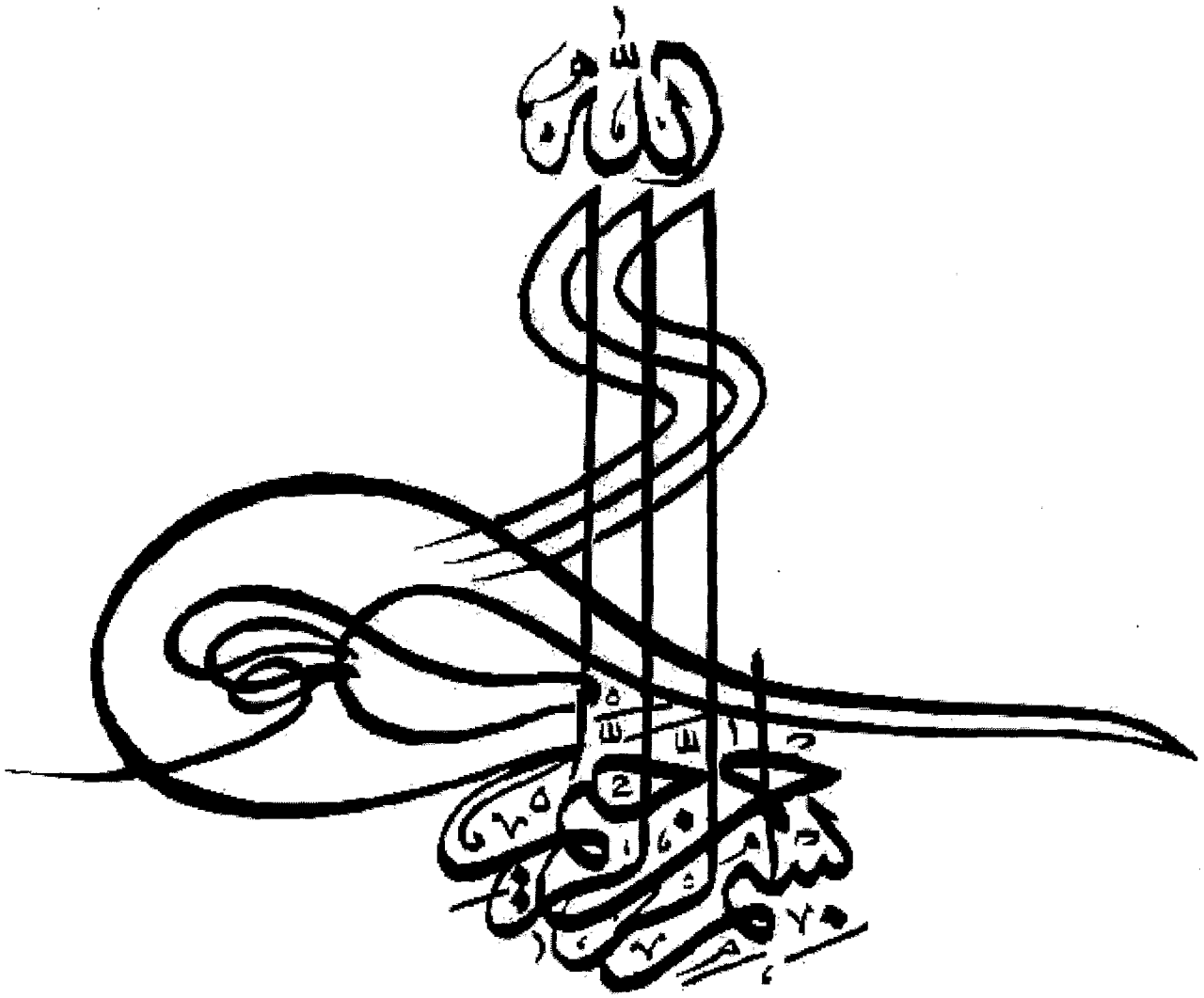

١٢٩٧٤٥

دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم
گروه زیست‌شناسی

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست‌شناسی - میکروبیولوژی

اثر عوامل مختلف تنش زا (عوامل شیمیایی و فیزیکی) روی رشد ، تغییرات فیزیولوژیک و ژنتیکی برخی باکتری ها ی پاتوژن با منشا عفونت بیمارستانی

استادان راهنما:

دکتر روحا کسری-کرمانشاهی

دکتر سید حمید زرکش اصفهانی

پژوهشگر:

فرناز ولی زاده

۱۳۸۸/۱۰/۲۷

شهریورماه ۱۳۸۸

۱۲۹۷۴۵

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات،

ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق

موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه

اصفهان است.

