

بakteri شناسی عمومی

عملی

دکتر کامیاب پاژنامه

فصل اول :

مقررات و اصول ایمنی در آزمایشگاه‌های

میکروب شناسی

بزرگترین عمل غیر اخلاقی این است که انسان، انجام وظیفه‌ای را که از عهده آن بر نمی‌آید، به عهده بگیرد

هدف از درس میکروبی‌شناسی عملی یادگیری تکنیک‌های پایه آزمایشگاهی برای مشاهده رشد، شناسایی و تشخیص میکروارگانیسم‌ها بخصوص، میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌باشد.

باتوجه به اینکه دنیای میکروب‌ها جهانی زنده ولی غیر قابل رویت است به این جهت علم میکروبیولوژی از سایر علوم مستثنی می‌باشد با استفاده از میکروسکوپ‌های مختلف و روش‌های رنگ‌آمیزی می‌توان به شکل و ساختمان و نوع قرارگیری باکتری‌ها پی برد.

همچنین می‌توان با استفاده از انواع متفاوت محیط‌های کشت، باکتری‌ها را کشت داده و رفتار این ارگانیسم‌های بسیار کوچک مهم را مطالعه نمود.

آزمایشگاه میکروب شناسی مکانی است که در آن میکروارگانیسم‌ها مورد کشت و آزمایش قرار می‌گیرند. آزمایش‌های صورت گرفته باید در محیطی کاملاً پاکیزه و استریل که مواد و وسایل به گونه‌ای منظم طبقه‌بندی شده‌اند، انجام گیرد، و روش‌های آزمایشگاهی بصورت کاملاً آسپتیک انجام شود. در این آزمایشگاه تمامی وسایل مورد استفاده استریل بوده و نهایت مراقبت باید صورت گیرد تا میکروارگانیسمی وارد آنها نشود.

همواره باید با این تصور وارد آزمایشگاه میکروبیولوژی شد که میکروب‌ها بالفعل و بالقوه بیماری‌زا هستند و به یاد داشت که حتی باکتری‌ها و قارچ‌های غیر بیماری‌زا نیز در صورتی که به بدن فردی که سیستم ایمنی ضعیف دارد وارد شود می‌توانند بیماری‌زا باشند.

علاوه از سلامت فرد آزمایش کننده، آلودگی ثانویه نمونه‌های مورد آزمایش نیز از مشکلات عمده می‌تواند باشد. لذا در آزمایشگاه باید کاری کرد که ضمن رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌ها از آلودگی ثانویه و رشد سایر میکروب‌ها جلوگیری گردد و پرسنل آزمایشگاه نیز آلوده نشوند. همچنین باید توجه نمود که محیط آزمایشگاه بوسیله میکروب‌های مورد بررسی یا از طریق نمونه‌های وارد شده به آزمایشگاه آلوده شوند.

شایان ذکر است روش‌های آسپتیک در تمام مراحل نمونه‌گیری، ارسال نمونه به آزمایشگاه و کار با مواد عفونی در آزمایشگاه باید رعایت شوند.

از طرف دیگر در برخی از آزمایشاتی که در این آزمایشگاه انجام می‌شوند موادی به کار می‌رود که در صورت کاربرد بدون رعایت موارد ایمنی می‌توانند خطرات بسیاری از جمله سوختگی یا ابتلا به سرطان را برای فرد به ارمغان آورند. لذا موقع کار با اینگونه مواد باید نهایت دقت را به کار برد. به منظور نیل به اهداف ذکر شده در مطالب فوق رعایت یک سری اصول در آزمایشگاه‌های میکروب شناسی الزامی است. که در متن زیر به برخی از آنها اشاره می‌شود:

(۱) پیش از ورود به آزمایشگاه، لباس اضافه، کتاب، لوازم شخصی و دیگر وسایل غیر ضروری را باید خارج آزمایشگاه در رختکن یا مکان مناسب قرارداده و تنها با وسایل ضروری وارد آزمایشگاه شد.

(۲) استفاده از روپوش به گونه‌ای که تا روی زانو را بپوشاند الزامی است هنگام لزوم و کار با میکروب‌های خطرناک حتی استفاده از عینک، دستکش و پیش بند هم الزامی است. دکمه‌های جلوی روپوش باید کاملاً بسته باشد. البسه باید مرتباً شسته ضد عفونی و اتو شوند.

(۳) خوردن، آشامیدن، سیگار کشیدن در آزمایشگاه ممنوع است چون راه ورود میکروب‌ها را هموار می‌کند.

(۴) باید موقع غذا خوردن و استراحت روپوش برتن نباشد و موقع خروج از آزمایشگاه تعویض شود

- (۵) هیچ وسیله‌ای نباید (قلم ، مداد) بادهان یا پوست زخمی در تماس باشد.
- (۶) در صورت وجود زخم تازه، بریدگی، سوختگی یا هر زخم دیگر دردست یا مناطق باز بدن زخم باید پوشانده شود.
- (۷) در صورتی که به روش کار مسلط نمی‌باشید بیش از ورود به آزمایشگاه و شروع کار باید روش کار مطالعه شود. همچنین اگر با کار با دستگاهی آشنایی ندارید قبلاً از کاربرد، راهنمای آن را مطالعه نموده و یا از اپراتور دستگاه سؤال نمایید.
- (۸) برچسب‌ها را نباید با آب دهان مرطوب کرد.
- (۹) از چشیدن مواد غذایی که به آزمایشگاه ارسال می‌شود باید خودداری کرد.
- (۱۰) میزها و سطوحی که آزمایش روی آن صورت می‌گیرد باید مرتباً شسته و با ماده ضدعفونی (عمدتاً الکل ۷۰٪ یا فنل ۵٪) ضدعفونی کرد.
- (۱۱) با توجه به اینکه نمونه‌هایی که به آزمایشگاه ارسال می‌شوند حاوی تعداد و انواع نامشخص میکروارگانیسم هستند باید در محل جداگانه پذیرش شوند که دارای دستشویی باشد تا در صورت نشت شیشه یا پلاستیک بیرون ریخته شود. این محیط باید به اندازه کافی روشن باشد.
- (۱۲) سرم‌ها، آنتی سرم‌ها، محلول‌ها و معرف‌هایی که مصرف می‌شود ممکن است سمی و سرطان‌زا باشند پس باید با احتیاط با آن‌ها کار کرد.
- (۱۳) از ورود افراد متفرقه به آزمایشگاه جلوگیری شود.
- (۱۴) موقع حمل و نقل مواد و وسایل آلوده به عوامل عفونی نهایت دقت را باید به کار بست تا علاوه از اینکه محیط آلوده نشود از آلودگی ثانویه نیز جلوگیری شود.
- (۱۵) مکیدن مایعات آلوده و عفونت‌زا با پی‌پت از طریق دهان ممنوع است (Pipating) بهتر است از پوار، یا پی‌پتور استفاده شود. پی‌پت‌ها پس از استفاده در شیشه ضدعفونی کننده قرار گیرد.
- (۱۶) ظروف حاوی کشت میکروارگانیسم‌ها باید به‌طور روشن و واضح برچسب گذاری شوند اگر پس از کشت در ظرف بخار آب جمع شود، می‌تواند باعث آلودگی شود.
- (۱۷) موقع کار با قارچ‌ها، آئروسول‌ها و انتشار آن‌ها و هاگ قارچ خطرناک است. باید ظرف پتری دیش حاوی کشت قارچ با نوار چسب محکم بسته شود.
- (۱۸) وسایلی که تحت فشار کار می‌کنند مثل اتوکلاو باید مرتب بازدید شده و صحت کار آن‌ها توسط معرف‌های خاص کنترل شود.
- (۱۹) بهتر است از لوازم آرایشی، لنزها و جواهرآلات در محیط آزمایشگاه استفاده نشود. همچنین ناخن‌ها باید کوتاه باشند.
- (۲۰) در صورت بارداری، یا مصرف داروی کاهش دهنده ایمنی، یا ابتلا به یکی از اختلالات تضعیف کننده سیستم ایمنی، باید قبلاً به مسئول آزمایشگاه اطلاع دهید.
- (۲۱) در صورت ابتلا به کور رنگی به مسئول آزمایشگاه اطلاع دهید.
- (۲۲) همیشه بطری‌ها و رنگ‌ها پس از پایان آزمایش به جای خود برگشت داده شوند.

(۲۳) قبل و بعد آزمایش دست‌ها را با آب و صابون مرتب شسته و در صورت لزوم ضدعفونی کنید. صابون مایع نسبت به قالب ارجحیت دارد چون امکان آلودگی کمتر است.

(۲۴) اگر ترومتر شکست به آن دست نزنید چون جیوه بسیارسمی است.

(۲۵) کشت باکتری‌های مصرف شده را قبل از دور ریختن باید استریل کرده و طبق اصول معدوم سازی زباله‌های عفونی اقدام نمود.

(۲۶) کلیه ظروف قبل از شسته شدن بهتراست استریل شوند.

(۲۷) از انجام هرگونه عمل که منجر به برهم زدن تمرکز و حواس پرتی درآزمایشگاه شود مثل مکالمات غیرضروری باید جداً خودداری کنید.

(۲۸) زمانیکه درآزمایشگاه هستید از روشن کردن لامپ UV بهره‌یزید چون برای سلامتی بسیار مضر می‌باشد.

(۲۹) اگر با سرنگ کار می‌کنید از هواگیری سرنگ پر شده جداً خودداری کنید چرا که باعث اسپری شدن محتویات سرنگ به محیط آزمایشگاه می‌شود.

(۳۰) فضای کافی برای کسی که در حال انجام آزمایش است، باید وجود داشته باشد.

(۳۱) لام‌ها پس از بررسی زیر میکروسکوپ در جای لام یا ماده ضد عفونی گذاشته شود همین کار در مورد پی‌پت‌ها هم انجام گیرد.

(۳۲) کلیه محلول‌ها و مواد مورد استفاده باید دارای برچسب شناسایی باشند.

(۳۳) اپراتور باید با علایم هشدار دهنده مورد استفاده در آزمایشگاه آشنا بوده و موقع لزوم از آنها استفاده نماید.

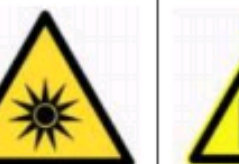
(۳۴) باتوجه به احتمال بروز سانحه در آزمایشگاه بایستی وسایل ایمنی مثل کپسول‌های آتش‌نشانی، وسایل کمک‌های اولیه، دوش‌های آب در آزمایشگاه تدارک دیده شود. همچنین چیش وسایل جوری باشد که در صورت بروز سانحه مانع خروج سریع کارکنان از آزمایشگاه نشود.

(۳۵) قبل از ترک آزمایشگاه از بسته بودن شیرهای آب و گاز اطمینان حاصل شود.

(۳۶) با دقت در انجام آزمایش‌ها از مصرف بی‌رویه مواد جلوگیری شود.

علائم هشدار دهنده در آزمایشگاه میکرو ب‌شناسی

				
اکسیدکننده (O)	آتشگیر (F)	به شدت آتشگیر (F+)	سمی (T)	خیلی سمی (T+)
				
مضر (Xn)	سوزش آور (Xi)	خورنده (C)	منفجره (E)	خطر تاک برای محیط زیست (N)

				
سمی	سوزش آور	اکسیدکننده	آتشگیر	خورنده
				
تابش یونشگر	تابش لیزر	تابش الکترومغناطیس	تابش نور	بخار منفجره
				
سرما	سطح داغ	سیلندر گاز	باتری های پرخطر	خطر برق
				
خطر بالقوه	میدان مغناطیسی	خطر زیستی		

فضای مورد نیاز در یک آزمایشگاه میکروپزشناسی

در یک آزمایشگاه استاندارد و خوب باید هر کدام از قسمت‌های زیر بطور جداگانه طراحی و فضای مستقلی داشته باشند.

۱. محل دریافت و نگهداری نمونه‌ها که مجهز به محل آماده سازی نمونه باشد و تمام تجهیزات لازم برای نمونه برداری در آن تعبیه شده باشد.
۲. محل آماده سازی و استریل کردن محیط‌های کشت و وسایل مورد نیاز
۳. محل شستشوی وسایل مجهز به فاضلاب و سپتیک
۴. انبار نگهداری محیط‌های کشت ، معرف‌ها ، رنگ‌ها و مواد شیمیایی
۵. رختکن
۶. سرویس‌های بهداشتی
۷. فضای کار کافی
۸. بخش کشت سلول و بافت
۹. بخش بیولوژی و تشخیص مولکولی
۱۰. محل استراحت پرسنل

مکان آزمایشگاه باید طوری ساخته و مجهز شود که خطر آلودگی به وسیله میکروارگانیسم‌ها به حداقل برسد. به این منظور دیوارها و کف باید صاف و قابل شستشو و دارای شیب ۲٪ باشد تا آب در کف جمع نشود. جنس کف مورد استفاده به شوینده‌ها و استریل کننده‌ها مقاوم بوده و لغزنده نباشد. محیط آزمایشگاه باید نور کافی داشته باشد. پنجره‌ها باید مجهز به توری باشند و در حین انجام آزمایش باید کاملاً بسته باشند تا از ورود هوای خارج جلوگیری گردد. استفاده از پرده برای پنجره‌های آزمایشگاه مناسب نیست چون می‌تواند منبع آلودگی باشد. فراهم بودن جعبه کمک‌های اولیه ، برق اضطراری ، وسایل شستشوی چشم و آتش خاموش کن الزامی است.

فصل دوم :

وسایل و تجهیزات مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی

وسایل شیشه‌ای

لام Slid

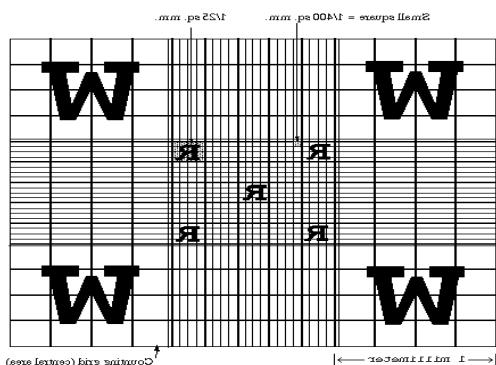
لام (تیغه شیشه ای) یک صفحه شیشه‌ای به شکل مستطیل و معمولاً به ابعاد $۷/۵ \times ۲/۵$ سانتی‌متر و ضخامت یک میلی‌متر می‌باشد. لام آزمایشگاهی معمولاً از جنس شیشه اپتیکی یا نوری ساخته می‌شود. این شیشه‌ها از جنس قلیای آهکی یا بروسیلیکات می‌باشند. لام‌هایی از جنس شیشه آمیخته به کوارتز وجود دارند که در زمانیکه وضوح ماورای بنفش مهم است استفاده می‌شوند مثلاً در میکروسکوپ فلئوئورسنت. انواع مختلفی از لام وجود دارد که به برخی از پرکاربردترین آن‌ها اشاره می‌شود:

لام ساده: این نوع از لام جهت رنگ آمیزی و مشاهده میکروب‌ها یا بررسی برخی واکنش‌های بیوشیمیایی توسط میکروسکوپ به کار می‌رود.

لام گوده دار: بر روی این نوع لام‌ها یک یا چند گودی یا چاله وجود دارد. از این لام‌ها برای مشاهده باکتری زنده و آزمایش قطره معلق به منظور پی بردن به حرکت باکتری استفاده می‌شود.

لام گراتیکول: این نوع لام با شبکه‌ای از خطوط که بر روی آن وجود دارد امکان اندازه گیری باکتری یا سایر میکروارگانیسم‌های مورد ارزیابی را به فرد می‌دهد. نواحی رفرنس برای شمارش اشیاء خیلی ریز هم به کار می‌رود.

لام هموسیتومتر یا لام نئوبار: به منظور شمارش سلول‌ها به کار گرفته می‌شود. در ابتدا طراحی آن بابت شمارش سلول‌های خونی بوده است. لام هموسیتومتر توسط لوئیز-چارلز مالاسز اختراع شده است و از یک اسلاید میکروسکوپی شیشه‌ای ضخیم با همراه کنگره‌های مستطیلی شکلی تشکیل شده است که یک محفظه را به وجود می‌آورد. این محفظه با ساختار توری ماندنی از خطوط عمودی حک شده است که شکل گیری آن‌ها توسط لیزر می‌باشد. این دستگاه با دقت خاصی ساخته شده است تا حدود خطوط مشخص، و عمق دستگاه نیز معلوم باشد. بنابراین احتمال شمارش تعداد سلول‌ها یا ذرات در حجم خاصی از مایع، و بنابر این محاسبه غلظت سلول‌ها در کل مایع امکان پذیر است.



Cover Slip (Lamel)

لامل (تیغک شیشه ای)

صفحه ایی شیشه ای نازک و کوچک معمولاً به شکل چهارگوش یا گرد می‌باشد. ضخامت لامل آزمایشگاهی کمتر از $۰/۲$ میلی‌متر می‌باشد. لامل‌های چهارگوش معمولاً به ابعاد ۱۸×۱۸ - ۲۰×۲۰ - ۲۲×۲۲ - ۲۴×۲۴ و ۵۰×۲۴ میلی‌متر و لامل‌های گرد معمولاً با قطر ۱۸ میلی‌متر تولید می‌شوند. از لامل برای ثابت نگه داشتن نمونه روی لام استفاده می‌کنند. ضخامت استاندارد لامل $۰/۱۷$ میلی‌متر می‌باشد. لامل تنها موقع استفاده از لنزهای خشک میکروسکوپ ($۴۰\times$ ، $۴۰۰\times$) کاربرد دارد.

مزایای استفاده از لامل حبس و ایزوله نمودن نمونه، جلوگیری از تماس‌های تصادفی، ممانعت از تماس لنز میکروسکوپ با نمونه، تاخیر در اکسیداسیون و دی‌هیدراته شدن نمونه، جلوگیری از نشست گرد و خاک روی نمونه و همچنین تثبیت نمونه‌های محلول در مایع حلال با فشردن آنها می‌باشد.

به مجموعه لام، نمونه و لامل در اصطلاح اسلاید می‌گویند. بعد از آماده نمودن اسلایدها، اسلاید را زیر میکروسکوپ قرار می‌دهند و پس از اینکه بوسیله گیره‌های اسلاید میکروسکوپ، آنها را در جای محکم نمودند، نمونه را در زیر میکروسکوپ مشاهده می‌کنند.

بوات دو پتری، پلیت یا پتری دیش Plate, Petri Dish

ظروف شیشه‌ای یا پلاستیکی هستند که فضایی برای رشد میکروارگانیسم‌ها در محیط مصنوعی فراهم می‌آورند. در داخل پلیت‌ها محیط کشت جامد (آگار) ریخته می‌شود.

اولین بار توسط پتری شاگرد کخ ساخته شد. قبل از اختراع آن کشت روی تیغه‌های شیشه‌ای صورت می‌گرفت که مشکلات زیاد از جمله تبخیر سریع محیط و آلودگی سریع را در برداشت.

پلیت‌ها در انواع شیشه‌ای چند بار مصرف و پلاستیکی یکبار مصرف ساخته می‌شوند.

پلیت دارای ۲ قسمت درب و کف می‌باشد که محیط کشت همیشه در قسمت کف که قطر کمتری دارد ریخته می‌شود. قطر انواع پلیت متفاوت می‌باشد و عمق آنها معمولاً ۱۲ میلی‌متر می‌باشد. پس از ریختن محیط کشت به داخل پلیت و خشک شدن آن و انجام کشت، پلیت‌ها بصورت وارونه داخل انکوباتور «گرمخانه» قرار داده می‌شوند به گونه‌ای که کف با قطر کم و دارای محیط کشت در بالا قرار گیرد، تا از تبخیر آب موجود در محیط کشت و خشک شدن آن جلوگیری شده، همچنین از برگشت قطرات آب ایجاد شده ناشی از متابولیسم باکتری، جمع شده داخل درب پلیت به محیط کشت و تداخل کلنی‌ها جلوگیری شود.

پلیت‌های شیشه‌ای را می‌توان چندین بار به کمک فور یا اتوکلاو استریل نمود. پلیت‌های یک بار مصرف پلاستیکی توسط شرکت سازنده با اشعه گاما یا اکسید اتیلن استریل می‌شوند.

پی‌پت‌ها Pipette

پی‌پت‌ها برای انتقال حجم معینی از مایعات از محیطی به محیط دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرند پی‌پت‌ها لوله‌های شیشه‌ای مدرج نوک باریک هستند که در حجم‌های مختلف ساخته شده‌اند. با انگشت می‌توان میزان خروج مایع از پی‌پت را کنترل کرد.

۲ نوع عمده از پی‌پت‌ها وجود دارند.

الف) پی‌پت مدرج معمولی: لوله مدرجی که برحسب مقدار حجمی که می‌توان با آن کشید درجه‌بندی شده است و اندازه‌های مختلف آن با رنگ‌های مختلف مورد پذیرش بصورت استاندارد جهانی مشخص می‌شود.

حجم‌های یک تا پنجاه میلی‌لیتری از پی‌پت‌های مدرج معمولی وجود دارند. در حجم‌های بالا برای جلوگیری از افزایش بیش از حد طول پی‌پت حبابی وسط پی‌پت ایجاد می‌شود، که به این نوع پی‌پت‌ها پی‌پت حبابدار گفته می‌شود.

در آزمایشگاه میکروب شناسی در انتهای پی‌پت مورد استفاده معمولاً پنبه‌ای قرار داده شده و استریل می‌شود تا از ورود مواد مورد آزمایش به درون دهان یا برعکس جلوگیری شود. هر چند توصیه می‌شود در انتقال مواد از دهان استفاده نگردد بلکه از پی‌پتور یا پوآر به این منظور استفاده شود.

پی‌پت‌ها در ظروف مخصوص بنام جا پی‌پتی یا CAN pipette استریل و نگهداری شوند.

ب) پی‌پت پاستور : پی‌پت پاستور لوله شیشه‌ای باریکی است که در انتها کاملاً باریک می‌شود. در قسمت گشاد آن پنبه‌ای قرار داده شده و قسمت باریک با حرارت مسدود و سپس استریل شوند. موقع استفاده، سر باریک در مجاورت حرارت شکسته و مورد استفاده قرار می‌گیرد. بوسیله پی‌پت پاستور می‌توان حجم نامشخصی از مایع را جابجا نمود. برای برداشت نمونه‌های مرضی هم از آن استفاده می‌شود. پی‌پت پاستور یک‌بار مصرف بوده پس از استفاده اوت می‌شود.

لوله‌های آزمایش Test tube

انواع متفاوتی از لوله‌های آزمایش با ابعاد مختلف وجود دارد. لازم است لوله‌های آزمایش نسبت به حرارت بالا مقاوم باشند. لوله‌ها به منظور تهیه معرف‌ها، محیط‌های کشت، رشد دادن میکروارگانیسم‌ها و مشاهده واکنش‌های بیوشیمیایی به کار می‌روند.

برخی از لوله‌ها در پیچ دار می‌باشند که در پیچ می‌تواند پلاستیکی یا از فلز زنگ نزن (لوله مورتون) باشد. در انواع بدون درپیچ معمولاً درب، پس از کشت با پنبه بسته می‌شود.

لوله‌های تخمیر یا لوله اسمیت SMITH Tube :

انتهای این لوله‌ها به شکل U می‌باشد برای جمع آوری و نگهداری گاز تولید شده کاربرد دارد.

لوله دورهام Durham:

نام این لوله‌ها از نام باکتری شناس انگلیسی Herbert Edward Durham گرفته شده است. لوله‌هایی کوچک هستند که بصورت وارونه داخل لوله آزمایش بزرگ قرار می‌گیرند و نشان می‌دهد میکروب قادر به تولید گاز از تخمیر قند می‌باشد یا خیر؟ این لوله‌ها به صورت وارونه در محیط مایع حاوی قند قرار می‌گیرند در صورت تخمیر قند مورد نظر و تولید گاز توسط میکروارگانیسم مورد مطالعه این گاز در ته لوله دورهام جمع آوری و مشاهده می‌شود.

ارلن مایر Erlen Meyer Flask :

ارلن ظرف مخروطی شکل مدرج است. ارلن‌های مدرج برای گرم کردن و جوشاندن محلول‌ها، ساخت و نگهداری محیط‌های کشت و ترکیبات با حجم مشخص، استفاده می‌شوند. نام این محصول از نام مخترع آلمانی آن امیل ارلنمایر شیمی‌دان آلمانی گرفته شده است. ارلن‌ها از نظر حجم و اندازه متفاوت بوده و نسبت به حرارت و اتوکلاو شدن، مقاومند.

بالن حجمی یا بالن ژوزه Volumetric Flack :

از وسایل حجم سنجی هستند که ظروف شیشه‌ای با ته پهن و گردن باریک بلند در حجم‌های مختلف می‌باشد. اکثراً دارای درپوش پلاستیکی هستند. از این ظروف برای محلول سازی دقیق و با غلظت معین، به حجم رساندن و رقیق سازی محلول‌ها استفاده می‌شود.

مزور یا استوانه مدرج :Graduated Cylinder

ظرف مدرج استوانه‌ای شکل که برای اندازه‌گیری دقیق حجمی مایعات آزمایشگاهی به کار می‌رود. این وسیله از یک لوله بلند و پایه‌ای پهن تشکیل شده که امکان قرار دادن روی میز را فراهم می‌کند. دقت اندازه‌گیری این ابزار از بورت و پی‌پت کمتر است. مزوره‌ای با اندازه کوچک و حجم پایین درصد خطای کمتری دارند. انواع استوانه مدرج شیشه‌ای و پلاستیکی از جنس پلی پروپیلن که به مواد شیمیایی مقاوم هستند، موجود است.

بشر :Beaker

جهت هم زدن، اندازه‌گیری و تهیه محلول‌ها با دقت کمتر نسبت به مزور در آزمایشگاه میکروب شناسی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در اندازه‌های مختلف با انواع شیشه‌ای یا پلاستیکی موجود هستند. بشرها معمولاً با استفاده از خطوطی که روی آن‌ها کشیده شده است درجه بندی می‌شوند. بشر برخلاف ارلن که دیواره مایل دارد، دارای دیواره عمود می‌باشد. بشرهای از جنس شیشه پیریکس برای حرارت دادن محلول روی شعله وسایل مناسبی هستند.

پخش کننده شیشه ای :Glass spreader

این وسیله از یک میله شیشه‌ای به قطر ۵ - ۴ میلی‌متر که یک سر آن به شکل حرف L خم شده تشکیل و به کمک آن می‌توان ارگانسیم تلقیح شده را در سطح محیط کشت جامد بصورت یکنواخت پخش کرد.

دسیکاتور :Desiccator

ظرف شیشه‌ای که بوسیله درپوش سمباده‌ای کاملاً مسدود می‌گردد. در داخل حاوی مواد رطوبت‌گیر مثل سیلیکاژل و زیر آن مواد خشک کننده‌ای مانند اسید فسفریک و CaCl_2 می‌باشد. برای خشک کردن و محافظت اجسام نم‌گیر کاربرد دارد. دسیکاتورها در دو نوع ساده و شیردار موجود هستند.

قیف شیشه ای :Funnel

ابزار مخروطی شکل که در قسمت پائین آن لوله باریک بلندی وجود دارد. نوک لوله مورب بوده و شیشه بدنه قیف معمولاً زاویه ۶۰ درجه دارد. برای انتقال مایعات از ظرفی به ظرف دیگر و جدا کردن مایعات از مواد جامد می‌توان از آن استفاده کرد.

قوطی استیل استوانه‌ای :

جهت استریل کردن پی‌پت مورد استفاده قرار می‌گیرد. در داخل آن ماده ضد عفونی کننده ریخته شده و پی‌پت‌ها داخل آن قرار می‌گیرند.

جا لوله‌ای :Test Tube Rack

وسيله‌ای که به منظور قراردادن لوله‌های آزمایش مورد استفاده قرار می‌گیرد. در انواع پلاستیکی و فلزی وجود دارد.

بوته چینی :Crucible

وسيله‌ای از جنس چینی یا فلز برای حرارت دادن یا ذوب کردن و سوزاندن مواد به کار می‌رود. این وسیله به شکل مخروط ناقص از جنس ماده نسوز عمدتاً گرافیت یا کاربید سیلیکون است.

برس لوله یا لوله شو:

وسیله‌ای که برای تمیز کردن داخل لوله آزمایش به کار می‌رود.

گیره:

وسیله‌ای برای نگهداری لوله آزمایش یا وسایل داغ دیگر به کار می‌رود. از جنس چوب یا فلز ساخته می‌شود.

میز آزمایشگاه:

میز کار و صندلی‌های آزمایشگاه باید دارای سطوح صاف غیر قابل نفوذ بوده و به آسانی قابل تمیز و استریل کردن باشند.

جنس رویه را می‌توان از اوراق فشرده چوبی یا روکش‌های مقاوم به اسید و قابل ضد عفونی انتخاب نمود. پایه‌ها پروفیل فلزی باشند که به صفحه زیر رویه کاملاً جوش خورده باشند. چهار گوشه میز باید گونیا باشد. برای جلوگیری از سر و صدا باید از ته پایه‌های پلاستیکی قابل تنظیم استفاده شود.

