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

آزمایشگاه میکروب پایه

بررسی اثر عوامل فیزیکی و شیمیایی بر روی رشد باکتری ها
(الکل و ساولون– حرارت)

تهیه کننده : سهیلا عباسی

- اگرچه سیستم ایمنی معمولا وظیفه از بین بردن و دور نگه داشتن میکروب ها را از بدن ایفا می کنند ولی کنترل میکروب ها در خارج از بدن هم با عوامل مختلف می تواند بر علیه عوامل بیماریزا بسیار موثر باشد.
- کنترل موثر میکروب های مولد بیماری نیازمند اطلاعات درستی از روشها و عوامل در دسترس از جمله روشهای فیزیکی و شیمیایی برای محدود نمودن رشد آنها با از بین بردن آنها است.
- استریلیزاسیون شامل از بین بردن یا حذف تمام اشکال حیات از جمله فرمهای رویشی ، اسپورهای باکتریها و همچنین ویروسها می باشد. برای مثال در اعمال جراحی، جراح از وسایلی که قبلا به روشهای مختلف استریل شده است استفاده می نماید.
- عواملی که میکروبها را می کشند، microbicidal (ساید ال = کشتن) و بطور عمومی تر germicides نامیده می شوند. این مواد اگر اختصاصا باکتریها را بکشند ، bactericidal و اگر قارچها را بکشند ، fungicidal نامیده می شوند.

- متدهای فیزیکی و عوامل شیمیایی مختلفی هستند که قادر به تخریب میکروب ها بر روی مواد غیر زنده و یا پوست بدن می باشند.
- اگرچه ، وقتی اشیا استریل دوباره تنها یکبار در مجاورت هوا قرار گیرند، به میکروبهای موجود در هوا و محیط اطراف آلوده می شوند. اغلب در تجربیات روزانه به موادی برخورد می کنیم که با جمعیت میکروبی آنها کاهش یافته است یا رشدشان مهار شده است .
- Sanitization یا پاکسازی و مطابق با اصول بهداشتی عمل کردن ، شامل روشهایی است تعداد میکروبهای پاتوژن را کم می کند یا از رشد آنها ممانعت می نماید. اگر به این پاتوژنها زمان کافی و شرایط مناسب داده شود دوباره رشد کرده و باعث فساد و ایجاد بیماری می شوند. بسیاری از عوامل شیمیایی هستند که اینکار را انجام می دهند و به نام Microbiostatic نامیده می شوند که اگر این اثر را روی باکتریها انجام دهند، Bacteriostatic و اگر روی قارچها اثر کند، Fungistatic نامیده می شوند. بطور کلی عوامل فیزیکی و شیمیایی مختلفی در این رابطه مورد استفاده هستند که در اینجا برخی از آنها آورده شده است.

اثر عوامل فیزیکی (حرارت و اشعه) بر روی رشد میکروبها

- روشهای فیزیکی که رشد و بقا میکروب ها را تحت تاثیر قرار می دهند، عموما شامل درجه حرارت، فیلتراسیون، تاباندن اشعه و فشار اسمزی است.