شیوه نگارش پایان نامه
رعایت شده است.
تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست‌شناسی

پایان‌نامه ی کارشناسی ارشد رشته ی زیست‌شناسی- میکروبیولوژی

خانم فرناز ولی زاده تحت عنوان

اثر عوامل مختلف تنش زا (عوامل شیمیایی و فیزیکی) روی رشد، تغییرات فیزیولوژیک و ژنتیکی برخی باکتری های پاتوژن با منشا عفونت بیمارستانی

در تاریخ ۸۸/۶/۲۵ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای اول پایان نامه دکتر روحا کسری کرمانشاهی با مرتبه ی علمی استاد امضا

۲- استادراهنمای دوم پایان نامه دکتر حمید زرکش اصفهانی با مرتبه ی علمی استادیار امضا

۳- استاد داور داخل گروه دکتر زهرا اعتمادی فر با مرتبه ی علمی استادیار امضا

۴- استاد داور خارج از گروه دکتر بهرام نصر اصفهانی با مرتبه ی علمی استادیار امضا

امضای مدیر گروه

تقدیر و تشکر:

سپاس و ستایش مخصوص خداوندی است که انسان را آفرید و او را به فضیلت تعلیم و دانایی بر دیگر خلوقات خود برتری بخشید. خدای من تو را سپاس می گویم که همواره یاری رسانم بوده ای و مرا در روزهای سخت زندگی همراهی نمودی. تویی که ترس و سرگردانی مرا در پناه لطف و عطوفتت به شجاعت تبدیل نمودی.

سپاس و قدردانی بی اندازه از سرکار خانم دکتر کرمانشاهی که در طول دوران انجام این پایان نامه با حسن خلق همیشگی شان در به سر انجام رساندن آن کمک شایانی کردند.

از زحمات بی دریغ و راهنمایی های ارزشمند جناب آقای دکتر زرکش در راستای انجام این پایان نامه تشکر و قدردانی می کنم.

تشکر فراوان از پدر و مادر دلسوز و فداکارم که در همه مراحل زندگی حامی من بودند و با آسایش و آرامشی که برای من فراهم کردند مرا در به اتمام رساندن این پایان نامه یاری کردند. همچنین تشکر می کنم از محبت ها و راهنمایی های برادر عزیزم.

از حضور داوران محترم جناب آقای دکتر نصر و سرکار خانم دکتر اعتمادی فر که داوری این پایان نامه را بر عهده گرفتند تشکر می کنم.

از تمامی اساتید محترم گروه که در این چند سال با راهنمایی های خود همواره راهگشای اینجانب بوده اند کمال تشکر را دارم.

از کمک های دوستان و همکلاسی های خوبم خانم ها: میسمی، جناب، عروجعلیان، شکرانی، مستاجران،علی پوریان، نصر، جلال پور و جهانشاه و آقایان: شکری، نورنژاد، آشنگرف، شاکری، کاردی، قاضی مراد و کمیجانی تشکر فراوان می کنم.

سپاس ویژه از زحمات و کمک های سرکار خانم پاکروان و جناب آقای دباغ کارشناس محترم آزمایشگاه که در این مدت کمک شایانی به اینجانب کردند.

از محبت های سرکار خانم بلوکی، طاهری و کاظمی کارشناس محترم کتابخانه دانشکده زیست شناسی تشکر و قدردانی می کنم .

واز تمامی عزیزانی که مرا تا انتهای این مسیر یاری نموده اند تشکر می کنم.

تقدیم به مادرم

که اسطوره فداکاری و صبر است و وجودش امید زندگی

تقدیم به پدرم

به پاس محبت ها و پشتیبانی های بی دریغش

تقدیم به یگانه برادرم

به پاس راهنمایی ها و مهربانی های بی پایانش

چکیده:

