذکور تولید می‌نمایند.

قوه ایونیک و فشار اسموتیک

فکتورهای دیگر از قبیل فشار اسموتیک و غلظت نمک نیز ممکن تا حدود کمتری کنترل گردند. برای بسیاری اورگانیزمها اوصاف اوساط عادی قناعت بخش اند ولی برای اشکال آبی و اورگانیزمهایی که به نشونما در محلول های قندی غلیظ تطابق یافته اند فکتورهای متذکره باید در نظر گرفته شوند. اورگانیزمهایی که به غلظت های بلند نمک ضرورت دارند به نام *halophilic* و آنهایی که به فشار بلند اسموتیک ضرورت دارند به نام *osmophilic* یاد می‌شوند.

اکثریت باکتری ها می‌توانند فشار اسموتیک و قدرت ایونیک خارجی زیادی را تحمل نمایند، زیرا چنین باکتری های قادر اند تا فشار اسموتیک و غلظت آیونیک داخلی شان را خود تنظیم نمایند: *Osmolarity* ذریعه ترانسپورت فعال ایون های K^+ بداخل حجره تنظیم می‌گردد؛ قوه ایونیک داخلی ذریعه اخراج پولی امین عضوی به نام *putrescine* که دارای چارج مثبت اند تنظیم می‌گردد. از آنجائیکه *putrescine* چارج های مثبت متعدد را در یک مالیکول انتقال می‌دهند، یک کاهش بزرگ در قوه ایونیک فقط مقادیر کمی از قوه اسموتیک را به مصرف می‌رساند.

میتوذهای کشت (Cultivation Methods)

دو پرابلم مورد ملاحظه قرار خواهد گرفت: انتخاب یک وسط مناسب و تجرید یک اورگانیزم باکتریایی به صورت کلچر خالص.

تخنیک مورد استفاده و وسط انتخاب شده نظر به نوعیت تحقیق فرق می‌نماید. طور عموم ممکن سه حالت ذیل موجود باشند:

۱- امکان دارد هدف از کلچر کشت حجرات یک نوع خاص باشد.

۲- امکان دارد هدف تعیین تعداد و انواع اورگانیزمهای موجود در مواد مورد مطالعه باشد.

۳- ممکن هدف، تجرید یک نوع خاص مایکرواورگانیزم از یک منبع طبیعی باشد.

الف: کشت حجرات با یک نوع خاص: مایکرواورگانیزمهای که از نظر میکروسکوپی در یک محیط طبیعی نشونما می‌نمایند امکان دارد نمودی شان بصورت کلچر خالص در وسط مصنوعی نهایت مشکل باشد. طور مثال کلچر انواع معین پرازیت ها هیچگاهی خارج از وجود میزبان بدست آمده نمی‌تواند. با وجود آنهم طور عموم اگر شرایط طبیعی که اورگانیزم در آن نشونما می‌نماید با دقت کامل فراهم گردند یک وسط مناسب بدست آمده می‌تواند. فکتورهای از قبیل *PH*، درجه حرارت و تهویه به سهولت و تنظیم گردیده می‌تواند، ولی تهیه مواد مغذی یک مشکل عمده شمرده می‌شود. نقش محیط حیه دارای اهمیت بوده و تحلیل آن مشکل می‌باشد. یک پرازیت ممکن به عصاره انساج میزبان

ضرورت داشته باشد و یک اورگانیزم آزاد ممکن به موادی ضرورت داشته باشد که توسط مایکرواورگانیزم دیگری که با آن زندگی اشتراکی دارد افزای می‌گردد. تجارب قابل ملاحظه‌ی می‌مکن برای تعیین نیازمندی‌های اورگانیزم لازم باشند و موفقیت در آن مربوط می‌باشد به تهیه منبع مناسب هر کتگوری از مواد مغذی که در آغاز این فصل تذکر داده شد.

ب. معاینه مایکروبیولوژیک مواد طبیعی: مواد طبیعی مورد معاینه امکان دارد حاوی *microenvironment* و یا محیط‌های کوچک دیگری باشد که هرکدام آن یک محیط زیست مناسب را برای انواع مختلفه اورگانیزم‌ها مهیا می‌سازد. قرار دادن یک نمونه مواد تحت شرایط معین باعث خواهد شد تا یک گروه خاص اورگانیزم‌ها تولید کالونی نموده و بسیاری انواع دیگر از نظر دور بمانند. به این دلیل معمولاً سمپل یا نمونه مواد تا حد ممکن با استفاده از اوساط و شرایط متنوع مورد نشونما قرار داده می‌شوند. اگر هدف این باشد تا اکثریت انواع اورگانیزم‌ها در مواد باید شناخته شوند غیرمعقول نخواهد بود که تحت ۶ الی ۸ نوع شرایط کلچری قرار داده شوند.

برای اینکه به هر نوع اورگانیزم موجود چانس نشونما داده شود، از وسط جامد استفاده به عمل می‌آید تا از ازدحام کالونی‌ها جلوگیری بعمل آید. درغیراینصورت، رقابت میان اورگانیزم‌ها باعث خواهد شد تا بعضی انواع از تشکل کالونی محروم گردند.

ج. تجرید یک نوع خاص مایکرواورگانیزم: اگر یک نمونه کوچک خاک با عملیه‌های مناسب مواجه گردد، در هر *microenvironment* یا محیط کوچک آن انواع مختلفه اورگانیزم‌ها نشونما خواهند نمود. از خاک بارور یا حاصلخیز (مرطوب، تهویه شده، غنی از منرالها و مواد عضوی) صدها و حتی هزاران نوع تجرید شده می‌تواند. این عملیه با انتخاب نوع معین صورت می‌گیرد. طور مثال یک گرم خاک در داخل یک فلاسک و یا وسط مایع که برای نوع مورد نظر اورگانیزم تهیه شده باشد قرار داده می‌شود، مثلاً *aerobic nitrogen fixer* برای (*azotobacter*). درینصورت وسط فاقد نایتروجن مرکب بوده و تهویه آن به درستی صورت می‌گیرد. اگر حجات *azotobacter* در خاک موجود باشند، در چنین وسط بخوبی نشونما خواهند نمود. انواع که قادر به تثبیت نایتروجن نباشند فقط تا حدی نشونما خواهند نمود که خاک با نایتروجن تثبیت شده آغشته باشد. زمانیکه نشونمای کلچر بیشتر می‌گردد فیصدی *azotobacter* نیز طور قابل ملاحظه‌ی زیاد می‌یابد. بنا برین میتود فوق به نام *enrichment culture* یا وسط غنی شده یاد می‌گردد. انتقال یک نمونه از چنین کلچر به یک وسط تازه باعث غنای بیشتر *azotobacter* شده و پس از چندین دوره انتقال، کلچر در وسط غنی شده جامد در ظروف هموار (پلیت) قرار داده شده و کالونی‌های *azotobacter* تجرید می‌گردند.

وسط مایع به منظور رقابت و انتخاب انواع دلخواه استفاده می‌گردند حتی اگر تنها چند حجره واحد

نوع مورد نظر در بین ملیونها حجره در خاک موجود باشند. مفاد بیشتر از *natural enrichment* یا غنای طبیعی گرفته شده می‌تواند. طور مثال به منظور دریافت *kerosene oxidizer* خاک *oil-laden* یا چرب انتخاب می‌گردد، زیرا چنین وسط یک محیط غنی شده برای نوع متذکره می‌باشد. کلچر غنی شده عبارت از عملیه ایست که طی آن وسط عیناً مانند محیط زیست طبیعی برای مایکرواورگانیزم مورد نظر آماده می‌گردد. یک اصل عمده در تهیه چنین محیط قرار ذیل می‌باشد: اورگانیزم انتخاب شده از نوعی خواهد بود که تمام ایجابات تغذی آن برآورده گردیده بتوانند. طور مثال *azotobacter* در وسطی که حاوی نایتروجن عضوی باشد بهتر نشونما می‌نماید، ولی ایجابات حداقل نشونمایی آنرا موجودیت N_2 تشکیل می‌دهد. بنابراین اورگانیزم متذکره برای وسطی انتخاب می‌گردد که حاوی N_2 به حیث یگانه منبع نایتروجن باشد. اگر نایتروجن عضوی به وسط علاوه گردد، *azotobacter* برای آن انتخاب نگردیده بلکه اورگانیزم دیگری که حداقل نیازمندی آن نایتروجن عضوی باشد، انتخاب می‌گردد.