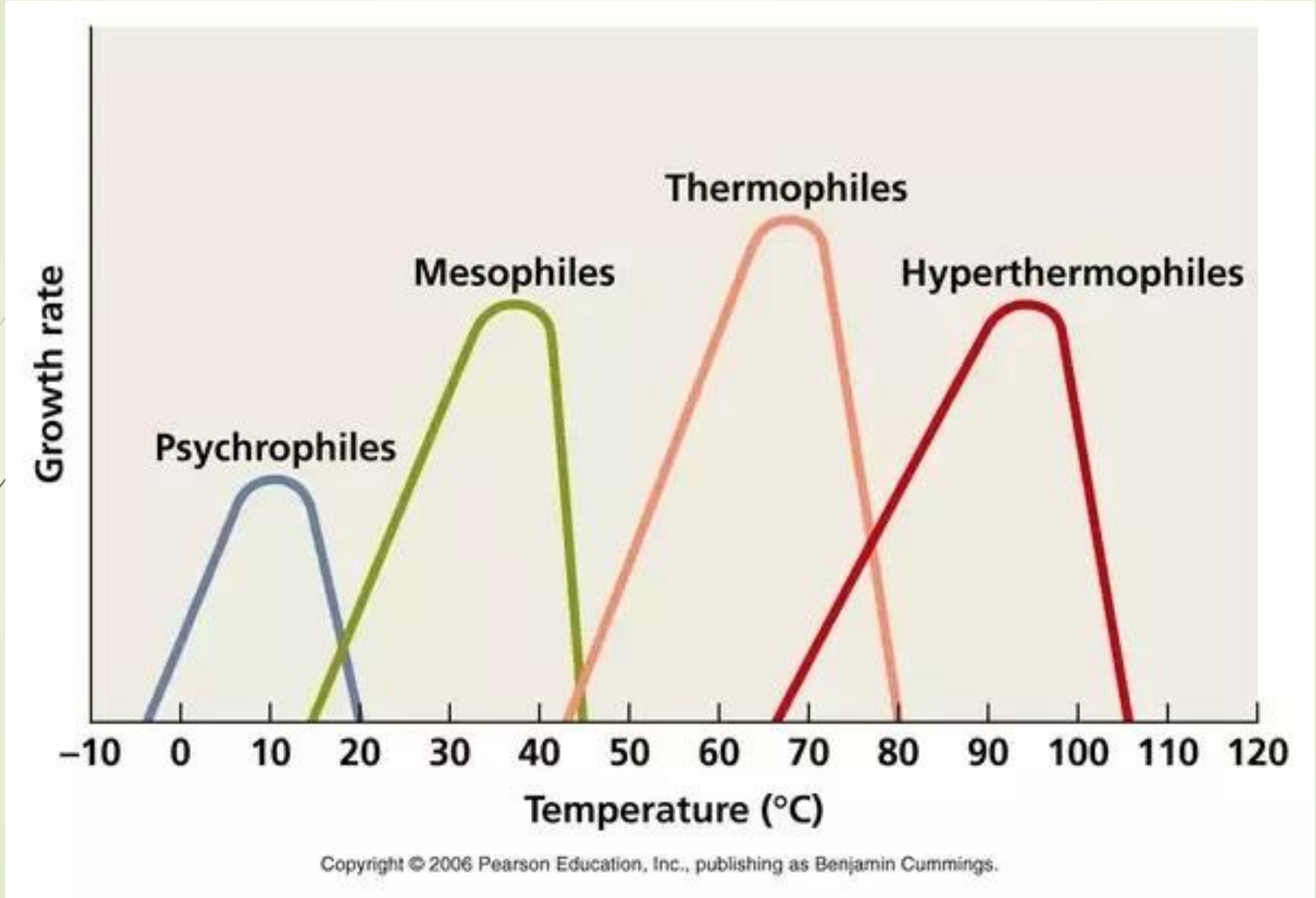
اثر حرارت:

- حرارت یکی از رایجترین روش های کنترل بصورت فیزیکی می باشد. اثر کشندگی حرارت بر روی میکروارگانیسم ها زمان طولانی است که شناخته شده است. حرارت سریع ، قابل اعتماد و نسبتا ارزان است. بالای دماهای رنج رشد برای یک میکروب، آنزیمها و پروتئین های دیگر و اسیدهای نوکلنیک دناتوره یا تقلیب می شوند.
- همچنین حرارت آب را خارج می کند و چون همه ارگانیسم ها به آب در درون خود نیاز دارند این حذف آب می تواند برای آن ها کشنده باشد.
- میزان کشندگی حرارت با دو پارامتر زمان و درجه حرارت وابسته بوده و با این دو بیان می شود. برای مثال، باسیل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در دمای ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه ، در دمای ۶۵ درجه به مدت ۲ دقیقه و در ۷۲ درجه به مدت چند ثانیه از بین می رود.