عفونت های اکتساب شده از محیط های بیمارستانی معمولا ۷۲ ساعت تا ۵ روز بعد از بستری شدن در بیمارستان ایجاد می شود. از میان باکتری ها *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروکوکوس فکالیس*، *اشرشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه* از عوامل مهم ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی می باشند که به واسطه خواص ویرولانسی خود مانند همولیزین وخاصیت هیدروفوبیسیته سطحی منجر به ایجاد بیماری می شوند. *اشرشیاکلی سویه O157:H7* نیز یکی از عوامل آلوده کننده مواد غذایی می باشد.باکتری های فوق هم در محیط و هم در بدن میزبان با تنش و تغییر شرایط زیستی رو به رو می شوند. تنش در باکتری ها به معنی هرگونه انحراف از حالت طبیعی رشد و در نتیجه کاهش سرعت رشد باکتری ها می باشد که این تنش ها شامل : تنش گرمایی، سرمایی، اسمولاریته، اشعه،pH، اکسیداتیو و محدودیت مواد غذایی می باشد.. از آنجایی که مقاومت باکتری های پاتوژن بیمارستانی به آنتی بیوتیک ها و عوامل ضدباکتریایی تنش زا رو به افزایش است لذا بررسی میزان مقاومت و تغییرات ژنتیکی باکتری ها به از بین بردن آن هاکمک می کند. در این تحقیق ما به بررسی اثر تنش شیمیایی(هیپوکلریت سدیم و پراکسیدهیدروژن) و همچنین اثر تنش فیزیکی(pH)، بر روی خواص فیزیولوژیک چهار سویه باکتری پاتوژن و استاندارد، شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروکوکوس فکالیس*، *اشرشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه* پرداختیم. همچنین تغییرات ژنتیکی(تغییرات بیان ژن *oxyR* که در حفاظت سلول های باکتریایی علیه تنش اکسیداتیو نقش دارد) روی *اشرشیاکلی O157:H7* بررسی شد. ابتدا MIC وMBC هریک از مواد ضدباکتریایی بر روی هر یک از باکتری ها با روش میکروتیترپلیت تعیین شد سپس با روش اسپریدپلیت میزان مقاومت باکتری ها نسبت به مواد ضد باکتریایی تعیین گردید . نتایج نشان داد که در زمان های مختلف باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای بیشترین مقاومت نسبت به دو ماده ضدباکتریایی و *اشرشیاکلی* کمترین میزان مقاومت را دارا می باشد. در قسمت دیگر از تحقیق به بررسی تغییرات بیوشیمیایی و مرفولوژیکی حاصل از تنش شیمیایی پرداخته شد. تغییرات مرفولوژیکی حاصل از تنش شیمیایی فقط در باکتری *اشرشیاکلی* مشاهده شد و تغییرات بیوشیمیایی دیده در هیچ باکتری نشد. نتایج حاصل از اثر تنش پراکسیدهیدروژن بر تغییرات خاصیت هیدروفوبیسیته سطحی باکتری ها این طور نشان داد که بیشترین میزان کاهش هیدروفوبیسیته سطحی در باکتری *اشرشیاکلی* و کمترین میزان کاهش در باکتری *کلبسیلا پنومونیه* دیده شد. در قسمت دیگر از تحقیق به بررسی اثرpH های مختلف بر تحمل اسیدی باکتری ها پرداخته شد. نتایج حاصل از اثر تنش فیزیکی بر روی باکتری ها این طور نشان داد که تیمار قبلی باکتری ها با pH های متفاوت می تواند منجر به بقای باکتری هادر شرایطی با pH اسیدی شود. در بین باکتری ها *اشرشیاکلی O157:H7* در۵: pH بیشترین میزان تحمل اسیدی را نشان داد. نتایج حاصل از بررسی تغییر ژنتیکی *اشرشیاکلی O157:H7* این طور نشان داد که میزان بیان ژن *oxyR* پس از مجاورت با پراکسیدهیدروژن به میزان ۲/۲ برابر افزایش می یابد .همچنین میزان بیان این ژن در فاز سکون بیشتر از فاز لگاریتمی رشد باکتری بوده است، که این نتایج با گزارشات بسیاری از محققین هماهنگ بوده و با برخی نتایج دیگر محققین مغایرت داشته است که در قسمت بحث به آن پرداخته می شود.

کلمات کلیدی: عوامل عفونت بیمارستانی، عوامل تنش زا، هیدروفوبیسیته سطحی، تحمل اسیدی باکتری ها

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول مقدمه

۱-۱- مقدمه ۱

۱-۲- عفونت بیمارستانی ۳

۱-۳- انواع تنش : ۴

۱-۳-۱- تنش گرمایی: ۵

۱-۳-۲- تنش سرمایی : ۷

۱-۳-۳- تنش اسمزی: ۸

۱-۳-۴- تنش اشعه: ۹

۱-۳-۵- تنش pH: ۱۰

۱-۳-۶- تنش اکسیداتیو: ۱۱

۱-۳-۶-۱- منابع تنش اکسیداتیو: ۱۲

۱-۳-۶-۲- تخریب سلولی به واسطه تنش اکسیداتیو : ۱۳

۱-۳-۷- تنش گرسنگی: ۱۴

۱-۴- مکانیسم حس کردن تنش در باکتری ها ۱۴

۱-۵- مکانیسم پاسخ گویی باکتری ها در برابر تنش ها ۱۵

۱-۵-۱- مکانسیم پاسخ علیه تنش گرمایی: ۱۵

۱-۵-۲- مکانیسم پاسخ علیه تنش سرمایی: ۱۸

۱-۵-۳- مکانیسم پاسخ علیه تنش اسمزی: ۲۰

۱-۵-۴- مکانیسم پاسخ علیه تنش اشعه ۲۲

۱-۵-۵- مکانسیم مقاومت علیه تنش اسیدی: ۲۳

۱-۵-۵-۱- مکانیسم هموستازی pH در باکتری گرم منفی: ۲۳

۱-۵-۵-۲- مکانیسم هموستازی در باکتری های گرم مثبت ۲۶

۱-۵-۶- مکانیسم دفاع علیه تنش اکسیداتیو ۲۸

عنوان | صفحه

۱-۵-۶-۱- پاسخ فیزیولوژی باکتری به تنش اکسیداتیو ۲۸
۱-۵-۶-۲- پاسخ مولکولی به تنش اکسیداتیو ۲۹
۱-۵-۷- مکانیسم پاسخ به تنش محدودیت مواد غذایی ۳۱
۱-۶- مواد ضد میکروبی ۳۱
۱-۶-۱- پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ۳۱
۱-۶-۲- هیپوکلریت سدیم ۳۲
۱-۷- تنش و ویرولانس باکتری ها ۳۳
۱-۸- باکتری های زنده ولی غیر قابل رشد ۳۴
۱-۹- باکتریها ۳۵
۱-۹-۱- *استافیلوکوکوس اورئوس* ۳۵
۱-۹-۲- *انتروکوکوس فکالیس* ۳۶
۱-۹-۳- *اشرشیاکلی* ۳۶
۱-۹-۴- *کلبسیلا پنومونیه* ۳۷