اگر یک اورگانیزم خاصی را در مواد طبیعی جستجو می‌نماییم بهتر خواهد بود که اورگانیزم دریافت شده در یک وسط تشخیص دهنده *differential medium* قرار داده شود. وسط تشخیص دهنده عبارت از وسطی است که در آن کالونی‌های یک نوع خاص مایکرواورگانیزم طور مشخص ظاهر می‌گردند. طور مثال کالونی‌های *E. coli* در وسط *agar* که حاوی رنگهای *eosin* و *methylene blue* باشند (*EMB agar*) به شکل درخشندگی قوس قزح ظاهر می‌گردند. در وسط *EMB agar* که دارای غلظت زیاد قند یک قیمته باشد اورگانیزم‌های فرمنت کننده قند نیز باعث تولید کالونی‌ها به رنگ سرخ خواهد شد. وسط تشخیص دهنده برای اهدافی از قبیل تشخیص موجودیت *enteric bacteria* در آب و یا شیر و موجودیت پتوجن‌های معین در نمونه‌های کلینیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

تجرید مایکرواورگانیزمها در کلچر خالص

به منظور مطالعه اوصاف اورگانیزم‌های مورد نظر لازم است تا کلچر آن بصورت خالص بدون موجودیت سایر انواع اورگانیزم‌ها بدست آید. برای این هدف باید یک حجره واحد را از سایر حجرات جدا نموده و به شکلی کلچر گردد که حجرات حاصله از آن نیز از هم مجزا قرار گیرند. به این منظور میتودهای مختلفی موجود اند:

الف. *Plating* یا قراردادن در پلیت‌ها: برعکس حجرات وسط مایع، حجرات در وسط جلاتینی به شکل غیرمتحرک قرار می‌گیرند. بنابراین اگر چند حجره در یک وسط جلاتینی قرار

گیرند، هر یک آن به داخل یک کالونی جداگانه نشونما خواهند نمود. ماده جلاتینی ایدآل که اکثراً برای اوساط مایکروبیولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرد عبارت از agar می‌باشد. Agar یک پولی سکراید اسیدی بوده از عصاره یک نوع خاص الجی های سرخ بدست می‌آید. یک suspension 2-1.5% آن در آب، به حرارت 100°C منحل گردیده و یک محلول شفاف را بدست می‌دهد که در حرارت 45°C دوباره شکل gel را بخود می‌گیرد. بنابراین یک محلول معقم agar در حرارت 50°C سرد ساخته شده، باکتری و یا سایر حجرات مایکروبی به آن علاوه شده و بعداً در حرارت 45°C سرد ساخته می‌شود تا شکل gel را اختیار نماید. (گرچه بسیاری حجرات مایکروبی در حرارت 50°C از بین می‌روند، سرعت کشته شدن مایکروبها درین درجه حرارت از نظر زمانی بسیار کم است). پس ازینکه شکل gel را به خود اختیار نمود agar برای بار دیگر مایع نمی‌گردد تا اینکه به حرارت بلندتر از 80°C مواجه نگردد. بدین ترتیب متعاقباً از یک درجه حرارت مساعد برای نموی کلچر مایکروبی استفاده صورت گرفته می‌تواند. در میتود افشاندن روی پلیت یک suspension حجرات با agar ذوب شده در حرارت 50°C یکجا گردیده و بداخل یک پتری دیش پاشیده می‌شود. زمانیکه agar دوباره جامد می‌گردد، حجرات در آن غیرمتحرک گردیده و بداخل کالونی ها نشونما می‌نمایند. اگر suspension حجرات بخوبی رقیق گردیده باشد، کالونی ها بخوبی از همدیگر جدا می‌گردند، به این ترتیب احتمال زیاد می‌رود که هر کالونی از یک حجره واحد مشتق گردیده باشد. باوجود آن برای تأیید این موضوع لازم است تا یک کالونی نوع مورد نظر با آب مواجه ساخته شده و بعداً در پلیت قرار داده شود. با تکرار این عمل برای چندین مرتبه کلچر خالص بدست خواهد آمد.

Suspension اولی به نوبه خود در یک پلیت agar ذریعه یک لوپ بصورت خطوط مستقیم کشیده می‌شود. با کشیدن خطوط بیشتر تعداد کمتر حجرات در لوپ باقی خواهند ماند. و بالاخره لوپ حجرات واحد را بالای agar جابجا خواهد نمود. بعداً پلیت در incubation قرار داده شده و کالونی هایی که بهتر جدا گردیده می‌توانند از آن گرفته می‌شوند. این کالونی ها با آب مواجه ساخته شده و دوباره بالای agar بشکل خطوط قرار داده می‌شوند. اگر یک suspension (نه فقط تعدادی از حجرات نشونما کننده از یک کالونی و یا یک خط) به شکل رگه یا خط تولید شوند، درینصورت این میتود به اندازه میتود pour-plate قابل اعتماد بوده و نیز سریعتر از آن می‌باشد.

ب. رقیق کردن: یک میتود کمتر قابل اطمینان می‌باشد. درین میتود suspension بصورت مسلسل رقیق می‌گردد و سمپل‌های از هر دوره رفاقت در بالای پلیت قرار داده می‌شود. اگر فقط چند نمونه یک رفاقت معین به نشونما آغاز نمایند احتمال می‌رود که این کلچرها از یک حجره واحد نشئت نموده باشند. این میتود مورد استعمال زیادی نداشته به استثنای حالاتیکه در آن میتود plating امکانپذیر نباشد. یکی از اوصاف نامطلوب این میتود آنست که فقط برای تجرید انواع غالب اورگانیزم‌ها در بین انواع مختلط مورد استفاده گرفته می‌تواند.

انزایم‌های مایکرواورگانیزم‌ها

تمام تعاملات بیوشیمییک که در یک اورگانیزم زنده بخاطر استقلاب مواد، نمو و انکشاف بعمل می‌آید با شرکت انزایم‌ها صورت می‌گیرد. انزایم‌ها موادی هستند که بحیث catalisator ها در فعل و انفعالات کیمیایی وارد عمل می‌شوند و در حجرات برای کمک و انجام اعمال حیاتی بوجود می‌آیند یا بعبارة دیگر انزایم‌ها کاتالیستهای بیولوژیک اند که توسط حجرات زنده تولید شده و ماهیتاً پروتینی اند، انزایم‌ها دارای وزن مالیکولی بلند هستند، انزایم‌ها از لحاظ ترکیب و نظر به ساختمان خود به دو گروه تقسیم می‌شوند:

۱- انزایم‌های یک جزئی که فقط از پروتین ساخته شده اند.

۲- انزایم‌های دو جزئی یا Protoid که از یک جزء یا قسمت پروتینی و یک جزء غیر پروتینی ساخته شده اند، که قسمت غیر پروتینی آنرا به نام گروه Prosthetic یاد می‌کنند.

دوام ارتباط قسمت پروستتیک با قسمت پروتینی در انزایم‌های دو جزئی مختلف بوده می‌تواند که گروه پروستتیک از قسمت پروتینی خود جدا شده و در ارتباط مؤقتی یک پروتین دیگر قرار گیرد که این گروه پروستتیک را به نام Co-Enzyme یاد می‌کنند. در انزایم‌های یک جزئی رول گروه پروستتیک را گروه‌های کیمیایی معین که در ترکیب انزایم‌ها وجود دارد بازی می‌کند که این گروه‌ها به نام مراکز فعال انزایم‌ها یاد می‌شوند مثلاً گروه SH و گروه OH حلقه امیدوول و غیره، انزایم‌ها دارای فعالیت بلند بوده که بمقایسه کاتالیزورهای غیر عضوی بی اندازه قوی و فعال اند مثلاً یک مالیکول یک انزایم در ظرف یک دقیقه می‌تواند ده‌ها هزار مالیکول Substrate سبسترات را به مواد مختلف تبدیل نماید.

خصوصیت عمده آنزایم‌ها اینست که هر آنزایم بالای مواد مختص به خود عمل کرده و در حضور مواد مخصوص به خود تحریک شده و فعالیت می‌کند و بقیه مواد را تماس نمی‌گیرد مثلاً آنزایم Lactase سبب تجزیه لکتوز به گلوکوز و گلکتوز شده و بالای دیگر مواد (کاربوهایدریت‌ها) اثر ندارد.

فعالیت یک آنزایم مربوط است به درجه حرارت محیط PH وسط، غلظت سبسترات و غلظت خود آنزایم، همچنین موجودیت بعضی مواد کیمیای در وسط بالای فعالیت آنزایم‌ها تاثیر دارد که بعضی از این مواد فعالیت آنزایم‌ها را بالا برده که به نام مواد Activator یاد می‌شوند. در جمله می‌توان از کاتیون‌های دو و لانسۀ از قبیل Mg, Ni, Mn, Ca نام برد برعکس بعضی مواد کیمیای دیگر سبب نهی فعالیت آنزایم‌ها شده یا اینکه فعالیت آنزایم‌ها را کاهش می‌دهند که به نام مواد Inhibitor یاد می‌شوند مانند نمک‌های فلزات ثقیله، انتی بیوتیک‌ها SH₂ و غیره... مواد Inhibitor مراکز فعال آنزایم‌ها یا اتم فلزات را که در ترکیب آنها وجود دارد تماس کرده و در نتیجه فعالیت آنزایم‌ها را فلج می‌کند، می‌دانیم که سیر بیوشیمیک استقلاب مواد در حجرات مایکرواورگانیزم توسط آنزایم‌ها تنظیم می‌شود از اینرو هر عاملی که بر فعالیت آنزایم‌ها اثر کند نتیجتاً بر فعالیت مایکرواورگانیزم‌ها تاثیر خواهد کرد.

هر مایکرواورگانیزم دارای کامپلکس از آنزایم‌های مختلفه می‌باشد که همین آنزایم‌ها فعالیت بیوشیمیک آنها را معین ساخته و هم نقش آنها را در سیکل مواد در طبیعت و در سیر فاسد شدن مواد غذایی تعیین می‌کند. با در نظر داشت چگونگی پیدایش آنزایم‌ها گروپ *Constitutive* و *Adaptive* آنها وجود دارد آنزایم‌های *Constitutive* عبارت از آنزایم‌های اساسی اند که به مسوولیت جن‌های مخصوص در داخل حجره مایکرواورگانیزم تولید می‌گردد در حالیکه آنزایم‌های سازگار یا *Adaptive* تنها در صورت موجودیت سبسترات معین و مخصوص در محیط تولید می‌شود یا بعبارۀ دیگر ترکیب اینوع آنزایم‌ها توسط سبسترات معین تحریک می‌شود، مثلاً اگر یک مایکرواورگانیزم در وط که حاوی قند مالتوز است کشت شود تحت این شرایط آنزایم‌ها را که مالتوز را تجزیه می‌کند ترکیب کرد، که متعاقب جذب و تحلیل آن بحیث منبع کاربن از آن استفاده می‌کند که البته همین مایکرواورگانیزم قبل از مواجه شدن به قند مالتوز این خصوصیت را نداشته است.

در حجرات باکتری‌ها تاثیر و نحوه عملکرد آنزایم‌ها موافقتاً بوجود می‌آیند به این معنی که اگر در یک حجره باکتری چند نوع آنزایم در عین زمان موجود باشد هر یک از این آنزایم‌ها مطابق به کیفیت و چگونگی مواد موجود در محیط یکی بعد دیگری وارد صحنه می‌گردند در عمل *Fermentation* در موقع لزوم سهم می‌گیرند.