- هر گونه میکروبی، یک زمان مرگ حرارتی (Thermal death time) دارد .

زمان مرگ حرارتی ، مدت زمانی است که برای کشتن یک جمعیت میکروبی در یک دمای معلوم مورد نیاز است.

- هر گونه یک نقطه مرگ حرارتی(Thermal death point) نیز دارا می باشد که مینیمم درجه حرارتی است که در آن، باکتری در آن زمان معلوم و ثابت می میرد. این پارامترها مخصوصاً در صنایع غذایی که از حرارت برای نگهداری مواد استفاده می شود مهم هستند.



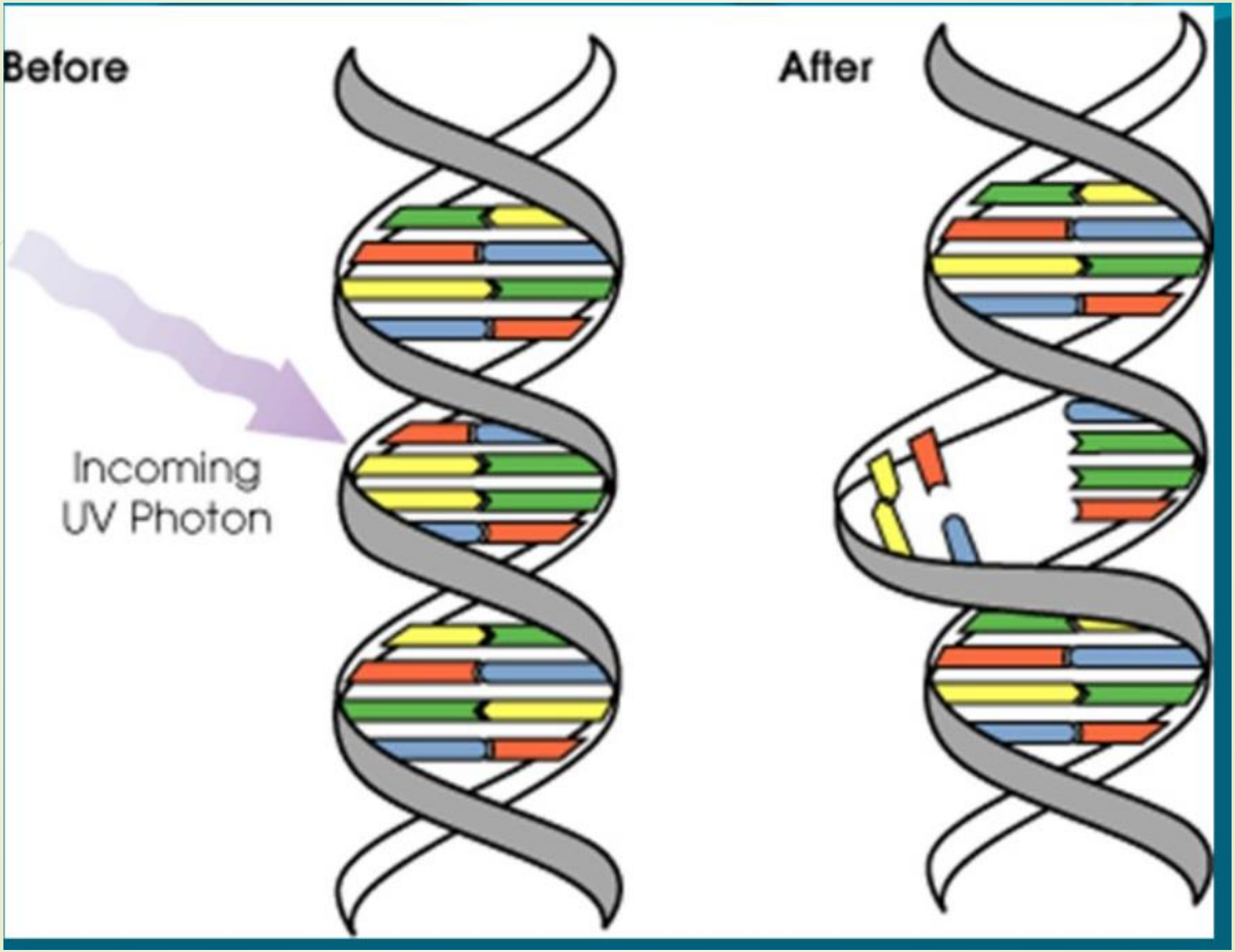
Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