انواع پنس و قیچی:

پنس یکی از تجهیزات آزمایشگاهی پر کاربرد می‌باشد. این وسیله در آزمایشگاه کاربردهای مختلفی دارد که از جمله آنها می‌توان به برداشتن و گذاشتن نمونه‌ها روی ترازو، برداشتن اجسامی که نباید آنها را با دست برداشت، برداشتن و نگه داشتن مقدار کمی ماده جامد بر روی آتش و برداشت دیسک‌های آنتی بیوتیک و ... اشاره کرد. پنس‌ها معمولاً از جنس فلزهای زنگ نزن ساخته می‌شوند و بسته به کاربرد در دو نوع بلند و کوتاه ساخته می‌شوند. همچنین یکی دیگر از انواع پنس‌ها پنس‌های سرکج می‌باشند که معمولاً برای برداشتن اجسام با ظرافت خیلی بالا استفاده می‌شوند.

قیچی‌ها نیز در این آزمایشگاه کاربرد دارند. برای استریل کردن این وسایل بهتر است آن‌ها را داخل فور قرار داده یا دهانه آن‌ها را وارد الکل کرده سپس روی شعله گرفت تا الکل روی آن شعله‌ور گردد. پس از خاموش شدن شعله از آن استفاده می‌شود.

نوری نسوز Wire Gauze:

وسیله فلزی مشبک که قسمت وسط آن روکش نسوز دارد و مانند مثلث نسوز روی ۳ پایه قرار می‌گیرد تا حرارت مستقیم به آن نرسد و حرارت پخش شود.

انواع سمپلر Sampler:

این وسیله که گاهی میکروپیپت هم نامیده می‌شود. از مهمترین و پرکاربردترین ابزارها در آزمایشگاه میکروبی شناسی محسوب می‌شود که برای برداشت و انتقال حجم معینی از مایعات و محلول‌های مورد بررسی که نیازمند دقت بالا هستند، به کار می‌رود. معمولاً در محدوده ۱ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر ساخته می‌شوند. سمپلرها در انواع ثابت که حجم معینی را جابه‌جا می‌کنند و متغیر که قابل استفاده روی حجمی بین کمترین و بیشترین حجم تعیین شده می‌باشند، وجود دارند. همچنین سمپلرها بصورت تک کاناله و چند کاناله (۸ و ۱۲ کاناله) عرضه می‌شوند که سمپلرهای چند کاناله به منظور راحتی کاربرد و جلوگیری از بروز اشتباه در آزمایشات دقیقی مثل الیزا یا هم‌آگلوتیناسیون مورد استفاده قرار می‌گیرند.

سمپلرها دارای سر سمپلر یا تیپ‌هایی هستند که در حجم متناسب با سمپلر هستند. سرسمپلر سفید مخصوص حجم کمتر از ۱۰ میکرولیتر، سر سمپلر زرد برای حجم ۱۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر و سر سمپلرهای آبی برای برداشت حجم ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر کاربرد دارند.

نکات مهم موقع کار با سمپلرها:

موقع کار با سمپلر باید در نظر داشت که شصتی سمپلر دو منطقه استوپ دارد که در هنگام کشیدن مایع داخل سمپلر باید تا استوپ اول فشار داد ولی موقع خالی کردن نمونه باید تا انتها و استوپ دوم فشار داده شود.

در حد امکان در آزمایشگاه برای نگهداری سمپلر از پایه سمپلر استفاده شود.

زمانیکه مایع درون سر سمپلر است به هیچ عنوان سمپلر در حالت افقی قرار نگیرد زیرا محلول وارد شفت دستگاه شده و باعث پرفتپی و عملکرد بد دستگاه می‌شود.

از سفت بودن سر سمپلر اطمینان حاصل شود تا سمپلر هوا نکشد.

با توجه به میزان کارکرد و مواد مورد استفاده به‌صورت دوره‌ای سرویس شود.



وسایل سنجش pH:

پی‌اچ یا پی‌هاش (Potential of Hydrogen) یک کمیت لگاریتمی است که میزان اسیدی یا بازی بودن مواد را مشخص می‌کند. در واقع نشان دهنده غلظت یون هیدروژن در محلول می‌باشد و در بسیاری از فرایندهای بیوشیمیایی نقش مهمی را بازی می‌کند، به‌عنوان مثال در طی فرایند تخمیر غلظت یون هیدروژن بسیار مهم بوده و روی فعالیت مخمرها تاثیر می‌گذارد.

مقیاس pH نخستین بار در سال ۱۹۰۹ توسط دانشمند دانمارکی به نام سون سن ابداع شد که بنا به تعریف منفی لگاریتم مبنای ۱۰ (لگاریتم معکوس) غلظت مولی هیدروژن فعال در یک محلول می‌باشد.

در دمای اتاق pH آب خالص را ۷ در نظر می‌گیرند چرا که در این دما غلظت یون هیدروژن در آب خالص 10^{-7} است. در دمای اتاق گستره pH بین ۰ تا ۱۴ می‌باشد که صفر اسیدی‌ترین محیط و ۱۴ بازی‌ترین محیط را نشان می‌دهد همچنین محلولی با pH=7 در چنین دمایی محلول خنثی در نظر گرفته می‌شود.

اسید: اسیدها موادی هستند که پروتون‌هایی را به صورت یون H^+ در محلول آزاد می‌کنند. مثل: اسید سولفوریک H_2SO_4 ، اسید کلریدریک HCL و یا اسید نیتریک HNO_3

باز: موادی که پذیرنده یون هیدروژن بوده و یون هیدروکسید OH^- در محلول آزاد می‌کنند مثل: هیدروکسید سدیم یا قلیا NaOH، هیدروکسی کلسیم یا آهک $Ca(OH)_2$ و آمونیاک NH_4OH

در ساخت محیط‌های کشت و معرف‌ها در میکروبیولوژی تعیین دقیق pH این ترکیبات و همچنین نمونه‌های مورد آزمایش به دلیل نقش و تاثیر pH بر روی آزمایش‌ها ضروری می‌باشد به همین علت از روش‌های مختلفی برای تعیین pH استفاده می‌شود.

روش‌های پتانسیومتری:

در این روش برای تعیین pH از اختلاف پتانسیل بین محلول آزمایشی و یک محلول استاندارد برای اندازه گیری pH استفاده می‌شود.

pH سنج دیجیتال: از جمله دستگاه‌هایی می‌باشد که با روش پتانسیومتری کار می‌کند. این دستگاه‌ها معمولاً الکترودهایی از جنس کلرید نقره دارند و pH معرف‌ها و محیط‌های کشت را با دقت ۰/۰۱ اندازه‌گیری می‌کند. قبل از استفاده باید دستگاه کالیبره شده و از صحت کار آن اطمینان حاصل نمود. به این منظور از محلول‌های استاندارد دارای pH ۴، ۷، ۱۰ استفاده می‌شود. سر pH متر همواره باید داخل محلول مخصوص نگهداری شود.

روش‌های کلریمتری:

در این روش‌ها از معرف‌ها یا شناساگرها یا اندیکاتورها Indicators مختلف که به شکل محلول یا کاغذ pH می‌باشد، استفاده می‌شود. این محلول‌ها بر حسب pH های مختلف رنگ‌های مختلف تولید می‌کنند. این معرف‌ها ترکیباتی هستند که به صورت سیستم‌های دهنده و گیرنده پروتون عمل کرده و هر کدام دارای رنگ‌های متفاوتی هستند.

از جمله شناساگرهای مهم مورد استفاده می‌توان به مواد زیر اشاره کرد:

- (۱) محلول متیل اورانژ (متیل نارنجی)
- (۲) محلول فنل فتالین : که در محیط بازی به سرعت رنگ محلول را ارغوانی می‌کند.
- (۳) کاغذ تورنسل (لیتموس) که از درخت لیتموس به دست می‌آید.
- (۴) محلول متیلن بلو
- (۵) گلبرگ گل سرخ

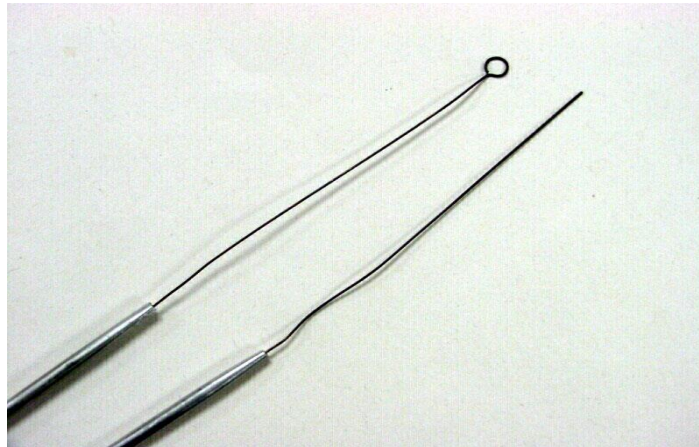
استفاده از این شناساگرهای شیمیایی وقت گیر و همراه با اشتباه در تعیین pH دقیق می‌باشد لذا امروزه استفاده از روش‌های پتانسیومتری و pH سنج‌های دیجیتالی ارجحیت دارد.

آنس یا فیلدوپلاتین Onse – File de platine

وسیله‌ای است که برای برداشتن و انتقال مقادیر بسیار کم نمونه‌های میکروبی از محیطی به محیط دیگر و کشت دادن میکروب‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. این وسیله از ۳ قسمت تشکیل شده است که شامل دستگیره، بدنه فلزی، و سیم می‌باشد. معمولاً طول این وسیله ۲۵ سانتی‌متر و طول سیم آن ۴ تا ۸ سانتی‌متر است.

دستگیره از جنس چوبی یا پلاستیکی می‌باشد. سیم از جنس پلاتین یا نیکروم (آلیاژ نیکل و انادیم) یا تنگستن ساخته می‌شود. اگر انتهای سیم حلقوی باشد به آن لوپ Loop می‌گویند، و اگر تیز باشد آنس یا نیدل گفته می‌شود. حلقه انتهایی لوپ دارای قطر استاندارد است و حجم آن ۰/۰۰۱ تا ۰/۰۰۰۱ میلی‌لیتر می‌باشد که می‌توان به منظور برداشت حجم بسیار کم مایعات هم از آن استفاده کرد. لوپ‌های یک‌بار مصرف پلاستیکی، پلی پروپیلنی و پلی استایرنی با قطرهای حلقه استاندارد در دسترس می‌باشد و در حال حاضر کاربرد وسیعی پیدا کرده‌اند. برای کنترل کیفی حجم برداشتی لوپ می‌توان از روش توزین دیسک‌های آنتی بیوگرام بوسیله ترازوهای با دقت ۰/۰۰۱، یا اسپکتروفتومتری با استفاده از متیلن بلو استفاده کرد.

لوپ و آنس را قبل و بعد از مصرف حتما باید استریل کرد. نقطه مهم در استریل کردن سوزن کشت به خصوص روی شعله این است که باید توجه داشت که امکان انتشار ارگانیسم‌ها در اثر حرارت شعله وجود دارد. لذا با حرکت دادن تدریجی سوزن از قسمت سرد شعله به قسمت گرمتر آن می‌توان از این پدیده جلوگیری کرد. شعله دهی به لوپ نباید بیش از ۲۰ ثانیه طول بکشد چون به مرور زمان باعث تخریب آن می‌شود.



آبفشان یا پیست Wash bottle

وسیله‌ای که از یک بطری پلاستیکی و یک نازل در بالای آن تشکیل شده است. از این ابزار برای شست و شوی ابزارهای آزمایشگاهی مانند لوله آزمایش و بالن ته‌گرد یا شستن لام‌ها موقع رنگ آمیزی استفاده می‌شود. عملکرد این وسیله به این ترتیب است که با فشردن دست روی بطری پلاستیکی فشار داخل بطری افزایش یافته و مایع داخل بطری به صورت باریکه‌ای از سر نازل به بیرون می‌ریزد.



پوار یا بالب Bulb

پووار وسیله‌ای پلاستیکی است که در قسمت سر پی‌پت قرار داده می‌شود برای مکش و تخلیه مواد بدون تماس دهان با پی‌پت مورد استفاده است. در صورتی که مواد سمی باشند قبل از استفاده از پووار باید از سالم بودن آن اطمینان حاصل نمود و آن را با آب امتحان کرد.

طرز استفاده: این وسیله دارای دو یا سه دکمه در سطح خود می‌باشد. دکمه A برای خالی کردن هوای داخل پووار است. دکمه B برای مکش مواد سمی است. دکمه E برای خالی کردن مواد مکش شده است.



بن ماری Bain marie

بن ماری واژه فرانسوی به معنی حمام آب (Water Bath) می‌باشد. این دستگاه برای گرم کردن تدریجی و یکنواخت محلول‌ها در یک بازه زمانی خاص استفاده می‌شود. در میکروب شناسی برای ذوب نمودن و ثابت نگه داشتن دمای محلول‌ها و محیط‌های کشت و یکسری واکنش‌های بیوشیمیایی مثل از بین بردن اثر کمپلمان کاربرد دارد. محدوده دمایی بن‌ماری‌ها بطور طبیعی از دمای اتاق تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. این دستگاه در انواع، اشکال و ظرفیت و سایزهای مختلف (۲ تا ۳۰ لیتر) وجود دارد. اکثراً محفظه فلزی دارند که خود از سه یا چهار بخش پایه تشکیل شده است. جنس بن ماری از فولاد بوده و توسط رنگ با مقاومت بالا پوشش‌دهی می‌شود تا زنگ نزنند. محفظه بن ماری باید همیشه حاوی مقادیر کافی آب مقطر تمییز باشد. بنابراین، باید قبل از روشن نمودن آن از کافی بودن حجم آب اطمینان حاصل شود. خصوصاً زمانی که قرار است شبانه یا برای مدت طولانی استفاده شود. کم شدن آب باعث بروز آسیب در دستگاه شده و احتمال آتش‌سوزی را بالا می‌برد.

کنترل دقیق دمای بن‌ماری به خصوص در آزمایشات انعقادی و آنزیمی بسیار مهم است چراکه تغییر دمای یک درجه سانتی‌گراد میتواند خطایی معادل ۱۰٪ را در این‌گونه آزمایشات باعث شود.

کنترل کیفی دستگاه بن‌ماری:

- (۱) المنت دستگاه هفته‌ای یک بار تمییز و جرم‌گیری شود. موقع عدم استفاده از آن باید درش را بست.
- (۲) علاوه از ترمومتر خود دستگاه ترمومتر دیگری برای کنترل دما داخل آن قرار گیرد.
- (۳) آب دستگاه باید مرتباً تعویض شود.
- (۴) اگر دستگاه رسوب داشته باشد با اسید رقیق (اسید کلریدریک ۲٪) شستشو و سپس سریعاً و بطور کامل با آب شسته شود.

چراغ گاز بونزن Burner Bunsen

برای استریل کردن به خصوص استریل کردن لوپ و آنس همچنین ایجاد فضای استریل در اطراف شعله از آن استفاده می‌شود. این وسیله دارای یک پیچ تنظیم گاز ورودی و یک پیچ تنظیم هوای ورودی برای آبی سوختن می‌باشد. در حال حاضر چراغ‌های الکتریکی در حال جایگزین شدن به جای این وسایل هستند.

جاری‌هوازی Anaerobic Jar

ظروف پلاستیکی یا شیشه‌ای هستند که هوای موجود در آن به روش‌های مختلف خارج شده و CO_2 جایگزین می‌شود. از این وسیله برای ایجاد شرایط بی‌هوازی (کشت باکتری‌های بی‌هوازی استفاده می‌شود) استفاده می‌شود. در برخی از انواع جار در درب جار شیرهای تخلیه تعبیه شده است که پس از قرار دادن باکتری‌های کشت شده در داخل جار، با استفاده از پمپ خلاء هوای داخل جار تخلیه و دی اکسید کربن وارد می‌شود. این سیستم جار بی‌هوازی سیستم مارت نامیده می‌شود.

روش راحت‌تر استفاده از گازپک Gas pack می‌باشد که پودرهای جاذب اکسیژن می‌باشند. بسته به حجم محفظه جار، گاز پک‌های مختلفی وجود دارد بطور مثال برای محفظه ۴ لیتر یا گازپک A استفاده می‌شود که با ۱۰ میلی‌لیتر آبمقطر مخلوط می‌شود. دلیل استفاده از آب تولید هیدروژن است که با اکسیژن محیط ترکیب و ضمن تولید آب آن را از دسترس باکتری‌ها خارج نماید.

ترازو Scale

ترازوها معمولاً برای وزن کردن پودرهای محیط کشت و مواد استفاده می‌شوند.

ترازوها در دو نوع: (۱) مکانیکی (۲) الکترومغناطیسی وجود دارند که حساسیت‌های مختلفی دارند.

معمولاً از ترازوی با حساسیت ۰/۱ که ظرفیت ۲ کیلوگرم دارد، استفاده می‌شود. در آزمایشگاه‌های پیشرفته‌تر از ترازوهای با دقت ۰/۰۰۱ هم استفاده می‌شود. برای سنجش حساسیت و کنترل دستگاه از وزنه‌های ۲۰۰ گرمی استفاده می‌شود. برای توزین بایستی پس از قرار دادن ظرف توزین، ترازو را با دکمه Tare صفر کرده و سپس نمونه مورد نظر وزن شود.

دستگاه همزن - هیتر Heater - Stirrer

دستگاهی است که سبب گرم شدن و مخلوط شدن محیط‌های کشت یا محلول‌ها می‌شود که می‌توان با تنظیم دما و دور دستگاه به میزان دلخواه و قرار دادن یک آهنربا (مگنت) در ظرف حاوی محلول در حال آماده سازی ضمن حرارت دادن محیط از سوختن و ته نشین شدن آن جلوگیری کرده و محلول یکنواخت و همگنی به دست آورد.

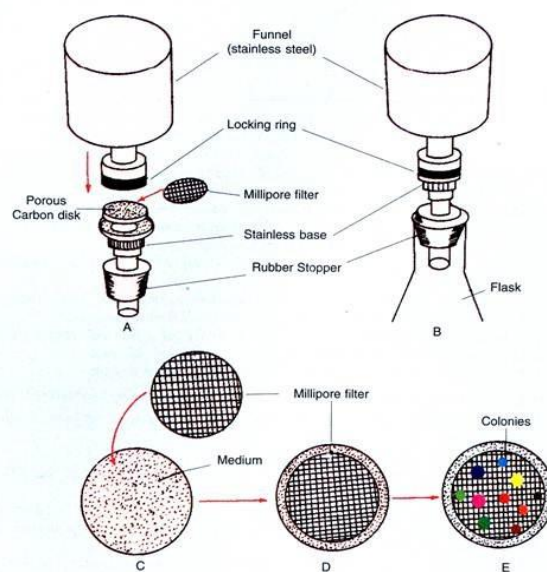
دستگاه دیسک گذار Disk Dispenser

در این وسیله ۹ تا ۱۲ ویال دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مختلف جای گرفته‌اند و در هر بار استفاده می‌توان این تعداد دیسک را روی محیط قرار داد. این وسیله بر اساس شرکت در اشکال و ابعاد مختلفی وجود دارد. مزیت استفاده از دیسک دیسپنسرها صرفه جویی در وقت و کاهش آلودگی محیط کشت و کاربر می‌باشد.

فیلتر یا پالاهای میکروب شناسی

از فیلترها به منظور استریل کردن محلول‌ها و کشت‌های حساس به حرارت مثل سرم، خون و قند استفاده می‌شود. فیلترها در واقع صفحات دارای سوراخ‌های ریز به قطر ۰/۴۴ تا ۰/۲۲ میکرون هستند که به باکتری‌ها اجازه عبور نمی‌دهند. بار الکتریکی و جنس فیلتر هم در حذف میکروارگانیسم نقش دارد. ویروس بعلاوه اندازه کوچک و مایکوپلاسماها بدلیل نداشتن دیواره و انعطاف پذیری از فیلترها رد می‌شوند.

اولین فیلترها توسط برگلد- چمبرلند و پاستور به کار گرفته شدند که از جنس پنبه نسوز، سیلیس و چینی بودند. امروزه از فیلترهایی از جنس نیترات سلولز استفاده می‌شود. به این فیلترها ممبران (میلی‌پور) نیز گفته می‌شود. از فیلترها برای جداسازی و شمارش میکروارگانیسم‌های مایعات هم استفاده می‌شود.



انکوباتور Incubator

به این دستگاه اتو هم اطلاق می‌شود. دستگاهی است که با تامین شرایط مناسبی مثل رطوبت و درجه حرارت مناسب باعث رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شود. انکوباتورها مجهز به سیستم پخش حرارت و گردش هوا هستند. دمای این دستگاه بین ۲۵- تا ۵۰°C قابل تنظیم است. درجه حرارت انکوباتور (گرمخانه) نباید از حد تنظیم شده بیش از $\pm 1^\circ\text{C}$ تغییر نماید. برای تنظیم و کنترل دمای انکوباتور بهتر است ۲ بار در روز، یک بار صبح ابتدا شروع کار که ساعت‌ها درب دستگاه بسته بوده و یک بار در پایان کار به کمک دماسنج دقیق، دمای انکوباتور را کنترل کرد. هر میکروارگانیسم در درجه حرارت خاصی بهترین رشد را دارد. این درجه در مورد باکتری‌ها و مخمرها معمولا در بازه ۳۵-۳۷ درجه سانتی‌گراد و در مورد کپک‌ها ۲۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد، که دمای انکوباتور باید روی آن تنظیم شود. ظروف و محیط‌های داخل انکوباتور باید ظرف ۲ ساعت به درجه حرارت مورد نظر برسند.

تنظیم رطوبت دستگاه نیز بسیار مهم است. رطوبت دستگاه نباید زیاد باشد که باعث جمع شدن قطرات آب روی ظروف کشت شود. از طرف دیگر باید به میزانی باشد که ظروف حاوی آگار در طی ۴۸ ساعت بیش از ۱۵٪ رطوبت خود را از دست ندهند. در صورت نبود سیستم مرطوب کننده می توان با قراردادن بشر حاوی آب میزان رطوبت لازم را فراهم نمود.

زمان انکوباسیون با توجه به نوع میکروارگانیسم متفاوت است. بطور مثال باکتری‌هایی مثل اشرشیاکلی یا استافیلوکوکوس ظرف ۱۸-۲۴ ساعت در محیط آگار کلنی قابل رویت تولید می کنند ولی این زمان برای باکتری‌هایی مثل میکوباکتریوم توبرکلوزیس وقارچ‌های درماتوفیت چند هفته می باشد.

پلیت‌ها را باید طوری در انکوباتور قرار داد که فاصله پتری دیش‌ها از هم و دیواره کمتر از ۲/۵ سانتی متر نباشد که جریان هوا بتواند چرخش داشته باشد.

انواع انکوباتور:

با توجه به نیازهای متفاوت میکروب‌ها، انواع انکوباتورها طراحی شده است که برخی از انواع آن عبارتند از:

(۱) انکوباتور ساده

(۲) انکوباتور CO₂ دار: مخصوص باکتری‌های کاینوفیل (میکروآئروفیلیک) و بی‌هوازی

(۳) انکوباتور شیکردار

(۴) انکوباتور یخچال دار

نکات مهم در کار با انکوباتور

(۱) برای جلوگیری از تغییرات دما توصیه می شود از باز و بسته کردن زیاد درب انکوباتور خودداری گردد.

(۲) برای جلوگیری از تجمع آلودگی در دستگاه توصیه می شود هر چند وقت یکبار فضای داخل دستگاه تمیز و ضد عفونی شود.

اسپکتروفتومتر Spectrophotometr

از این دستگاه برای تعیین کدورت در محلول‌های حاوی میکروب استفاده می شود. محلول را در برابر نور قرار داده و میزان جذب نور توسط محلول اندازه گیری می شود. این روش یکی از روش‌های مطالعه رشد باکتری‌ها می باشد، به این ترتیب که هر چه کدورت بیشتر، جذب نوری بیشتر خواهد بود که معرف تعداد زیاد باکتری می باشد.

هود شیمیایی یا هود فیوم Fume Hood

این هودها از پخش شدن و مواجهه کارکنان با بخارات سمی، قابل اشتعال، قابل انفجار جلوگیری می کنند. هودهای شیمیایی هوای آلوده را در یک محفظه بسته نگه می دارند و این هوا را یا به بیرون تخلیه کرده یا آن را تصفیه و دوباره به آزمایشگاه بر می گردانند. این هودها برای کار با مواد کارسینوژن، سمی و رادیواکتیو کاربرد دارند.

هودهای بیولوژیک یا لامینار Laminar Flu

هود بیولوژیک وسیله‌ای است که یک فضای بسته برای محافظت از کاربر در برابر آئروسل‌های حاصل از عوامل عفونی و مواد شدیداً سمی را ایجاد می‌کند همچنین از آلوده شدن نمونه به وسیله کاربر نیز جلوگیری می‌شود. داخل این هودها لامپ UV و چراغ گاز بنسون برای ایمنی بیشتر تعبیه شده است.

این هودها مجهز به فیلترهای HEPA (High Efficiency Particulate Air) می‌باشند که از ترکیبات پشم شیشه خیلی ریز ثابت و ذرات آلومینیوم ساخته شده و اجازه عبور به ذرات بزرگتر از 0.3 میکرون را نمی‌دهند. این فیلترها بایستی سالیانه تعویض و با فیلتر نو جایگزین گردند.

هودهای لامینار در انواع عمودی و افقی وجود داشته و بسته به حدت عامل عفونی به دو دسته هودهای کلاس ۲ و کلاس ۳ تقسیم می‌شوند.

در هودهای لامینار کلاس ۲ جریان هوای آزمایشگاه از طریق قسمت جلویی هود وارد و به‌صورت عمودی از طریق شبکه جلویی به‌طرف پایین عبور می‌کند، سپس هوا از طریق کانال عقبی هود به قسمت بالایی رانده می‌شود. بخشی از هوای وارد شده به قسمت فوقانی از طریق در خروجی که دارای فیلترهای HEPA می‌باشد پس از جذب ذرات میکروبی به خارج از هود هدایت می‌شود. بخش دیگر هوای تصفیه شده به سمت پایین هدایت شده و در امتداد محل باز جلوی هود یک منطقه حفاظتی هوایی ایجاد می‌کند. بخشی از این هوا نیز مجدداً به قسمت پایین وارد و شروع به چرخش می‌کند. فضای داخل هودها پس از کار بوسیله اشعه UV یا حرارت استریل می‌شود.

هودهای لامینار کلاس ۳ که موقع کار با ویروس‌ها و باکتری‌های با حدت و کشندگی بالا و امکان گسترش زیاد استفاده می‌شوند یک فضای کاملاً بسته ایجاد کرده و هوا از هود خارج نمی‌شود.

نکات مهم در کار با هود:

هود زمانی عملکرد مناسب دارد که در اتفاقی بسته قرار گیرد استفاده از پنکه یا باز کردن پنجره ممکن است باعث اختلال در عمل هود شود.

۱۵ تا ۲۰ دقیقه قبل از کار هود روشن شود.

زمانیکه کار تمام شد اجازه دهید موتور هود حدود ۱۵ دقیقه اضافه تر روشن باشد تا ذرات عفونی به خارج منتقل شود.

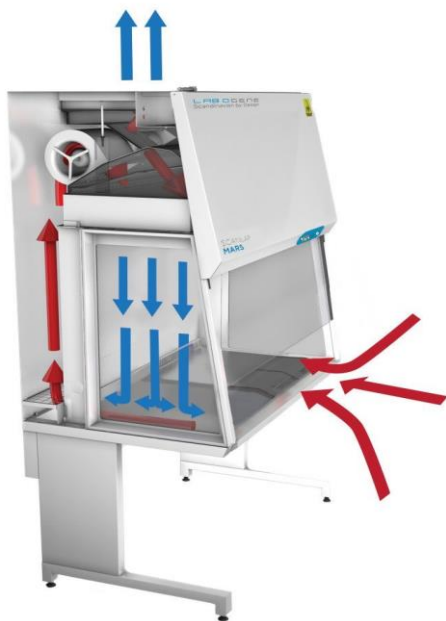
طبقه بندی میکروب‌ها از نظر صدمات ناشی از آن‌ها

گروه اول: کم خطر برای انسان مثل کپک‌ها، مخمرها، باکتری‌های موجود در سطح پوست و...

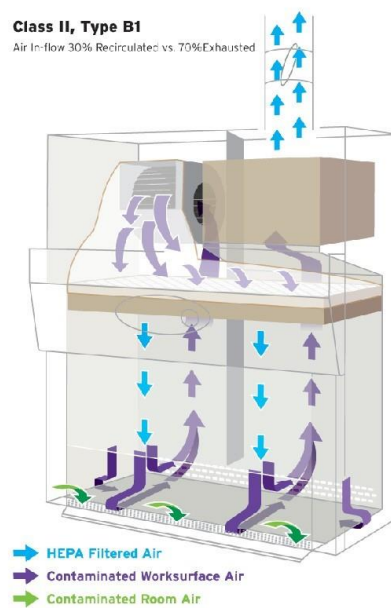
گروه دوم: خطر کم داشته و در صورت ایجاد مشکل با دارو قابل درمان هستند و خطر گسترش در جامعه ندارند. مثل آنتروباکتریاسه جز سالمونلا، استرپتوکوک‌ها، آدنوویروس‌ها،

گروه سوم: خطر زیاد برای کارکنان آزمایشگاه و خطر کم برای جامعه دارند و سریع و بصورت گسترده از فردی به فرد دیگر منتقل نمی‌شوند. مثل بروسلا، فرانسیسلا، هسیتوپلاسما، ریکتزیاها

گروه چهارم: خطر بسیار زیاد برای کارکنان آزمایشگاه دارند و بیماری جدی تولید می‌کنند و به سرعت از فردی به فرد دیگر منتقل شده و در جامعه گسترش می‌یابند. مثل طاعون انسانی، آبله، ویروس‌های ایجاد کننده تب هموراژیک،



هود لامینار کلاس ۲



هود لامینار کلاس ۳

اتوکلاو Autoclave

دستگاهی است که با فشار بخار آب کار کرده و از آن برای استریل کردن وسایل آزمایشگاهی و محیط های کشت استفاده می شود. این وسیله توسط میکروبیولوژیست فرانسوی چارلز چمبرلن در سال ۱۸۷۹ اختراع شد. واژه اتوکلاو از ترکیب دو واژه (auto-) در زبان یونانی به معنی خودکار و (clavis) در زبان لاتین به معنی کلید تشکیل شده است. در این وسیله از حرارت بخار آب تحت فشار استفاده می شود. این وسیله حرارت ۱۲۱ درجه سانتی گراد را تحت فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع را در مدت زمان مورد نظر (عمدتاً ۱۵-۲۰ دقیقه) فراهم می کند. باید تمام هوا دستگاه قبل از کار کردن خارج شود چون درجه حرارت بخار آب در تماس با هوا کم می شود.