انزایم که در قسمت‌های مختلف حجره باکتری موجود اند در *Mesosomes* در میتوکاندریون و در غشای سائتوپلازمیک.

بعضی از انزایم‌ها توسط حجره باکتری در وسط افراز می‌شوند که به نام *Exoenzymes* یاد می‌گردند که این انزایم‌ها رول عمده‌ئی در تهیه مواد غذائی، دخول آنها در حجره باکتری دارند زیرا این نوع انزایم‌ها تجزیه مواد پیچیده و مغلق مانند نشایسته و پروتین را به مالیکول‌های ساده به عهده داشته که متعاقب پارچه شدن این مواد می‌توانند داخل حجره باکتری شوند. همچنین نوع دیگری از انزایم وجود دارد که توسط باکتری در وسط افراز نشده بلکه توسط ساختمان‌های داخل حجروی *Adsorbed* یا تثبیت شده که به نام *Endoenzyme* یاد می‌شوند و در استقلاب داخل حجروی مواد سهم می‌گیرند.

بعضی باکتری‌های مخصوص دارای مواد (انزایم خارج الحجروی) از قبیل *Coagulase*, *Ureas*, *Leukocidins* و *Collagenase* *Hyalurenidase* *Lecithinase* *Hemolysins* می‌باشد. به طور مثال *Clostridium perfringens* آگروتوکسین (*Lecthinase*) تولید می‌نماید آنانیکه قابلیت تبدیل نمودن لیستین به فاسفوریل کولین و دای گلیسراید دارد نکروز عضلی از اثر عمل مشترک *Lecithinase*, *Collagenase* و *Mucinase* (*Hyaluronidase*) به میان می‌آید. *Mucinase* و *Collagenase* نسج استنادی عضلات را تجزیه نموده و *Lecithinase* لستین غشا و رشته‌های عضلاتی را منحل می‌نماید. *Hemolysis* در سیر انتانات *Anaerobic* از سبب انحلال *Lecitin* سترومای کریوات سرخ خون واقع می‌شود.

تظاهرات نکروتیک توکسین‌ها اهمیت زیاد برای توفیق عامل مرضی دارد اولاً توکسین نسج فعال و زنده را برای مایکروب مرضی به یک سبسترات بی خطر تبدیل نموده ثانیاً نسج نکروتیک پرازیت را از تأثیرات عکس‌العمل‌های دفاعی عضویت نگه می‌دارد.

چرا ما توکسین‌ها را مطالعه می‌کنیم از آن جائیکه لوحه کلینیکی امراض انتانی ارتباط مستقیم به موجودیت کمپلکس توکسین‌ها و تأثیرات آن دارند بناً وقتیکه ما این کمپلکس توکسین را بشناسیم لوحه کلینیکی و تشخیص مرض را تعیین تداوی سببی مرض را اجرا نموده و بالاخره وخامت و اندازه مرض را پیشبینی کرده می‌توانیم.

میتود کشت باکتری‌های غیر هوازی

جهت کشت انایروب‌ها غلظت اوکسیجن در محیطی که باکتری در آن قرار دارد باید کاهش داده شود که به این منظور میتود‌های مختلف وجود دارد و ذیلاً توضیح می‌گردد:

۱- کشت توسط وخذه: این ساده ترین میتود جهت کشت انایروب ها است که مایکروب مورد نظر را بطور عمود در اوساط قندی اگر دار (Suger Agar) توسط وخذه به عمق وسط کشت می کنند.

۲- علاوه نمودن مواد ارجاع کننده در وسط: به این منظور اکثراً از وسط Kitt – Tarocci استفاده می شود که در ترکیب آن گلوکوز پنج فیصد با بویون، پارچه های گوشت و پارچه های تازه مواد عضوی گوشت کوفته شده وجود دارد که از جمله گلوکوز و یک قسمت از مواد عضوی قابلیت ارجاعی را دارند. طرز تهیه این وسط چنین است که قبل از استفاده بخاطر خارج ساختن اوکسیجن آنرا جوش می دهند و بعداً برای اینکه از تماس اوکسیجن اتمسفر محفوظ باشد سطح آنرا با واسلین و یا پارافین می پوشانند.

۳- محو هوا از محیط: با اخراج هوا از محیط، غلظت اوکسیجن نیز کاهش می یابد که با استفاده از میتود های میکابیکی (بوسیله Anaerostate یا مخراج الهوا) می توان به این هدف نایل شد.

۴- تعویض هوای محیط با دیگر گازات: به این منظور معمولاً از گاز هایدروجن استفاده می شود.

۵- محافظه میخانیکی وسط از اوکسیجن هوا: به این منظور موج ترین میتود (میتود Venial – Vion است. درین میتود از تیوپ های شیشه ای که دارای 30cm طول و 3 – 6mm قطر است کار می گیرند. طوریکه یک نهایت آنرا در تیوپ های مخصوص دیگر که Capillair tube نام دارد وصل نموده و نهایت دیگر آنرا با پنبه مسدود می نمایند، بعداً مواد تحت مطالعه را که قبلاً در Agar مذاب کشت مخلوط شده است در تیوپ شیشه ئی بالا می کشند و انجام باز تیوب را به وسیله آتش مسدود می نمایند تیوپ را در ترموستات به حرارت 37°C گذاشته که با ظاهر شدن کالونی های سیاه رنگ در داخل تیوپ، از قسمت دلخواه شکستنده شده و بدینسان کلچر خالص باکتری های غیر هوازی بدست می آید.

۶- جذب اوکسیجن محیط بطرق کیمیاوی: به این منظور معمولاً از محلول قلوی پیروگالول (ده فیصد قلوی و بقیه Pyrogallol) استفاده می شود.

۷- میتود بیولوژیک جهت مهیا ساختن شرایط غیر هوازی: به این منظور ساده ترین روش،

Fortner می‌باشد بدین ترتیب که نصف پیتری دیش را بوسیله یک مایکروب هوازی معلوم و نصف دیگر آنرا با مواد مورد آزمایش (تحت مطالعه) که گمان می‌شود دارای مایکروب‌های غیر هوازی است کشت می‌نمایند، البته وسط مورد نظر قبلاً توسط یک کارد معقم به دو حصه از هم جدا می‌شود بعد از کشت اطراف پیتری دیش را بوسیله موم مخصوص یا پارافین مستور می‌نمایند و در ترموستات می‌گذارند، در ابتدا مایکروب‌های هوازی شروع به تکثیر نموده و تمام اوکسیجن محیط را مصرف می‌نمایند که در نتیجه شرایط رشد آنایروب‌ها مساعد می‌گردد.

اوساط زرعیه برای کشت غیر هوازی ها

برای کشت غیر هوازی‌ها اغلباً از اوساط ذیل استفاده می‌شود:

۱- وسط Kitt - Tarocci: برای تهیه این وسط غذائی کبد گاو و گوشت گاو و یا قطعات از پلاستتا را خورد، خورد پارچه نموده به مقدار سه چند آن بویون مغزی را که دارای PH 7.0 - 7.4 می‌باشد با آن یکجا نموده و برای 30 دقیقه جوش می‌دهند، بویون را فلتر نموده و پارچه‌های گوشت را (کبد و یا پلاستتا) در یک ظرف جالی می‌شویند و با کاغذ فلتر خشک می‌نمایند، بعداً به هر تیوب به مقدار 3-4 گرم از گوشت و یا کبد متذکره را علاوه نموده و به مقدار 7.8ml از بویون فلتر شده را به آن اضافه می‌کنند، تیوب را برای 30 دقیقه تحت فشار یک اتموسفیر تعقیم می‌نمایند که درینحالت حرارت اتوکلاو 121°C می‌باشد.

۲- Agar for Venial - Vion tube: در بویون مارتین گلوکوز یک یا دو فیصد را حل نموده و Agar را در آن علاوه می‌نمایند وسط غذائی متذکره به تیوب‌های مخصوص جا داده می‌شود (Capillairy tube) وسط زرعیه دارای PH 7.4 می‌باشد که در حرارت مرطوب برای سه روز متوالی تعقیم می‌شود.

۳- Ferum sulfat agar یا Weelsenbleer agar: بالای 100ml از وسط Meat peptone agar 3% گلوکوز یک فیصد را در PH = 7.4 یکجا می‌کنند و آنرا حرارت می‌دهند در اثنای حرارت $10\text{ml}/60^{\circ}\text{C}$ از محلول 32% Na_2SO_3 از محلول 28% FeCl_3 را که با آب مقطر تهیه شده به آن علاوه می‌نمایند (محلول NaSO_3 به

حرارت مرطوب در ظرف یک ساعت تعقیم می‌کنند) وسط را تعقیم نه نموده و آنرا در ترموستات می‌گذارند. باکتری‌های غیر هوازی کالونی‌های سیاه رنگ را تولید می‌نمایند. (بخاطر تشکل FeS در وسط)

در صورت موجودیت *Clostridium Perferingenes* وسط بعد از 1-2 ساعت تغییر رنگ می‌دهد در حالیکه در انواع دیگر انایروب‌ها تشکل کالونی‌های سیاه رنگ سبز مایل بعد از 6-8 ساعت نمایان می‌شود.

انٹی بیوگرام یا حساسیت مایکروب‌ها به مقابل انٹی بیوتیک‌ها

مقدمه

- برای دلایل عمده ذیل حساسیت مایکروب‌ها به مقابل انٹی بیوتیک تعیین می‌شود:
- برای رهنمائی نمودن دوکتور معالج تا مناسب‌ترین انٹی بیوتیک را برای هر فرد از مریضان خود انتخاب نماید.
 - نگهداشت ثبت حساسیت مایکروب‌های یک جامعه و انتانات شفاخانه به مقابل انٹی بیوتیک‌ها و تغییراتی که به مرور زمان در آن رخ می‌دهد.
 - رهنمائی نمودن مسوؤلین پروگرام ملی تداوی کتگوری امراض بخصوص مانند انتانات حاد طرق تنفسی، اسهالات و امراضیکه توسط مقاربت جنسی انتقال می‌نمایند.
 - کشف تغییراتی که در نوع و توزیع مقاومت به مقابل انٹی بیوتیک‌ها در امراض که غیراز شفاخانه رخ می‌دهد.