تاباندن اشعه:

- اشعه ها نیز از جمله عواملی هستند که بطور فیزیکی می توانند کنترل کننده میکروبها باشند. نور مرنی نوعی از انرژی است که بوسیله سلولهای حساس به نور در چشم ما مشخص می شود.
- طول موج این انرژی بین ۴۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر است. اشعه های دیگر طول موجی کمتر یا بیشتر از این طول موج داشته و بنابراین توسط چشم ما دیده نمی شوند.
- یکی از این پرتوها ، اشعه ماوراء بنفش (UV) است که برای کنترل نمودن میکروارگانیسمها بسیار مناسب می باشد. این نور طول موجی معادل ۱۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر دارد و انرژی آن در ۲۶۵ نانومتر برای سلولهای باکتریایی کشنده است.

- وقتی این اشعه به باکتریها تابانده می شود، DNA آنها این انرژی را جذب کرده و مولکولهای تیمین مجاور در یک رشته به هم می پیوندند و ساختار DNA و همانند سازی از آن مختل می شود. ارگانیسم آسیب دیده نمی تواند پروتئینهای ضروری خود را بسازد با تولید مثل نماید ، و بنابراین می میرد.

- این اشعه برای استریل کردن سطوح مناسب می باشد ولی نمی تواند در آب و مواد جامد نفوذ کند و همچنین قادر به از بین بردن همه اسپورهای باکتریایی نیست.


Before
After
Incoming
UV Photon

- انواع دیگری از اشعه ها از جمله اشعه X و گاما نیز که هر دو طول موجهای کوتاهتری از اشعه ماورابنفش دارند، نیز می توانند در استریلیزاسیون بکار روند.

- این دو اشعه از مولکلهای میکروبی عبور کرده و الکترون ها را از مدار خارج می کنند و بنابراین ایجاد یون می نمایند. به همین دلیل به آنها اشعه های یونیزه کننده می گویند. یون ها به سرعت ترکیب می شوند ، بطور عمده با آب موجود در سلول، و رادیکال های آزادی که ایجاد می شوند فیزیولوژی و متابولیسم سلول را تحت تاثیر قرار می دهد.

- این اشعه ها در صنعت برای استریل کردن مواد حساس به حرارت مثل ویتامینها و هورمونها، آنتی بیوتیکها، بعضی از پلاستیکها و مواد ساختاری و همچنین در کنترل میکروبها و نگهداری غذا مورد استفاده قرار می گیرند.

مواد و وسایل لازم:

- بن ماری ۸۰ درجه سانتیگراد
- محیط کشت مایع NB و یا TSB
- کشت میکروبی مایع E.coli – S.aureus
- سمپلر

روش کار :

- ابتدا بن ماری را روی حرارت موردنظر تنظیم می کنیم . سپس لوله ها را در این دما می گذاریم تا همدما شوند و بعد در ۴ لوله حاوی محیط کشت در هر کدام مقدار مساوی از باکتری (با لوپ دو قطره و با سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر) اضافه کرده و لوله ها را در بن ماری قرار می دهیم .
- یکی از این لوله ها بعنوان شاهد بوده و نباید در بن ماری قرار گیرد. اولین لوله را بعد از ۵ دقیقه، دومی را بعد از ۱۰ دقیقه و سومی را بعد از ۱۵ دقیقه از بن ماری خارج کرده و سریعا در آب سرد خنک می کنیم.
- مشخصات کشت را و زمان حرارت را روی آنها یادداشت کرده و آنها را در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار می دهیم بعد از گذشت زمان مزبور از روی کدورت لوله ها نتایج را گزارش می کنیم.
- به این ترتیب که اگر لوله ها در مقایسه با شاهد شفاف بودند، نتیجه منفی (عدم رشد) و اگر کدورت داشته باشد از ۱ تا ۴+ گزارش می شود. نمونه های منفی نشان دهنده اثر میکروب کشی عامل حرارت می باشند و بدین ترتیب توانسته ایم زمان مرگ حرارتی را بدست آوریم.