فصل ۲ مواد و روش ها

۲-۱- مواد و وسایل مورد استفاده بخش اول ۳۹
۲-۱-۱- مواد: ۳۹
۲-۱-۲- محیط های کشت ۴۰
۲-۱-۳- وسایل و دستگاه ها ۴۱
۲-۱-۴- باکتری های مورد استفاده ۴۱
۲-۲- طرز تهیه محیط های کشت ۴۲
۲-۲-۱- محیط کشت نوترینت آگار(NA) ۴۲
۲-۲-۲- محیط کشت نوترینت براث (NB) ۴۲
۲-۲-۳- محیط کشت تریپتیکاز سوی آگار(TSA) ۴۲
۲-۲-۴- محیط کشت تریپتیکاز سوی براث (TSB) ۴۲
۲-۲-۵- محیط کشت لوریا برتانی (LB) ۴۳

عنوان | صفحه

۲-۲-۶- محیط کشت برین هارت اینفیوژن آگار(BHI) ۴۳
۲-۲-۷- محیط برین هارت اینفیوژن براث (BHI)..... ۴۳
۲-۲-۸- محیط SIM..... ۴۳
۲-۲-۹- محیط کشت سیمون سیترات آگار..... ۴۴
۲-۲-۱۰- محیط کشت MR-VP..... ۴۴
۲-۲-۱۱- محیط بررسی تخمیر هیدرات کربن..... ۴۴
۲-۲-۱۲- محیط کشت TSI..... ۴۴
۲-۲-۱۳- محیط کشت EMB..... ۴۵
۲-۲-۱۴- تهیه استاندارد مک فارلند..... ۴۵
۲-۲-۱۵- بافر فسفات..... ۴۵
۲-۳- روش کار..... ۴۶
۲-۳-۱- تهیه باکتری های مورد نظر..... ۴۶
۲-۳-۱-۱- نمونه برداری..... ۴۶
۲-۳-۲- شناسایی باکتری های جدا شده..... ۴۶
۲-۳-۲-۱- رنگ آمیزی گرم..... ۴۶
۲-۳-۲-۲- بررسی واکنش اکسیداز..... ۴۶
۲-۳-۲-۳- بررسی واکنش کاتالاز..... ۴۶
۲-۳-۲-۴- بررسی تولید اندول..... ۴۷
۲-۳-۲-۵- بررسی تولید SH_2..... ۴۷
۲-۳-۲-۶- بررسی تخمیر هیدرات کربن..... ۴۷
۲-۳-۲-۷- بررسی مصرف سیترات..... ۴۷
۲-۳-۲-۸- بررسی تست وژپرسکوئر..... ۴۷
۲-۳-۲-۹- بررسی تست متیل رد..... ۴۸
۲-۳-۲-۱۰- بررسی تست اوره آز..... ۴۸
۲-۳-۲-۱۱- بررسی رشد در درجه حرارت مختلف..... ۴۸
۲-۳-۲-۱۲- بررسی مقاومت به نمک..... ۴۸

عنوان | صفحه

۲-۴- بررسی منحنی رشد باکتری های به کار رفته ۴۸
۲-۴-۱- تهیه باکتری ها و محیط کشت ۴۸
۲-۵- بررسی تاثیر برخی عوامل شیمیایی بر باکتری ها در شرایط آزمایشگاهی ۴۹
۲-۵-۱- بررسی اثر هیپوکلریت سدیم بر روی باکتری ها ۴۹
۲-۵-۱-۱- آماده سازی مواد ۴۹
۲-۵-۱-۱-۱- تهیه محلول هیپوکلریت سدیم با غلظت های مختلف ۴۹
۲-۵-۱-۲- تهیه مایه میکروبی ۴۹
۲-۵-۱-۳- تعیین میزان MIC هیپوکلریت سدیم بر روی باکتری های جداسازی شده ۵۰
۲-۵-۱-۴- تعیین میزان MBC هیپوکلریت سدیم بر روی باکتری ها ۵۰
۲-۵-۱-۵- بررسی اثر ضدباکتریایی هیپوکلریت سدیم بر رشد باکتری ها به روش اسپرید پلیت ۵۱
۲-۵-۲- بررسی اثر پراکسید هیدروژن بر روی باکتری ها ۵۴
۲-۵-۲-۱- آماده سازی مواد ۵۴
۲-۵-۲-۱-۱- تهیه محلول پراکسید هیدروژن با غلظت های مختلف ۵۴
۲-۵-۲-۲- تهیه مایه میکروبی ۵۴
۲-۵-۲-۳- تعیین میزان MIC پراکسید هیدروژن بر روی باکتری های جداسازی شده ۵۴
۲-۵-۲-۴- تعیین میزان MBC پراکسیدهیدروژن بر روی باکتری ها ۵۴
۲-۵-۲-۵- بررسی اثر ضد باکتریایی پراکسیدهیدروژن بر رشد باکتری ها به روش اسپرید پلیت ۵۵
۲-۵-۲-۶- بررسی اثر عوامل تنش شیمیایی بر روی مرفولوژی باکتری ها ۵۵
۲-۵-۲-۷- بررسی عوامل تنش شیمیایی بر روی تست های بیوشیمیایی باکتری ها ۵۵
۲-۶- بررسی تاثیر عامل فیزیکی بر روی باکتری ها در شرایط آزمایشگاهی ۵۶
۲-۶-۱- برسی اثر PH بر روی باکتری ها و تحمل اسیدی باکتری ها ۵۶
۲-۶-۱-۱- آماده سازی محیط کشت و باکتری ها ۵۶
۲-۷- بررسی اثر آب اکسیژنه بر خاصیت هیدروفوبیسیته باکتری ها ۵۸
۲-۷-۱- آماده سازی مواد و باکتری ها ۵۹
۲-۸- بررسی ژنتیکی اثر تنش بر روی باکتری ۶۰
۲-۸-۱-RT-PCR ۶۰
۲-۹- جداسازی Total RNA ۶۱