این عملیه بالای تمام مایکروب‌هایی که قبلاً حساسیت آنها معلوم نشده و سبب انتاناتی می‌گردند که ایجاب کیموتراپی را می‌نمایند، باید اجرا شود.

تست حساسیت مایکروب‌ها قدرت انٹی بیوتیک را نشان می‌دهد که در لابراتوار تحت شرایط معیاری مانع نشونمای مایکروب می‌گردد. این نهی نشونما به دو طریقه ای رقیق سازی و انتشار تخمین می‌گردد.

در تست رقیق سازی، فعالیت انٹی بیوتیک طوری تخمین می‌گردد که غلظت‌ها مختلف انٹی بیوتیک را در وسط زرعیه ای مایع یا جامد می‌سازند و بعد مایکروب مورد نظر را در آن زرع

می‌کند. پایان‌ترین غلظت انتی‌بیوتیک که مانع نشونمای قابل دید مایکروب بعد از گذشت یک شب گردد به نام Minimal inhibitory Concentration (MIC) مایکروب یاد می‌گردد.

در تست انتشار اصول کیربی باور (Kirby Bauer) یک دیسک کاغذی را گرفته با یک مقدار انتی‌بیوتیک آنرا مغطوس (Impregnate) می‌سازند و بالای یک وسط Agar دار که در آن مایکروب مورد نظر بصورت متجانس زرع شده باشد می‌گذارند.

انتی‌بیوتیک از کاغذ بداخل وسط زرعیه انتشار می‌نماید. هر قدر که از مرکز دیسک دور شویم غلظت انتی‌بیوتیک کمتر شده می‌رود. بعد از گذاشتن به درجه ای حرارت 35°C برای 18 تا 24 ساعت دیده می‌شود که نشونمای مایکروب به شکل دایروی به دور دیسک نهی گردیده است. قطر این دایره، در بین دیگر عوامل، تابع حساسیت مایکروب به انتی‌بیوتیک دیسک می‌باشد. منطقه ای بزرگ نهی مترافق است یا حساسیت زیاد مایکروب به مقابل انتی‌بیوتیک منطقه ای متوسط نهی مترافق است با حساسیت متوسط آن و عدم منطقه ای نهی مترافق است به مقاومت مایکروب به مقابل انتی‌بیوتیک داخل دیسک کاغذی یک ارتباط تقریباً خطی بین لوگارتیم غلظت اصغری نهی (MIC) و قطر زون نهی شده که به این دو طریقه ای مختلف تعیین می‌گردد وجود دارد. اگر حساسیت مایکروب‌های مختلف به این دو طریقه تعیین گردد، می‌توان یک Regression Line را بدست آورد.

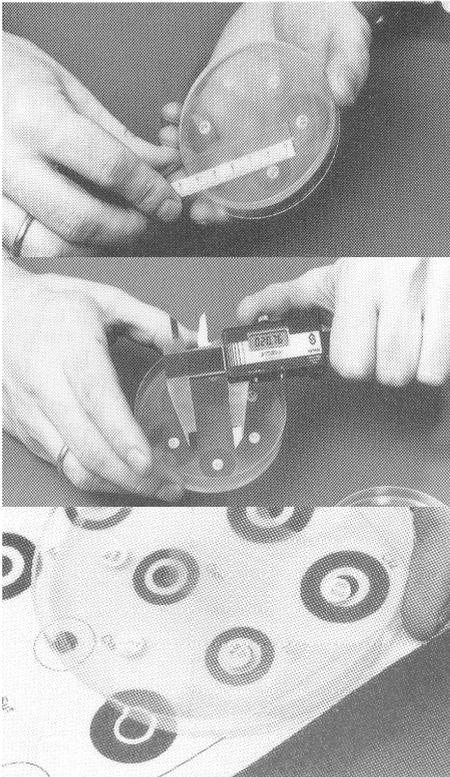
انتخاب وسط زرعیه برای تست انتشار (Diffusion Test) بسیار مهم می‌باشد، زیرا انتی‌بیوتیک در اوساط زرعیه ای مختلف بصورت متفاوت انتشار می‌کند. بعضی اوساط زرعیه می‌تواند موادی داشته باشد که فعالیت انتی‌بیوتیک را نهی کند مانند Sulfonamide و Trimethoprim. غلظت Agar، ضخامت وسط زرعیه و PH آن نیز عوامل مهم می‌باشند. اگر ضخامت وسط زرعیه کم باشد منطقه ای نهی بصورت کاذب بزرگ می‌باشد و اگر زیاد باشد منطقه ای نهی بصورت کاذب کوچک می‌باشد.

اعتماد بر تست حساسیت به مقابل انتی‌بیوتیک به انجام دادن تست به اصول ستاندر و کنترل کیفیت مناسب و درست آن تعلق دارد.

تعبیر تست حساسیت عادتاً به سه درجه داده می‌شود:

• حساس (S) اگر انتان توسط مایکروبی به وجود آمده باشد که احتمال دارد انتان با دادن

- مقدار یا Dosage عادی آن انتی بیوتیک شفا یاب گردد.
- متوسط (I) Intermediate که احتمال دارد انتان با مقدار بلند آن انتی بیوتیک جواب بدهد. یا وقتیکه انتان در جایی رخ داده باشد که غلظت انتی بیوتیک در آنجا زیاد گردد مانند طرق بولی.
 - مقاوم (R) Resistant که مایکروب به دادن انتی بیوتیک، صرف نظر از مقدار دادن



شکل ۲-۴ تست انتی بیوگرام و اندازه گیری قطر نواحی نهی شده مایکروب به مقابل انتی بیوتیک ها

انتی بیوتیک و محل انتان، جواب شاید ندهد.

نامگذاری حساس و مقاوم باکتری ها عموماً به سویه ای غلظت انتی بیوتیک ارتباط دارد که در سیرم بدست آمده بتواند. انتی بیوتیک هائیکه از طریق گرده اطراح می شوند در ادرار غلظت آنها به کرات بیشتر از سیرم می گردد. مایکروب هائیکه از انتان طرق بولی تجزیه می شوند و حساسیت آنها به اصول انتشار در "اگر" متوسط یا حتی مقاوم باشد می تواند در طرق بولی به همان انتی بیوتیک حساس باشد. به همین دلیل برای انتی بیوتیک که تنها برای تداوی انتان طرق بولی استعمال می گردند مانند Nitrofurantoin, Trimethoprim, Sulfonamide و Nalidixic Acid اندازه ای زون نهی شده ای آنها مطابق به غلظت آنها در ارار تعیین شده است.

تست حساسیت فعالیت انتی بیوتیک را به مقابل مایکروب‌ها در تحت شرایط لابراتوار

اندازه می نمایند، اما کنترل انتان را نزد هر مریض تضمین نمی تواند. جذب، انتشار در نسج، میتابولیزم، اطراح و سمیت انتی بیوتیک های مختلف متفاوت می باشد که قبل از توصیه ای انتی

بیوتیک باید مد نظر گرفته شود.

برای بعضی انتی بیوتیک‌ها فاصله بین غلظت مؤثر و غلظت سمی آن در خون بسیار کم است. در خون مریضانی که این انتی بیوتیک‌ها را می‌گیرند غلظت آنها باید شدیداً زیر نظارت گرفته شود، مخصوصاً اگر انتان شان شدید باشد و خود شان Dehydrated باشند و وظایف جگر یا گرده ای شان مختلف باشد.

دو سویه ای غلظت انتی بیوتیک اندازه می‌شود یکی غلظت اعظمی در سیرم که بعد از زرق بعدی از یک مدت کوتاه حاصل می‌شود و دیگر غلظت اصغری در سیرم که فقط پیش از زرق بعدی به آن می‌رسد.

اکثراً انتانات طرق بولی سفلی سلیم بوده حتی بدون تداوی می‌تواند خوب شود لذا انتی بیوتیک بسیار قیمتی یا سمی به ندرت ضروری می‌باشد و نباید یومیه راپور داده شود.

عبور انتی بیوتیک به داخل مایع نخاع شوکی (C.S.F) برای انتی بیوتیک‌های مختلف متفاوت می‌باشد. تنها انتی بیوتیک‌هایی که تا رسیدن به غلظت مؤثر در تداوی در داخل مایع نخاع شوکی عبور نموده بتواند باید راپور داده شود. (8)

Penetration of antibiotics into the CSF		
Good	Intermediate	Poor or none
Chloramphenicol	Pencillin G	Clindamycin
Sulphamide	Ampicillin	Vancomycin
Trimethoprim	Ceftriaxone	Tetracycline
Metronidazole	Cefuroxime	Erythromycin
Isoniazid	Cefotaxime	Flucytosine
Rifampicin	Methicillin	Cephalothin
Pyrazinamide	Ethambutol	
Ethionamide		
Amphotericin B		

زرع برای انتی بیوگرام می‌تواند از نمونه ای که از مریض گرفته می‌شود صورت گیرد که به نام تست حساسیت مستقیم یا direct susceptibility test یاد می‌شود. یا از زرع خالص مایکروب صورت می‌گیرد که به نام تست حساسیت غیر مستقیم یا indirect susceptibility test یاد می‌شود.

تست حساسیت مستقیم دارای مزایای ذیل می‌باشد:

- راپور دادن را سرعت می‌بخشد.
- تجرید نمودن باکتری‌ها را در یک زرع مخلوط آسان می‌سازد.
- تعداد کم از انواع مقاوم را شناسائی می‌کند.