Gram-Positive
Ribitol

اثر عوامل شیمیایی مواد ضد عفونی کننده بر روی رشد میکروبها

- عوامل فیزیکی برای کنترل میکروبها بیشتر برای استریلیزاسیون مورد توجه هستند. در مقابل، عوامل شیمیایی، به ندرت باعث استریلیزاسیون می شوند. در عوض آنها باعث از بین بردن پاتوژنها می شوند.
- فرآیند از بین بردن و تخریب پاتوژنها عمل ضدعفونی کردن (Disinfection) نامیده می شود. اگر چیزی که ضدعفونی می شود جاندار نباشد، عامل شیمیایی بکار رفته برای این منظور Disinfectant، و اگر مورد ضد عفونی شده جاندار مثل بافت با بدن انسان باشد ، این عامل به نام Antiseptic نامیده می شود.
- اگر چه ممکن است یک عامل شیمیایی هم بعنوان antiseptic هم بعنوان disinfectant استفاده شود، ولی فرمول شیمیایی آن در این دو نوع محصول و توانایی کشندگی یا غیر فعالسازی آنها نیز متفاوت است.

- Antiseptic و disinfectant ها معمولا کشنده میکروبها هستند microbicidalو اکثر آنزیمهای اورگانیسم را غیر فعال کرده و در متابولیسم آن دخالت کرده و نهایتا آن را می کشند.

- عوامل شیمیایی می توانند microbiostatic (متوقف کننده رشد میکروب) نیز باشند که باعث تخریب واکنشهای شیمیایی کمتری می شوند و متابولیسم را کند می کنند که باعث افزایش زمان بین تقسیمهای سلولی می شود.

- واژه دیگر sepsis است که اشاره به شرایطی دارد که در آن میکروبها یا سموم آنها در بافت با خون وجود دارند. بنابراین فرد دارای سپتی سمی یعنی اینکه این شخص دارای عفونت میکروبی خون می باشد و آنتی سپتیک یعنی بر علیه عفونت. این ریشه لغت asepsis به معنی خالی از میکروبهای بیماریزا نیز می باشد.

- واژه دیگر در این مقوله sanitize کردن است که کاهش جمعیت میکروبی به سطح استانداردی که توسط استانداردهای سلامت عمومی تعیین شده است می باشد. برای مثال در صنایع لبنیات و غذا، دستگاهها تحت فرایند sanitization قرار می گیرند.

- برای اینکه یک عامل شیمیایی antiseptic با disinfectant خوبی باشد باید خصوصبانی داشته باشد از جمله :

بتواند میکروارگانیسم مورد نظر را بکشد یا رشد آن را کند کند.

برای انسان با حیوان سمی نباشد ، بخصوص اگر بعنوان آنتی سپتیک استفاده می شود.

محلول در آب بوده و عمر مفید یا ماندگاری خوبی نیز داشته باشد که در فعالیت خود را نیز حفظ کند.

در فرم خیلی رقیق هم مفید باشد و در زمان نسبتا کوتاهی بتواند اثر خود را اعمال نماید.

- خصوصیات دیگری نیز برای این مواد در نظر گرفته می شود از جمله : باعث خوردگی در وسابل نشود، پایدار باشد و به خوبی نفوذ کند. علاوه بر این بهتر است قابل دسترس و ارزان قیمت باشد.