برخی اتوکلاوها از جلو و برخی دیگر از بالا بارگیری می شوند.

فور الکتریکی Oven:

این دستگاه ۴۰۰-۲۵۰ درجه سانتی گراد حرارت تولید می کند. برای استریل کردن شیشه آلات نشکن و وسایل جراحی به روش حرارت خشک از آن استفاده می شود. برخی از باکتری ها با تبدیل شدن به فرم اسپور می توانند از این دما جان سالم به در ببرند. برای استریل کردن وسایل با فور به اشیاء در کاغذ پیچیده شده و در دمای ۱۸۰-۱۷۰ درجه سانتی گراد بمدت ۹۰-۱۲۰ دقیقه حرارت داده می شود. وسایل قبل از استریل شدن تمیز و خشک می شوند به طوری که نباید کمترین رطوبت داشته باشند چون موجب شکستن می شود. برخی فورها ونتیلاتور دارند که وقتی وسایل مرطوب گذاشته می شود کمک می کنند که بخارات خارج شود.

از نوار چسب های معرف جهت تایید استریلیزاسیون استفاده می شود. در صورت نبود نوارهای معرف زرد شدن رنگ پنبه و کاغذ سفید نشانه سترون بودن است.



کلنی شمار Colony counter

دستگاهی است الکتریکی که جهت شمارش باکتری ها و یا میکرو ارگانیسم های موجود در محیط کشت آگار به کار می رود.

کلنی کانترهای دیجیتالی از یک صفحه شطرنجی مخصوص شمارش باکتری، قسمتی که به وسیله دو نیم حلقه پلیت را نگه می دارد، منبع نور که صفحه شمارش را روشن می کند، یک

ذره بین متحرک قابل تنظیم و قلم یا دکمه شمارشگر تشکیل می شوند.



فصل سوم:

انواع میکروسکوپ و کاربرد آنها در میکروب شناسی

پیروزی آن نیست که هرگز زمین نخوری آن است که پس از هر زمین خوردن برخیزی

چشم انسان از لحاظ دید دارای محدودیت‌هایی است. از جمله اینکه چشم توانایی دیدن اجسام دور را ندارد، همچنین اگر فاصله شیئی از چشم کمتر از ۲۵ سانتی‌متر یا ۱۰ اینچ باشد نمی‌تواند آن را به وضوح ببیند. انسان توانایی دیدن اجسامی که قطر آن‌ها کمتر از ۰/۱ میلی‌متر باشد را نیز ندارد همچنین چشم انسان قدرت تفکیک کمی داشته و اگر فاصله دو شیئی کمتر از ۰/۲ میلی‌متر باشد چشم انسان آن دو شیئی را بصورت به هم چسبیده خواهد داد.

قطر سلول‌های جانوری ۱۰ تا ۲۰ میکرومتر (هر میکرومتر برابر با 10^{-3} میلی‌متر و 10^{-6} متر) می‌باشد که ۵ بار کوچکتر از جسمی است که چشم غیر مسلح می‌بیند. میکروارگانیسم‌ها نیز بسیار کوچکتر از آن هستند که با چشم غیر مسلح دیده شوند بطوریکه قطر باکتری‌ها ۱ میکرومتر، کلامیدیاها ۳۰۰ نانومتر (هر نانومتر 10^{-3} میکرومتر و 10^{-9} متر است) و ویروس‌ها ۲۰ تا ۲۰۰ نانومتر می‌باشند.

تذکر: باکتری‌های تیومارگاریتا نامیبینسس *Thiomargarita namibiensis*^۱ و اپیلیپسیوم فیش‌السیوم که اخیراً کشف شده‌اند با چشم غیر مسلح قابل رویت هستند.

بشر از زمانیکه پی به ضعف‌های چشم خود برده همواره سعی در رفع این نقیصه‌ها داشت. سابقه اختراع عدسی به یونان باستان برمی‌گردد. در سال ۱۶۱۱ کپلر ایده‌ای برای ساخت میکروسکوپ ارائه داد و بدنال آن گالیله و جانسون تلسکوپ و میکروسکوپ را با استفاده از قوانین شکست نور و عدسی‌ها ابداع کردند.

آنتونی ون لوین هوک با استفاده از میکروسکوپ‌های ابداعی خود که تا ۴۰ برابر بزرگنمایی داشتند در سال ۱۶۷۴ پروتوزئرها و ۹ سال بعد باکتری‌ها را گزارش نمود. در آن زمان میکروسکوپ‌ها بسیار ابتدایی و ساده بودند و تنظیم این میکروسکوپ‌ها کار بسیار سختی بود و لوین هوک برای مشاهده اجرام زیر مجبور به ساخت صدها میکروسکوپ شد. رابرت هوک با میکروسکوپ به بررسی برش‌های چوب پنبه پرداخت و منافذ کوچک در آن را سلول نامید. میکروسکوپ‌های امروزی دستگاه‌های پیشرفته و ترکیبی از عدسی‌های شیئی و چشمی می‌باشند.

علاوه از ریز بود مشکل دیگری که در آن زمان در سر راه تشخیص سلول‌ها و میکروارگانیسم‌ها بود بی‌رنگ و شفاف بودن آن‌ها بود که این مشکل نیز با ساخت رنگ‌ها و رنگ آمیزی میکروارگانیسم‌ها حل شد.

امروزه بدنال پیشرفت‌های شگرف علم در ساخت میکروسکوپ هم تحولات بزرگی صورت گرفته است و انواع مختلف میکروسکوپ اعم از نوری، فاز کنتراست، فلورسنت و الکترونی اختراع شده‌اند. حتی میکروسکوپ‌های اتمیک فورث به بازار آمده که تا حد اتم‌ها می‌توانند اجسام را بررسی کنند.

میکروسکوپ‌ها با قوانین شکست نور کار می‌کنند. همانگونه که می‌دانید نور حین تعویض محیط شکسته و از مسیر اصلی خود منحرف می‌شود. اگر نور از محیط غلیظ وارد محیط رقیق شود پرتوها از هم دور می‌شوند در حالیکه اگر از محیط رقیق وارد محیط غلیظ شود پرتوها شکسته و به هم نزدیک می‌شوند. نورها شکسته شده موقع استفاده از عدسی در یک نقطه روی هم تمرکز پیدا می‌کنند که این نقطه را نقطه کانونی و فاصله نقطه کانونی تا عدسی را فاصله کانونی می‌گویند.

^۱ این باکتری کوکسی گرم منفی با تنفس بی‌هوازی اختیاری است که در سال ۱۹۹۹ در نامیبیا کشف شد. قطر این باکتری ۰/۷۵ میلی‌متر است که ۳ میلیون برابر اندازه عادی باکتری‌ها می‌باشد که قسمت عمده آن از یک واکوئل غذایی تشکیل شده است.

میکروسکوپ معمولاً اولین وسیله‌ای است که یک میکروب شناس برای شناسایی و بررسی سیستماتیک میکروب‌ها به کار می‌برد.

میکروسکوپ‌ها در واقع دو ضعف چشم را با دو صفت اصلی خود بر طرف می‌کنند.

(۱) بزرگنمایی Magnification

بزرگ‌نمایی هم توسط عدسی شئی و هم توسط عدسی چشمی صورت می‌گیرد. بزرگنمایی کلی میکروسکوپ از حاصل ضرب بزرگنمایی عدسی شئی در بزرگنمایی عدسی چشمی حاصل می‌شود.

(۲) حد وضوح یا حد تفکیک Resolution Power

میکروسکوپ علاوه از بزرگنمایی قدرت تفکیک چشم را نیز افزایش می‌دهد. منظور از حد وضوح کمترین فاصله بین دو شی است که بتوان آن دو را بصورت مجزا دید. در مورد چشم غیر مسلح این فاصله ۰/۱ میلی‌متر می‌باشد و اگر فاصله دو شد از هم کمتر از این باشد بصورت منطبق بر هم دیده می‌شوند. قدرت تفکیک عمدتاً به طول موج نوری که به عنوان منبع روشنایی به کار می‌رود بستگی دارد و نصف طول موج نور مورد استفاده است $RP = \frac{0.61 \lambda}{NA}$. به عنوان مثال پرتوهای الکترونی و نور ماورا بنفش طول موج کوتاهتری نسبت به نور مرئی (۰/۴ میکرومتر) دارند، لذا قدرت تمایز میکروسکوپ‌هایی که با این نورها کار می‌کنند بیشتر از میکروسکوپ‌هایی است که با نور مرئی کار می‌کنند. البته در قدرت تمایز کیفیتی اپتیکی عدسی‌ها هم نقش دارد.

قدرت تفکیک عدسی به ضریب شکست نور هم بستگی دارد بطوریکه ضریب شکست هوا کمتر از شیشه است لذا پرتوها هنگام عبور از شیشه به هوا منحرف و دچار شکستگی می‌شوند که در میکروسکوپ نوری موقع استفاده از عدسی ۱۰۰× با استفاده از روغن ایمرسیون (صدر) می‌توان ضریب شکست نور را کاهش و قدرت تفکیک را افزایش داد.

نکته مهم این است که افزایش بزرگنمایی بدون افزایش حد وضوح متناسب با آن فقط تصویر بزرگتر مبهم ایجاد خواهد کرد.

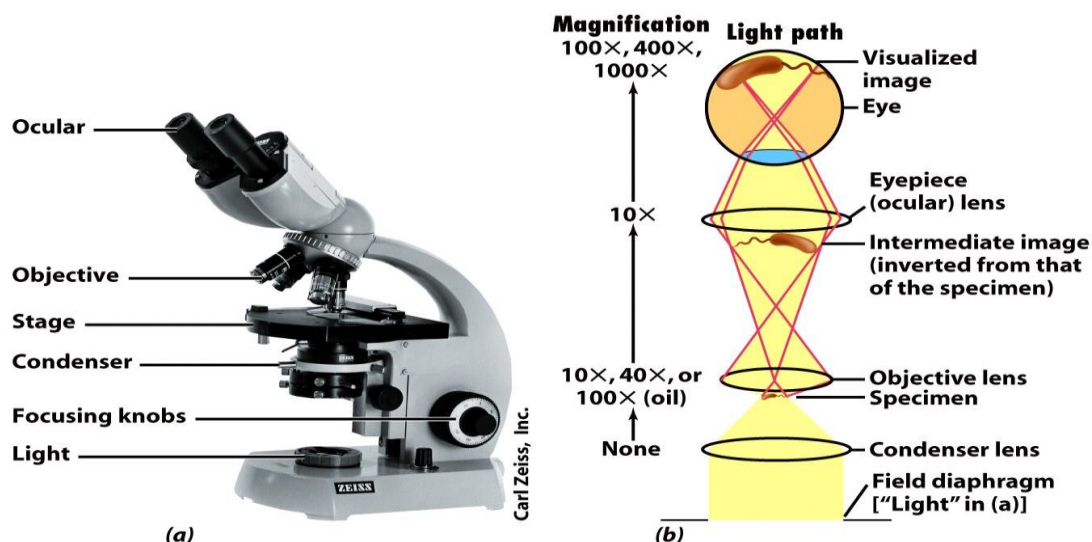
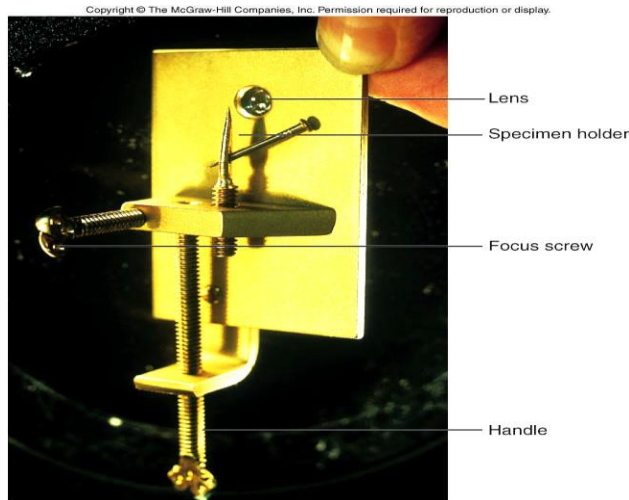
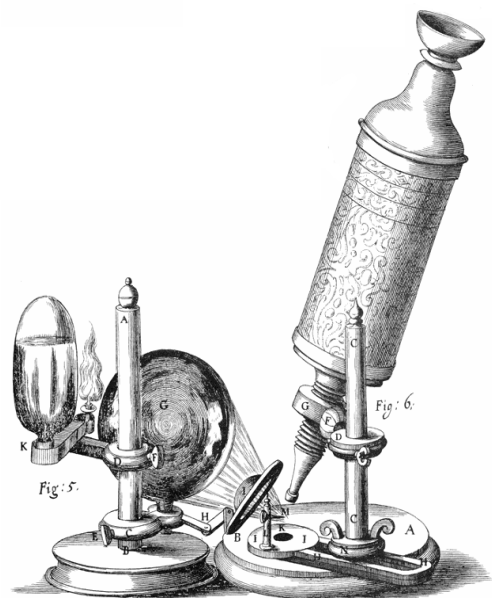


Figure 4-1 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

اصول شکست نور در میکروسکوپ نوری



میکروسکوپهای استفاده شده توسط ون لیون هوک و رابرت هوک

میکروسکوپهای زمینه روشن Bright field

این میکروسکوپها پرکاربردترین نوع میکروسکوپ در یک آزمایشگاه تشخیصی می‌باشند. در این میکروسکوپها منبع نور مستقیماً نور مرئی را به روی نمونه می‌تاباند. نمونه بصورت تیره و در زمینه تاریک دیده می‌شود. دو سری عدسی شئی (با بزرگنمایی ۴، ۱۰، ۴۰ و ۱۰۰ برابر) و چشمی دارند که عدسی چشمی تصویر بزرگ شده توسط عدسی شئی را ۱۰ بار دیگر بزرگ تر می‌کند، پس حداکثر بزرگنمایی در این نوع میکروسکوپ ۱۰۰۰ برابر و قدرت تفکیک آن 0.2 میکرومتر می‌باشد. برای تشخیص بهتر باید بین شی و زمینه کنتراست وجود داشته باشد که کنتراست را با رنگ آمیزی می‌توان افزایش داد ولی با رنگ آمیزی نمونه کشته شده و مشاهده فعالیت سلول زنده غیر ممکن می‌شود.

اجزا تشکیل دهنده میکروسکوپ نوری زمینه روشن:

- (۱) پایه Base
- (۲) بازوی میکروسکوپ
- (۳) منبع نوری
- (۴) کلید روشن و خاموش
- (۵) دکمه تنظیم شدت نور
- (۶) کندانسور Condensor زیر سکوی میکروسکوپ قرار داشته و از چند عدسی تشکیل شده است و وظیفه آن جمع کردن نور و ارسال آن به عدسی شئی است. کندانسور توسط یک پیچ به طرف بالا و پایین حرکت می‌کند.

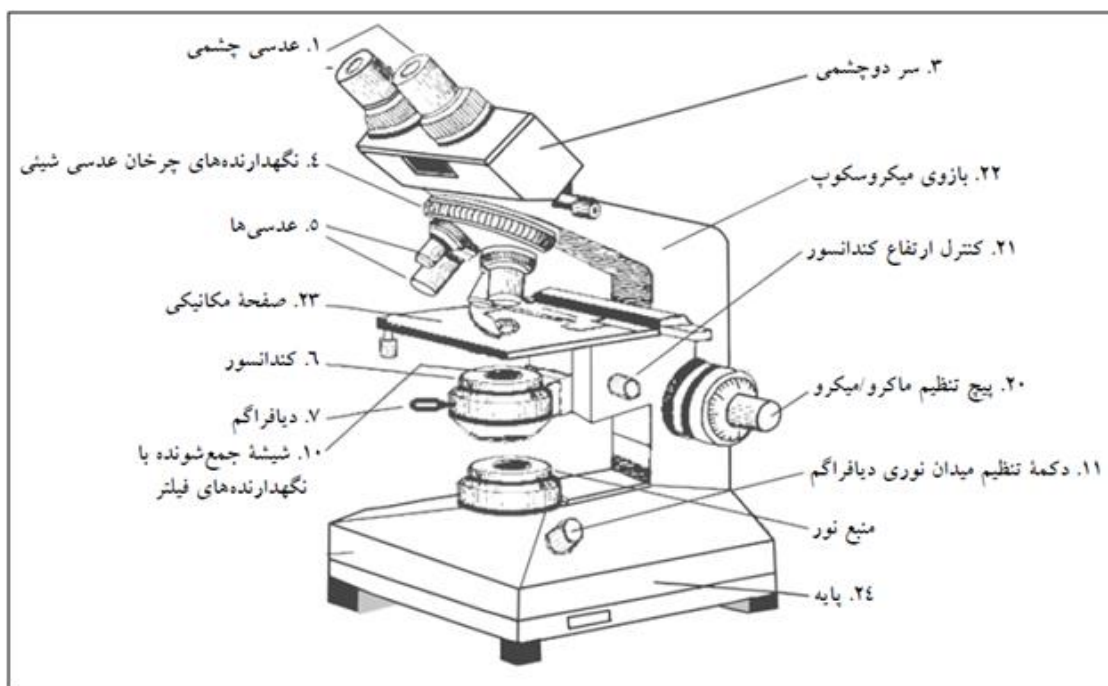
۷) دیافراگم Diaphragm بر روی کندانسور نصب شده و عمل آن کنترل مقدار نور عبوری از کندانسور است و دارای شاتری است که با دکمه باز و بسته می‌شود. بهتر است دیافراگم همیشه نیمه باز باشد. البته در برخی موارد از جمله مشاهده کپسول با رنگ آمیزی مرکب چین توصیه می‌شود از دیافراگم بسته استفاده شود. موقع استفاده از عدسی با قدرت کم بهتر است دیافراگم باز باشد.

۸) سکوی میکروسکوپ یا صفحه نگهدارنده stage

۹) گیره‌های نگهدارنده لام که به وسیله پیچ به عقب و جلو، راست و چپ منتقل می‌شوند.

۱۰) عدسی‌های شئی با بزرگنمایی ۱۰۰× - ۴۰× - ۱۰× - ۴× که عدسی ۱۰۰× را عدسی روغنی می‌گویند.

۱۱) پیچ‌های ماکرومتر برای واضح کردن تصویر با عدسی ۴× و ۱۰× و میکرومتر برای واضح کردن تصویر با عدسی بزرگتر



قسمت‌های تشکیل دهنده میکروسکوپ نوری

نکات مهم موقع کار با میکروسکوپ‌های زمینه روشن

الف) این میکروسکوپ‌ها هم کانون Parfucal هستند و اگر نمونه با عدسی کوچک تنظیم شود در عدسی بزرگ نیاز به تنظیم نمی‌باشد لذا ابتدا باید نمونه با عدسی کوچک و استفاده از پیچ ماکرو تنظیم شود سپس برای وضوح و استفاده از عدسی‌های بزرگتر از پیچ میکرو استفاده شود.

ب) موقع کار با عدسی ۱۰۰ برای وضوح بیشتر حتماً از روغن ایمرسیون استفاده شود. همچنین کندانسور باید بالا و نزدیک به سکوی میکروسکوپ قرار داشته باشد.

ج) دیافراگم بهتر است همیشه نیمه باز باشد مگر زمانیکه از عدسی شئی کم قدرت استفاده شود که دیافراگم باید باز باشد.

د) موقع استفاده چشم را منقبض نکنید و سعی شود چشم به عدسی چشمی نچسبد. بهترین فاصله زمانی است که بتوان میدان دید را به حداکثر اندازه ممکن دید.

ه) عدسی شئی نباید با لام و لامل برخورد داشته باشد.

و) موقع تعویض لام حتما سکو پایین کشیده شود.

ز) پس از اتمام کار با میکروسکوپ لامها هرگز زیر میکروسکوپ یا روی میز کار باقی گذاشته نشود. عدسی شئی در موقعیت ۴ و سکو در پائین‌ترین موقعیت قرار گیرد. عدسی‌ها و سکو باید همواره تمییز و خشک باشد و اگر روغن ریخته شده بود با گزیلول یا الکل تمییز شود. در خاتمه سیم الکتریکی از پرز خارج و دور بدنه میکروسکوپ پیچانده شود.

میکروسکوپ فاز کنتراست Phase-Contrast Microscopy

جزو میکروسکوپ‌های زمینه روشن محسوب می‌شوند که در آن با استفاده از اختلاف فاز نور عبوری می‌توان اجزاء را تشخیص داد. این وسیله بهترین وسیله برای مشاهده سلول زنده در نمونه مایع است. جزئیات ساختارهای با چگالی متفاوت مانند سلول و محیط اطراف را بخوبی مشخص می‌کند. اندامک‌های داخلی سلولی چون چگالی متفاوت دارند بدون استفاده از رنگ بصورت سایه روشن دیده می‌شوند. امکان مشاهده تحرک و فاگوسیتوز هم وجود دارد. حداکثر قدرت بزرگنمایی این میکروسکوپ ۱۰۰۰ برابر است.

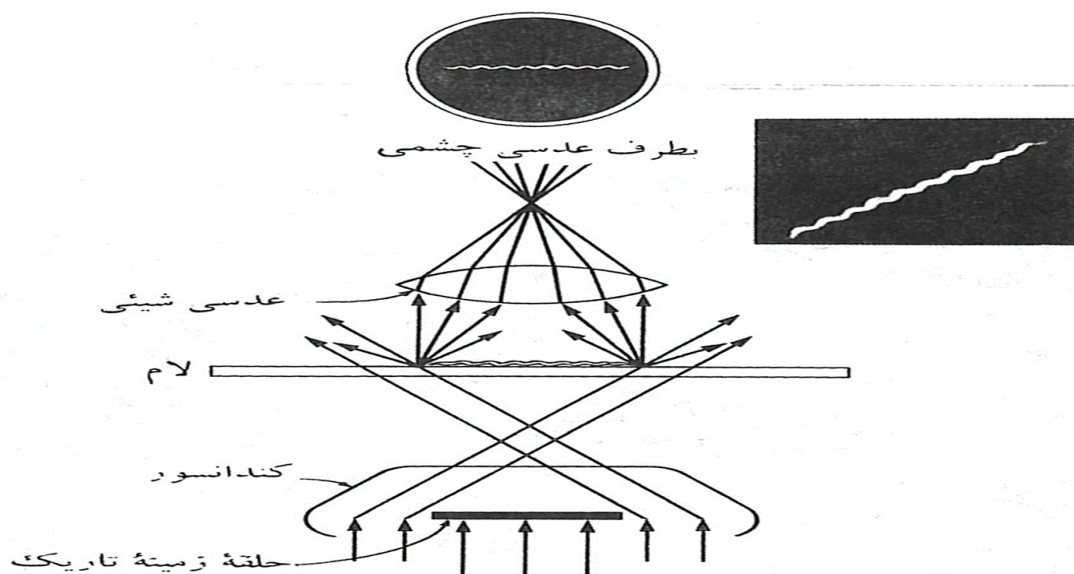
میکروسکوپ فلورسنت UV

نوعی میکروسکوپ نوری است که به جای نور مرئی از نور ماوراء بنفش استفاده می‌کند که توسط لامپ‌های جیوه تولید می‌شود. چون طول موج نور ماوراء بنفش 0.2 میکرومتر است پس قدرت تفکیک آن 0.1 بوده و بهتر از قدرت تفکیک میکروسکوپ نور مرئی است. عدسی‌های چشمی در این نوع میکروسکوپ صافی دارند تا اشعه ماوراء بنفش به چشم آسیب نرساند. چون نور فرا بنفش با چشم انسان قابل رویت نمی‌باشد لذا از رنگ‌های فلورسنت جهت تشخیص استفاده می‌شود که در برابر تابش اشعه فرا بنفش بصورت درخشان در یک زمینه تاریک دیده می‌شود. رنگ مشاهده شده تابع رنگ مصرف شده در رنگ آمیزی است. رنگ‌هایی مثل فلوروکروم - اکریدین نارنجی برای مشاهده مایکوپلازما - کالکفور سفید برای مشاهده قارچ‌ها - اورامین رد امین برای تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده می‌شود.

روش ایمونوفلورسنت که در آن رنگ فلورسنت با یک پیوند شیمیایی به آنتی‌بادی وصل شده و سپس به وسیله میکروسکوپ فلورسنت در بافت مورد مطالعه ردیابی می‌شود روش بسیار مفیدی در تشخیص عوامل عفونی محسوب می‌شود. این روش در تشخیص سریع عوامل ایجاد کننده سیفلیس، لژیونلا، سل و حتی ویروس‌های هاری و تب خال کاربرد دارند.

میکروسکوپ زمینه تاریک Dark field Microscopy

در این نوع میکروسکوپ نمونه بصورت روشن در زمینه تاریک دیده می‌شود که دیدن شئی روشن در زمینه تاریک آسان تر از دیدن شئی تاریک در زمینه روشن است. کندانسور آن از ورود مستقیم نور به عدسی شئی جلوگیری می‌کند (نور با زاویه خاصی وارد می‌شود) و زمینه کاملاً تاریک به وجود می‌آید. در واقع در ایت میکروسکوپ تنها نوری که به چشم می‌رسد همان است که توسط نمونه منتشر می‌شود برای دیدن سلول‌های زنده رنگ نشده و همچنین تره پانوما پالیدرم (عامل سیفلیس) و نیز باکتریوفاژها مناسب است. در این میکروسکوپ از قدرت پائین یا متوسط عدسی استفاده می‌شود و چون نمی‌تواند رنگ را مشخص کند برای نمونه‌های رنگ شده به کار نمی‌رود.



میکروسکوپ معکوس Invert Microscopy

این نوع میکروسکوپ در سال ۱۸۵۰ توسط جان لورنس اسمیت ابداع شد. سیستم چشمی در این نوع میکروسکوپ درست برعکس میکروسکوپ نوری طراحی شده است. عدسی شیئی در پایین و کندانسور در بالا قرار دارد. مزیت این نوع قرارگیری این است که عدسی شیئی در سلول‌هایی که ممکن است در لوله‌های مملو از محیط مایع قرار گرفته باشند یا در میکروسکوپ نوری استاندارد میزان نمی‌شوند تمرکز می‌یابد.

این نحوه قرارگیری در بررسی سلول‌های زنده و رشد یافته در فلاسک کشت سلول و میکرو پلیت‌ها که بررسی آنها اغلب با میکروسکوپ‌های استاندارد مشکل است کمک کننده است.



میکروسکوپ‌های الکترونی

این میکروسکوپ در سال ۱۹۳۱ توسط نول و هیروسکا اختراع شد. به جای نور مرئی از پرتوهای الکترونی استفاده می‌کنند، که چون طول موج آن بسیار کوتاه‌تر از نور مرئی است قدرت تفکیک و بزرگنمایی بیشتر می‌شود. به جای عدسی از حلقه‌های الکترومغناطیس استفاده می‌شود. چون الکترون از عدسی عبور نمی‌کند طول موج الکترون $\frac{1}{\lambda} = \frac{h}{mv}$ طول موج نور مرئی است پس وضوح آن بیشتر از نوری است. منبع نور در این میکروسکوپ در بالا قرار دارد و تصویر تشکیل شد را مستقیماً نمی‌شود دید و باید روی صفحه تلویزیون یا فیلم عکاسی باشد. تصاویر یک میلیون برابر بزرگ‌تر می‌شوند که ۱۰۰۰ بار بیشتر از میکروسکوپ نوری است. در این نوع میکروسکوپ به نیروی ولتاژ ۱۰۰۰۰ تا ۴۰۰۰۰ ولت و سیستم خلا برای جلوگیری از برخورد الکترون به ملکول هوا نیاز می‌باشد. قدرت تفکیک میکروسکوپ الکترونی ۲۰-۱۰ nm است. در این میکروسکوپ قدرت تفکیک یا رزولانس ۰,۰۰۰۳ میکرون یا ۳ آنگستروم قریب ۶۰۰ برابر رزولانس میکروسکوپ است.