مشکل عمده درین است که بدست آوردن زرع استاندارد برای تست حساسیت از نمونه‌ای مریض آسان نیست. اگر نموی مایکروب در زرع برای حساسیت مستقیم بسیار کم یا بسیار زیاد باشد، باید تست حساسیت تکرار شود و تخنیک استاندارد برای هر یک از انواع مایکروب‌ها استعمال گردد.

دیسک‌های تجارتمی برای تعیین انتی‌بیوگرام

هر دیسک تجارتمی که قطر و مقدار انتی‌بیوتیک مناسب داشته باشد می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. دیسک‌ها به 20°C - نگهداری شوند. دیسک‌هایی که مورد استفاده قرار می‌گیرند باید به 4 تا 8 درجه سانتی‌گراد گذاشته شوند. اما برای اینکه رطوبت بالای آن بصورت اصغری تشکیل گردد قبل از باز کردن گذاشته شود تا درجه‌ای حرارت اتاق را بگیرد.

تهیه‌ای دیسک انتی‌بیوگرام در لابراتوار

- ۱- از کاغذ فلتر یا کاغذ جاذب خوب دیسک‌ها به قطر 5 تا 6 میلی‌متر قطع می‌شود.
- ۲- بالای هر دیسک حرفی را بنویسید که محتویات انتی‌بیوتیک‌های مختلف را نشان بدهد.
- ۳- دیسک‌ها را برای یک ساعت به حرارت خشک به 160 درجه‌ای سانتی‌گراد تعقیم نمائید.
- ۴- طبق جدول ذیل محلولات رقیق انتی‌بیوتیک‌های مختلف را در محلول انتی‌بیوتیک بسازید:

Antibiotics	Dry substance per vial	Disk content	Dilution & added antibiotic solvent	Concentration in final dilution
Ampicillin	250 mg	10 μg	250 mg/10 ml, 25 mg/ml + 9 ml	
			2.5 mg /ml + 4 ml	500 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Penicillin G	100.000 IU	10 μg	60 mg/10 ml	

	60 mg		6 mg/ml + 1 ml	
			3 mg/ml + 5 ml	500 µg/ml
Ceftriaxone,	250 mg	30 µg	250 mg/10 ml	
Cephalothin			6x25 mg/ml + 9 ml	
			15 mg/ml + 9 ml	1500 µg/ml
Cefuroxime	750 mg	30 µg	750mg/10 ml	
			75 mg/ml + 4 ml	
			15 mg/ml + 9 ml	1500 µg/ml
Chloramphenicol	1g	30 µg	1g/10 ml	
			3x100mg/ml+7ml	
			30 mg/ml+ 9 ml	
			3mg/ml+1 ml	1500 µg/ml
Ciprofloxacin	40 mg	5 µg	400mg/10 ml	
			400mg/ml+9ml	
			4 mg/ml+ 3 ml	
			1mg/ml+3 ml	250 µg/ml
Clindamycin	300 mg	2 µg	300mg/3 ml	
			100mg/10ml	
			10 mg/10 ml	
			1 mg/10 ml	100 µg/ml
Erythromycin	100 mg	15 µg	100 mg/4 ml	

			3x25 mg/ml+ 7 ml	
			7.5 mg/ml+ 9 ml	750 µg/ml
Gentamycin				
	20 mg	10 µg	20 mg/10 ml	
			2 mg/ml+ 3 ml	500 µg/ml
Oxacillin				
	250 mg	7 µg	250 mg/10 ml	
			25 mg/ml+ 9 ml	
			2.5 mg/ml+ 9 ml	
	100.000 IU	10 µg	0.25 mg/ml+4ml	50 µg/ml
piperacillin				
	1 g	100 µg	1 g/10 ml,	
			100 mg/ml+ 1 ml	5 mg/ml
			50 mg /ml+ 9 ml	
Streptomycin				
	500 mg	10 µg	500 mg/10 ml	
			50 mg/ml+ 9 ml	
			5 mg/ml+ 9 ml	500 µg/ml
Sulfisoxazole				
	1 mg	300 µg	1 g/10 ml	
			3x100 mg/ml+ 7 ml	
			30 mg/ml+ 1 ml	15 µg/ml
Tetracycline				
	500 mg	30 µg	500mg/10 ml	
			3x50 mg/ml+ 7 ml	
			15 mg/ml+ 9 ml	1500 µg/ml

- ۵- بالای هر دیسک 20 مایکرولیتر از محلول رقیق شده ای آخری هر انتی بیوتیک را باندازید.
- ۶- دیسک ها را در یک قطی پتری انداخته در داخل انکیوپتور تا فردا آن ها را خشک کنید. سرپوش پتری دیش را قدری بلند بگذارید.
- ۷- دیسک ها را در یک بوتل انداخته لیبیل و تاریخ بزیند. سر بوتل باید خوب بسته باشد که هوا در آن داخل شده نتواند. برای نگهداری دراز مدت که از یک سال بیشتر نباشد به 20°C در فریزر آنرا نگهداری کنید.
- ۸- دیسک‌هاییکه از آن کار گرفته می‌شود تا یک هفته در یخچال نگهداری شده می‌تواند.
- ۹- بوتل دیسک ها را از فریزر یا یخچال یک تا دو ساعت پیشتر از استعمال بیرون بکشید تا درجه ای حرارت اتاق را قبل از باز کردن بگیرد. این کار مقدار رطوبت را که در بالای دیسک تراکم می‌کند به حد اصغری کاهش می‌دهد.
- کنترول کیفیت: هر Batch دیسک را بالای مایکروب‌های کنترول امتحان کنید که کار می‌دهد یا نه. پتوجن های هوازی که بالای *Mueller-Hinton agar* می‌رویند: تخنیک که در ذیل شرح داده شده اشاره ای است به *Kirby-Bauer method* که در هر جا میسر است و خوب به ثبوت رسیده است.

Mueller-Hinton agar

- از یک *Mueller-Hinton agar* کنترول کیفیت شده طبق توصیه ای کمپنی تولید کننده یک وسط زرعیه بسازید.
- در قطی پتری دیش به عمق 3-4 ملی متر آنرا بریزید. یک قطی پتری دیش 9 سانتی متره تقریباً 20 تا 25 ملی لیتر وسط زرعیه به کار دارد، در حالیکه یک قطی پتری دیش 14 سانتی متره به 60 ملی لیتر ضرورت دارد. پتری دیش را در یک سطح هموار گذاشته معطل شوید تا منجمد شود.
- پتری دیش را خشک نموده به 2-4 درجه ای سانتی گراد نگهداری کنید *PH* وسط به درجه ای حرارت اتاق باید 7.2 تا 7.4 باشد.

ستاندرد مکدریت (Turbidity standard)

برای اینکه معلق مایکروب را که زرع می‌نمایید عیار سازید، یک ستاندرد *barium sulphate turbidity standard* را باید بسازید.

اول محلولات ذیل را بسازید:

0.048 M BaCl ₂ solution	
BaCl ₂ , 2H ₂ O	1.175 g
Distilled water	100 ml
0.36 N H ₂ SO ₄ solution	
H ₂ SO ₄ , conc	1 ml
Distilled water	100ml

بعد محلولات ذیل را به هم یکجا بسازید.

0.048 M BaCl ₂	0.5 ml
0.36 N H ₂ SO ₄	99.5 ml

در تیوب‌ها در هر یک 5 ملی لیتر توزیع نموده سر آنها را با ستاپر رابری محکم کنید. قبل از استعمال تیوب را شدیداً شور بدهید. این استاندارد باید در تاریکی به درجه ای حرارت اتاق نگهداری شود و تا شش ماه نگهداری شده می‌تواند. (8)

عملیه

- (1) از یک زرع یک شبه 4 تا 5 کالونی خوب جداگانه ای هم شکل را انتخاب کنید. نوک سوزن زرع را در قسمت بالائی کالونی تماس بدهید. در داخل آن باید سوزن نرود. در تیوبیکه در آن 5 ملی لیتر محلول 0.9 فیصد سودیم کلوراید باشد انتقال بدهید.
- (2) مکدریت آنرا با مکدریت استاندارد مقایسه کنید با علاوه کردن مایکروب یا محلول نمک معقم مکدریت آنرا با مکدریت استاندارد برابر نمائید. برای اینکه نموی مایکروب‌ها متجانس باشد و کولونی‌ها تقریباً به تماس یکدیگر بیایند باید مکدریت خوب عیار شود.
- (3) مایکروب را در Mueller Hinton agar plate ذیلاً زرع کنید:
 - دو قطره ای معلق مایکروب را در بالای Agar باندازید توسط Spreader شیشه ای آنرا طوری پخش کنید که تمام سطح Agar را بگیرد.
 - یک سواب معقم پنبه ای را در معلق مایکروب غوطه کنید. مایع اضافگی را با فشار دادن شدید پنبه به جدار تیوب و دور دادن آن از پنبه دور کنید. سواب را در تمام سطح Agar بمالید.

- (4) سرپوش قطعی پتری را بالای آن گذاشته برای 3 الی 5 دقیقه آنرا بگذارید تا قبل از گذاشتن دیسک انتی بیوتیک مایع اضافگی سطح توسط Agar جذب گردد.
- (5) توسط یک فورسپس یا سوزن دیسک های انتی بیوتیک را اقلأ 24 ملی متر دور از یکدیگر در بالای Agar زرع شده بگذارید. در قطی پتری های 9 سانتی متره بصورت اعظمی پنج دیسک (برای مایکروب‌های Fastidious چهار دیسک). اگر قطی پتری های 14 سانتی متر استعمال شده باشد بصورت اعظمی 12 دیسک (برای مایکروب‌های Fastidious نه (9)

دیسک استعمال می‌گردد. وقتیکه یک دیسک در یکجا گذاشته می‌شود باید شور داده نه شود، زیرا به مجرد گذاشتن دیسک انتشار انتی بیوتیک شروع می‌شود.