عنوان | صفحه

۲-۹-۱- دستگاه ها، وسایل و مواد مورد استفاده ۶۱
۲-۹-۲- غیر فعال سازی RNAase در استخراج RNA ۶۱
۲-۹-۲-۱- تهیه آب تیمار شده با DEPC ۶۱
۲-۹-۳-RNX ^{TM}PLUS ۶۲
۲-۹-۳-۱- مراحل جداسازی RNA ۶۲
۲-۱۰- تهیه cDNA از RNA ۶۳
۲-۱۰-۱- دستگاه ها و مواد مورد استفاده در RT-PCR ۶۳
۲-۱۰-۲- آنزیم Reverse Transcriptase ۶۳
۲-۱۰-۲-۱-M-MLV Reverse Transcriptase (M-MLV RT) ۶۴
۲-۱۰-۳- پرایمر ۶۴
۲-۱۰-۳-۱-Random Hexamer ۶۵
۲-۱۰-۳-۲-Oligo dT ۶۵
۲-۱۰-۳-۳-Specific primer ۶۵
۲-۱۱-PCR ۶۸
۲-۱۱-۱- دستگاه های مورد استفاده ۶۸
۲-۱۱-۲- مواد مورد استفاده ۶۸
۲-۱۱-۳- پرایمر OXYR ۶۹
۲-۱۱-۴- پرایمر عمومی ۶۹
۲-۱۱-۵- روش تهیه اتیلن دی آمینو ترا استیک اسید(EDTA) ۷۰
۲-۱۱-۶- روش تهیه محلول TBE ۷۰
۲-۱۱-۷- مارکر DNA ۷۱
۲-۱۱-۸- روش تهیه محلول اتیدیوم برماید ۷۱
۲-۱۱-۹- روش انجام PCR برای ژن OXYR و ژن 16S rRNA ۷۱
۲-۱۱-۹-۱- بهینه سازی PCR ۷۱
۲-۱۱-۱۰- بررسی محصول PCR ۷۳
۲-۱۱-۱۰-۱- ساخت ژل آگارز ۷۳
۲-۱۱-۱۰-۲- لودینگ بافر ۷۳

عنوان | صفحه

۲-۱۱-۱۰-۳- انتقال محصول PCR به ژل ۷۴
۲-۱۲- استفاده از نرم افزار Gene Tools ۷۴
۲-۱۳- محاسبات آماری ۷۴

فصل ۳ نتایج و مشاهدات

۳-۱- جداسازی و شناسایی باکتری های مورد نظر ۷۵
۳-۱-۱- تهیه باکتری ها ۷۶
۳-۱-۲- شناسایی باکتری های جداسازی شده از بیمارستان و سویه های استاندارد ۷۶
۳-۲- بررسی منحنی رشد باکتری ها ۷۷
۳-۳- بررسی اثر عوامل شیمیایی تنش زا بر روی باکتری ها ۷۸
۳-۳-۱- بررسی اثر هیپوکلریت سدیم بر باکتری های مورد نظر ۷۸
۳-۳-۱-۱- بررسی اثر غلظت های مختلف هیپوکلریت سدیم بر باکتری ها به روش میکروتیتر پلیت ۷۸
۳-۳-۱-۲- بررسی MIC هیپوکلریت سدیم بر باکتری ها به روش میکروتیتر پلیت ۸۱
۳-۳-۱-۳- بررسی MBC هیپوکلریت سدیم بر روی باکتری ها ۸۱
۳-۳-۱-۴- بررسی اثرضدباکتریایی هیپوکلریت سدیم بر روی میزان مرگ و میرباکتری ها ۸۳
۳-۳-۱-۴-۱- بررسی میزان زنده ماندن باکتری ها به روش اسپرید پلیت با غلظت $\frac{1}{2}$ sub-MIC ۸۳
۳-۳-۲- بررسی اثر پراکسیدهیدروژن بر روی باکتری های به کار رفته ۸۸
۳-۳-۲-۱- بررسی اثر غلظت های مختلف پراکسیدهیدروژن بر باکتری ها به روش میکروتیترپلیت ۸۸
۳-۳-۲-۲- بررسی MIC پراکسیدهیدروژن بر باکتری ها به روش میکروتیترپلیت ۹۰
۳-۳-۲-۳- بررسی MBC پراکسیدهیدروژن بر باکتری ها ۹۰
۳-۳-۲-۴- بررسی اثر ضدباکتریایی پراکسیدهیدروژن بر میزان مرگ و میر باکتری ها ۹۲
۳-۳-۲-۴-۱ بررسی میزان زنده ماندن باکتری به روش اسپریدپلیت درغلظت $\frac{1}{2}$ sub-MIC ۹۲
۳-۳-۲-۵- بررسی اثر عوامل تنش شیمیایی بر روی مرفولوژی باکتری ها ۹۸
۳-۳-۲-۶- بررسی اثر تنش های شیمیایی بر تست های بیوشیمیایی ۹۹
۳-۴- بررسی اثر تنش فیزیکی بر روی باکتری ها ۱۰۱