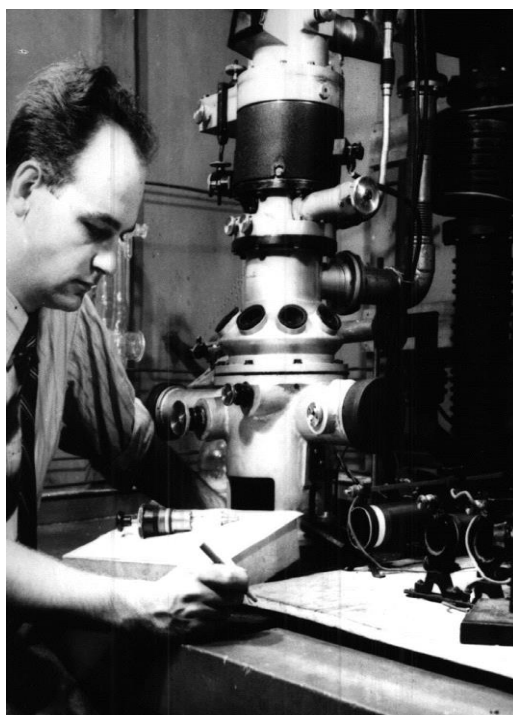
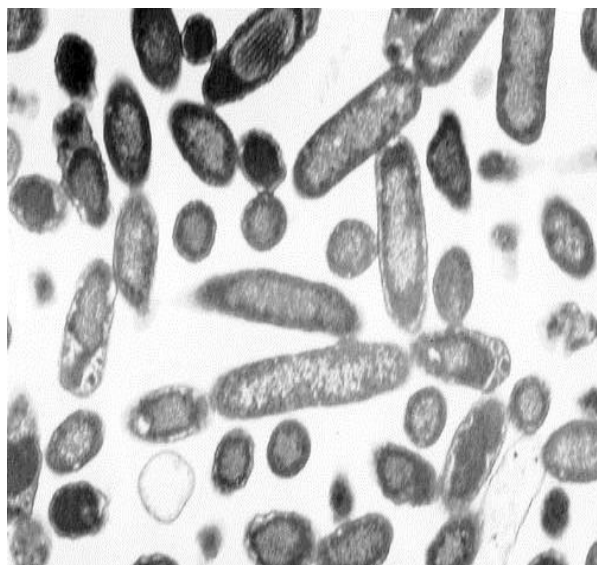
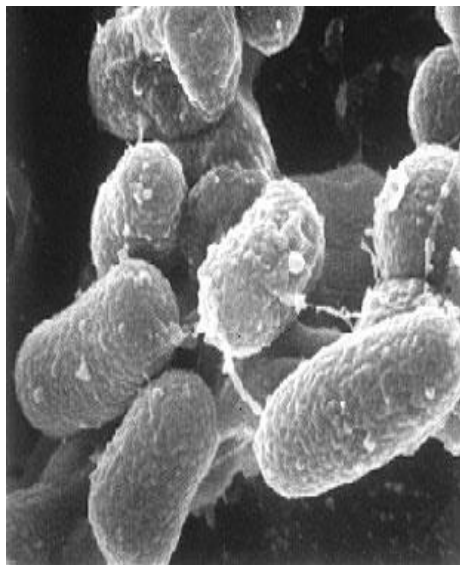
برای مشاهده میکروارگانیسم‌ها در میکروسکوپ الکترونی باید آن را رنگ آمیزی کرد که به این منظور از رنگ آمیزی منفی با استفاده از فلزات سنگین که نور را منعکس می‌نمایند مثل اورانیوم، تنگستن یا سرب استفاده می‌شود. بدلیل رنگ آمیزی نمونه در هیچکدام از میکروسکوپ‌های الکترونی امکان بررسی نمونه زنده وجود ندارد.

با توجه به این که بی توجهی در آماده سازی نمونه‌ها برای مشاهده در میکروسکوپ الکترونی می‌تواند ضایعاتی را در نمونه به وجود آورد و به ایجاد تصاویر غیر واقعی و اجزاء ساختگی منجر گردد بنابر این کار با این نوع میکروسکوپ‌ها نیازمند نیروی متخصص دوره دیده می‌باشد.

۲ نوع میکروسکوپ الکترونی وجود دارد :

(۱) میکروسکوپ الکترونی ترانس‌میشن (TEM) (Transmission Electron Microscope) یا نگاره : برای بررسی اجزاء داخل سلول کاربرد دارد. با توجه به این که الکترون‌ها قدرت نفوذ کمی دارند برای دیدن داخل سلول باید با میکروتوم مخصوص از سلول‌ها برش‌های نازکی تهیه گردد.

(۲) میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM) (Scanning Electron Microscope) یا نگاره: برای بررسی سطح سلول به کار می‌رود که نمونه‌ها را با صورت سه بعدی نمایش می‌دهد و با استفاده از آن علاوه از بررسی حضور میکروارگانیسم‌ها در نمونه‌های مورد بررسی می‌توان از شکل بسیاری از میکروارگانیسم‌ها اطلاعات منحصر به فرد به دست آورد.



میکروسکوپ نیروی اتمی AFM

از انواع میکروسکوپ‌های پروپ ریشی SPM است که با جمع آوری اطلاعات لیزرهای حاصل از بر همکنش پروپ دستگاه و اتم‌های سطح تصویر توپوگرافی از آن تولید می‌کند.

مقایسه ۵ نوع میکروسکوپ

میکروسکوپ	حداکثر بزرگ نمائی	موارد استفاده متداول	مزایا	اشکالات
زمینه روشن استاندارد	۱۰۰۰x	مشاهده نمونه های رنگ آمیزی شده شمارش میکربها	سهولت استفاده ارزانی قیمت امکان تفسیر واکنشهای ناشی از رنگ آمیزی دسترسی آسان	فقدان کنتراست عدم توانایی مشاهده ویروسها و بعضی باکتریهای کوچک اغلب اجزاء درون سلولی باید رنگ آمیزی شوند تا قابل مشاهده باشند. تشکیل اجزاء ساختگی طی روشهای رنگ آمیزی
زمینه تاریک	۱۰۰۰x	مشاهده میکربهای رنگ نشده ای که امکان مشاهده آنها با میکروسکوپ زمینه روشن بسیار کم است.	امکان مشاهده نمونه های زنده کاهش میزان اجزاء ساختگی	عدم امکان ارزیابی واکنشهای ناشی از رنگ آمیزی جزئیات درون سلولی به آسانی قابل مشاهده نیست.
اختلاف فاز	۱۰۰۰x	مشاهده سلولهای زنده رنگ آمیزی نشده مشاهده ساختارهای درون سلولی	امکان مشاهده فعالیتهای زیستی درون سلولی افزایش امکان مشاهده جزئیات یافته	عدم امکان ارزیابی واکنشهای ناشی از رنگ آمیزی
فلوئورسانس	۱۰۰۰x	تشخیص میکروارگانیسمها نشان دادن عوامل عفونی ویژه در بافتها	امکان تشخیص سریع عوامل عفونی	محدود به مشاهده نمونه هایی که به طور طبیعی فلوئورسانس اند و یا با رنگهای فلوئورسانت رنگ می گیرند.
الکترونی	۱۰۰۰۰۰۰x	نشان دادن واکنشهای ایمونولوژیک مشاهده ساختار ریز سلولها و ویروسها تشخیص برخی از بیماریهای ویروسی و سرطانها نشان دادن بعضی مولکولهای غول پیکر	امکان مشاهده اجسام بسیار کوچک با میکروسکوپ نوری قابل رویت نیستند	نمونه باید کشته شود بی توجهی در روشهای آماده سازی احتمال تولید اجزاء ساختگی را در نمونه افزایش دهد بسیار گران است.

جدول مقایسه انواع مختلف میکروسکوپ

فصل چهارم :

رنگ‌ها و رنگ آمیزی در میکروبیولوژی

اولین گام در شناسایی باکتری‌ها بررسی مستقیم آنها زیر میکروسکوپ است. میکروب‌ها عمدتاً بی‌رنگ هستند که برای بدست آوردن اطلاعات اضافی و افزایش قدرت دید آن‌ها را رنگ آمیزی می‌کنند. رنگ آمیزی باعث افزایش کنتراست بین باکتری و محیط شده و به افتراق و شناسایی باکتری‌ها کمک می‌کند.

رنگ آمیزی باعث می‌شود که رنگ‌ها بصورت شیمیایی با پروتوپلاسم باکتری ترکیب شده و این فرآیند باعث کشته شدن و بی‌حرکتی باکتری‌ها می‌شود.

نخستین کوشش‌ها جهت رنگ آمیزی باکتری‌ها در سال ۱۸۶۹ توسط هافمن انجام شد. کخ با مهار کردن لایه نازکی از باکتری توسط حرارت روی شیشه، نواقص کار هافمن را برطرف کرد.

در میکروبیولوژی به جای Dye از واژه Stain به معنی رنگ استفاده می‌شود.

رنگ‌ها ترکیبات محلول در آب و آروماتیک هستند که آنیون و کاتیون متصل به مواد مختلف را در بر می‌گیرند که در آن‌ها اتصالات گاه به صورت یونی و گاه به صورت هیدروژنی است. بخشی که عامل رنگی است کروموفور نام دارد. کروموفورهای رایج در رنگ‌ها عبارتند از: (۱) اتیل (۲) آزوماتین (۳) آزو.

رنگ‌ها علاوه بر استفاده در رنگ آمیزی در مواردی به عنوان معرف، همچنین در محیط‌های کشت (به عنوان ممانعت کننده انتخابی یا شناسایی باکتری) و در تست‌ها بیوشیمیایی (بعنوان معرف pH برای نشان دادن تخمیر منبع کربن) هم استفاده می‌شوند.

علاوه از نوع رنگ عوامل فیزیکی مثل خاصیت چسبندگی در غلظت‌های بالا و فشار اسمزی در رنگ پذیری باکتری‌ها دخالت دارد.

رنگ‌ها قبلاً از مشتقات آنیلینی ساخته می‌شدند به همین دلیل رنگ‌های آنیلیک گفته می‌شدند. امروزه رنگ‌هایی که از قطران ذغال سنگ حاصل می‌شوند بیشتر کاربرد دارند که این رنگ‌ها را براساس pH به ۳ دسته تقسیم می‌کنند:

- **رنگ‌های بازی:** کاتیون رنگی که با گروه‌های آنیونی ترکیب می‌شود. برای رنگ کردن ترکیبات با بار منفی (مثل اسید نوکلئیک داخل سلولی) تمایل زیادی دارند. در تجارت رنگ‌های بازی را بصورت نمک می‌سازند مثلاً کلرید متیلن بلو که با افزودن آب یونیزه شده و آبی متیلن با بار + به وجود می‌آید. چون سلول باکتری غنی از اسید نوکلئیک است و بار منفی دارد به صورت گروه‌های فسفات با رنگ بازی با بار + ترکیب می‌شود. این رنگ‌ها مثل: متیلن بلو - کریستال ویوله - سبز درخشان - مالاشیت گرین - فوشین.
- **رنگ‌های اسیدی:** آنیون رنگی که با گروه‌های کاتیون بی رنگ ترکیب شده اند و اغلب به عنوان رنگ زمینه هم کاربرد دارند و پروتئین‌های بازی را نیز رنگ می‌کنند. مثل: اتوزین - سیاه نیگروزین - اسید پیکونیک
- **رنگ‌های خنثی:** ترکیبی از رنگ‌های اسیدی و بازی که هر یون واجد یک کروموفور است و جهت رنگ کردن ترکیبات بدون بار مثل چربی‌ها مناسب است. مثل رنگ سودان سیاه رنگ.

البته رنگ‌ها را بر اساس وضعیت کروموفور هم طبقه بندی می‌کنند:

(۱) رنگ‌های گزانتین: مثل اتوزین

(۲) رنگ‌های اتوزین: مثل نیگروزین

نکته: رنگ دندانه (Mordant)

موادی هستند که رنگ آمیزی را آسان می‌کنند. این رنگ‌ها ضمن ترکیب با دیواره آن را به گونه ای می‌پوشانند که ماده لاکه حساس به رنگ تولید می‌شود و باعث قوی شدن تاثیر رنگ می‌شوند مثل تانین و اسید کرومیک

رنگ آمیزی باکتری‌ها

روش‌های مختلف رنگ آمیزی در میکروب‌شناسی ابداع شده است که طبقه بندی‌های مختلفی نیز برای انواع رنگ آمیزی وجود دارد.

انواع رنگ آمیزی بر اساس تعداد رنگ‌های به کار رفته:

- (۱) **رنگ آمیزی ساده:** گسترش باکتری فقط با یک نوع رنگ رنگ آمیزی می‌شود. اولویت با رنگ‌های بازی با بار مثبت مثل: متیل بلو - کریستال ویوله - کریول فوشین می‌باشد. با این رنگ آمیزی فقط شکل و آرایش سلولی مشخص می‌شود و تمام ساختار رنگ یکسانی می‌گیرد. این رنگ آمیزی بر این اساس استوار است که سلول باکتری از نظر شیمیایی با محیط اطراف متفاوت است. پس می‌تواند پس از رنگ آمیزی از محیط اطراف خود متمایز شود.
- (۲) **رنگ آمیزی مرکب یا افتراقی:** در این رنگ آمیزی دو یا چند رنگ به کار میرود که با رنگ کردن ساختارهای درون سلولی به رنگ‌های مختلف باعث تمایز آن‌ها می‌شود. اساس این رنگ آمیزی این است که میکروارگانیسم‌ها دارای اختلافات فیزیکی و شیمیایی هستند پس در مقابل یک روش رنگ آمیزی معین واکنش‌های متفاوتی نشان می‌دهند. مثل رنگ آمیزی گرم یا اسید فست.

انواع رنگ آمیزی بر اساس رنگ پذیری یا عدم رنگ پذیری باکتری و محیط اطراف:

- (۱) **رنگ آمیزی مثبت:** باکتری رنگ می‌گیرد ولی محیط بی رنگ است.
- (۲) **رنگ آمیزی منفی:** باکتری نسبت به رنگ نفوذ ناپذیر است و رنگ اطراف باکتری را فرا می‌گیرد. از رنگ‌هایی مثل مرکب چین یا سیاه نیگروزین در این روش استفاده می‌شود.

توصیه‌های قبل از رنگ آمیزی

- (۱) محلول‌های رنگی باید در ظروف در دار رنگی که محکم بسته بندی شده نگهداری شوند، از قرار دادن در معرض نور جلوگیری شود و نباید نزدیک آن‌ها اسید و آمونیاک باشد.
- (۲) آب مقطر مورد مصرف در ساخت رنگ تازه و pH آن خنثی باشد.
- (۳) دو میله ای که برای گذاشتن لام موقع رنگ آمیزی به کار می‌روند باید در سطح هم باشند.
- (۴) بهتر است نمونه را در وسط لام گذاشته تا موقع بررسی مشکلی پیش نیاید.
- (۵) بهترین راه نوشتن روی لام استفاده از مداد الماس است.
- (۶) باید مطمئن باشید که لام را سر و ته نگرفته باشید.

(۷) از لام تمیز و عاری از چربی جهت تهیه گسترش و رنگ آمیزی استفاده شود. لام‌ها را بهتر است با مخلوط ۱:۱ اتانول-آتر و گاز استریل تمیز کرد.

(۸) سرم فیزیولوژی هر دو هفته یکبار تهیه شده و باید اطمینان حاصل شود که آلوده نشده باشد

تهیه گسترش میکروبی (Smear)

اولین قدم در رنگ آمیزی تهیه گسترش میکروبی است. باید سعی شود نمونه ضخیم نباشد. در مورد محیط‌های مایع با حلقه فیلدو پلاتین یا پیت پاستور یا سوپ استریل کمی از مایع مورد آزمایش برداشته و وسط لام قرار داده می‌شود و سپس مثل ورقی نازک روی لام گسترش داده می‌شود. در مورد محیط‌های جامد، یک قطره سرم فیزیولوژی وسط لام گذاشته و با فیلدوپلاتین مقدار بسیار کمی از کلنی (پرگنه) باکتری برداشت و پس از مخلوط کردن با نمونه باکتری و پخش کردن آن روی لام، اجازه داده می‌شود در مجاورت هوا و در حرارت اتاق خشک شود. اگر برداشت میکروبی روی لام به صورت گلوله در آمد نشانه چرب بودن لام است که باید تمیز شود.

قبل از برداشت کلنی باید سوزن کشت با استفاده از شعله استریل شود. سوزن کشت باید به تدریج از قسمت کم حرارت شعله به قسمت گرمتر کشیده شود تا از انتشار میکروارگانیسم‌ها در اثر ترکیدن حباب‌ها جلوگیری شود. پس از تهیه گسترش نیز استریل کردن سوزن کشت نباید فراموش شود.

پس از خشک کردن باید نمونه تثبیت شود (Fixation) تا در طی مراحل مختلف رنگ آمیزی از روی لام شسته نشود. برای تثبیت از دو روش استفاده می‌شود:

(۱) استفاده از فیکساتور شیمیایی مثل الکل متانول (۱۰٪-۷۰٪)

(۲) استفاده از حرارت است به این منظور ۲-۳ بار لام را از روی شعله عبور داده می‌شود بطوریکه اگر پشت دست به لام زده شود احساس گرما شود. گرما نباید خیلی زیاد باشد چون سبب تغییر شکل میکروارگانیسم‌ها و انعقاد پروتوپلاسم باکتری می‌شود. منظور از تثبیت نمونه کشتن میکروارگانیسم‌ها، انعقاد پروتوپلاسم باکتری‌ها و چسپاندن آن‌ها به لام است.

رنگ آمیزی ساده Simple Staining

در این نوع رنگ آمیزی گسترش باکتری فقط با یک نوع رنگ، رنگ آمیزی می‌شود. در رنگ آمیزی ساده استفاده از رنگ‌های بازی با بار + اولویت دارد. چون اسید نوکلئیک و ترکیبات اختصاصی دیواره سلولی باکتری بار منفی دارند و با کروموژن کاتیون پیوند محکم ایجاد می‌کنند.

رنگ‌های مهم مورد استفاده در رنگ آمیزی ساده

(۱) آبی متیلن: ۲-۱ دقیقه و پس از شستشوی گسترش میکروب‌ها آبی دیده می‌شوند.

(۲) کریستال ویوله ۵/۰٪: ۱ دقیقه سپس میکروب‌ها بنفش دیده می‌شوند.

(۳) کربول فوشین: ۳۰ ثانیه تا یک دقیقه سپس میکروب‌ها قرمز دیده می‌شوند.

پس از طی زمان لام با جریان ملایم آب و ترجیحاً غیر مستقیم شسته شده و برای خشک کردن لام‌ها آن‌ها به صورت مایل در جالامی گذاشته شود. سپس زیر میکروکوپ با عدسی ۱۰۰× بررسی می‌شود.

پس از بررسی لام به منظور جلوگیری از آلودگی بهتر است لام‌ها را در ظرف محتوی فنل ۵٪ قرار داده و لام‌های مربوط به مایکو باکتریوم باید نابود شوند.



رنگ آمیزی حیاتی Vital Staining

برای رنگ آمیزی باکتری زنده کاربرد دارد. از رنگ‌های حیاتی استفاده می‌شود که برای باکتری اثر سمی نداشته باشد و حتی حرکت باکتری را متوقف نکند. رنگ‌های کمی‌دارای این خاصیت هستند مثل: قرمز خنثی $\frac{5gr}{1000}$ و سبز متیل $\frac{1gr}{1000}$ و آبی نیلی $\frac{1}{1000}$.

در این روش یک قطره از محلول رنگ مورد نظر را روی لام تمیز ریخته و با نمونه حاوی باکتری مخلوط و به وسیله لامل پوشانده و بررسی می‌شود.

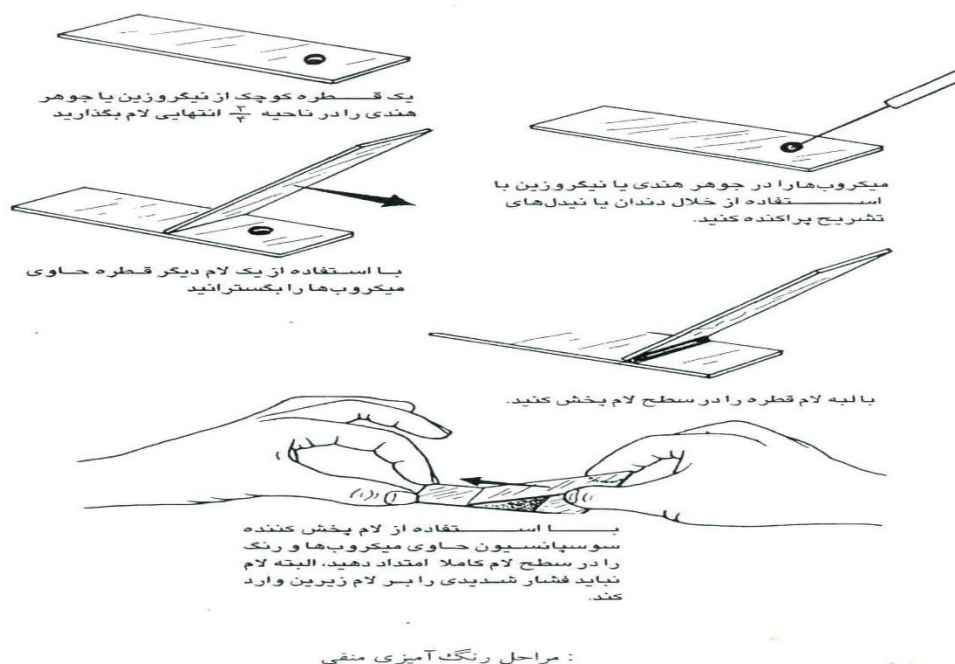
رنگ آمیزی منفی Negative Staining

در این روش از رنگ‌های اسیدی مثل مرکب چین یا نیگروزین استفاده می‌شود که این رنگ‌ها دارای کروموزن با بار منفی هستند و قادر به نفوذ داخل سلول نیستند چون سطح سلول هم منفی است سلول‌های باکتری بدون رنگ در زمینه رنگی دیده می‌شود. در این روش سلول حرارت نمی‌بیند (مرحله تثبیت حذف می‌شود) بنابراین سلول از نظر اندازه و شکل تغییر ندارد و به صورت طبیعی دیده می‌شود.

اسپیروکت‌ها با این روش به خوبی دیده می‌شود. این روش برای دیدن کپسول که به صورت‌هاله‌ای شفاف اطراف میکروارگانیسم دیده می‌شود بسیار مناسب است (برای مشاهده کپسول کریپتوکوکوس نئوفورمنس توصیه می‌شود).

مراحل رنگ آمیزی منفی:

- (۱) یک قطره مرکب پلیکان ۱۷ که بهتر است ۰/۳٪ تری کروزل به آن اضافه شده باشد یا یک قطره نیگروزین در انتهای لام قرار داده شود.
- (۲) یک لوپ پر از باکتری وارد کرده قطره شده کاملاً مخلوط می‌شود.
- (۳) با لام دیگری با زاویه ۴۵ درجه قطره رنگ کاملاً پخش می‌شود.
- (۴) پس از خشک شدن گسترش با عدسی $\times 100$ و استفاده از روغن ایمرسیون بررسی می‌شود.



رنگ آمیزی گرم Germ Staining

رایج‌ترین رنگ آمیزی در باکتری شناسی است. در سال ۱۸۸۶ توسط هانس کریستین گرم دانمارکی ابداع شد. دانشمندی بنام راکس (Roux) از این رنگ آمیزی برای این شناسایی باکتری استفاده کرد اما در طول تاریخ تغییراتی در آن داده شده است و روش‌های مختلفی (بیش از ۱۰۰ نوع) برای انجام این رنگ آمیزی ابداع شده‌اند. این رنگ آمیزی هم روی نمونه‌های بالینی و هم روی نمونه‌های به‌دست آمده از محیط کشت انجام می‌شود.

مراحل رنگ آمیزی گرم کلاسیک

- (۱) تهیه گسترش نازک میکروبی: گسترش نباید ضخیم باشد چون در صورتی که میکروب‌ها روی هم بیفتند احتمال اشتباه در تشخیص وجود دارد. گسترش را داخل فور یا دمای اتاق زیر هود می‌توان خشک نمود.
- (۲) فیکس کردن نمونه: فیکس کردن با الکل متانول و یا حرارت صورت می‌گیرد.
 - A. فیکس کردن با الکل: بیشتر برای نمونه‌های بالینی توصیه می‌شود که به مدت یک دقیقه سطح گسترش با متانول پر شده و پس از یک دقیقه خالی می‌شود. در این روش نیازی به حرارت جهت فیکس کردن نیست.
 - B. فیکس کردن با حرارت: ۲-۳ بار گسترش از روی شعله گذرانده می‌شود. باید مراقب بود تا حرارت بیش از اندازه نباشد چون باعث آسیب به دیواره باکتری‌ها بخصوص گرم مثبت‌ها می‌شود و باعث اشتباه در تشخیص می‌شود. حرارت باعث انعقاد پروتئین‌ها و چسپیدن باکتری به سطح لام می‌شود. باید مراقب بود که برخی از باکتری‌ها از جمله فرم اسپور با حرارت از بین نرفته و احتمال آلودگی وجود دارد بنابراین نباید به لام دست زد.
- (۳) استفاده از رنگ کریستال ویوله ($C_{25}N_3H_{30}Cl$): به عنوان رنگ اولیه به مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه سطح لام با این رنگ پر شده و سپس شستشو با جریان آب ملایم صورت می‌گیرد. همواره قبل از استفاده باید چک کرد که رنگ رسوب نکرده باشد و حد المقذور از رنگ تازه استفاده نمود.
- (۴) استفاده از رنگ ید دار لوگل: این رنگ به عنوان تثبیت کننده به کار می‌رود. مدت زمان لازم برای این کار ۴۵ ثانیه می‌باشد. سپس لام با جریان ملایم آب شسته می‌شود. البته برخی از منابع شستشوی لوگل را توصیه نمی‌کنند.
- (۵) رنگ بری: این مرحله مهم ترین مرحله است و ۱۰-۴۰ ثانیه طول می‌کشد. باید تا آخرین قطره از لام ریخته و لام بی رنگ یا کم رنگ شود. برای این منظور می‌توان از مواد مختلفی استفاده نمود:
- (۶) اتانول ۹۵٪: کندترین رنگ بر می‌باشد.
- (۷) استون: (روش Lillie) سریعترین رنگ بر می‌باشد ولی قابلیت اشتعال دارد لذا موقع کار حتما باید دقت شود.
- (۸) الکل- استون یا اسید- الکل: رنگ بری متوسط دارد که حجم مساوی از الکل اتانول ۹۵٪ با استون مخلوط و در ظروف قهوه ای نگه داری می‌شود.
- (۹) رنگ زمینه (رنگ ثانویه): سافرانین یا فوشین ۱/۰۲-۰٪ به مدت ۳۰-۶۰ ثانیه روی لام ریخته و سپس جریان ملایم آب شستشو می‌شود. برخی از باکتری‌ها مثل هموفیلوس آنفولانزا، یرسینیا پستیس، لژیونلا پنوموفیلا رنگ سافرانین را خوب جذب نمی‌کنند. بنابر این استفاده از فوشین توصیه می‌شود. در مورد برخی باکتری‌های گرم منفی مثل هموفیلوس و کمپلیوباکتر می‌توان از کربول فوشین رقیق استفاده کرد و همچنین مدت زمان استفاده از این رنگ را می‌توان به ۳ دقیقه افزایش داد.

* رمز ترتیب رنگ‌ها = کلاس: کریستال ویوله - لوگل - الکل - سافرانین یا فوشین

پس از رنگ آمیزی و خشک شدن لام‌ها، لام را با عدسی $40\times$ و $100\times$ میکروسکپ نوری بررسی می‌شود. باکتری‌های گرم مثبت به رنگ بنفش و گرم منفی به رنگ صورتی دیده می‌شوند.

مکانیسم رنگ آمیزی گرم

با توجه به این که ضخامت پپتیدوگلیکان جدار باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی می‌باشد از طرف دیگر باکتری گرم منفی در پرده خارجی دیواره خود دارای لیپید است که با الکل استن آسیب می‌بیند لذا در باکتری گرم منفی رنگ اولیه شسته شده و خارج می‌شود و با رنگ زمینه رنگ گرفته و صورتی یا قرمز دیده می‌شود.



نکات مهم در رنگ آمیزی گرم

برخی میکروارگانیسم‌ها را با این روش نمی‌توان رنگ آمیزی نمود که برخی از آن‌ها اشاره می‌شود:

(۱) ارگانسیم‌های داخل سلولی مثل کلامیدیاها و ریکتزیاها به خاطر ماهیت داخل سلولی آن‌ها

(۲) مایکوپلاسماها به خاطر نداشتن دیواره

(۳) تریپونما پالیدوم‌ها و سایر اسپیروکت‌ها به دلیل نازکی بسیار زیاد دیواره

(۴) مایکو باکتریوم‌ها به دلیل وجود چربی و اسید میکولیک در دیواره که اجازه ورود رنگ را نمی‌دهد.

(۵) سلول‌های حیوانی به رنگ گرم منفی دیده می‌شوند.

۶) در نمونه‌های موضعی که گسترش و رنگ آمیزی می‌شود فیبرین و مواد یاخته ای وجود دارد که به رنگ بنفش تیره دیده می‌شود.

۷) زمان سپری شده از کشت (سن) و نوع محیط کشت (وجود مهار کننده‌ها - برات یا آگار) در پاسخ به رنگ آمیزی گرم مهم است. توصیه می‌شود از کلنی‌های تازه که کمتر از ۲۴ ساعت از زمان کشت آن‌ها گذشته و باکتری در زمان رشد لگاریتمی است استفاده شود. چون در کشت‌های کهنه باکتری‌های گرم مثبت به صورت گرم منفی دیده می‌شوند.