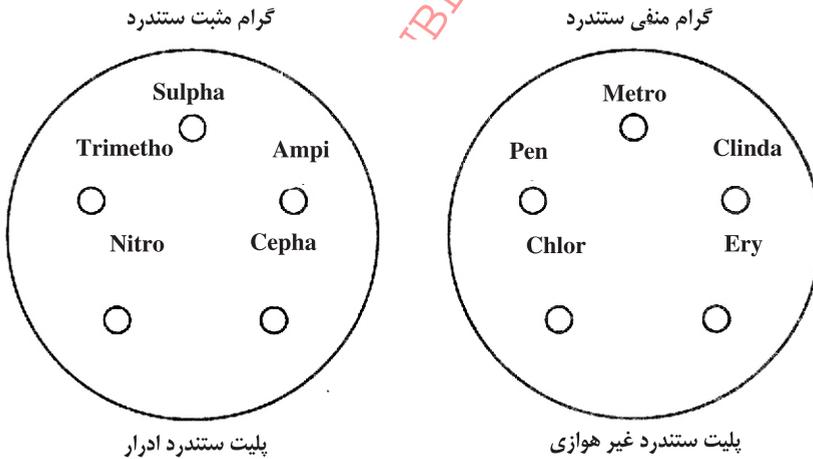
۶) قطی پتری ها را در انکیوبتور به 35 درجه ای سانتی گراد بگذارید. طول مدت آن ذیلاً به مایکروب‌های تحت امتحان تعلق دارد:

- *Staphylococci & Enterococci*: 24 hours
- *Haemophilus influenzae, Streptococcus, Pneumoniae & Neisseria gonorrhoeae*: 20-24 hours in 5-7% carbon dioxide or in a candle jar
- *All other species*: 16-18 hours

۷) اگر زرع درست صورت گرفته باشد بعد از 18 الی 24 ساعت کالونی‌ها به اندازه ای می‌شود که در بین آنها Agar محض قابل دید می‌باشد و تمام زون‌های نهی شده بصورت متحدالشکل دایروی می‌باشد. اگر نموی مایکروب‌ها بسیار ضخیم یا بسیار نازک باشد معاینه را تکرار کنید.

۸) قطر هر زون نهی شده (به شمول قطر دیسک) را به ملی متر اندازه نمائید و نتیجه را طبق جدول تعبیر نمائید.

۹) نتیجه را برای قطی پتری test و کنترل ثبت نمائید.

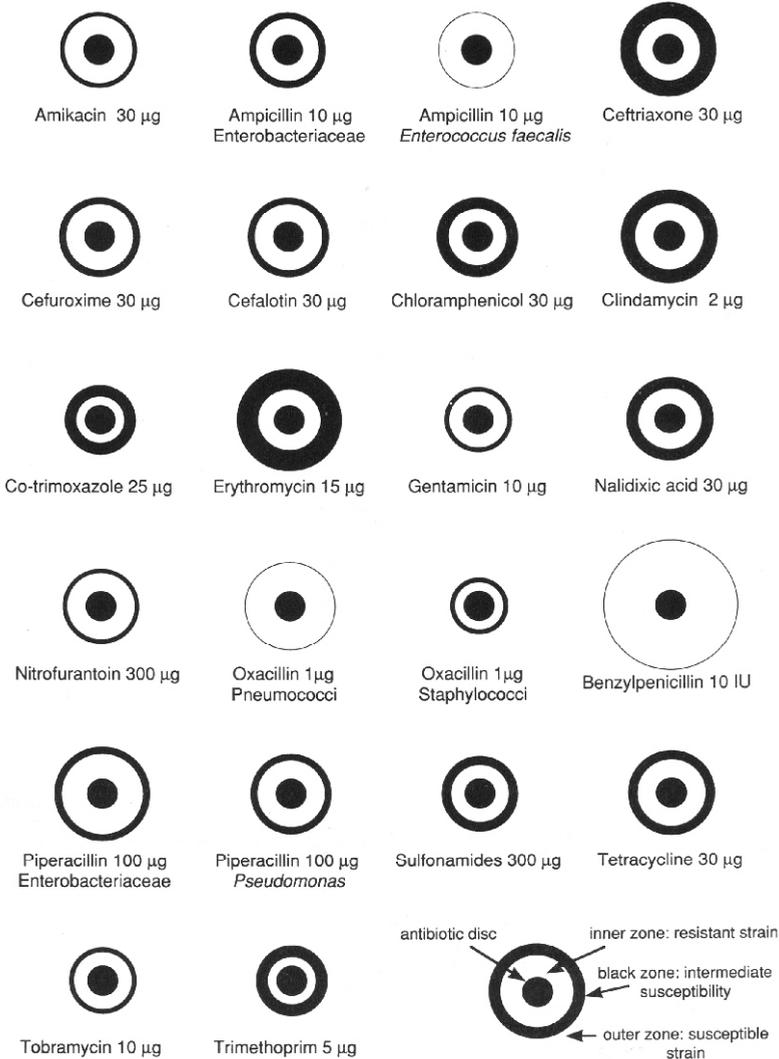


شکل ۲-۵

۱۰) بعد از گذاشتن در انکیوبتور با استفاده از یک خطکش قطر منطقه ای نهی شده را به ملی متر اندازه نمائید.

۱۱) بسیار کالونی‌های بزرگ که در داخل ناحیه ای نهی شده می‌روند باید دوباره زرع و شناسائی کردند و انتی بیوگرام آن دوباره تعیین شود. بعضی اوقات انواع مایکروب‌های *Protesu*

mirabilis and *P. vulgaris* می‌تواند در منطقه ای نهی شده گردش نمایند لکن هنوز هم حساس می‌باشند. با بعضی Batch های *Mueller – Hinton Agar* در منطقه ای نهی شده ای نادیده گرفته شود و تنها حاشیهٔ نموی ضخیم برای تعیین منطقه ای نهی شده گرفته شود. (۱۲) منطقه ای نهی شده را تعبیر نموده راپور مایکروب را حساس (S) متوسط (I) و مقاوم (R) بدهید.



اندازه نواحی ایکه توسط انتی بیوتیک ها نهی شده می‌توانند.

شکل ۲-۶

Antibiotic or chemotherapeutic agent	Diameter of zone of inhibition (mm)			
	Disc potency	Resistant	Intermediate/moderately susceptible	Susceptible
amikacin	30 µg	≤ 14	15–16	≥ 17
ampicillin when testing:				
– Enterobacteriaceae	10 µg	≤ 13	14–16	≥ 17
– <i>Enterococcus faecalis</i>	10 µg	≤ 16	—	≥ 17
benzylpenicillin when testing staphylococci	10 IU	≤ 28	—	≥ 29
ceftriaxone	30 µg	≤ 13	14–20	≥ 21
cefuroxime sodium	30 µg	≤ 14	15–17	≥ 18
cefalotin	30 µg	≤ 14	15–17	≥ 18
chloramphenicol	30 µg	≤ 12	13–17	≥ 18
clindamycin	2 µg	≤ 14	15–20	≥ 21
co-trimoxazole	25 µg	≤ 10	11–15	≥ 16
erythromycin	15 µg	≤ 13	14–22	≥ 23
gentamicin	10 µg	≤ 12	13–14	≥ 15
nalidixic acid	30 µg	≤ 13	14–18	≥ 19
nitrofurantoin	300 µg	≤ 14	15–16	≥ 17
oxacillin when testing:				
– staphylococci	1 µg	≤ 10	11–12	≥ 13
– pneumococci	1 µg	≤ 19	—	≥ 20
piperacillin when testing:				
– Enterobacteriaceae	100 µg	≤ 17	18–20	≥ 21
– <i>Pseudomonas</i>	100 µg	≤ 14	15–17	≥ 18
sulfonamides	300 µg	≤ 12	13–16	≥ 17
tetracycline	30 µg	≤ 14	15–18	≥ 19
tobramycin	10 µg	≤ 12	13–14	≥ 15
trimethoprim	5 µg	≤ 10	11–15	≥ 16

شکل ۲-۷ اندازه نهی انتی بیوتیک ها به ملی متر

باکتری‌های آنایروبیک (*Anaerobic bacteria*)

امتحان حساسیت باکتری‌های آن‌ایروبیک توسط *disk diffusion method* تنها وقتی امکان پذیر است اگر قطر منطقه ای نهی شده بعد از 24 ساعت در انگیوتور اندازه شود. حتی درین صورت *the agar and broth dilution method* بیشتر قابل اعتماد است و در تمام واقعاتیکه اتان شان وخیم و بحرانی است باید استعمال شود.

عملیه

- (۱) آنایروبییک‌هایی که به سرعت می‌رویند مانند *Bacteroids fragitis* و *Clostridium* در وسط *Mueller-Hinton* و باکتری‌های ایروبییک در وسط *Blood Agar* کشت می‌شوند تا بعد از 24 ساعت به اندازه کافی برویند.
- (۲) دیسک‌های کاغذی *Penicillin*، *Chloramphenicol*، *Metronidazole* و *Clindamycine* را بالای پتری دیش کشت شده بگذارید و آنرا در *Aneorobic Jar* به درجه حرارت 35°C بگذارید.
- (۳) قطر منطقه ای نهی شده را توسط خط کش یا *Calliper* به ملی متر اندازه کنید.
- (۴) مایکروب‌های آن آیروبیک تنها حساس (S) و مقاوم (R) راپور داده می‌شود. حساسیت بین البینی یا *intermediate* استعمال نمی‌شود.
- (۵) به منظور تعبیر نتایج قطر منطقه‌های نهی شده ذیلاً داده شده است:

Zone diameter in mm	Resistant	Sensitive
<i>Penicillin</i>	<19	>20
<i>Ampicillin</i>	<24	>25
<i>Cephalosporin</i>	<24	>25
<i>Piperacillin</i>	<29	>30
<i>Clindamycin</i>	<19	>20
<i>Chloramphenicol</i>	<34	>35
<i>Erythromycin</i>	<24	>25
<i>Tetracycline</i>	<29	>30
<i>Metronidazole</i>	<19	>20

Extended Spectrum β -lactamases (ESBLs) عبارت از انزایم‌هایی اند که توسط باسیل‌های گرام منفی تولید می‌شوند که قدرت غیر فعال ساختن انتی‌بیوتیک‌های β -Lactam را که دارای گروپ *Oxyimino* باشند دارند، مانند *Ceftizoxime*، *Ceftriaxone*، *Cefotaxime*، *Cefuroxime*، *Cefpirome* و *Ceftazidime*. اینها به نام *Spectrum Extended* یاد می‌شوند، زیرا یکنوعاد زیاد انتی‌بیوتیک‌های β -Lactam را هایدرولیز می‌نمایند.