عنوان | صفحه

۳-۴-۱- بررسی میزان زنده ماندن باکتری ها در شرایط تحمل محیط اسیدی و شرایط غیر تحمل اسیدی... ۱۰۱

۳-۴-۲- بررسی و مقایسه تحمل اسیدی باکتری ها در PH های مختلف ۱۰۲

۳-۵- بررسی اثر آب اکسیژنه بر خاصیت هیدروفوبیسیته باکتری ها ۱۱۱

۳-۶- بررسی اثر تنش اکسیداتیو پراکسید هیدروژن بر میزان بیان ژن OXYR باکتری *E.COLI O157: H7* ۱۱۳

۳-۶-۱- تهیه نمونه باکتریایی ۱۱۳

۳-۶-۲- استخراج Total RNA ۱۱۳

۳-۶-۳- تهیه cDNA از RNA ۱۱۳

۳-۶-۴- PCR ۱۱۴

۳-۶-۵- بررسی محصول PCR و بررسی بیان ژن OXYR ۱۱۵

فصل ۴ بحث ونتیجه گیری

۴-۱- بحث ۱۲۰

۴-۲- اثر تنش شیمیایی روی باکتری ها ۱۲۰

۴-۲-۱- اثر ماده ضدباکتریایی هیپوکلریت سدیم بر باکتری ها ۱۲۱

۴-۲-۱-۱- اثر غلظت های مختلف هیپوکلریت سدیم به روش میکروتیتر پلیت ۱۲۱

۴-۲-۱-۲- بررسی MIC و MBC هیپوکلریت سدیم بر باکتری ها ۱۲۱

۴-۲-۱-۳- بررسی اثرهیپوکلریت سدیم بر روی باکتری ها به روش اسپرید پلیت در غلظت $\text{sub-MIC}\frac{1}{2}$ ۱۲۲

۴-۲-۲- اثرماده ضدباکتریایی پراکسیدهیدروژن بر باکتری ها ۱۲۵

۴-۲-۲-۱- اثر غلظت های مختلف پراکسیدهیدروژن بر باکتری ها به روش میکروتیترپلیت ۱۲۵

۴-۲-۲-۲- بررسی MIC وMBC پراکسیدهیدروژن بر باکتری ها ۱۲۵

۴-۲-۲-۳- بررسی اثر پراکسیدهیدروژن بر باکتری ها به روش اسپریدپلیت در غلظت $\text{sub-MIC}\frac{1}{2}$ ۱۲۶

۴-۲-۲-۴- اثرتنش شیمیایی بر تغییرات بیوشیمیایی و تغییرات مرفولوژیکی باکتری ها ۱۲۹

۴-۳- بررسی اثر تنش فیزیکی PH بر باکتری ها ۱۳۰

۴-۳-۱- بررسی تحمل اسیدی(ATR) در باکتری ها ۱۳۰

عنوان **صفحه**

۴-۴- اثر پراکسیدهیدروژن بر خاصیت هیدروفوبیسیته باکتری ها..... ۱۳۳
۴-۵- اثر تنش اکسیداتیو پراکسیدهیدروژن بر بیان ژن OXYR در *اشرشیاکلی O157:H7* ۱۳۴
پیوست-۱..... ۱۳۸
منابع و مآخذ..... ۱۳۹

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل (۱-۱) مکانیسم پاسخ به تنش گرمایی در باکتری ها ۱۷

شکل (۱-۲) مکانیسم پاسخ عقب گرد منفی به تنش گرمایی ۱۷

شکل (۱-۳) مکانیسم پاسخ به تنش اسمزی در باکتری ها ۲۲

شکل (۱-۴) مکانیسم هموستازی با تغییرات pH در باکتری گرم منفی*(اشرشیاکلی)* ۲۵

شکل (۱-۵) مکانیسم هموستازی با کاهش pH در *سالمونلا و اشرشیاکلی* ۲۶

شکل (۱-۶) مکانیسم هموستازی باکتری های گرم مثبت با تغییرات محیطی ۲۷

شکل (۱-۷) اکسید و احیا شدن پروتئین OxyR در مواجه با پراکسیدهیدروژن در باکتری *اشرشیاکلی* ۳۰

شکل (۲-۱) طرز تهیه سریال رقت از نمونه باکتریایی ۵۲

شکل (۲-۲) شمایی از عملکرد Random Hexamer primer ۶۶

شکل (۲-۳) شمایی از عملکرد Oligo dT primer ۶۶

شکل (۲-۴) شمایی از عملکرد Gene specific primer ۶۶

شکل (۳-۱) منحنی رشد باکتری های گرم مثبت پاتوژن و استاندارد ۷۷

شکل (۳-۲) منحنی رشد باکتری های گرم منفی پاتوژن و استاندارد ۷۸

شکل (۳-۳) بررسی اثر غلظت های مختلف هیپوکلریت سدیم بر باکتری های پاتوژن ۷۹

شکل (۳-۴) بررسی اثر غلظت های مختلف هیپوکلریت سدیم بر باکتری های استاندارد ۷۹

شکل (۳-۵) مقایسه اثر غلظت های مختلف هیپوکلریت سدیم بین باکتری های پاتوژن و استاندارد گرم مثبت ۸۰