۸) پس از مشاهده اسلایدها در ظروف مخصوص Safety Box دفع شوند در صورت تمایل برای نگهداری لام روغن ایمرسیون با محلول گزیلن یا الکل از روی لام شسته شود.

کاربردهای رنگ آمیزی گرم

این رنگ آمیزی به دلیل تشخیص سریع میکروب‌ها بخصوص در تعیین نوع آنتی بیوتیک موثر می‌باشد. باکتری‌های گرم مثبت و منفی از نظر حساسیت به عوامل ضد عفونی کننده متفاوت هستند. به طوری که حساسیت گرم + نسبت به اسید، دترجنت و ید بیشتر از گرم منفی و نسبت به قلیاها و عوامل اکسید کننده مقاوم تر از گرم منفی‌ها هستند.

عواملی که باعث نامناسب بودن اسلایدهای گرم می‌شود

- ۱) لام‌هایی که تمیز نبوده یا چربی زدایی نشده باشند. (از اتانول ۹۵٪ یا گزیلن به این منظور استفاده شود).
- ۲) گسترش خیلی ضخیم.
- ۳) حرارت زیاد موقع تهیه گسترش و فیکس کردن
- ۴) آب کشی زیاد در فرآیند رنگ آمیزی
- ۵) استفاده از کشت‌های کهنه

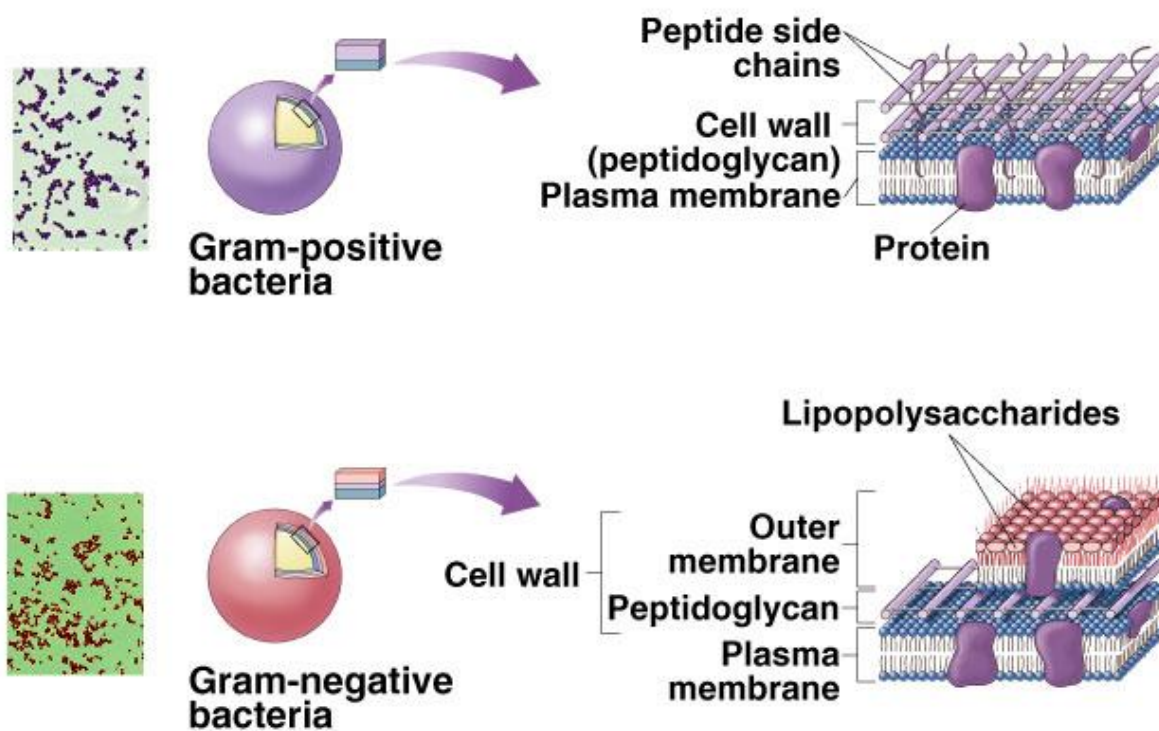
روش‌های دیگر شناسایی باکتری‌های گرم + و گرم -

با استفاده از روش‌های الکتروشیمیایی و با توجه به تفاوت نقطه ایزوالکتریک هم می‌توان گرم مثبت‌ها را از گرم منفی‌ها متمایز کرد.

روش گری - گرسن یا استفاده از پتاس ۳٪

کلنی باکتری در محلول ۳٪ هیدروکسید پتاسیم KOH با لوپ به مدت ۶۰ ثانیه مخلوط می‌شود. سپس لوپ به آرامی از محلول خارج و به طرف بالا کشیده می‌شود. (۰.۵-۲۰۰) اگر ماده چسپناک و کش‌دار باشد گرم منفی و در غیر این صورت گرم + است.

مکانیسم: دیواره گرم منفی در اثر پتاس پاره شده و DNA رها می‌شود که موجب تشکیل محلول چسپناک و غلیظ می‌شود.



رنگ آمیزی زیل نلسون ziehl - nelson

برخی از باکتری‌ها با اینکه در اصل گرم مثبت هستند ولی به دلیل وجود برخی ترکیبات در اختتام دیواره سلولی از جمله وجود مقادیر زیادی چربی و اسید میکولیک گرم مثبت دیده نمی‌شود. این باکتری‌ها به سختی رنگ گرفته و در صورت رنگ گرفتن به سختی رنگ اولیه را از دست می‌دهند. از جمله این باکتری‌ها می‌توان به مایکوباکتریوم‌ها، اکتینومیسیت‌ها و برخی نوکاردیایا (بصورت نسبی) اشاره کرد. این باکتری‌ها را باکتری‌های مقاوم در برابر اسید فست Acid – Fact گویند. این باکتری‌ها به دلیل وجود مقادیر زیادی چربی در برابر اسیدها – قلیاها و ضد عفونی‌ها مقاوم هستند. برای رنگ آمیزی این باکتری‌ها نیاز به استفاده از حرارت و همچنین رنگ‌های غلیظ که دارای گرایش قوی به سلول این باکتری‌ها باشند، می‌باشد. ایده رنگ آمیزی مایکوباکتریوم‌ها توسط پل ارلیش ۱۸۸۲ بنا نهاده شد که بعدها زیل و نلسون آنرا تکمیل کردند.

این رنگ آمیزی به دو صورت گرم و سرد صورت می‌گیرد.

زیل نلسون گرم

(۱) ایجاد گسترش از باکتری و ثابت کردن آن با حرارت (لام مصرفی باید کاملاً تمیز باشد و بهتر است گسترش کمی ضخیم تر تهیه شود). در صورتیکه گسترش از مایکوباکتریوم‌ها تهیه می‌شود باید نهایت دقت را انجام داد و برای فیکس کردن از Hot plat 80°C به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شود.

(۲) پوشاندن سطح لام با فوشین غلیظ (از کرپول فوشین استفاده می‌شود که ۱۰ برابر غلیظ تر از فوشین معمولی است) و حرارت آب جوش یا حرارت معمولی به مدت ۵-۶ دقیقه داده شود ولی نباید اجازه داد رنگ جوشیده و خشک شود (فقط باید بخار از روی لام بلند شود و در صورت کم شدن رنگ باید اضافه شود)، سپس لام شسته شود. بهتر است شستشو با آب مقطر باشد چون آب لوله ممکن است حاوی باکتری اسید فست باشد. (بعد از این مرحله بهتر است لام بعد از شستشو با آب ۵ دقیقه در هوای آزاد بماند).

(۳) روی گسترش بمدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه اسید الکل ۳٪ ریخته می‌شود، تا عمل رنگبری صورت گیرد می‌توان از اسید سولفوریک ۱٪ تا ۵٪ هم به مدت ۱ تا ۲ دقیقه استفاده کرد. (بخصوص در مورد نوکاردیا). الکل باعث از بین رفتن مایکوباکتریوم‌های ساپروفیت مثل مایکوباکتریوم سمگماتیس M. Smegmatis می‌شود. در برخی منابع توصیه شده است که لام پس از شستشو با آب ۵ دقیقه در هوای آزاد بماند.

(۴) رنگ زمینه متیلن بلو ۱٪ به مدت ۶۰ - ۱۲۰ ثانیه اضافه شده سپس لام با جریان ملایم آب شسته شده با کاغذ خشک کن یا عمودی قرار دادن خشک شود و در زیر میکروسکوپ با عدسی ۱۰۰× بررسی شود. (می‌توان از مالاشیت گرین هم استفاده کرد) در این رنگ آمیزی مایکوباکتریوم‌های تیپیک بصورت توده Plamb دیده می‌شوند در حالیکه مایکوباکتریوم‌های آتیپیک بصورت تکی و بزرگتر هستند.

رنگ آمیزی کرپول فوشین کینیون

Kenyon ابداع کننده این روش بود اصطلاحاً به آن رنگ آمیزی زیل نلسون سرد هم گفته می‌شود.

روش کار :

(۱) رنگ کرپول فوشین غلیظ بمدت ۳ - ۵ دقیقه بدون حرارت رووی لام ریخته شده سپس لام شسته شود تا رنگ خارج شود.

(۲) استفاده از اسید الکل یا اسید سولفوریک جهت رنگ بری سپس شستشو و خارج کردن آن با آب. اگر گسترش ضخیم بود به مدت بیشتر از رنگ بر استفاده شود.

(۳) استفاده از رنگ زمینه متیلن بلو به مدت ۲ دقیقه و سپس شستشوی لام و خشک کردن.

(۴) مشاهده با عدسی روغنی $100\times$

در هر دو روش فوق زمینه و سایر باکتری‌ها آبی و باکتری اسید فست قرمز دیده می‌شود.

تذکر:

اگر از رنگ سبز درخشان بعنوان رنگ زمینه استفاده گردد زمینه سبز دیده می‌شود. اگر از اسیدپیکریک بعنوان رنگ زمینه استفاده شود زمینه زرد دیده می‌شود که مخصوصا افراد کور رنگ است.

تذکر : در لام‌های بالینی اگر باکتری اسید فست دیده نشود بصورت NO-AFB گزارش می‌شود نه منفی

نحوه ساخت کربول فوشین Carbolufuschin :

محلول فوشین بازیک : ۰,۳ گرم فوشین بازیک در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ حل شود.

محلول فنل: ۵ گرم فنل کریستاله کمی گرم شود تا ذوب گردد سپس با آب مقطر حجم به ۹۰ میلی‌لیتر رسانده شود. سپس ۱۰ میلی‌لیتر محلول فوشین بازیک به ۹۰ میلی‌لیتر از محلول فنل اضافه شود.

متیلن بلو: ۰/۳ گرم آبی متیلن در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شود.

اسید الکل ۳٪ = الکل ۹۵٪ (۹۷ میلی‌لیتر) + اسید کلریدریک ۳٪ یا اسید نیتریک ۲/۵٪ (۳ میلی‌لیتر)

(بایستی اسید به الکل اضافه شود و نه بر عکس)

برای مشاهده مایکوباکتریوم‌ها از میکروسکوپ فلورسنت و روش رنگ آمیزی فلوروکروم هم استفاده می‌شود در این روش از اورامین یا رد امین یا مخلوط از هر دو استفاده می‌شود که ۲ ماده فلورسنت هستند که با اسید میکولیک موجود در دیواره باکتری ترکیب می‌شود و خاصیت فلورسنت به باکتری می‌دهد.

اسپور باکتری‌ها و رنگ آمیزی آن

برخی از باکتری‌ها مثل کلسترییدیوم‌ها ، باسیلوس و اسپورولاکتوباسیلوس‌ها در شرایط نامساعد از نظر محیطی و فیزیولوژیکی مثل کمبود مواد غذایی یا قرار گرفتن در معرض مواد ضد عفونی کننده شیمیایی و همچنین حرارت اسپور تولید می‌کنند که فرم مقاوم باکتری است. در خصوص ساختمان‌هاگ‌ها در مبحث نظری بحث شده است.

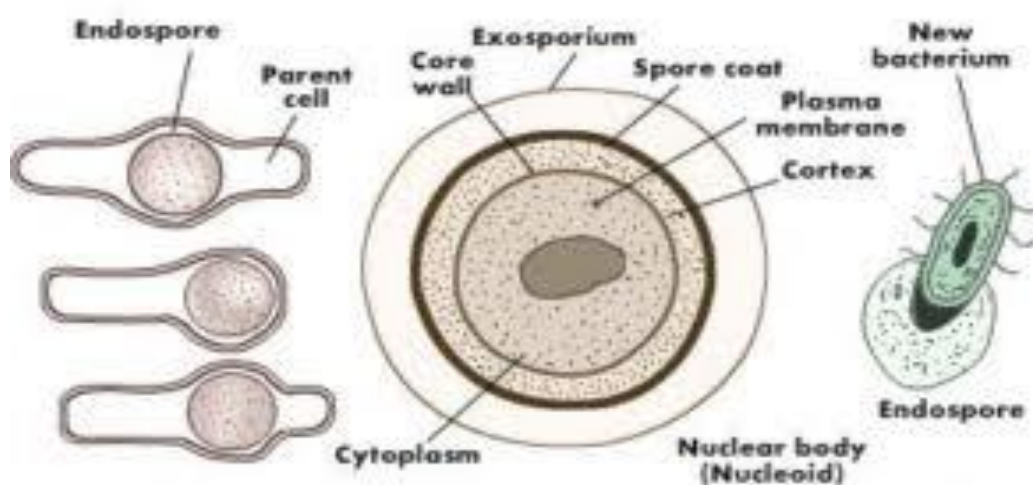
اسپور یا هاگ‌هایی را که در داخل ساختمان باکتری هستند آندوسپور و آنهایی را که خارج ساختمان باکتری هستند اگزوسپوز گویند. (از هر باکتری یک اسپوز وجود می‌آید و وقتی شرایط مساعد شود همان اسپور به یک باکتری رویشی تبدیل می‌شود). این تشکیلات را با میکروسکوپ الکترونی می‌توان مشاهده کرد. همچنین می‌توان از میکروسکوپ فاز کنتراست استفاده کرد که آندوسپور بصورت ساختمان سفید کلفت در داخل سلول دیده می‌شود.

دیدن اسپور با رنگ آمیزی‌های معمولی کمی سخت است و نیاز به رنگ آمیزی‌های خاص دارد چون اسپور در برابر رنگ آمیزی مقاومت نشان می‌دهد و بعد از یک بار رنگ شدن هم به سختی رنگ خود را از دست داده و رنگ زمینه را می‌پذیرد. شکل و محل قرار گیری اسپور بسته به نوع باکتری متفاوت بوده و در تشخیص باکتری کمک کننده است . همچنین گاه قطر اسپور از قطر باکتری بیشتر بوده و باعث برجستگی باکتری می‌شود .

برخی از اشکال اسپور باکتری عبارتند از :

- متورم انتهایی Terminal swollen: کلستریديوم تتانی
- مرکزی Central: باسیلوس پلی میکسوس
- مرکزی متورم Central swollen: کلستریديوم پرفرژنس
- نزدیک به انتها متورم Subterminal swollen:

روش‌های مختلفی برای رنگ آمیزی و مشاهده آندوسپورها وجود دارد که به برخی از آنها اشاره می‌گردد. شایان ذکر است که برای دیدن اسپور بهتر است از کشت کهنه باکتری (بیش از ۷۲ ساعت) استفاده شود.



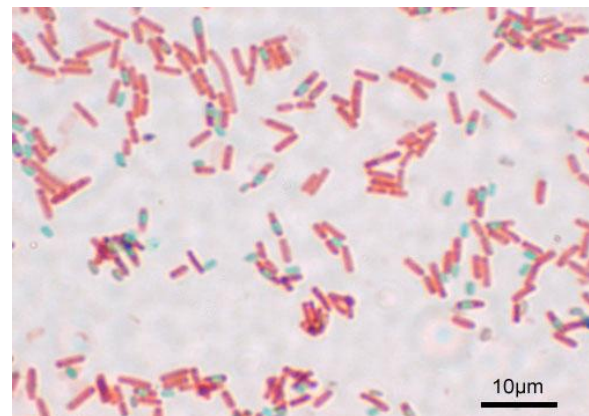
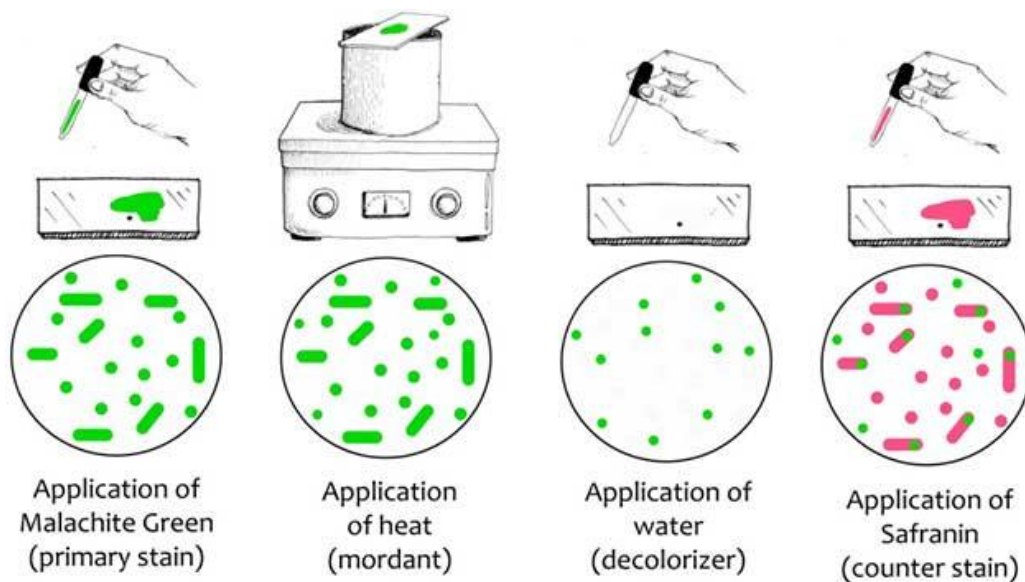
روش دورنر Dorner method

- (۱) سوسپانسیون غلیظ باکتریایی در ۵ قطره آب مقطر استریل در لوله آزمایش مخلوط گردد.
 - (۲) هم حجم سوسپانسیون میکروبی، کربول فوشین تازه تهیه شده افزوده و ۵ الی ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار گیرد.
 - (۳) از سوسپانسیون حاصل ۱ لوپ برداشته روی لام گذاشته ۱ لوپ هم نیگروزین ۱۰٪ اضافه و گسترش تهیه کرده و به سرعت خشک شود. نیگروزن هم به عنوان رنگ منفی و هم به عنوان بی‌رنگ کننده به کار می‌رود.
 - (۴) با عدسی روغنی $\times 100$ نمونه بررسی شود.
- در این روش آندوسپورها به رنگ قرمز سلول‌های جوان بی رنگ و زمینه سیاه یا خاکستری دیده می‌شود.
- نکته: بهتر است کشت خیلی کهنه نباشد چون باکتری‌ها تماماً به اسپور تبدیل شده و کاملاً واضح دیده نمی‌شوند.

روش فولتون و شافر Schaeffer – Fulton

این روش شبیه روش رایتزکونکلین می‌باشد.

- (۱) گسترشی نازک از باکتری تهیه کرده بعد از خشک شدن با حرارت تثبیت می‌شود.
 - (۲) سطح لام با مالاشیت گرین ۵٪ پوشانده شده و بمدت ۵ دقیقه حرارت بخار آب داده می‌شود. (استفاده از حرارت به منظور نفوذ دادن رنگ به داخل‌هاگ باکتری است.) باید سعی شود رنگ نجوشد و به محض بلند شدن بخار و کم شدن رنگ، رنگ اضافه شود. می‌توان در این مرحله از مالاشیت گرین غلیظ ۱۰٪ بدون حرارت استفاده کرد.
 - (۳) سپس گسترش به آرامی با آب شسته شود.
 - (۴) به مدت ۳۰ ثانیه با سافرانین ۰٫۵٪ رنگ شود و سپس با آب شسته و خشک شود.
 - (۵) با عدسی ۱۰۰× نمونه بررسی شود.
- در این روش اسپورها سبز و بقیه سلول‌ها به رنگ قرمز در می‌آید.



روش اسید فست یا مولر Mueller

(۱) بعد از تهیه گسترش از باکتری و ثابت کردن آن، روی آن کربول فوشین (فوشین غلیظ) ریخته ۵ دقیقه حرارت داده شود تا بخار متصاعد شود ولی باید سعی کرد، رنگ نجوشد سپس با آب شستشو داده شود.

(۲) به مدت ۱-۳ دقیقه اتانول یا اسید سولفوریک ۵/۰٪ روی لام ریخته شود تا رنگ لام رفته و بعد از این مدت لام قرمز کم رنگ تر می‌شود. سپس با آب شستشو شود.

(۳) متیلن بلو ۱٪ روی لام ریخته به مدت ۱-۳ دقیقه صبر می‌شود سپس لام شسته و با عدسی ۱۰۰٪ بررسی می‌شود

در این روش میکروارگانسیم آبی و اسپور قرمز دیده می‌شود.

کپسول باکتری‌ها و رنگ آمیزی capsule stains

در خارج از دیواره برخی از باکتری‌ها اعم از گرم مثبت یا گرم منفی و... مایکوپلازما لایه‌ای متمرکز وجود دارد. هنگامی که این پلیمر خارج سلولی بصورت تراکم و دارای حد وضوح مشخص است آن را کپسول می‌نامند. در مواقعی که ماده مذکور متراکم نبوده و بصورت الیاف درهم و تا حدودی گسسته است به آن گلیکوکالیس گویند (مثلا در استرپتوکوکوس موتانس). در برخی باکتری‌ها مقدار زیادی از ماده فوق ساخته می‌شود که ظاهرا از سلول جدا شده و به نظر می‌رسد باکتری در آن فرو رفته است که چنین مواردی را قشر لعابی slime layer یا لایه S گویند که عمدتا در باکتری‌های محیطی دیده می‌شود.

جنس کپسول در اکثر موارد پلی ساکارید است ولی در باسیلوس آنتراسیس جنس آن پلی‌پپتید است. در باسیلوس مگاتریوم کپسول ترکیبی از پلی ساکارید و پلی پپتید می‌باشد. کپسول لکونوستیک مزانتروئیدی^۱ (جز لاکتوباسیل بی‌هوازی) از جنس دکستران می‌باشد.

کپسول تحت شرایط نامساعد محیطی مثل خشک شدن، باکتری را حفظ می‌کند. همچنین به عنوان لایه محافظ باکتری بخصوص در برابر عمل بیگانه‌خواری عمل کرده، در بیماری‌زایی هم نقش اساسی دارد و باعث چسبیدن باکتری به سطح سلول میزبان می‌شود (مثل چسبیدن استرپتوکوکوس موتانس به مینای دندان)

نوع محیط رشد باکتری در پیدایش و رشد کپسول نقش دارد به‌طوری‌که برخی باکتری‌ها در شرایط داخل بدن *In vivo* کپسول دارند ولی در شرایط آزمایشگاهی *Invitro* فاقد کپسول هستند.

پیدایش و رشد کپسول در محیط‌های حاوی پروتئین حیوانی افزایش می‌یابد. به همین دلیل برای دیدن کپسول توصیه شده به محیط‌های کشت خون یا شیر اضافه شود.

کپسول در برخی از باکتری‌ها بسیار باریک است و به سختی قابل رویت یا میکروسکوپ نوری می‌باشد که به آن میکروکپسول گویند. (مثل بروسلا) کپسول خاصیت آنتی ژنی دارد که آنتی ژن دارد که آنتی ژن‌های کپسول را K گویند که از کلمه kapsul که آلمانی است گرفته شده است.

اندازه کپسول به محیطی که در آن رشد داده می‌شود بستگی دارد مثلا در محیط تریپوزفسفات آگار بزرگتر می‌شود.

رنگ آمیزی‌های اختصاصی کپسول

^۱*Leuconostoc mesentrioieds*

روش Duegid یا مرکب چین (نوعی رنگ آمیزی منفی است).

- (۱) یک قطره مرکب چینی Indian ink را وسط لام قرار داده مقداری از باکتری را در آن حل کرده سپس به آرامی یک لامل روی آن گذاشته شود. نباید به لامل فشار آورد چون کپسول آسیب می بیند.
 - (۲) با عدسی $\times 100$ و استفاده از روغن امیرسیون سطح لام بررسی گردد.
- در این عمل باید به شدت نور کاهش داد و کندانسور پایین آورده شود. در این روش باکتری سیاه رنگ و کپسول بصورت شفاف در زمینه سیاه رنگ دیده می شود

رنگ آمیزی با نیگروزین ۱۰٪ روش Butt:

- (محلول نیگروزین با آب ولرم تهیه پس از فیلتر کردن 0.5% فرمالین اضافه می شود).
- (۱) یک قطره نیگروزین 10% روی لام گذاشته یک لوپ از باکتری در آن داخل حل می شود. سپس با لام دیگری گسترش ضخیم تهیه می شود. (اگر محیط جامد بود مقداری مساوی مرکب چینی و سرم فیزیولوژی مخلوط می کنیم).
 - (۲) پس از خشک شدن گسترش به مدت ۱ دقیقه کریستال ویوله روی لام ریخته می شود. البته می توان با ریختن متیل الکل روی گسترش آن را فیکس کرد و سپس کریستال ویوله افزود (۱۵ ثانیه) یا می توان از متیلن بلو لوفلر به مدت ۳ دقیقه استفاده کرد. (متیلن بلو لوفلر از متیلن بلو 0.3% گرم و اتانول 95% سی سی و آب مقطر 100 سی سی تشکیل می شود).
- در این روش باکتری سیاه رنگ و کپسول بصورت آبی شفاف در زمینه سیاه رنگ دیده می شود
- همچنین می توان به جای نیگروزین از قرمز گنگو استفاده کرد که در این صورت کپسول بی رنگ در زمینه تیره و باکتری قرمز دیده می شود.
- روش های فوق بخصوص برای دیدن کپسول کریپتوکوکوس نئوفورنس که نوعی قارچ است هم بسیار با ارزش می باشند.

روش آنتونی Antony method

- (۱) ابتدا باکتری در محیط شیر تورنوسل دار Litmus milk کشت شود سپس لام تهیه و خشک شود در این روش نیازی به ثابت کردن با حرارت نیست. در صورتی که بذر باکتری از محیط جامد بر داشته شود می توان روی لام یک قطره شیر بدون چربی گذاشته و باکتری را در آن حل و گسترش تهیه کرد.
 - (۲) کریستاله ویوله 1% بمدت ۱۰ دقیقه روی لام و گسترش ریخته شود.
 - (۳) بعد از مدت با استفاده از سولفات مس 20% لام شستشو داده شود که سولفات مس هم به عنوان رنگ بر و هم رنگ مخالف و زمینه عمل می کند. لام در وضعیت عمودی قرار داده شود تا در حرارت اتاق خشک شود. این کار برای این است که کریستال های مس روی لام رسوب نکنند.
 - (۴) با عدسی $\times 100$ زیر میکروسکوپ مشاهده شود.
- کپسول آبی بسیار کم رنگ و آبی پر رنگ دیده می شود.

روش هیس Hiss method

- (۱) در این روش گسترش تهیه شده با حرارت فیکس می‌شود
- (۲) کریستال ویوله روی لام ریخته شده و بمدت ۱ دقیقه حرارت بخار آب داده شود .
- (۳) با سولفات مس ۲۰٪ لام شستشو داده شود.
- کپسول آبی کم رنگ در اطراف باکتری که آبی پر رنگ یا ارغوانی است دیده می‌شود.

روش استفاده از رنگ دندانیه یا روش مویر Muir Method

- (۱) بعد از تهیه گسترش از باکتری روی آن کاغذ صافی قرار داده و روی کاغذ صافی کربول فوشین غلیظ زیل نلسون اضافه کرده لام به مدت ۲ دقیقه حرارت داده می‌شود تا بخار از آن متصاعد شود.
- (۲) با اتانول ۹۵٪ و پس از آن با آب لام شسته شود.
- (۳) رنگ دندانیه بمدت ۶۰ – ۳۰ ثانیه اضافه شود.
- (۴) دوباره لام با اتانول شسته شود تا گسترش بصورتی دیده شود و سپس با آب شسته شود.
- (۵) با آبی متیلن ۰٫۳٪ به مدت ۳۰ ثانیه سطح لام پوشانده شود
- (۶) لام با آب شسته شده و پس از خشک شدن با عدسی ۱۰۰ X بررسی شود.
- باکتری قرمز رنگ و کپسول به رنگ آبی مشاهده می‌شود.

روش تهیه محلول muir یا رنگ دندانیه

۲۰ ml اسید تانیک ۲۰٪ + ۲۰ ml کلرید نقره یا کلرید جیوه ۷٪ اشباع شده + ۵۰ پتاسیم **آلوم** (آلومینیوم پتاسیم سولفات) + ۵۰ میلی لیتر آلوم ۱۲٪ اشباع شده.