- از آنجاییکه ضد عفونی کردن عملی شیمیایی است ، چندین پارامتر شیمیایی نیز در هنگام انتخاب یک ماده ضدعفونی کننده یا آنتی سپتیک از جمله دما و pH باید در نظر گرفته شوند.
- مورد دیگر نوع میکروارگانیسمی است که قرار است حذف شود و سطحی که باید مورد تیمار قرار بگیرد. برای مثال ، حذف اسپورهای باکتریایی نسبت به فرم رویشی تیمار قویتری نیاز دارد.
- همچنین موادی که برای ضدعفونی کردن میزهای آزمایشگاه بکار می رود با آنچه بر روی یک زخم یا استریل کردن یک جسم استفاده می شود متفاوت است. بنابراین تشخیص طبیعت antiseptic یا disinfectan بودن یک ماده شیمیایی قبل از بکار بردن آن لازم می باشد.
- عوامل شیمیایی که بعنوان disinfectant در نظر گرفته می شوند بوسیله آژانس حفاظت محیطی آمریکا (EPA) و فرمول مواد آنتی سپیک توسط وزارت دارو و درمان آمریکا تنظیم و مشخص شده اند.

- در حال حاضر بیش از ۸۰۰۰ ماده ضد عفونی کننده برای مصارف بیمارستانی یا عمومی وجود دارند.
- تعیین کارایی و ارزیابی این عوامل بسیار سخت و خسته کننده است بعلت گستردگی تنوع شرایطی که در آن مورد مصرف قرار می گیرند . یکی از روشهای سنجش کارایی یک ماده شیمیایی تعیین ضریب فنلی می باشد phenol coefficient (PC) که در حقیقت عددی است که نشانگر توانایی یک ماده antiseptic با disinfectantدر مقایسه با فنل تحت شرایط یکسان می باشد.
- وقتی این عدد بیشتر از یک باشد نشاندهنده این است که ماده شیمیایی مورد نظر قویتر از فنل است و اگر این عدد کمتر از یک باشد توانایی ضدعفونی کردن آن کمتر از فنول است.
- ضریب فنولی با یک آزمایش که در آن رقتهای فنل و مواد شیمیایی مورد آزمایش با گونه های باکتریایی استاندارد شده مثل استافیلوکو کوس آرئوس و سالمونلا تیفی با گونه های دیگر مخلوط می شوند و سپس تکنسین آزمایشگاه تعیین می کند که کدام رقت بعد از ۱۰ دقیقه مجاورسازی قادر به کشتن میکروب بوده ولی بعد از ۵ دقیقه قادر به این کار نمی باشد.

Savlon
Antiseptic Liquid

اثر الکل :

- برای استفاده های عملی الکل اتیلیک یا اتانول ترجیح داده می شود که بر علیه سلولهای باکتریایی رویشی فعال است ولی بر روی اسپورها تاثیری ندارد.
- الکل پروتئینها را دناتوره می کند و لیپیدها را حل می نماید که در نهایت باعث از بین رفتن غشاء سلولی می شود. اتانول همچنین یک عامل قوی دهیدراسیون به شمار می آید.

مواد و وسایل لازم:

- الکل با رقتهای مختلف
- محیط نوترینت براث یا TSB
- پیپت یا سمپلر
- کشت میکروبی ۲۴ ساعته در محیط مایع

روش کار:

- به هر کدام از رقتهای الکلی (۹۶، ۷۰، ۵۰ درجه)، ۱۰۰ میکرولیتر از کشت میکوبی تلقیح می کنیم
- پس از ۱۰ دقیقه ، ۱۰۰ میکرولیتر از هر لوله برداشته و به محیط نوترینت براث منتقل می کنیم و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه می کنیم.
- برای تهیه شاهد نیز ابتدا ۱۰۰ میکرولیت از باکتری را درون ۳ سی سی محیط TSB تلقیح می کنیم و بعد از این محیط ۱۰۰ میکرولیتر باکتری را به محیط نوترینت آگار انتقال داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه می کنیم.
- بعد از این زمان کدورت محلول داخل لوله ها را بررسی کرده و از ۱+ تا ۴+ گزارش می شود.

از حسن توجه شما سپاسگزارم
تهیه کننده : سهیلا عباسی