شکل (۳-۶) مقایسه اثر غلظت های مختلف هیپوکلریت سدیم بین باکتری های پاتوژن و استاندارد گرم منفی ۸۰

شکل (۳-۷) تعیین MIC مواد ضد باکتریایی به واسطه میکروتیترپلیت ۸۱

شکل (۳-۸) بررسی MBC هیپوکلریت سدیم در *استافیلوکوکوس اورئوس* ۸۲

شکل (۳-۹) بررسی MBC هیپوکلریت سدیم در *اشرشیاکلی* ۸۳

شکل (۳-۱۰) میزان زنده ماندن باکتری های پاتوژن بعد از مجاورت با هیپوکلریت سدیم ۸۵

شکل (۳-۱۱) میزان زنده ماندن باکتری های استاندارد بعد از مجاورت با هیپوکلریت سدیم ۸۵

شکل (۳-۱۲) مقایسه میزان زنده ماندن باکتری های گرم مثبت پاتوژن و استاندارد بعد از مجاورت با هیپوکلریت سدیم ۸۶

عنوان **صفحه**

شکل (۳-۱۳) مقایسه میزان زنده ماندن باکتری های گرم منفی پاتوژن و استاندارد بعد از مجاورت با هیپوکلریت سدیم ۸۶

شکل (۳-۱۴) بررسی اثر هیپوکلریت بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به روش اسپریدپلیت ۸۷

شکل (۳-۱۵) بررسی اثر غلظت های مختلف پراکسیدهیدروژن بر باکتری های پاتوژن ۸۸

شکل (۳-۱۶) بررسی اثر غلظت های مختلف پراکسیدهیدروژن بر باکتری های استاندارد ۸۹

شکل (۳-۱۷) مقایسه اثر غلظت های مختلف پراکسیدهیدروژن بین باکتری های پاتوژن و استاندارد گرم مثبت ۸۹

شکل (۳-۱۸) مقایسه اثر غلظت های مختلف پراکسیدهیدروژن بین باکتری های پاتوژن و استاندارد گرم منفی ۹۰

شکل (۳-۱۹) بررسی MBC پراکسیدهیدروژن در *کلبسیلا پنومونیه* ۹۱

شکل (۳-۲۰) بررسی MBC پراکسیدهیدروژن در *انتروکوکوس فکالیس* ۹۱

شکل (۳-۲۱) میزان زنده ماندن باکتری های پاتوژن بعد از مجاورت با پراکسیدهیدروژن ۹۳

شکل (۳-۲۲) میزان زنده ماندن باکتری های استاندارد بعد از مجاورت با پراکسیدهیدروژن ۹۳

شکل (۳-۲۳) مقایسه میزان زنده ماندن باکتری های پاتوژن و استاندارد گرم مثبت در مجاورت پراکسیدهیدروژن ۹۴

شکل (۳-۲۴) مقایسه میزان زنده ماندن باکتری های پاتوژن و استاندارد گرم منفی در مجاورت پراکسیدهیدروژن ۹۴

شکل (۳-۲۵) بررسی اثر پراکسیدهیدروژن بر *کلبسیلا پنومونیه* به روش اسپریدپلیت ۹۶

شکل (۳-۲۶) مقایسه اثر هیپوکلریت سدیم با پراکسیدهیدروژن در باکتری ها ۹۷

شکل (۳-۲۷) بررسی اثر پراکسیدهیدروژن بر مرفولوژی *اشرشیاکلی O157:H7* ۹۸

شکل (۳-۲۸) بررسی اثر پراکسیدهیدروژن بر مرفولوژی *انتروکوکوس فکالیس* ۹۸

شکل (۳-۲۹) بررسی اثر تنش اکسیداتیو بر *اشرشیاکلی* O157:H7(تست IMViC) ۱۰۱

شکل (۳-۳۰) اثر تطابق اسیدی در pH های مختلف در *استافیلوکوکوس اورئوس پاتوژن* ۱۰۲

شکل (۳-۳۱) اثر تطابق اسیدی در pH های مختلف در *انتروکوکوس فکالیس پاتوژن* ۱۰۲

شکل (۳-۳۲) اثر تطابق اسیدی در pH های مختلف در *اشرشیاکلی* O157: H7 ..... ۱۰۳

شکل (۳-۳۳) اثر تطابق اسیدی در pH های مختلف در *کلبسیلا پنومونیه پاتوژن* ۱۰۳

شکل (۳-۳۴) اثر تطابق اسیدی در pH های مختلف در *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC 1431 ..... ۱۰۴

عنوان | صفحه

شکل (۳-۳۵) اثر تطابق اسیدی در PH های مختلف در *انتروکوکوس فکالیس* PTCC 1237 ..... ۱۰۴

شکل (۳-۳۶) اثر تطابق اسیدی در pH های مختلف در *اشرشیاکلی* PTCC 1394 ..... ۱۰۵

شکل (۳-۳۷) اثر تطابق اسیدی در pH های مختلف در *کلبسیلا پنومونیه* PTCC 1290 ..... ۱۰۵