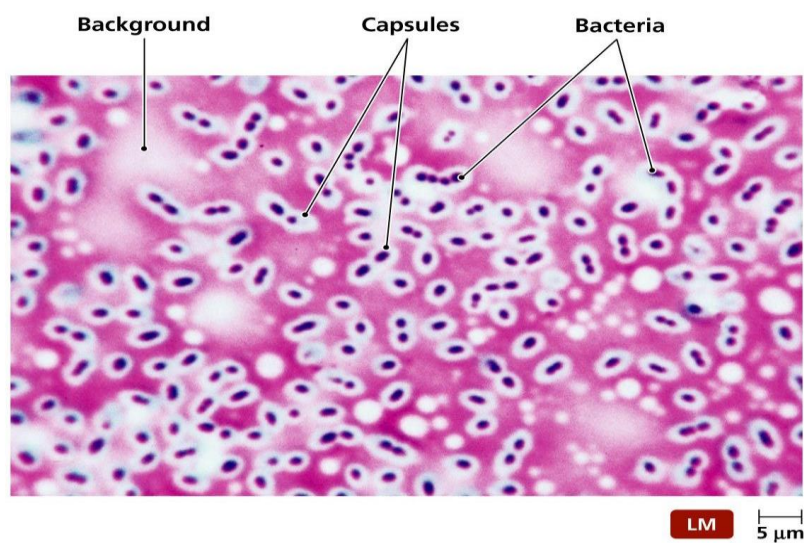
آزمایش بادکردگی کپسول یا آزمایش کولانگ (Quellung Reaction = Capsul Swelling Test)

- (۱) یک قطره از ماده مورد آزمایش (نخاع یا خلط یا شیرابه کشت جوان باکتری) روی لام تمیز قرار داده شود .
- (۲) یک قطره آنتی سرم و یک قطره رنگ متیلن بلو در مجاورت شیرابه باکتری گذاشته شود.
- (۳) با اپلیکاتور قطره رنگ و ارگانیسیم مخلوط و سپس آنتی سرم با آن مخلوط گردد.
- (۴) سطح مخلوط با لامل پوشانده ۱۰-۱۵ دقیقه بعد از آن ، با عدسی ۱۰۰ X بررسی شود. اگر نتیجه منفی بود ۱۰-۱۵ دقیقه دیگر آزمایش تکرار شود.
- (۵) کپسول متورم و حجیم شده و قابل رویت می‌شود.

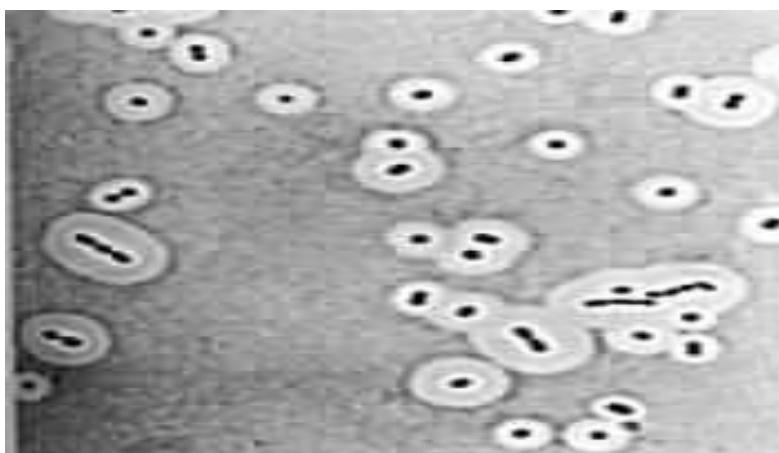
تذکره: در صورتیکه از کشت سلول استفاده می‌شود باید میزان باکتری برداشت شده کم باشد (کمتر از ۵۰ میکروارگانیسم در هر حیوان) چون اگر زیاد باشد نمی‌توان تورم کپسول را مشاهده کرد.

تذکره ۲: اگر آنتی سرم اختصاصی باشد در مقایسه با آنتی سرم هتروژن میزان قابل ملاحظه‌ای کپسول باکتری متورم و حجیم خواهد بود.

این آزمایش برای تشخیص کپسول در هموفیلوس آنفلوآنزا، کلبسیلاپنومونیه، نایسریا مننژیدیتیس مناسب است.



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



رنگ آمیزی دانه‌های ذخیره‌ای

دانه‌های ولوتین یا متاکروماتیک در سیتوپلاسم برخی از باکتری‌ها از جمله کورینه باکتریوم‌ها و دیفتروئیدها دیده می‌شوند. این دانه‌ها از پلی فسفات و تعداد قابل توجهی اسید ریبونوکلیک ، لیپید و پروتئین تشکیل شده است. نقش آن‌ها کاملاً شناخته نشده است ولی به عنوان منبع ذخیره انرژی به کار می‌روند. دانه‌های ولوتین میل ترکیبی شدید به رنگ‌های بازی دارند. کلمه متاکروماتیک از متاکرومازی به معنی تغییر رنگ گرفته شده است.

این دانه‌ها اکثراً در کشت‌های کهنه (بیش از ۷۲ ساعت از زمان کشت گذشته باشد) و قبل از شروع فقر غذایی دیده می‌شوند. البته در کورینه باکتریوم دیفتریه در کشت جوان هم می‌توان آن‌ها را دید. برای مشاهده بهتر دانه‌های ذخیره‌ای بهتر است باکتری در محیط لوفلر یا تلوریت کشت داده شود.

روش رنگ آمیزی آلبرت یا تغییر یافته کریستین سن:

- الف) گسترش نازکی از باکتری تهیه پس از خشک شدن در معرض هوا با حرارت فیکس شود.
 - ب) سطح لام با رنگ آلبرت به مدت ۳ تا ۵ دقیقه پوشانده شده سپس با جریان ملایم آب شسته شود.
 - ج) سطح لام با لوگل به مدت ۱ تا ۲ دقیقه پوشانده شده و سپس با جریان ملایم آب شسته شود.
 - د) سطح لام با مالاشیت گرین ۰.۲٪ به مدت یک دقیقه پوشانده شده، سپس با جریان ملایم آب شسته شود.
 - ه) پس از خشک شدن لام با عدسی ۱۰۰ میکروسکوپ بررسی شود.
- در این روش باکتری‌ها به رنگ سبز و گرانول‌ها به رنگ آبی تا سیاه دیده می‌شوند.

روش رنگ آمیزی نایسر:

- الف) گسترش نازکی از باکتری تهیه در معرض هوا خشک و سپس با حرارت فیکس شود.
 - ب) سطح لام با متیلن بلوی نایسر به مدت ۳ دقیقه پوشانده شود.
 - ج) روی لام لوگل رقیق شده (۰/۱) به مدت یک دقیقه ریخته شده و سپس با جریان ملایم آب شسته شود.
 - د) روی سطح لام رنگ نوترال رد به مدت ۳ دقیقه ریخته شده و سپس شسته شود.
- در این روش باکتری به رنگ صورتی تا قهوه‌ای روشن و گرانول‌ها به رنگ آبی تیره دیده می‌شوند.

طرز تهیه رنگ آلبرت:

آبی تولوئیدین ۰/۱۵ گرم – مالاشیت گرین ۰/۲ گرم – اسید استیک گلاسیال ۱ میلی لیتر – الکل اتیلیک ۹۵٪ ۲ میلی لیتر – آب مقطر ۱۰۰ میلی لیتر

. مالاشیت گرین در الکل حل شده و آبی تولوئیدین به ترکیب اضافه و با هاون سابیده شود سپس اسید استیک به آب مقطر اضافه شود و به آرامی به ترکیب اضافه شود.

طرز تهیه رنگ نایسر:

۰/۱ گرم متیلن بلو در هاون ریخته شده و ۲ میلی لیتر الکل ۹۶٪ به آن اضافه و سابیده شود. سپس ۵ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال با ۹۵ میلی لیتر آب مقطر مخلوط و به تدریج به محلول اول اضافه شود.

بررسی حرکت در باکتری‌ها

Bacteria Motility Test

برخی از باکتری‌ها متحرک و برخی دیگر غیر متحرک هستند. از این پدیده در شناسایی و تفریق باکتری‌ها از هم استفاده می‌شود. حرکت در باکتری‌ها توسط تاژک‌ها صورت می‌گیرد. اسپروکت‌ها با الیاف محوری و تاژک داخلی Endoflagella حرکت می‌کنند. حرکت در میکسوباکتری‌ها و باکتری‌های سبز آبی با روش لغزیدن Gliding صورت می‌گیرد، که سلول‌ها در تماس با سطح جامد انجام می‌دهند.

تاژک (فلاژل) باکتری‌ها زوائد نخ ماندنی هستند که جنس آن‌ها منحصرًا از پروتئینی بنام فلاژلین است و در باکتری‌های متحرک دیده می‌شوند. ضخامت تاژک ۳۰-۱۲ نانومتر است. تاژک‌ها جز اجزاء ثابت باکتری‌ها نیستند و تولید آن‌ها تحت کنترل دمای محیط، مواد غذایی موجود در محیط رشد باکتری و مرحله رشد باکتری می‌باشد.

حلال‌های آلی، pH اسیدی، دمای بالای ۶۰ درجه سانتی‌گراد می‌توانند باعث دپلیمریزه شدن تاژک و از بین رفتن آن شوند.

تعداد فلاژل‌ها و محل قرار گرفتن آنها در باکتری‌های مختلف، متفاوت است و به چند صورت دیده می‌شود که در طبقه بندی باکتری‌ها حائز اهمیت بوده و به وسیله آن می‌توان باکتری‌های مختلف را از همدیگر جدا نمود.

تاژک مونوتریش (Monotrichous): یک تاژک در یک قطب باکتری قرار می‌گیرد. مثل باکتری سودوموناس / ائروژینوزا

تاژک لوفوتریش (Lophotrichous): دسته ای از تاژک‌ها در یک قطب باکتری قرار می‌گیرد. مانند باکتری هلیکوباکتر پیلوری

تاژک آمفی تریش (Amphitrichous): در هر قطب یک تاژک یا یک دسته تاژک قرار می‌گیرد. مانند باکتری لیستریا مونوسایتوژنز

تاژک پری تریش (Peritrichous): تاژک‌های متعدد در اطراف باکتری قرار می‌گیرد. مثل باکتری / شرشیا کلی یا پروتئوس و لگاریس

حرکت باکتری‌ها را به روش‌های مختلف شامل: استفاده از میکروسکوپ الکترونی، میکروسکوپ زمینه تاریک، کشت نیمه جامد SIM، و روش قطره معلق می‌توان بررسی کرد.

برخی از باکتری‌ها مثل پروتئوس میرابلیس به شدت متحرک هستند و حتی در محیط جامد نیز حرکت می‌کنند که به این پدیده سوارمینگ Swarming گفته می‌شود.

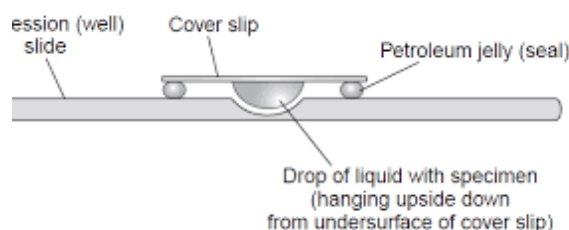
حرارت محیط در حرکت باکتری نقش مهمی دارد به طوری که برخی باکتری‌ها مثل لیستریا منوسیتوژنز و یرسینیا اینتریکولتیکا در ۳۷ درجه سانتی‌گراد بی‌حرکت ولی در ۲۵ درجه سانتی‌گراد متحرک هستند

روش قطره معلق Hanging drop

در این آزمایش از کشت جوان باکتری (۶ تا ۲۴ ساعته) که در حرارت ۳۵ درجه سانتی‌گراد ترجیحاً در محیط مایع تکثیر شده است یک قطره کوچک حاوی رقت مناسب از باکتری انتخاب و وسط لامل گذاشته شده سپس در هر چهار گوشه لامل وازلین گذاشته لام گوده دار Cavity Slide روی آن قرار داده شود، طوریکه قطره درست در وسط گودی لام قرار گیرد. سپس لام

و لامل سریعا برگردانده شود تا لامل در قسمت بالا قرار گیرد و با عدسی $40\times$ و سپس ، عدسی روغنی بررسی شود. باکتری ها معمولا در لبه قطره دیده می شود. برای بررسی نمونه باید دیافراگم بسته شده، کندانسور پائین آورده شده و از نور کم استفاده شود.

- این حرکت را از حرکت براونی Brownian باکتری ها باید تفریق نمود.
- حرکت براونی: جنبش نامنظم باکتری در محیط مایع است که باکتری ها به وسیله مولکول های محلول جابجا می شوند در واقع باکتری در محل خود می جهد و مکان خود را نسبت به سایر میکروارگانیسمها تغییر نمی دهد.
- در مورد باکتری بی هوازی بهتر است از محیط تیوگلیکولات نمونه ، جهت قطره معلق تهیه شود.
- در صورت نداشتن لام گوده دار می توان با خمیر بازی روی لام معمولی گوده درست کرد.

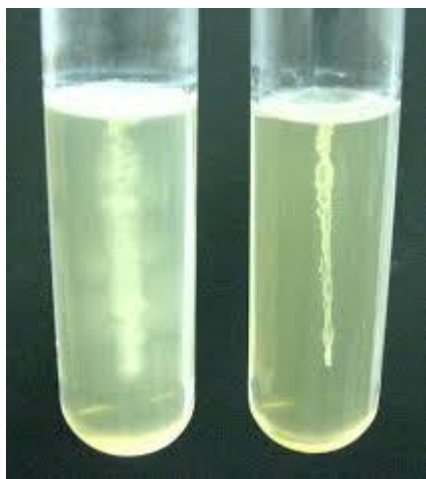


بررسی حرکت باکتری ها با استفاده از محیط SIM

SIM محیطی نیمه جامد می باشد که در لوله آزمایش تهیه شده و به منظور بررسی حرکت ، باکتری بوسیله آنس در عمق محیط کشت داده شده و در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه می گردد ، اگر باکتری متحرک باشد در تمام محیط کشت انتشار می یابد ولی چنانکه باکتری بی حرکت باشد فقط در مسیر ورود آنس رشد می یابد.

تذکر:

✓ همانطور که پیش تر گفته شد حرارت محیط در حرکت باکتری نقش مهمی دارد به طوری که برخی باکتری ها مثل *لیستریا منوسیتوژنز* و *یرسینیا / اینتروکولتیکا* در ۳۷ درجه سانتی گراد بی حرکت ولی در ۲۵ درجه سانتی گراد متحرک هستند. در صورت شک به متحرک بودن باکتری در حرارت پائین تر یا احتمال آلودگی نمونه با باکتری های فوق الذکر بایستی ۲ کشت همزمان از نمونه تهیه شده یک نمونه در ۳۷ درجه سانتی گراد و دیگری در ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه گردد.



بررسی حرکت باکتری در محیط SIM لوله سمت راست باکتری غیرمتحرک و سمت چپ باکتری متحرک

تاژک و روش‌های رنگ آمیزی آن

Flagella Staining Tests

با توجه به ضخامت کم تاژک مشاهده تاژک با میکروسکوپ نوری و با استفاده از رنگ آمیزی‌های معمول ناممکن است و برای مشاهده آن باید از روش‌هایی استفاده شود که قطر تاژک افزایش یابد که اصطلاحاً به این نوع رنگ آمیزی، رنگ آمیزی دندانیه گفته یا موردانت می‌شود. تاژک علاوه از نازک بودن شکننده هم می‌باشد و رنگ آمیزی آن نیاز به مهارت و حوصله دارد. برای مشاهده تاژک باید باکتری را در محیطی کشت داد تا قدرت تولید تاژک را داشته باشد. محیط‌های کشت غنی شده مثل آگار خون دار از محیط‌های مناسب جهت این کار می‌باشند.

برای رنگ آمیزی تاژک باید از لام کاملاً تمیز و عاری از چربی استفاده شود و حتی توصیه می‌شود لام‌ها جهت جلوگیری از چرب شدن با دست گرفته نشود. برای تهیه لام مناسب توصیه می‌شود لام‌ها در اسید کلریدریک ۳٪ و سپس اتانول ۹۵٪ قرار داده شده و سپس با آب مقطر شسته و در هوای اتاق خشک گردند. قبل از استفاده بهتر است لام روی شعله قرار گیرد تا هر گونه ناخالصی روی آن بسوزد.

روش‌های مختلفی برای رنگ آمیزی تاژک ابداع شده که هر کدام از آن‌ها رنگ دندانیه مخصوص به خود دارند و در زیر به برخی از آنها اشاره می‌شود.

رنگ آمیزی تاژک با روش گری Grey :

۱ - به آرامی گسترش ضخیمی از کشت ۲۴-۱۸ ساعته باکتری روی لام عاری از چربی تهیه شده و در حرارت آزمایشگاه خشک گردد.

۲- بدون ثابت نمودن گسترش به مدت ۱۰ دقیقه با محلول دندان (شامل پتاسیم آلوم، اسید تانیک و کلرید جیوه) پوشانده شده و سپس با آب مقطر و به آرامی لام شسته شود.

۳- گسترش با رنگ کربول فوشین زیل نلسون به مدت ۱۰ دقیقه پوشانده شود. سپس لام با آب مقطر به آرامی شسته شده و در هوای آزمایشگاه خشک شده و با عدسی ۱۰۰ و روغن ایمرسیون در زیر میکروسکوپ بررسی و مشاهده شود.

برای تهیه محلول دندان دو محلول ذیل باهم مخلوط گردد:

محلول الف: این محلول حاوی ۵ میلی لیتر محلول آبکی اشباع پتاسیم آلوم، ۲ میلی لیتر محلول آبکی و اشباع کلرید مرکوریوم و ۲ میلی لیتر محلول آبکی اسید تانیک

محلول ب: این محلول حاوی ۱۰ میلی لیتر الکل متانول و ۱۰ میلی لیتر فوشین بازیک ۱۰٪



رنگ آمیزی تازک به روش :

در این روش ابتدا دو محلول با ترکیب زیر تهیه می شود:

محلول الف : ۰/۶ گرم فوشین قلیایی به ۵۰ میلی لیتر الکل اتیلیک افزوده شده و در سطح یک همزن الکتریکی به مدت ۱۲ ساعت قرار داده شود تا فوشین کاملاً حل شود.

محلول ب: ۰/۳۷ گرم کلرید سدیم و ۰/۷۵ گرم اسید تانیک در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل شود.

این دو محلول مخلوط و pH با سود نرمال به ۵ رسانده شود. محلول در ظرفی با جدار قهوه‌ای رنگ ریخته شده و قبل از مصرف ۳ روز در یخچال نگهداری شود. این محلول تا یک ماه قابل استفاده است.

روش کار:

۱- یک قطره بزرگ از آب مقطر وسط لام گذاشته شده و مقدار کمی از میکروارگانیسم مورد مطالعه درون آن حل و سپس در هوای آزمایشگاه خشک شود.

۲- یک میلی لیتر از محلول آماده شده روی گسترش قرار داده شود تا رسوب قرمز فلزی پس از ۵ تا ۱۵ دقیقه آشکار شود.

۳- لام با جریان ملایم آب شسته شده و به طور افقی قرار گیرد تا در مجاورت هوا خشک شود. سپس لام با بزرگنمایی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری بررسی شود.

روش اصلاح شده لیفسون Modifid Leifson:

برای این آزمایش باید از کشت تازه باکتری استفاده شود. در صورت استفاده از محیط مایع حدود ۱ تا ۲ درصد فرمالین به آن اضافه شود که این فرمالین باعث تثبیت تاژک می‌شود. سپس لوله‌ها در ۲ تا ۳۰۰۰ دور به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ گردد تا رسوب یابد. در مرحله بعد مایع رویی تخلیه و رسوب با آب مقطر به آرامی مخلوط شود. این کار را می‌توان دوبار تکرار کرد. سپس رسوب مجدد با آب مقطر حل شود به نحوی که کدورت مختصر حاصل گردد.

رنگ آمیزی تاژک به روش املاح نقره:

- به آرامی و با دقت فراوان گسترشی ضخیم از کشت ۱۸ تا ۲۴ ساعته باکتری تاژک دار تهیه شده و در حرارت آزمایشگاه خشک شود.
- بدون ثابت کردن با محلول دندان به مدت ۴ دقیقه گسترش پوشانده شود.
- لام با آب مقطر و به آرامی شسته شود.
- گسترش با محلول رنگی نقره به مدت ۴ دقیقه پوشانده شده و به ملایمت حرارت داده شود.
- لام با آب مقطر شسته شده و صبر کنید تا لام خشک شود.
- با عدسی ۱۰۰ و روغن ایمرسیون در زیر میکروسکوپ بررسی شود.
- **محلول رنگی املاح نقره:** ۹۰ میلی لیتر محلول نیترات نقره ۵ درصد به علاوه ۴-۲ میلی لیتر محلول هیدروکسید آمونیوم غلیظ
- **محلول دندان:** ۳/۵ گرم سولفات آلومینیوم و پتاسیم در ۲۵ میلی لیتر آب مقطر به علاوه ۵۰ میلی لیتر اسیدتانیک ۱۰ درصد به علاوه ۵ میلی لیتر محلول کلرور فریک ۵ درصد

فصل پنجم :

تکنیک های کشت دادن باکتری ها

هنگامی که باکتری در شرایط مناسب از نظر دما، اکسیژن و رطوبت قرار می گیرد تا تکثیر یابد گفته می شود که باکتری کشت داده شده است.

رشد دادن و تکثیر میکروب ها در محیط های مصنوعی عملی مهم در میکروبیولوژی بوده و از مهمترین روش های تشخیص باکتری و قارچ ها محسوب می شود. علاوه از تشخیص با این روش می توان باکتری ها را تکثیر کرده و فراورده های مهم آن ها را جمع آوری کرد تا در مقابله با بیماری های عفونی مورد استفاده قرار گیرند. مثلا بخش اصلی واکسن ها میکروب یا یکی از فراورده های آن می باشد که بر اثر تغییراتی در آن قدرت بیماریزایی ندارد. همچنین با کشت برخی میکروب ها مثل پروتئین تک سلولی با روش های جدید اقتصادی تغذیه می توان از گرسنگی در کشورهای فقیر جلوگیری کرد. محیط کشت در واقع ابزار رشد دادن و شناسایی خواص شیمیایی باکتری ها می باشد.

ذکر این نکته لازم است که برخی میکروب‌ها در شرایط آزمایشگاهی سریعتر از بدن رشد می‌کنند و به سرعت می‌توان آن‌ها را شناسایی کرد و قبل از بروز ضایعه برگشت ناپذیر بیماری را مهار کرد.

کشت باکتری‌ها مثل کشت دادن گیاهان است. باکتری‌ها نیازهای غذایی عام و خاصی داشته و برای رشد باید شرایط مناسب آن‌ها فراهم شود. برای این که باکتری بتواند رشد کند علاوه از مواد غذایی شامل منابع کربن، انرژی، ازت، مواد معدنی و یون‌ها، فاکتورهای رشد مثل اسیدهای آمینه و ویتامین‌ها به رطوبت و شرایط نیاز اکسیژن آنها باید تامین شود.

با توجه به این که میکروارگانیسم‌های مختلف نیازهای متفاوتی دارند، در این محیط‌ها مخلوط متعادلی از غذاهای مورد نیاز به غلظتی تهیه می‌شود که رشد میکروارگانیسم در آن به خوبی صورت گیرد.

انواع محیط کشت‌ها در کارخانجات معتبر به صورت پودر دهیدراته ساخته و به بازار ارائه می‌گردد.

معایب کشت باکتری‌ها

(۱) علی‌رغم تمام پیشرفت‌های علمی هنوز کشت برخی باکتری‌ها در محیط‌های مصنوعی ممکن نشده است. مانند برخی از این باکتری‌ها مثل کلامیدیاها و ریکتزیاها، بدسونیاها که انگل‌های اجباری داخل سلول هستند. تروپونما پالیدروم (عامل سیفلیس) و مایکوباکتریوم لپره (عامل جذام) در محیط مصنوعی کشت داده نمی‌شود.

(۲) برخی از میکروارگانیسم‌ها سخت رشد هستند و برای رشد نیاز به مواد غذایی خاصی دارند و به سختی و زحمت رشد می‌کنند.

(۳) کشت برخی از باکتری‌ها مثل ارلیشیا – فرانسیلاتولارسنس نیاز به هزینه زیاد دارند

(۴) کشت عوامل عفونی در محیط کشت مستلزم صرف زمان است (گاه هفته‌ها در مورد مایکوباکتریوم‌ها) همچنین بعد از بدست آوردن کلنی باید برای انجام آزمایشات بیوشیمیایی عمل کشت مجدد ساب کالچر Sub Culture انجام دادن که خود این مسئله هم مستلزم وقت است.

(۵) در بهترین شرایط با استفاده از تمام مقدمات محیط کشت فقط درصد کمی از جمعیت میکروبی یک نمونه قادر به رشد در آزمایشگاه هستند.

برای رسیدن به کشت خالص می‌توان از روشهای زیر استفاده کرد :

(۱) استفاده از محیط کشت خاص

(۲) تنظیم درجه حرارت، pH یا نور. مثلاً برای جدا سازی باکتری اسپور ساز محیط کشت را ۵-۲ روز در درجه حرارت ۸۰ درجه قرار می‌دهند تا سلول رویشی از بین رفته و اسپوردار باقی ماند.

(۳) رقیق سازی: برای ایزوله کردن باکتری‌هایی که به اکسیژن حساس هستند. از روش رقیق سازی در یک سری لوله که دارای ۰/۸٪ آگار است استفاده می‌شود.

(۴) استفاده از آنتی‌بیوتیک یا مواد مضر برای باکتری‌ها

۵) حرکت باکتری‌ها: پروتئوس و سالمونلا به سرعت روی سطحی که کمی مرطوب باشد گسترش می‌یابد ولی در محیط خشک نه. اسپیروکت‌ها و باکتری‌های سبز آبی حتی در سطح آگار خشک هم رشد می‌کند.

در مورد کشت باکتری‌ها بعد از رسیدن به کشت خالص، رسیدن به کلنی تک و مجزا مطرح است. که این کار در مورد محیط‌های مایع مشکل است و باید از محیط جامد استفاده شود. نمونه‌ها باید طوری تلقیح شود که از هم فاصله داشته باشند و کلنی مجزا داشته باشند.

ویژگی‌های محیط کشت ایده‌آل

یک محیط کشت خوب باید دارای شرایط زیر باشد تا بتوان به آن محیط ایده‌آل اطلاق کرد. محیط‌های بسیار محدودی تمام شرایط زیر را دارند.

- ۱) اختصاصی و قابل اطمینان باشد.
 - ۲) تهیه آن راحت و سریع بوده و قیمت آن مناسب باشد.
 - ۳) تمایز کلنی‌های گوناگون که در آن محیط رشد می‌کنند امکان پذیر باشد.
 - ۴) ترکیبات سازنده محیط پایدار باشند.
 - ۵) طیف تشخیص گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها را در برگیرند.
- در انتخاب یک محیط برای کشت دادن میکروب‌ها بایستی نوع نمونه، نوع میکروب و شرایط رشد را مد نظر داشت.

انواع محیط کشت از نظر ترکیبات سازنده

- ۱) محیط کشت حداقل: فقط شامل منابع کربن، نیتروژن، انرژی، آب و عناصر اساسی است و فقط میکروب‌های با نیاز غذایی کم در آن رشد می‌کنند.
- ۲) محیط‌های کشت ساختار معین: تمام مواد شیمیایی ویژه به کار رفته در یک محیط کشت و غلظت آنها را بتوان تعیین کرد که محیط معین نام دارد.
- ۳) محیط‌های کشت پیچیده: محتوای مواد شیمیایی و مقدار آنها مشخص نیست دارای منابع انرژی و کربن هستند. عصاره مخمر، گوشت و نمک‌ها از ترکیبات به کار رفته هستند.

انواع محیط کشت از نظر شکل فیزیکی (ظاهری)

۱) محیط‌های مایع (Liquid Media – Broth):

این محیط‌ها فاقد آگار بوده و در هر دمایی مایع می‌باشند. این نوع محیط‌ها عمدتاً در لوله آزمایش تهیه و مورد استفاده قرار می‌گیرند. از جمله محیط‌های مایع پر مصرف می‌توان به محیط‌های زیر اشاره کرد.

- نوترینت برات Nutrient Broth

- عصاره قلب و مغز Brain Heart Broth

- مولر هینتون برات Muller Hinton Broth

۲) محیط‌های جامد (Agar) Solid Media:

در این محیط‌ها از ماده سفت کننده ای به نام آگار استفاده می‌شود که ۱۵-۲۰٪ محیط کشت را شامل می‌شود ($15gr/Lit - 12$). آگار پلی ساکارید غیر قابل متابولیسم و کلئیدی است از نوعی جلبک قرمز دریایی به نام ژلیدیوم تهیه می‌شود.

قبل از کشف آگار باکتری‌ها را روی ژلاتین پرورش می‌دادند ولی برخی میکروب‌ها ژلاتین را تجزیه می‌کردند و خود ژلاتین نیز در دمای بالای ۲۰ درجه تجزیه می‌شد تا این که شاگرد کخ، هس Hess با الهام از مربای ساخته شده توسط همسرش از جلبک‌های دریایی آگار تهیه نمود و حقیقتاً تا امروز جانشینی برای آن پیدا نشده است.

آگار در دمای بالا ذوب شده و در $80-100^{\circ}C$ در آب حل می‌شود و در حرارت زیر $45^{\circ}C$ به صورت جامد در می‌آید. آگار هیچ نقش تغذیه ای ندارد و فقط برای جامد کردن محیط به کار می‌رود. البته از ژلاتین و ژل سیلیکا هم می‌توان برای این منظور استفاده کرد.