ESBLs توسط Plasmid از یک مایکروب بر مایکروب دیگر انتقال می‌نماید و عموماً در مایکروب‌هایی از قبیل *Klebsilla Pneumonia*، *E. Coli*، *Proteus Mirabilis* و سلمونیللا پیدا می‌شود.

توصیه می‌شود که تمام لابراتوارهای مایکروبیولوژی سریری تمام باکتری‌های انتریک گرام منفی را برای مقاومت به مقابل Cefpodoxime امتحان نمایند. اگر حساسیت آن به مقابل Cefpodoxime کم شده باشد تست برای تولید انزیم ESBL باید انجام شود. تمام انواع تولید کننده ESBL باید راپور داده شود که به مقابل تمام Penicillin ها و Cephalosporin ها مقاوم است به استثناء Cephamycin.

لابراتوار مایکروبیولوژی وقتیکه یک نوع مایکروب ESBL-producing را می‌یابد بصورت واضح به دوکتور معالج راپور بدهد و اهمات لازم گرفته شود تا جلو پخش آن به دیگر مریضان شفاخانه گرفته شود.

دو میتود تأیید کننده برای تولید ESBL عادتاً استعمال می‌شود:

- ۱- معاینه Synergy بین Cephalosporin و Clavulanic Acid (میتود Double Disc).
- ۲- مقایسه نمودن منطقه ای نهی شده ای، Cefazidime یا Cefpodoxime با یا بدون Clavulanic Acid (میتود Combined Disc).

میتود دیسک دو چند (Double Disc Method)

۱. از یک زرع خالص یک شبه بالای Mac Conkey agar چهارالی پنج کولونی را به یک تیوب دارای 0.9 فیصد سودیم کلوراید باشد انتقال بدهید و مکدریت معلق به مکدریت 0.5 Mcfarland standard برابر ساخته شود که با علاوه کردن مایکروب یا محلول نمک صورت می‌گیرد.

۲. یک سواب را در معلق مایکروب غوطه نموده مایع اضافگی را با فشار دادن پنبه ای سواب جدار تیوب بالاتر از مایع بر طرف نمائید. سواب را به تمام سطح وسط زرعیه Mueller Hinton Agar - بمالید و بعد آنرا برای خشک شدن بگذارید اما نه بیشتر از 15 دقیقه.

۳. دسک که دارای Amoxicillin - Clavulanic Acid (20+10 Mg) باشد و دیسک Cefazidime را به فاصله ای 25 تا 30 ملی متر بالای Agar بگذارید یک دیسکی که دارای

Cefotaxime یا *Cefpodoxime* باشد می‌تواند در مقابل دیسک *Amoxicilin + Clavulanic Acid* گذاشته شود.

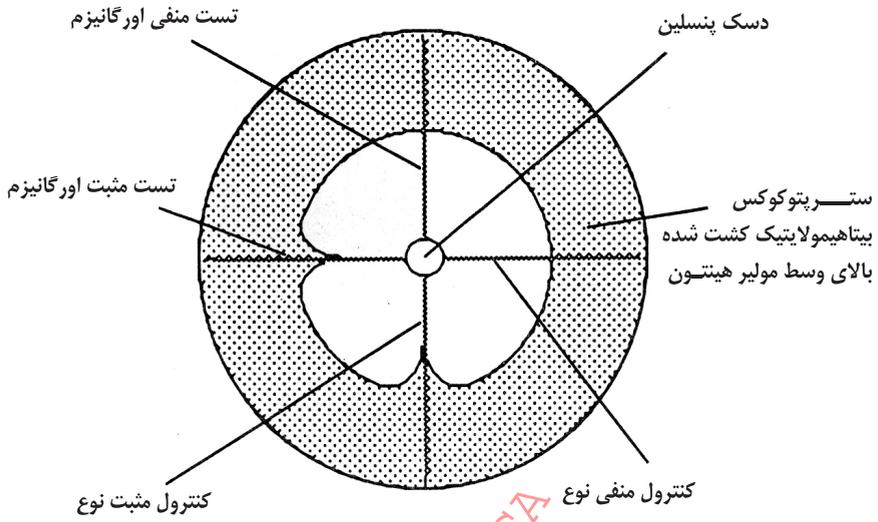
۴. پتری دیش تا فردا به 35 درجه سانتی‌گراد گذاشته می‌شود.

۵. اگر منطقه ای زهی شده *Cephalosporine* با علاوه شدن *Clavulanic Acid* توسعه یافته باشد از آن تولید *ESBL* استنباط می‌گردد.

ع. مایکروب‌هایی که *REM* و *SHVESBLs* تولید می‌نمایند با دیسک‌های *ceftazidime* *cefotaxime* و *cefpodoxime* نتیجه ای مثبت می‌دهند، در حالیکه آنهائیکه *انزایم CTX-M* تولید نموده اند تنها با دیسک‌های *cefotaxime* و *cefpodoxime* نتیجه ای مثبت می‌دهند. تولید کننده ای *AmpC* و اکثر تولید کنندگان فوق العاده ای *انزایم K1* همراهی تمام این سه دیسک نتیجه ای منفی می‌دهند.

Combined disc Method

۱. وسط *Mueller – Hinton agar* را مانند فوق کشت کنید. دو دیسک دارای *cefpodoxime* ($10 \mu\text{g}$) و *cefpodoxime + clavulanic acid* ($10 + 1 \mu\text{g}$) را به فاصله ای 24 ملی متر بالای آن بگذارید.
۲. پتری دیش را به 35 درجه ای سانتی‌گراد برای 16 الی 18 ساعت برای نموی *confluent* آنرا معاینه کنید.
۳. قطر منطقه ای زهی شده را به ملی متر اندازه نمائید.
۴. اگر منطقه ای زهی شده ای *cefpodoxime* با *Clavulanic Acid* به اندازه ای بیشتر از 5 ملی متر از منطقه ای زهی شده ای *cefpodoxime* بدون *clavulanic acid* بزرگتر باشد، مایکروب مذکور تولید کننده ای *انزایم ESBL* می‌باشد.
۵. این میتود با استفاده از *ESBL – producing Klebsiella* و تحقیق شد نتیجه داده *sensitivity* و *specificity* آن 100% بود.
- ع. *NCCLS* توصیه می‌نماید که منطقه ای زهی شده ای ($30 \mu\text{g}$) *ceftazidime* با منطقه ای زهی شده ($30 + 10 \mu\text{g}$) *Ceftazidime + Clavulanic Acid* باید مقایسه گردد.



شکل ۸-۲

© AAZEM PUBLICA

Book Name	Medical Microbiology I
Author	Prof. Dr. Obaidullah Obaid
Publisher	Kabul Medical University
Website	www.kmu.edu.af
Printing	Aazem Printing House, Kabul, Afghanistan / 0799572817
Number	2000
Published	2012
Download	www.ecampus-afghanistan.org

This publication was financed by the German Academic Exchange Service (DAAD) with funds from the German Federal Foreign Office.

Administrative and Technical support by Afghanic organization.

The contents and textual structure of this book have been developed by concerning author and relevant faculty and being responsible for it. Funding and supporting agencies are not holding any responsibilities.

If you want to publish your text books please contact us:
Dr. Yahya Wardak, Ministry of Higher Education, Kabul
Office: 0756014640
Email: wardak@afghanic.org



AAZEM PUBLICATIONS

ISBN:

This book has been published 2000 copies in full agreement with the **author** and **Aazem Publications**.

All copy rights reserved by **Aazem Publications**

© AAZEM PUBLICATIONS

Message from the Ministry of Higher Education



In the history, book has played a very important role in gaining knowledge and science and it is the fundamental unit of educational curriculum which can also play an effective role in improving the quality of Higher Education. Therefore, keeping in mind the needs of the society and based on educational standards, new learning materials and textbooks should be published for the students.

I appreciate the efforts of the lecturers of Higher Education Institutions and I am very thankful to them who have worked for many years and have written or translated textbooks.

I also warmly welcome more lecturers to prepare textbooks in their respective fields. So, that they should be published and distributed among the students to take full advantage of them.

The Ministry of Higher Education has the responsibility to make available new and updated learning materials in order to better educate our students.

At the end, I am very grateful to the German Federal Foreign Office, the German Academic Exchange Service (DAAD) and all those institutions and people who have provided opportunities for publishing medical textbooks.

I am hopeful that this project should be continued and publish textbooks in other subjects too.

Sincerely,

Prof. Dr. Obaidullah Obaid
Minister of Higher Education

Kabul, 2012

© AAZEM PUBLICATIONS

Publishing of textbooks & support of medical colleges in Afghanistan

Honorable lecturers and dear students,

The lack of quality text books in the universities of Afghanistan is a serious issue, which is repeatedly challenging the students and teachers alike. To tackle this issue we have initiated the process of providing textbooks to the students of medicine. In the past two years we have successfully published and delivered copies of 60 different books to the medical colleges across the country.