شکل (۳-۳۸) مقایسه تطابق اسیدی بر میزان زنده ماندن بین باکتری های پاتوژن پس از ۶ ساعت ۱۰۶

شکل (۳-۳۹) مقایسه تطابق اسیدی بر میزان زنده ماندن بین باکتری های استاندارد پس از ۶ ساعت ۱۰۶

شکل (۳-۴۰) بررسی اثر تحمل اسیدی بر روی *اشرشیاکلی* O157: H7 به روش اسپرید پلیت ۱۰۷

شکل (۳-۴۱) بررسی اثر تحمل اسیدی بر *انتروکوکوس فکالیس* به روش اسپرید پلیت ۱۰۸

شکل (۳-۴۲) بررسی تحمل اسیدی در *کلبسیلا پنومونیه* با روش اسپریدپلیت رقت باکتری: (10^{-3}) ۱۰۹

شکل (۳-۴۳) بررسی تحمل اسیدی در *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش اسپریدپلیت ۱۱۰

شکل (۳-۴۴) بررسی اثر پراکسیدهیدروژن بر هیدروفوبیسیته باکتری ها ۱۱۲

شکل (۳-۴۵) cDNA سنتز شده از RNA استخراج شده ۱۱۴

شکل (۳-۴۶) بهینه سازی محصول PCR در سیکل های مختلف ۱۱۵

شکل (۳-۴۷) نمودار بهینه سازی RT-PCR در سیکل های مختلف با نرم افزار Gene Tools ۱۱۵

شکل (۳-۴۸) استفاده از نرم افزار Gene Tools اعداد حاصل از شدت باند ستون شماره ۸ در قسمت پایین شکل نمایش داده شده است ۱۱۷

شکل (۳-۴۹) بررسی بیان ژن oxyR و 16s rRNA در *اشرشیاکلی* O157: H7 با استفاده از RT-PCR ۱۱۸

شکل (۳-۵۰) نمودار میزان بیان ژن oxyR ۱۱۹

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول (۱-۱) فاکتور های تنش و اثر آن ها بر باکتری ها و مکانیسم دفاعی باکتری ها ۵

جدول (۲-۱) مواد مورد استفاده جهت آزمایش ۳۹

جدول (۲-۲) محیط کشت های به کار رفته ۴۰

جدول (۲-۳) وسایل های به کار رفته ۴۱

جدول (۲-۴) باکتری های به کار رفته در تحقیق ۴۱

جدول (۲-۵) مواد به کار رفته جهت استاندارد مک فارلند ۴۵

جدول (۲-۶) مواد موجود در 5x reaction buffer ۶۴

جدول (۲-۷) مواد مورد استفاده در RT در ساخت cDNA ۶۷

جدول (۲-۸) برنامه RT در ساختcDNA ۶۷

جدول (۲-۹) مواد مورد استفاده و غلظت آن ها ۶۸

جدول (۲-۱۰) مشخصات پرایمر OxyR-forward ۶۹

جدول (۲-۱۱) مشخصات پرایمر OxyR-reverse ۶۹

جدول (۲-۱۲) مشخصات پرایمر 16s rDNA –RW01 ..... ۷۰

جدول (۲-۱۳) مشخصات پرایمر 16s rDNA-DG74 ..... ۷۰

جدول (۲-۱۴) غلظت و میزان مورد استفاده در PCR ۷۲

جدول (۲-۱۵) برنامه PCR ۷۲

جدول (۲-۱۶) درصد آگارز با توجه به اندازه مولکولی DNA ۷۳

جدول (۳-۱) تست های انجام شده جهت شناسایی باکتری های گرم مثبت ۷۶

جدول (۳-۲) تست های انجام شده جهت شناسایی باکتری های گرم منفی ۷۶

جدول (۳-۳) بررسی MIC وMBC هیپوکلریت سدیم بر روی باکتری های پاتوژن و استاندارد ۸۲

جدول (۳-۴)درصد کشته شدن باکتری ها پس از مجاورت با هیپوکلریت سدیم در زمان های مختلف ۸۴

جدول (۳-۵) بررسی MIC وMBC پراکسیدهیدروژن بر روی باکتری های پاتوژن و استاندارد ۹۲

جدول (۳-۶) درصد کشته شدن باکتری ها پس از مجاورت با پراکسیدهیدروژن در زمان های مختلف ۹۵

جدول (۳-۷) بررسی اثر تنش شیمیایی بر واکنش های بیوشیمیایی *استافیلوکوکوس اورئوس* ۹۹

جدول (۳-۸) بررسی اثر تنش شیمیایی بر واکنش های بیوشیمیایی *انتروکوکوس فکالیس* ۹۹

جدول (۳-۹) بررسی اثر تنش شیمیایی بر واکنش بیوشیمیایی *اشرشیاکلی* ۱۰۰

جدول (۳-۱۰) بررسی اثر تنش شیمیایی بر واکنش شیمیایی *کلبسیلا* پنومونیه ۱۰۰

عنوان **صفحه**

جدول (۳-۱۱) بررسی اثر پراکسیدهیدروژن بر خاصیت هیدروفوبیسیته باکتری ها..... ۱۱۱