محیط جامد به ۲ صورت تهیه و استفاده می‌شود:

(A) داخل پلیت: بسته به حجم پلیت ۱۲-۱۵ میلی‌لیتر

(B) داخل لوله: امکان آلوده شدن کمتر بوده و محیط کشت عمر بیشتری دارد و به دو صورت ساخته می‌شوند:

(۱) قائم Butt

(۲) شیب دار Slant: محیط بصورت کاملاً شیب دار مثل سیمون سیترات یا شیب‌دار به همراه سطح قائم مثل TSI ساخته می‌شود.

۳) محیط کشت نیمه جامد (Medium) Semi Solid Media :

آگار در این محیط‌ها کم بوده $5gr/Lit - 2$ (۰/۵ تا ۰/۷٪) و معمولاً برای تشخیص باکتری‌های متحرک کاربرد دارند محیط SIM از جمله محیط نیمه جامد است که در آزمایشگاه میکروبیولوژی کاربرد زیادی دارد.

۴) محیط‌های کشت ۲ فازي Biphasic :

این محیط‌ها از یک فاز جامد آگار ۲,۵٪ به صورت مورب و یک فاز مایع تشکیل می‌شوند. هر دو فاز جامد و مایع از یک ترکیب ساخته می‌شود. محیط کاستندا Castaneda که جهت تشخیص بروسلاها به کار می‌رود و از بروسلا آگار و بروسلا برات ساخته شده است از جمله این نوع محیط‌ها محسوب می‌شود.

انواع محیط کشت از نظر کارکرد و ویژگی‌های بیوشیمیایی

(۱) محیط‌های کشت عمومی یا پایه Basic Media – General Media:

این محیط‌ها کمترین غلظت از ترکیبات اساسی برای رشد باکتری‌ها را دارند و برای رشد دادن باکتری‌های با نیاز غذایی معمولی مناسب هستند. این محیط‌ها فاقد ترکیبات بازدارنده رشد باکتری‌ها هستند و اکثراً به عنوان محیط اولیه برای جدا سازی باکتری‌ها به کار می‌روند. مثال‌ها:

Nutrient Agar – BHI Agar – Muller Hinton – TSA (Trypticase Soy Agar)

(۲) محیط‌های کشت انتخابی Selective Media:

این دسته از محیط‌ها حاوی موادی هستند که از رشد بسیاری از باکتری‌ها جلوگیری کرده و تنها به باکتری‌های خاص اجازه رشد می‌دهند. مثل مانیتول سالت آگار Mannitol Salt Agar که دارای قند مانیتول و ۷/۵٪ کلرید سدیم است که فقط باکتری استافیلوکوکوس اورئوس که قدرت تحمل این غلظت نمک را دارد رشد می‌کند. یا محیط سالمونلا- شینگلا آگار SS-Agar که باکتری سالمونلا و شینگلا فقط توانایی رشد در آن را دارند. این محیط حاوی املاح صفراوی و رنگ قرمز خنثی است. علاوه بر نمک‌ها برخی رنگ‌ها و برخی آنتی‌بیوتیک‌ها نیز می‌توانند در این محیط‌ها به کار روند. مثلاً در سالمونلا - شینگلا آگار معرف نوترال رد وجود دارد. که از رشد باکتری‌های گرم منفی رقیب سالمونلا و شینگلا جلوگیری می‌کند.

(۳) محیط‌های افتراقی Differential Media:

بعلت داشتن ترکیبات ویژه کلنی باکتری‌های مختلف را از هم تمایز می‌کند. مک کانکی آگار و ائوزین متیل بلو آگار EMB از جمله این محیط‌ها هستند. هر دو محیط املاح صفراوی دارند که باکتری‌های گرم مثبت در آن رشد نمی‌کنند همچنین لاکتوز دارند که باکتری‌های لاکتوز مثبت کلنی صورتی و لاکتوز منفی کلنی سفید در محیط مک کانکی می‌دهند. در حالی که در محیط EMB، اشرشیاکلاهی کلنی سیاه با درخشش جلای فلزی، انتروباکترکلنی صورتی رنگ می‌دهد. این محیط‌ها معمولاً به عنوان محیط ثانویه در تشخیص باکتری‌ها به کار می‌روند.

(۴) محیط‌های غنی شده Enriched Media:

برخی از باکتری‌ها سخت رشد Fastidious بوده و احتیاجات غذایی پیچیده داشته و در محیط‌های معمولی رشد نمی‌کنند. به منظور رشد دادن این باکتری‌ها به محیط پایه ترکیباتی مانند خون، عصاره، مخمر و ... اضافه می‌شود تا غنی تر شده و باکتری‌های سخت رشد نیز بتوانند رشد کنند که به این محیط‌ها محیط‌های غنی شده گفته می‌شود. محیط‌های آگار خون‌دار Blood Agar و شکلات آگار Chocolate Agar از جمله محیط‌های غنی شده پر مصرف در آزمایشگاه میکروبیولوژی هستند.

(۵) محیط‌های غنی کننده Enrichment Media:

محیط‌های غنی کننده دارای ترکیباتی است که می‌تواند رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را در بین سایر میکروارگانیسم‌ها از جمله میکروفلور نرمال ترغیب نماید.

محیط سلینت F: در مدفوع رشد باکتری‌های پاتوژن مثل سالمونلا را ترغیب نموده از و رشد باکتری‌های فلور طبیعی جلوگیری می‌کند. این محیط حاوی سرم، عصاره مخمر، ویتامین و ... بوده بعنوان محیط اولیه برای جداسازی میکروب‌ها به کار می‌رود.

(۶) محیط‌های کشت انتقالی Transport Media:

این محیط‌ها برای نگهداری موقت نمونه برای حمل آن به آزمایشگاه و زمانی استفاده می‌شود که بین نمونه برداری و کشت فاصله زمانی وجود دارد. این محیط‌ها بافرهای نمک هستند که قدرت زیست باکتری موجود را بدون تغییر در تراکم (کاهش یا تکثیر) در شرایط ایده آل فراهم می‌کند.

- **محیط استوارت Stuart's Media**: دارای تیوگلیکولات، متیلن بلو و فاقد نیتروژن است که به دلیل فقدان نیتروژن رشد میکروارگانیسم محدود است ولی نمونه‌ها از خشک شدن حفظ و برای مدت طولانی زنده باقی می‌مانند. تیوگلیکولات کاهش دهنده عوامل محیطی بوده و تجزیه اکسیژن را محدود می‌کند و از پدیده اکسیداسیون جلوگیری می‌کند. در صورت وجود اکسیداسیون با تغییر رنگ متیلن بلو می‌توان به آن پی برد.
- **محیط گری-بلیر Gary-Blair**: محیط انتقالی برای انتقال سوپ‌های مدفوعی بهترین محیط برای انتقال نمونه‌های مشکوک به ویبریوکلرا می‌باشد.
- **محیط ایمز Amie's Media**: این محیط حاوی زغال چوبی بوده و برای انتقال سوپ‌های بدست آمده از گلو، دستگاه ادراری تناسلی، زخم و پوست مناسب است.
- **محیط بافر گلیسرول سالین**: محیط مناسب برای انتقال نمونه‌های مدفوع مشکوک به آلودگی با شیگلا می‌باشد.

۷) محیط‌های کشت تشخیصی یا بیوشیمیایی Diagnostic Media:

با استفاده از این محیط‌ها می‌توان باکتری‌ها را بر اساس خواص بیوشیمیایی گوناگون مثل تخمیر قندها، نوع منبع کربن، حرکت، تولید گاز، ذوب ژلاتین و ... شناسایی کرد. از جمله این محیط‌ها می‌توان به محیط TSI اشاره کرد. محیط Triple Sugar Iron Agar (TSI): محیطی که دارای سه قند و املاح آهن و معرف فنل رد در ساختار خود بوده و بسته به قندی که باکتری تخمیر می‌کند و یا تولید H_2S منظره کلنی و شکل و رنگ آن متفاوت خواهد بود و برای تفريق باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه از آن استفاده می‌شود.

۸) محیط کشت‌های اختصاصی Specific Media

اخصاصا برای کشت و رشد دادن باکتری‌های خاص ایجاد شده اند. مثل محیط کشت لونشتاین-جانسون Lowenstein-Jenson که محیطی بر پایه تخم مرغ بوده و برای تشخیص عامل سل (مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم بوویس) به کار می‌رود.

طرز تهیه محیط‌های کشت

محیط‌های کشت آزمایشگاهی به صورت پودرهای دهیدراته آماده مصرف تهیه می‌شوند. معمولاً در روی قوطی‌های پودر محیط کشت در یک طرف فرمول شیمیایی و در سمت دیگر روش تهیه آنها ذکر می‌گردد. برای تهیه محیط کشت باید مراحل زیر صورت گیرد:

- ۱) **مرحله توزین**: وزن کردن مقدار مناسب مشخصی که معمولاً این مقدار روی قوطی محیط برای ساخت یک لیتر محیط ذکر می‌گردد که در صورت نیاز به مقادیر کم با ایجاد تناسب می‌تواند مقدار مناسب را بدست آورد.

۲) **مرحله حل کردن:** پودر وزن شده در حجم معینی از آب مقطر در ارلن مایر حرارت داده شده و حل می‌شود. هم‌زمان بهتر است برای حل شدن و یکنواختی محیط مخلوط (شیک) نیز شود که برای این عمل از شعله مستقیم یا دستگاه هیتر شیکر استفاده می‌شود. عمل حرارت دادن تا زمان شفاف شدن محیط ادامه می‌یابد. بهتر است برای این عمل از آب مقطر استفاده شود چرا که آب معمولی دارای املاح است و ممکن است جلوی رشد باکتری را بگیرد. محیط‌های مایع یا براث معمولاً نیازی به این مرحله ندارند.

۳) **استریل کردن و تقسیم:** استریل کردن پس از مسدود کردن درب ارلن یا بطری تهیه کشت با پنبه یا درب بطری (بهتر است نیم بسته باشد) در اتوکلاو در دمای 121°C ، فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع و به مدت ۱۵ دقیقه صورت می‌گیرد. در این مرحله نمی‌توان از فور (آون) استفاده کرد چرا که محیط تبخیر می‌شود.

پس از استریل کردن عمل تقسیم در پلیت‌ها یا لوله‌ها صورت می‌گیرد. بهتر است این عمل زیر هود بیولوژیک صورت گیرد تا آلودگی محیط کشت اتفاق نیافتد.

در محیط‌هایی که در لوله تهیه می‌شوند بهتر است ابتدا تقسیم در لوله‌های آزمایش صورت گیرد درب لوله با پنبه مسدود گردد ($\frac{2}{3}$ پنبه داخل لوله و $\frac{1}{3}$ خارج لوله باشد) و سپس اتوکلاو صورت گیرد. این عمل باعث می‌شود که موقع نیاز به راحتی باز شود و هم‌زمان باعث کاهش آلودگی گردد. هرچند به محیط‌های کشت مواد بافری افزوده می‌شود که pH را ثابت نگه دارند با این حال توصیه می‌شود قبل از تقسیم کردن محیط‌ها بهتر است از pH محیط اطلاع یافت.

در صورتی که محیط کشت در لوله در پیچ‌دار تهیه می‌شود، باید درب لوله موقع استریل کردن شل باشد تا از شکستن لوله جلوگیری شود و مجدداً پس از استریل کردن در آن بسته شود.

در محیط‌های جامد که در پلیت تهیه می‌شوند وقتی که دمای محیط اتوکلاو شده به 50°C رسید بسته به قطر پلیت ۱۲-۱۵ میلی لیتر از محیط استریل شده داخل آن ریخته می‌شود و صبر می‌شود تا محیط سرد شده و جامد گردد. در مورد محیط‌های تهیه شده در لوله، لوله‌ها در جا لوله‌ای قرار داده می‌شوند تا سرد و جامد شوند. در مورد محیط‌هایی مثل سیمون سیترات و TSI که به صورت مورب (Slant) تهیه می‌شوند، لوله‌ها به طور مایل در محلی قرار می‌گیرند تا جامد شوند. این عمل ۱۰-۱۵ دقیقه در حرارت محیط آزمایشگاه زمان می‌برد.

اگر در روی محیط کشت دستور دیگری قید شده باشد باید طبق آن عمل شود. برخی از محیط‌ها مثل SS Agar و محیط‌های کروم آگار نیازی به اتوکلاو کردن ندارند.

برخی از محیط‌ها از جمله محیط‌های قندی به حرارت حساس اند و نمی‌توان آن‌ها را اتوکلاو کرد. به منظور تهیه این محیط‌ها پس از آن که محیط پایه تهیه و اتوکلاو شد، قند یا ماده مذکور (مثلاً اوره) توسط فیلترهای میکروب شناسی استریل و طبق دستور کارخانه سازنده محیط در دمای مشخص به آن اضافه می‌شود. مثلاً در مورد محیط برد پارکر Beard Parker Agar به محیط پایه سفیده تخم مرغ استریل و تلوریت پتاسیم طبق دستور کار خانه اضافه می‌شود.

در مورد برخی محیط‌ها مثل بلاد آگار یا شکلات آگار نیز ابتدا محیط پایه طبق دستور کارخانه سازنده تهیه و پس از اتوکلاو شدن ۵-۱۰٪ خون دفیبرینه گوسفند به آن اضافه می‌شود و با چرخاندن کاملاً مخلوط و سپس در پلیت‌ها تقسیم می‌شود. اگر هدف ساخت بلاد آگار باشد خون در 45°C و اگر شکلات آگار باشد در 60°C خون اضافه می‌شود.

محیط‌های ساخته شده در پلیت به صورت وارونه داخل کیسه فریزر در یخچال به مدت ۲-۳ هفته قابل نگهداری است. محیط‌های لوله ای تهیه شده در جا لوله ای در یخچال قابل نگهداری هستند.

جهت اطمینان از استریل بودن پلیت‌ها و لوله‌ها بصورت کاملاً تصادفی از بین آن‌ها چند عدد انتخاب و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد. اگر میکروب رشد نکند نشان دهنده استریل بودن محیط است ولی در صورت رشد میکروارگانیسم آلودگی وجود دارد و کل محیط‌های ساخته شده باید اوت شوند.

تذکر:

PH محیط کشت:

PH مناسب رشد اکثر باکتری‌ها ۶/۸ - ۷/۲ است. البته تغییرات PH در مورد برخی باکتری‌ها می‌تواند اثرات ممانعت از رشد را باعث شود لذا موقع ساخت محیط ضمن توجه به دستورالعمل ساخت محیط چنانچه باکتری نیاز به PH خاصی دارد بایستی از محیط اختصاصی آن باکتری استفاده شود و یا PH مد نظر با افزودن باز یا اسید فراهم شود. PH مناسب رشد لاکتوباسیل‌ها ۵/۸ است هر چند این باکتری‌ها در PH ۴-۳ هم قادر به رشد هستند. ویبریو کلرا عامل بیماری وبا در PH ۸/۲ تا ۹/۵ رشد می‌کند.

خطاها و مشکلات در تهیه محیط تهیه شده وعلل آن

(A) رنگ یا تیرگی غیرطبیعی:

۱. آب ناخالص
۲. ظروف شیشه‌ای کثیف
۳. کیفیت بد محیط کشت دهیدراته
۴. حرارت زیاد در طی استریلیزاسیون
۵. pH نادرست
۶. حل نشدن کامل محیط کشت

(B) رگه رگه شدن :

۱. رگه رگه سیاه : آگار نیم‌سوز شده است
۲. رگه رگه روشن : وقتی مکمل اضافه شده که مکمل سرد شده بوده است.

(C) pH نادرست

۱. آب ناخالص یا ظرف شیشه‌ای کثیف
۲. حرارت بیش از حد، ذوب مجدد یا ذخیره طولانی محیط کشت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد
۳. آلودگی شیمیایی
۴. کالیبراسیون نادرست PH متر
۵. حل نشدن کامل محیط کشت

۶. اندازه گیری PH در دمای بالای ۲۵ درجه سانتی گراد

(D) رسوب کدورت

۱. حرارت بیش از حد

۲. ذخیره طولانی بیش از ۴ ساعت در حالت مذاب ۵۰ درجه

۳. کیفیت بد محیط دهیدراته

۴. PH نادرست

۵. حل شدن کامل محیط کشت

(E) آگار نیم بند

۱. حرارت بیش از حد به خصوص در PH پایین

۲. هیدرولیزاسید در آگار در محیط‌های کشت با PH پایین

۳. توزین و مخلوط کردن نادرست

۴. حل شدن کامل آگار

۵. ذخیره سازی طولانی در دمای ۵۰ درجه

۶. حجم نادرست آب، رقیق سازی زیاد با مایع تلقیح یا مکمل محیط کشت

(F) رشد باکتری یا اثر روی خواص، افتراقی

۱. توزین و مخلوط کردن نامناسب

۲. وجود مواد مهار کننده در آب یا ظروف

۳. کیفیت بد محیط کشت دهیدراته

۴. وقتی مکمل اضافه شده‌اند که محیط کشت خیلی داغ بوده است.

۵. محیط هنگام کشت نمونه روی آن خیلی داغ بوده است

۶. حل نشدن کامل محیط کشت، تغییر PH محیط کشت

۷. ذخیره طولانی و بیش از حد خشک شدن محیط کشت

آشنایی با برخی محیط های کشت مهم باکتریایی

Blood Agar **بلاد آگار**

به معنی آگار خون دار است. این محیط که یکی از مغذی‌ترین و شایع‌ترین محیط‌های غیر انتخابی در آزمایشگاه است، به دلیل داشتن خون، رنگ این محیط قرمز کدر است. این محیط از دو جزء تشکیل شده است

- (۱) خون عمدتاً از نوع دفیبرینه گوسفندی، خرگوشی، اسبی استفاده می‌شود. در صورت نبود خون حیوانی می‌توان از خون دفیبرینه انسانی استفاده کرد.
- (۲) محیط پایه شامل: بروسلا بیس آگار، برین هارت اینفیوژن آگار است.

ابتدا محیط پایه ساخته و اتوکلاو می‌شود پس از رسیدن محیط پایه به ۴۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد ۵٪ خون دفیبرینه به آن اضافه می‌شود. این محیط مناسبی برای رشد اغلب باکتری‌ها از جمله برخی باکتری‌های سخت رشد محسوب می‌شود. همچنین از این محیط برای بررسی قدرت همولیز (لیز گلبول قرمز) باکتری‌ها استفاده می‌شود.

باکتری‌ها از نظر قدرت همولیز به ۳ گروه تقسیم می‌شوند:

همولیز ناقص یا α آلفا: باکتری واجدهمولیزین بوده ولی نسبت لیز کم است اطراف کلنی باکتری هاله سبز رنگ ایجاد می‌شود.

همولیز کامل یا β بتا: باکتری واجد آنزیم همولیزین بوده ضمن لیز کامل گلبول قرمز و آزاد سازی هموگلوبین در اطراف منطقه رشد باکتری هاله کاملاً شفاف ایجاد می‌کند.

بدون قدرت همولیز یا γ گاما: باکتری فاقد آنزیم همولیزین بوده و قدرت لیز گلبول قرمز را ندارد

همچنین با استفاده از این محیط تست کمپ CAMP که تستی راهبردی در تفریق گونه‌های استرپتوکوکوس و لیستریا، است صورت می‌گیرد.



شکلات آگار Chocolate Agar

این محیط در اصل بلاد آگار حرارت دیده است که در آن محیط پایه (بروسلا بیس آگار یا برین هارت اینفیوژن آگار) و خون را به این محیط پایه استریل شده اضافه می‌شود که خون دفیبرینه به جای ۴۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به محیط پایه افزوده می‌شود که باعث تخریب گلبول‌های قرمز و نشت مواد مغذی گلبول در محیط می‌شود. به دلیل حرارت، رنگ قرمز به قهوه‌ای (شکلاتی) تغییر می‌کند. این محیط به رنگ شکلات و کدر است. این محیط نسبت به بلاد آگار، به مراتب مغذی‌تر می‌باشد و حتی باکتری‌هایی که در بلاد آگار رشد نمی‌کنند (مانند هموفیلوس آنفلوانزا) در این محیط رشد می‌کنند که این به دلیل دسترسی باکتری به طور مستقیم به مواد مغذی موجود در گلبول قرمز است

مولر هینتون آگار Mueller Hinton Agar

یکی از محیط‌های عمومی پرکاربرد در میکروب شناسی است. این محیط از لحاظ شکل شبیه به "نوترینت آگار" است با این تفاوت که کدرتر و کمی کرم رنگ و یا سفید رنگ است. این محیط بیشتر برای انجام تست‌های تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی مانند آنتی بیوگرام به روش "دیسک دیفیوژن آگار" تست تعیین حداقل غلظت مهار آنتی بیوتیک MIC، استفاده می‌شود. با این وجود می‌توان برای کشت های روتین آزمایشگاهی نیز از آن استفاده کرد.

تریپتی کیس سوی آگار یا براث TSA or TSB

این محیط با اینکه یک محیط غیر انتخابی است اما بیشتر به عنوان یک محیط تقویتی می‌شناسند و اصولاً آن را به همراه آب پیتونه قلیایی و بلاد آگار و دیگر محیط‌ها که بعداً اشاره می‌شود جزء محیط‌های "تقویت کننده" دسته بندی می‌شود. این محیط بیشتر به شکل مایع (Trypticase Soy Broth) به رنگ زرد شفاف است. در کارهای روتین مانند افزایش تعداد باکتری مورد مطالعه به کار می‌رود، هرچند که به صورت جامد (Trypticase Soy Agar) به رنگ کرم شفاف تا نیمه شفاف نیز به کار می‌رود، این محیط حاوی سدیم کلراید، دکستروز، دی پتاسیم فسفات و آگار (اگر جامد باشد) یا بدون آگار (اگر مایع باشد) است.

کلیستین نالیدیگسیک اسید آگار CNA

این محیط نوعی بلاد آگار است حاوی (۵ درصد خون گوسفند، کلیستین یا پلی میکسین B و نالیدیگسیک اسید، پیتون، سدیم کلراید و آگار) است. نام دیگر آن Columbia Colistin Nalidixic acid agar یک محیط انتخابی است که به دلیل وجود کلیستین مانع رشد گرم باکتری‌های گرم منفی می‌شود.

فنیل اتیل الکل آگار PEA

همانند محیط CNA این نیز یک محیط انتخابی برای باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد. این محیط حاوی فیتون، سدیم کلراید، بتا متیل اتیل الکل و آگار است. به دلیل حذف لیپیدهای گرم منفی‌ها باعث ممانعت از رشد باکتری‌های گرم منفی می‌شود. این محیط به رنگ کرم شفاف تا نیمه شفاف است.

مانیتول سالت آگار MSA (Manitol Salt Agar)

این محیط انتخابی حاوی نمک سدیم کلراید و مانیتول و فنل رد (معرف محیط)، پیتون و عصاره گوشت گوساله است. این محیط به دو صورت پلیت و لوله‌ای تهیه می‌شود که به دلیل وجود معرف فنل رد در محیط قرمز رنگ هستند. به دلیل وجود نمک (معمولاً ۷٫۵ درصد) مانع رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌ها می‌شود. و در میان باکتری‌هایی که در آن رشد می‌کنند استافیلوکوکوس‌ها را می‌توان نام برد. از یک طرف، به دلیل وجود مانیتول (نوعی قند احیاء شده) تنها استافیلوکوک اورئوس توانایی استفاده از این قند را دارد که منجر به افت pH و تغییر رنگ فنل رد به زرد می‌شود، در این محیط کلنی‌های استافیلوکوکوس اورئوس به طور مشخص زرد رنگ شده و توسط هاله زردی احاطه می‌شوند اما سایر استافیلوکوکوس‌ها و میکروکوکوس‌ها که قدرت تخمیر مانیتول را ندارند با شکستن پیتون موجود در محیط کلنی‌های قرمز رنگ با هاله ای ارغوانی - قرمز ایجاد می‌کنند.



محیط‌های کروم آگار Chrom Agar

رنگ‌ها یکی از اجزاء محیط‌های کشت هستند. رنگ‌ها در محیط کشت نقش بازدارنده گاه نقش معرف را بازی می‌کنند. امروزه بر اساس عملکرد معرف‌ها و رنگ‌ها نسل جدید محیط‌های کشت به بازار آمده که به آن‌ها محیط‌های کروم آگار می‌گویند. این محیط‌ها اولین بار توسط دکتر رامباخ ساخته شدند. ضمن این که باعث سرعت بخشیدن به تشخیص می‌شوند باعث کاهش هزینه هم می‌شوند به صورتی که نیاز به آزمایش تاکیدی نیست. این محیط‌ها نیاز به اتوکلاو شدن ندارند. برخی از این محیط‌های کروم آگار عبارتند از :

(۱) محیط رامباخ Rombach propylene glycolagar

از این محیط برای تشخیص سالمونلا استفاده می‌شود با استفاده از این محیط‌ها براساس تشکیل اسید از پروپیلن گلیکول جنس‌های سالمونلا غیر از سالمونلا تیفی و سالمونلا پاراتیفی را می‌توان از سایر آنتروباکتریاسه‌ها باز شناخت. دراین محیط: سالمونلا به رنگ قرمز درخشان، اشرشیا کلی آبی، سیتروباکتر بنفش، پروتئوس بی‌رنگ دیده می‌شود.

(۲) محیط کروم آگار سالمونلا CAS

برای تشخیص سالمونلا تیفی و غرابل سالمونلا دو نوع سودمند است. در صورت استفاده از این محیط به غنی‌سازی ابتدایی نیازی نیست. بعد از ۱۸ ساعت انکوباسیون سالمونلا به رنگ ارغوانی دیده می‌شود. سایر باکتری‌های با کلنی بی‌رنگ و محدب دیده می‌شوند.

(۳) محیط کروموژن آئرول Cromoagar aureole

در سنجش مستقیم و همزمان استافیلوکوک آرتوس در نمونه‌های غذایی به کار می‌رود که استافیلوکوکوس‌ها با هاله کواگولازی به راحتی از سایر جنس‌ها قابل تمیز هستند.

(۴) محیط کروم آگار Ecoli

برای سنجش Ecoli در نمونه‌های غذایی کاربرد دارد : (۱) Ecoli آبی (۲) کلیفرم‌ها قرمز دیده می‌شوند

(۵) محیط کروم‌آگار O₁₅₇Ecoli

برای شناسایی سویه انتروهموراژیک اشرشیا کلی و تمیز آن از سایر سویه‌ها است. Ecoli O₁₅₇ به رنگ قرمز و سایر گونه‌های اشرشیاکلی آبی رنگ دیده می‌شوند.

(۶) محیط کروم آگارکاندیدا

برای شناسایی گونه‌های مختلف کاندیدا از این محیط استفاده می‌شود. کاندیدا آلبیکنس در این محیط رنگ سبز، کاندیدا گلابرتا رنگ قهوه‌ای می‌دهد.

تکنیک‌های کشت دادن باکتری‌ها

هنگام مطالعه باکتری‌ها مشاهده می‌شود که باکتری‌ها بصورت توده‌های مخلوط وجود دارند و تنها در جاهای خاصی ممکن است به صورت گونه خالص دیده شوند.

برای اینکه بتوان خصوصیات طبیعی، ظاهری و فیزیکی گونه خاصی را مطالعه کرد لازم است این باکتری از سایر باکتری‌ها که بصورت طبیعی در محیط یافت می‌شود جدا شود. به عبارت دیگر باید یک محیط کشت خالص از باکتری مورد نظر تهیه گردد. کشت خالص کشتی است که فقط حاوی یک گونه میکروب باشد. کشتی را که بیش از یک نوع میکروارگانیسم داشته باشد کشت مخلوط Mixed Culture گویند. برای تهیه محیط کشت خالص از یک محیط کشت مخلوط روش‌های زیادی وجود دارند

میکروب‌های ساپروفیت معمولاً رشد سریعتری دارند و اگر محیط را آلوده کنند جلوی رشد سایر میکروب‌ها را می‌گیرند در نتیجه تشخیص اشتباه صورت می‌گیرد. برای جلوگیری از این امر باید تمام اعمال مربوط به کشت و انتقال باکتری‌ها از یک محیط به محیط دیگر باید در شرایط استریل صورت گیرد.

کشت و انتقال باکتری‌ها توسط پیپت پاستور استریل یا فیلدو پلاتین استریل زیر هود یا در مجاورت شعله چراغ گاز باید صورت گیرد. حتی هوای تنفسی بهتر است از محیط کشت دور باشد تا محیط کشت آلوده را نسازد و همچنین محیط باکتریایی شخص آزمایش کننده را آلوده نسازد.

البته ذکر این نکته الزامی است که قبل از استفاده از لوپ باید مطمئن شد که سرد شده است وگرنه تمام باکتری‌ها از بین می‌روند. وقتی نمونه اولیه از بیمار گرفته می‌شود در صورتیکه چند نوع کلنی رشد کرده باشند. معمولاً از هر کلنی یک کشت مجزا تهیه می‌شود البته عامل بیماری معمولاً کلنی غالب می‌باشد.

با توجه به اینکه در نتیجه مصرف مواد غذایی موجود در محیط رشد و ترشح مواد زائد و همچنین تغییرات شیمیایی محیط، باکتری‌های موجود در آن قادر به ادامه زندگی نیستند لذا هر چند وقت یکبار باید تجدید کشت شوند.