The Afghan National Higher Education Strategy (2010-1014) states:

“Funds will be made ensured to encourage the writing and publication of text books in Dari and Pashto, especially in priority areas, to improve the quality of teaching and learning and give students access to state-of- the-art information. In the meantime, translation of English language textbooks and journals into Dari and Pashto is a major challenge for curriculum reform. Without this, it would not be possible for university students and faculty to acquire updated and accurate knowledge”

The medical colleges’ students and lecturers in Afghanistan are facing multiple challenges. The out-dated method of lecture and no accessibility to update and new teaching materials are main problems. The students use low quality and cheap study materials (copied notes & papers), hence the Afghan students are deprived of modern knowledge and developments in their respective subjects. It is vital to compose and print the books that have been written by lecturers. Taking the critical situation of this war torn country into consideration, we need desperately capable and professional medical experts. Those, who can contribute in improving standard

of medical education and public health throughout Afghanistan, thus enough attention, should be given to the medical colleges.

For this reason, we have published 60 different medical textbooks from Nangarhar, Khost, Kandahar, Herat, Balkh & Kabul medical colleges. Currently we are working on to publish 60 more different medical textbooks, a sample of which is in your hand. It is to mention that all these books have been distributed among the medical colleges of the country free of cost.

As requested by the Ministry of Higher Education, the Afghan universities, lecturers & students they want to extend this project to non-medical subjects like (Science, Engineering, Agriculture, Economics & Literature) and it is reminded that we publish textbooks for different colleges of the country who are in need.

As stated that publishing medical textbooks is part of our program, we would like to focus on some other activities as following:

1. Publishing Medical Textbooks

This book in your hand is a sample of printed textbook. We would like to continue this project and to end the method of manual notes and papers. Based on the request of Higher Education Institutions, there is need to publish about 100 different textbooks each year.

2. Interactive and Multimedia Teaching

In the beginning of 2010, we were able to allocate multimedia projectors in the medical colleges of Balkh, Herat, Nangarhar, Khost & Kandahar. To improve learning environment the classrooms, conference rooms & laboratories should also be equipped with multimedia projectors.

3. Situational Analysis and Needs Assessment

A comprehensive need assessment and situation analysis is needed of the colleges to find out and evaluate the problems and future challenges. This would facilitate making a better academic environment and it would be a useful guide for administration and other developing projects.

4. College Libraries

New updated and standard textbooks in English language, journals and related materials for all important subjects based on international standards should be made available in the libraries of the colleges.

5. Laboratories

Each medical college should have well-equipped, well managed and fully functional laboratories for different fields.

6. Teaching Hospitals (University Hospitals)

Each medical college should have its own teaching hospital (University Hospital) or opportunities should be provided for medical students in other hospitals for practical sessions.

7. Strategic Plan

It would be very nice if each medical college has its own strategic plan according to the strategic plan of their related universities.

I would like to ask all the lecturers to write new textbooks, translate or revise their lecture notes or written books and share them with us to be published. We assure them quality composition, printing and free of cost distribution to the medical colleges.

I would like the students to encourage and assist their lecturers in this regard. We welcome any recommendations and suggestions for improvement.

We are very thankful to the German Federal Foreign Office & German Academic Exchange Service (DAAD) for providing funds for 90 different medical textbooks and the printing process for 50 of them are ongoing. I am also thankful to Dr. Salmaj Tural from J. Gutenberg University Mainz/Germany, Dieter Hampel member of Afghanic/Germany and Afghanic organization for their support in administrative & technical affairs.

I am especially grateful to GIZ (German Society for International Cooperation) and CIM (Centre for International Migration & Development) for providing working opportunities for me during the past two years in Afghanistan.

In Afghanistan, I would like cordially to thank His Excellency the Minister of Higher Education, Prof. Dr. Obaidullah Obaid, Academic Deputy Minister Prof. Mohammad Osman Babury and Deputy Minister for Administrative & Financial Affairs Associate Prof. Dr. Gul Hassan Walizai, the universities' chancellors and deans of the medical colleges for their cooperation and support for this project. I am also thankful to all those lecturers that encouraged us and gave all these books to be published.

At the end I appreciate the efforts of my colleagues Dr. M. Yousuf Mubarak, Abdul Munir Rahmanzai, Ahmad Fahim Habibi, Subhanullah and Hematullah in publishing books.

Dr Yahya Wardak
CIM-Expert at the Ministry of Higher Education, November, 2012
Karte 4, Kabul, Afghanistan
Office: 0756014640
Email: textbooks@afghanic.org
wardak@afghanic.org

ABSTRACT

Medical Microbiology is a basic subject which deals with different microorganisms that has medical importance. It has been taught in the Medicine, Dentistry, Nursing, Public Health, Allied Health, Technology and Pharmacy colleges.

The first volume of Medical Microbiology is prepared according to the curriculum of Kabul Medical University and has four sections and 9 chapters (Morphology and Physiology of Microorganisms, Normal Microbial Flora, Infections, Immunology, Genetic of Microbes, Antimicrobial Therapy and Systemic infections). It contains essential information about those microorganisms which can cause diseases inside the human body. In addition it is designed with pictures and diagrams.

Since infectious diseases are very common in Afghanistan, I strongly recommend the studying of this book for medical students, young doctors and medical technologists.

All efforts have gone into equipping each section of this book with required pictures, collecting all information from a valid reference.

At the end, I am also thankful to German Ministry of foreign affairs and DAAD for publishing this book.

Sincerely,

Prof. Dr Obaidullah Obaid
Minister of Higher Education and
Head of Microbiology Department,
Kabul Medical University

بیوگرافی مختصر پوهاند دوکتور عبیدالله عبید



پوهاند دوکتور عبیدالله عبید ولد عبدالوهاب خان در سال ۱۳۴۷ هجری شمسی در یک خانواده روشنفکر و مسلمان در شهر کابل تولد گردیده، پس از فراغت از پوهنچی ستوماتولوژی پوهنتون طبی کابل در سال ۱۳۶۹ به سویه ماستر، بعد از امتحان مؤفقاڼه کادر علمی به صفت استاد در دیپارتمنت مایکروبیولوژی و پرازیتولوژی پوهنتون طبی کابل شامل که بعد از سال ۱۳۷۲ الی قوس ۱۳۸۹ به حیث شف این دیپارتمنت ایفای وظیفه کرده است.

از سال ۱۳۷۲ الی ۱۳۷۶ بر علاوه تدریس، به حیث مدیر عمومی تدریسی در پوهنتون طبی کابل، از سال ۱۳۸۱ الی ختم سال ۱۳۸۲ به حیث معاون امور محصلان پوهنتون طبی کابل، از سال ۱۳۸۳ الی سنبله سال ۱۳۸۴ به حیث مشاور رییس جمهور در امور اجتماعی و از سال ۱۳۸۴ الی سال ۱۳۸۹ به حیث رییس پوهنتون طبی کابل مصروف خدمت به اولاد وطن بود. در سال ۲۰۰۳ برای مدت چهار ماه جهت کسب آموزش میتودهای جدید درسی در پوهنتون لومالیندا ایالات متحده امریکا و در سال ۲۰۰۷ برای مدت سه ماه جهت کسب انکشاف مهارت‌های بین‌المللی در پوهنتون نبراسکا ایالات متحده امریکا به ادامه تحصیل پرداخته و از هردو پوهنتون سرتفکیت‌های مساعد و مؤفق به دست آورد.

موصوف برای مدت یکسال به حیث رییس بورد توقف توبرکلوز افغانستان فعالیت نموده و مدت یکسال و سه ماه به حیث سفیر کبیر و نماینده فوق‌العاده رییس جمهور افغانستان در جمهوری اسلامی ایران ایفای وظیفه کرده است.

وی وکیل منتخب مردم شهر کابل در لویه جرگه اضطراری و وکیل منتخب مردم شهر کابل در لویه جرگه تصویب قانون اساسی نیز بودند.

محترم پوهاند دوکتور عبیدالله عبید بعد از معرفی از سوی رییس جمهور کشور به حیث وزیر تحصیلات عالی با کسب ۱۹۹ رأی اعتماد از سوی اعضای پارلمان به حیث وزیر تحصیلات عالی تقرر حاصل نمودند.



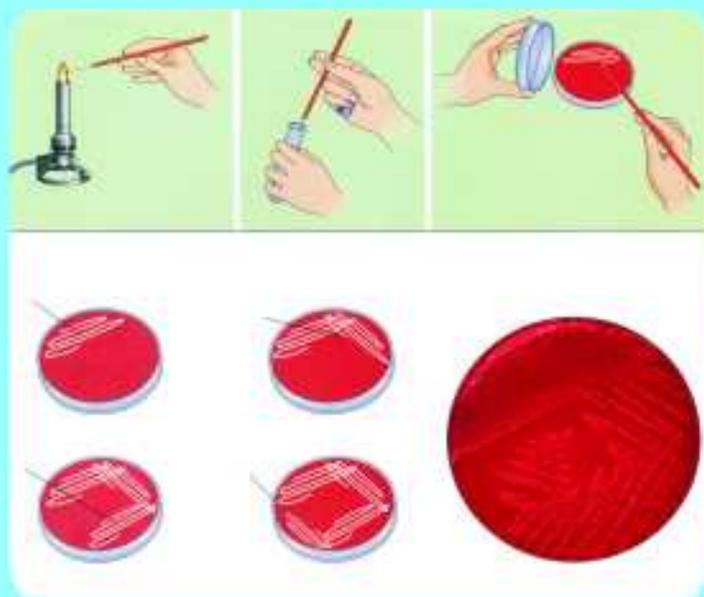
Kabul Medical University

AFGHANIC

Prof. Dr. Obaidullah Obaid

Medical Microbiology

Volume I



Funded by:

DAAD

Deutscher Akademischer Austausch Dienst
German Academic Exchange Service

ISSN 978-9936-400-67-2



9 789936 400672 >

Printed: Azem Printing House
Kabul - Afghanistan



2012