کشت در محیط مایع

به منظور کشت در محیط مایع، نمونه با سواپ یا لوپ استریل برداشته شده و پس از وارد کردن در محیط مایع تکان داده می‌شود. پس از خارج کردن لوپ، سر محیط با پنبه پوشانده شود، بطوریکه دو سوم پنبه داخل و یک سوم آن خارج لوله باشد. پنبه ضمن اینکه به اکسیژن هوا اجازه ورود می‌دهد بعنوان فیلتر برای به دام انداختن سایر باکتری‌ها نیز عمل می‌کند.

موقع برداشتن پنبه بهتر است با همان دستی که لوپ در دست گرفته شده است، با انگشت کوچک و کف دست پنبه این کار انجام شود و پایان کشت نباید پنبه روی زمین گذاشته شود.

عمل انتقال در کنار شعله یا زیر هود بیولوژیک صورت می‌گیرد و قبل و پس از انتقال سر لوله حرارت داده شود که در این حالت جریان هوا از داخل به خارج پدید آمده و باعث کاهش آلودگی می‌شود.

به منظور کشت از محیط مایع در محیط مایع دیگر با استفاده از پیپت کمی از مایع بعد از پی‌پتاژ و شیک کردن وارد لوله دوم شود.

رشد باکتری در محیط مایع سریع صورت می‌گیرد (ظرف ۴ ساعت) ولی ایراد کار در آن است که تفکیک باکتری‌ها در محیط مایع بسیار مشکل است

کشت در محیط جامد

کشت در محیط جامد هم باید در نهایت استریل کاری صورت گیرد و در زیر هود یا مجاورت شعله باشد.

در روش کشت در محیط جامد کلنی‌ها تشکیل می‌شوند که اجتماع قابل رویت میکروارگانیسم‌هاست که در اثر رشد و تکثیر ایجاد شده باشد. حسن این روش این است که می‌توان به تک کلنی رسید ولی عیب آن این است که میکروبها دیر رشد می‌کنند.

کشت در پلیت یا پتری دیش

در این مورد انتقال مستقیم نمونه به پتری دیش، انتقال از محیط مایع به پتری دیش یا انتقال از محیط جامد به پتری دیش مطرح است که به ۳ روش صورت می‌گیرد:

(۱) کشت پخش نمونه Spread plate

یک قطره از محیط مایع را در وسط پلیت حاوی محیط کشت قرار داده و با L پاستور استریل یا با استفاده از سواپ استریل در چندین جهت آنرا کاملاً پخش کنید در صورت انتقال نمونه از محیط جامد نیز کلنی باکتری با لوپ استریل برداشته و در محیط جامد کشت داده شود.

باید دقت کرد که :

- سطح آگار کنده نشود.
- فقط لبه جلویی حلقه لوپ با سطح آگار در تماس باشد. جهت لوپ با سطح آگار باید در زاویه ۳۰ درجه قرار گیرد.
- موقع استریل کردن لوپ برای جلوگیری از تشکیل و پخش آئروسول بهتر است ابتدا لوپ در قسمت پایین شعله قرار داده سپس به آرامی بالا آورده و در نهایت به داغ‌ترین ناحیه شعله یا راس آن آورد.

(۲) استریک پلیت Sterack plate

روش کشت خطی. تقریباً چندین روش خطی دارد :

- روش $\frac{1}{4}$

- روش چند خطی ۴ خطی:

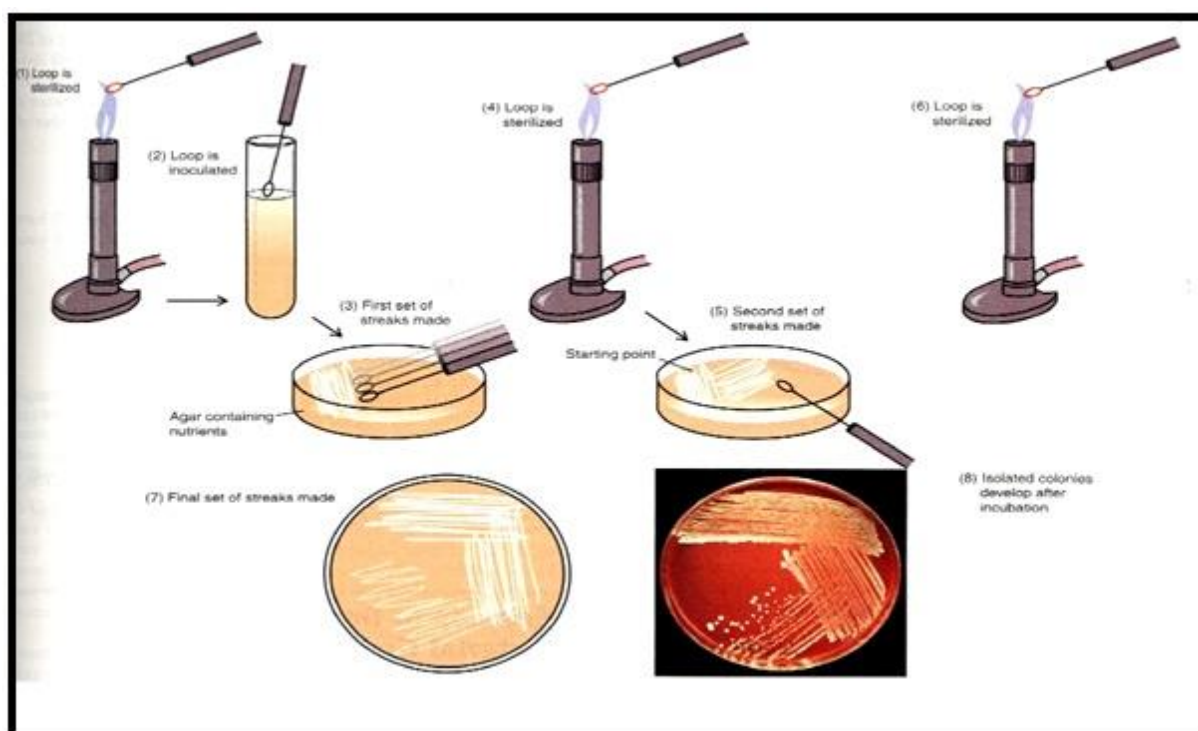
کشت استریل هم می‌گویند. در این روش با هر بار چرخاندن پلیت تعداد میکروب کم می‌شود.

نحوه انجام:

- (۱) لوپ را استریل کرده و اجازه دهید سرد شود.
- (۲) از نمونه برداشت کرده در یک چهارم پلیت که فاز ۱ نامیده می‌شود کشت داده و سپس در پتری‌دیش بسته شود.
- (۳) لوپ مجدداً ضد عفونی و سرد شده پلیت را چرخانده در فاز دوم کشت شود.
- (۴) به همین ترتیب در فاز ۳ و ۴ هم کشت انجام شود.

- روش یکنواخت یا سراسری

در کشت در محیط جامد مسئله مهم ایجاد فضای مناسب بین پرگنه‌ها می‌باشد.



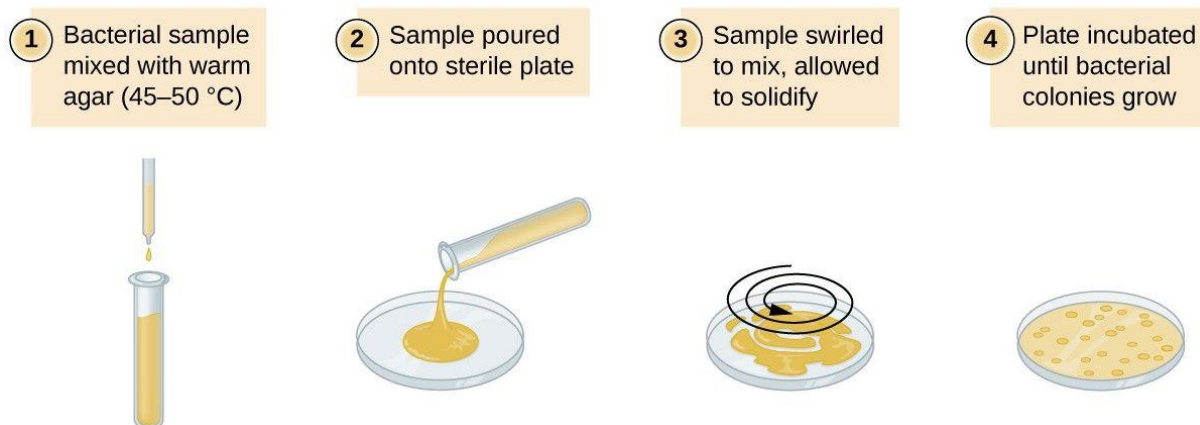
(۳) روش مخلوط Pour plate

در این روش مقداری کمی از نمونه رقیق شده با آگار ذوب شده در حال سرد شدن مخلوط (که در بن ماری در درجه ۴۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود) و سپس در یک پتری‌دیش استریل خالی ریخته شود. این روش برای شمردن باکتری‌ها بخصوص در مواد غذایی روش مناسبی است و در مورد باکتری‌های بی‌هوازی بسیار به‌درد بخور است. این روش در سال ۱۸۷۰

توسط جوزف لیستر به کار گرفته شد. اگر نیاز بود مجدد سطح آمیخته با باکتری را با لایه نازکی از همان محیط کشت بپوشانید در این حالت به آن کشت ۲ لایه گفته می‌شود.

نکته مهم: باز کردن در پلیت با قرار دادن آن بین انگشت کوچک و کف دست صورت می‌گیرد. روش قرار دادن پتری دیش: چون محیط کشت حاوی آگار، آب دارد در حرارت اتاق این آب خارج شده و بصورت بخار در درپوش ظاهر می‌شود که مقداری از آن روی سطح آگار ریخته باعث مخلوط شدن کلنی مجزا می‌شود و توده ای از میکروارگانیسم در هم ایجاد می‌کنند که برای جلوگیری از این حالت توصیه می‌شود پتری دیش را وارونه قرار داد.

Pour Plate Method



نحوه تهیه کشت پورپلیت

کشت در محیط جامد لوله

محیط کشت‌ها در لوله هم به‌صورت سطح قائم Butt و هم سطح مورب slant تهیه می‌شوند. در مورد کشت در لوله هم باید شرایط استریل رعایت شود دهانه لوله پنبه گذاری گردد و قبل و بعد از کشت سر لوله با شعله و در مجاورت چراغ الکی حرارت داده شده همچنین قبل از کشت و برداشت نمونه و بعد از کشت آنس استریل شود برای استریل کردن آنس نباید آن را مستقیم داخل شعله کرد بلکه باید به تدریج به شعله نزدیک کرد چون ممکن است مواد استریل نشده اطراف پخش شوند.

برای کشت در لوله تهیه شده به روش قائم از آنس استفاده می‌شود که نوک آنس در مسیر مستقیم وارد محیط و در مسیر مستقیم هم از آن خارج می‌شود.

در محیط‌های تهیه شده با سطح مورب یا slant علاوه از کشت در عمق، در سطح مورب محیط کشت بصورت زیگزاگ کشت داده می‌شود. محیط مورب برای ذخیره میکروب نسبت به پلیت ارجحیت دارد زیرا محیط کمتری لازم است و مشکل آلوده می‌شود.

نکته: در صورت نیاز به بررسی رشد باکتری‌هایی که به اکسیژن کمتری نیاز دارند بهتر است که از آگار عمیق استفاده شود.

مراحل پس از کشت باکتری‌ها

بعد از انجام نمونه کشت نمونه‌ها باید انکوباسیون شوند که در طی این مرحله شرایط حرارتی، اکسیژن و رطوبت جهت رشد میکروب‌ها فراهم می‌شود. باکتری‌ها از لحاظ نیاز به موارد فوق‌الذکر متفاوت هستند، لذا شرایط انکوباسیون نمونه‌ها متفاوت می‌باشد که در زیر به برخی از موارد مهم اشاره می‌شود.

شرایط هوایی و اکسیژن مورد نیاز باکتری‌ها

باکتری‌ها از نظر نیاز به اکسیژن به ۴ گروه عمده تقسیم می‌شوند:

۱) هوازی اجباری ۲) بی‌هوازی اجباری ۳) هوازی - بی‌هوازی اختیاری ۴) میکرو آئروفیلیک یا کاپتنوفیلیک

اکسیژن ماده غذایی ضروری رشد باکتری هوازی اجباری است ولی برای باکتری‌های بی‌هوازی در حکم سم است. اکسیژن علاوه بر این که به عنوان گیرنده نهایی هیدروژن در تنفس سلولی به کار می‌رود، می‌تواند باعث تغییر در پتانسیل اکسیداسیون و احیاء شود.

باکتری‌های هوازی در انکوباتور هوازی و باکتری‌های بی‌هوازی باید در شرایط بی‌هوازی انکوباسیون شوند که در فصول بعد در خصوص شرایط صحبت خواهد شد.

دمای مناسب انکوباسیون باکتری‌ها:

هر باکتری در محدوده خاص دمایی رشد می‌کند. پائین‌ترین درجه‌ای که رشد باکتری در آن صورت می‌گیرد را دمای حداقل رشد گویند. تعیین این دما بسیار مشکل است چون رشد باکتری به کندی صورت می‌گیرد. بالاترین درجه که رشد باکتری در آن صورت می‌گیرد را دمای حداکثر رشد گویند. حرارت رشد مناسب حرارتی است که سریع‌ترین تکثیر در آن رخ می‌دهد و اغلب از حداکثر دمای رشد، چند درجه پایین‌تر است.

درجه حرارت در اعمال آنزیمی سلول اثر می‌گذارد که اگر پایین باشد فعالیت آنزیمی کاهش یافته و رشد باکتری نیز آهسته می‌شود. در انجماد تمام فعالیت‌های متابولیکی متوقف می‌شود. درجه حرارت بالا بدلیل تغییر ماهیت پروتئین‌های باکتری و آنزیم‌ها باعث آسیب به سلول و مرگ سلول می‌شود.

انکوباسیون نمونه‌های بالینی به طور معمول در ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد صورت می‌گیرد در حالیکه باکتری‌هایی که به صورت طبیعی در خاک زندگی می‌کنند در ۲۵ درجه انکوباسیون می‌شوند. دمای مناسب رشد برای برخی باکتری‌ها ۲۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. برخی باکتری‌ها سرما دوست هستند که برای تحریک رشد آن‌ها را در یخچال نگهداری می‌کنند. انکوباتور یخچال‌دار نیز برای جداسازی این باکتری‌ها وسیله مناسبی است.

زمان انکوباسیون :

زمان لازم برای مشاهده کلنی‌های باکتری بسته به جنس و گونه میکروب متفاوت است. در مورد برخی از باکتری‌ها که سریع‌الرشد هستند در محیط مایع ۴ ساعت انکوباسیون نمونه و در محیط جامد پس از ۱۸ - ۲۴ ساعت انکوباسیون کلنی قابل مشاهده تشکیل می‌شود. این زمان در میکروب‌هایی مثل مایکوباکتریوم‌ها ۳ - ۶ هفته می‌باشد.

محیط‌های کشت باید هر چند هفته یکبار به محیط جدید منتقل شوند که به فاصله نگهداری و میزان رشد ارگانیسم بستگی دارد.

عفونت بی‌هوازی و کشت باکتری‌های بی‌هوازی

کشت باکتری بی‌هوازی

باکتری‌های هوازی، در فقدان اکسیژن مولکولی قادر به رشد نیست. در حالیکه باکتری‌های بی‌هوازی اجباری فقط در شرایط عدم حضور اکسیژن رشد می‌کنند.

برای کشت دادن میکروب بی‌هوازی می‌توان از تکنیک‌های مختلفی استفاده کرد.

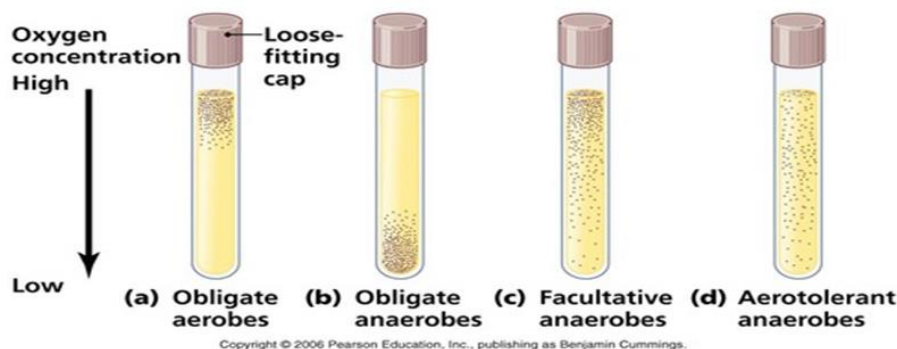
افزودن مواد احیاء کننده (سیستئین - تیوگلیکولات) در محیط کشت، قرار دادن پلیت‌های کشت شده در انکوباتور بی‌هوازی (هوای داخل انکوباتور با گازهای نیتروژن و هیدروژن و CO_2 جایگزین می‌شود)، استفاده از جار بی‌هوازی و سیستم گاز پک از جمله این تکنیک‌ها هستند.

کشت در محیط تیوگلیکولات Thioglycollate media

یک محیط نیمه جامد است که در لوله‌های درب پیچ‌دار تهیه می‌شود. ماده سدیم اسید تیوگلیکولیک موجود در این محیط، ترکیب احیاء کننده قوی است که با اکسیژن محیط ترکیب شده و شرایط بی‌هوازی ایجاد می‌کند.

این محیط حاوی ۰/۰۷۵ درصد آگار نیز می‌باشد که جهت جلوگیری از جریان اکسیژن اتمسفر به محیط به آن اضافه می‌شود. رنگ معمولی محیط تیوگلیکولات زرد کم رنگ است، اما زمانی که اکسیژن در آن حل شود به رنگ صورتی یا آبی کم رنگ تغییر خواهد یافت. زیرا در این محیط معرف رنگی مانند متیلن بلو یا رزازورین (Resazurin) وجود دارد که به عنوان معرف پتانسیل اکسیداسیون احیاء عمل می‌کند.

رنگ صورتی در قسمت بالای لوله مشاهده می‌شود، اگر عمقی بیش از ۱/۵ سانتی‌متر از بالای لوله تغییر رنگ دیده شد، برای کشت بی‌هوازی مناسب نیست. در چنین حالتی درب پیچ‌دار محیط کشت را کمی باز کرده و ده دقیقه درون بن ماری جوش قرار می‌دهند تا اکسیژن حل شده در محیط خارج گردد. به منظور تلقیح نمونه‌های بی‌هوازی باید اجازه دهید تا دمای محیط کاهش یابد و ترجیحاً نمونه را به عمق لوله تلقیح نمائید. رشد باکتری‌ها در محیط مایع به صورت کدورت دیده می‌شود هرچه کدورت بیشتر، تعداد باکتری بیشتر است.



شکل بالا به صورت شماتیک محل رشد باکتری‌ها را در این محیط نشان می‌دهد در لوله A باکتری‌های هوازی اجباری، لوله B بی‌هوازی اجباری، لوله C و لوله D هوازی - بی‌هوازی اختیاری رشد کرده‌اند.

کشت در جار بی‌هوازی: (Anaerobic jar)

جار بی‌هوازی محفظه‌ای شیشه‌ای با درهای بسیار محکم که به روش های مختلف اکسیژن آن تخلیه شده و شرایط را برای رشد باکتری های بی‌هوازی فراهم می‌سازند. حذف اکسیژن از محیط داخلی جار به دو طریق عمده صورت می‌گیرد:

الف- پمپ تخلیه یا سیستم Mart:

در این روش نوعی از جار بی‌هوازی به کار می‌رود که روی درب آن دو عدد شیر وجود دارد. یکی از شیر ها برای تخلیه گازهای درون جار به پمپ تخلیه متصل می‌شود و شیر دیگر برای اتصال به کپسول گاز ازت و دی اکسید کربن (۹۵ درصد ازت و ۵ درصد دی اکسید کربن) به کار می‌رود و این دو گاز را جایگزین هوای خارج شده نموده سپس جار به انکوباتور معمولی منقل می‌شود.

ب- سیستم گاز پک Gas Pack :

اولین بار توسط شرکت اسکات در آمریکا ساخته شد. این مواد در اثر واکنش با آب باعث تولید H_2 ، CO_2 می‌شود که H_2 در حضور کاتالیزور (پالادیوم یا دآلومینا ۳-۵ گرم) با O_2 موجود در جار ترکیب شده و به صورت قطرات آب ظاهر شده و فشار داخل جار کم می‌شود. به این ترتیب اکسیژن موجود در جار حذف شده و شرایط بی‌هوازی حاکم می‌شود.

دو نوع گاز پک وجود دارد:

(۱) گاز پک کلاس C : به منظور کشت باکتری‌های میکروآئروفیلیک که نیازمند CO_2 می‌باشد مثل کمپیلوباکتر استفاده می‌شود.

(۲) گاز پک کلاس A : به منظور کشت باکتری‌های بی‌هوازی مطلق مثل کلستریدیوم

در این روش به پکت گاز پک طبق دستورالعمل مندرج بر روی پکت حجم مشخصی آب اضافه می‌شود. در اثر واکنش آب با ترکیبات موجود در پکت، گاز های CO_2 و H_2 آزاد می‌شود. هیدروژن حاصل در مجاورت کاتالیزور پالادیوم با اکسیژن موجود ترکیب شده و آب تولید می‌گردد. برای حصول اطمینان از شرایط بی‌هوازی سیستم، از اندیکاتور استفاده می‌شود رایج ترین اندیکاتور متیلن بلو است که در حضور اکسیژن به رنگ آبی و در عدم حضور بی رنگ است. در صورت عملکرد خوب اندیکاتور ابتدا بنفش می‌شود ولی به مرور سفید می‌شود. گاز پک‌ها اندیکاتور متیلن بلو دارند ولی اگر نداشتند باید اندیکاتور متیلن بلو را در آن قرار داد.

پس از کشت باکتری در محیط مناسب به گاز پک ۱۰ سی سی آب مقطر اضافه و سپس داخل جار که پلیت‌های کشت میکروبی قبلا داخل آن قرار گرفته، گذاشته می‌شود. پس از چند دقیقه گرما تولید می‌شود که با تولید بخار بالای جار مشخص می‌شود تولید قطرات آب نشانگر عملکرد خوب کاتالیزور و حذف اکسیژن است.

روش پیروگال قلیایی

عامل احیا کننده در فضای بالایی لوله کشت جایگزین شده و به باکتری بی‌هوازی اجازه رشد روی آگار شیبدار خواهد داد. روش بسیار مشکلی است و متداول نیست فقط هنگامی که بسیار ضروری باشد انجام می‌شود.

شرایط بی‌هوازی با فعال کردن پیروگال توسط کربنات سدیم ایجاد می‌شود که پیروگال بعنوان عامل احیاء کننده قوی عمل کرده و اکسیژن آزاد داخل لوله را در لوله در بسته معرفی می‌کند.

نحوه انجام آزمایش:

(۱) آگار مغذی شیبدار که با درپوش پنبه‌ای سطح بسته شده انتخاب و میکروآرگانیسم در سطح آن تلقیح می‌شود.

(۲) پس از کشت پنبه فشار داده می‌شود تا به ۱ سانتی متری لبه آگار شیبدار برسد باید درپوش پنبه ای بسیار محکم باشد که مواد مایع جابجا نشود ولی گاز قادر به تبادل باشد.

(۳) کریستال‌های پروگال با قاشق توزین به لوله اضافه می‌شود بطوریکه تا ۲ سانتی متری دهانه لوله برسد.

(۴) یک قطره چکان پر از سدیم کربنات ۱۰٪ به پیروگال اضافه می‌شود

(۵) یک درپوش لاستیکی داخل دهانه لوله قرار داده شده و لوله وارونه شده در پیچ پیچانده می‌شود تا سفت شود.

(۶) یک پوشش روی در لوله مثل لفاف پیچانده شده و لوله به صورت وارونه داخل سبد سیمی نگهداری می‌شود

(۷) انکوباسیون در ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت انجام شود. (باکتری بی هوازی در این شرایط قادر به رشد است).

موقع برداشت درپوش لوله باید با احتیاط عمل کرد چون برخی میکروارگانیسم‌ها گاز زیادی تولید کرده و باعث پرتاب شدن درب لوله می‌شوند.

از محیط کشت حاوی عامل احیاء کننده مثل تیوگلیکولات استفاده می‌شود که پتانسیل اکسیداسیون و احیاء را پایین می‌آورد . در این محیط‌ها معرفی مثل متیلن بلو است که در حالت اکسید آبی و در حالت احیاء بی‌رنگ است.

کشت باکتری‌های میکروآئروفیلیک یا کاپتنوفیل:

این باکتری‌ها در فشار کم اکسیژن رشد می‌کنند و برای رشد به CO₂ نیاز دارد پس از جار حاوی شمع استفاده Candle jar استفاده می‌شود. جار کندل ظرفی است که دارای درب می‌باشد. بر اثر سوختن شمع داخل آن مقدار غلظت اکسیژن کمتر از هوای اتاق می‌شود و غلظت گاز کربنیک ۳٪ می‌شود. که شرایط مناسبی برای رشد این باکتری‌هاست. همچنین از گاز پک‌های کلاس C نیز که شرایط میکروآئروفیلیک داخل جار تولید می‌کنند، می‌توان استفاده کرد.

شناسایی عفونت‌های بی‌هوازی:

چه عواملی باعث شک به وجود یک میکروب بی‌هوازی می‌شود؟

(۱) وجود هر نوع فرآیند نکروتیک به‌خصوص در نقاطی از بدن که به طور طبیعی محل وجود جمعیت زیادی از باکتری‌های بی‌هوازی است.

(۲) بوی تعفن

(۳) وجود گاز

نمونه‌های مربوط به باکتری‌های بی‌هوازی می‌تواند شامل موارد زیر باشد:

- مایع مغزی نخاعی بخصوص در صورت وجود شواهدی دال بر آسیب مغزی

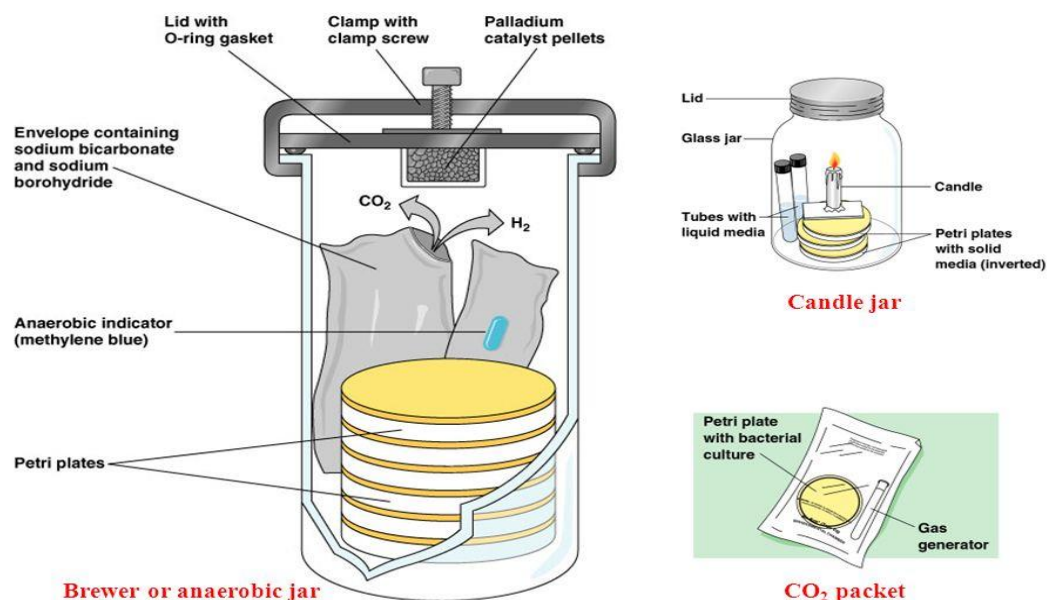
- آبسه‌ها

- آسپیره نای- بیوپسی نسوج - ترشحات رحم - خون - صفرا - مغز استخوان - مایع مفصلی

اگر نمونه از محلی بدست آمده باشد که در حالت طبیعی حاوی فلور باکتری بی‌هوازی است فاقد ارزش باکتری بی‌هوازی می‌باشد.

* پلیت‌هایی را که مشکوک به باکتری بی‌هوازی هستیم هیچگاه (حتی به مدت کوتاه) نباید روی میز آزمایشگاه باقی گذاشت.

Anaerobic and Low O₂ Culture Methods



بررسی رشد میکروارگانیسم‌ها

بعد از طی دوره انکوباسیون رشد میکروارگانیسم‌ها بررسی می‌شود. رشد میکروارگانیسم‌ها در محیط مایع سریع بوده و ظرف ۴-۶ ساعت مشخص می‌شود. ولی در این روش تفکیک و تشخیص باکتری‌ها از هم بسیار مشکل است.

علامت رشد میکروارگانیسم در محیط مایع

(۱) ایجاد کدورت Turbidity: تیرگی کم و بیش متراکم

(۲) تشکیل پوسته سطحی Pellicle formation: تعداد کمی از سلول‌ها در سطح محیط مایع شناور است.

(۳) ایجاد رسوب sediment: سلول‌ها در ته لوله محیط کشت مایع بصورت رسوب تجمع کرده و در صورت تکان دادن آهسته لوله سلول‌ها بالای لوله مشاهده می‌شود.

علایم رشد میکروارگانیسم در محیط جامد

در محیط جامد باکتری‌ها کلنی‌های متفاوتی تشکیل می‌دهند. که به شناسایی آنها کمک می‌کند همچنین تغییر رنگ محیط نیز کمک کننده است.

کلنی: توده‌ای قابل رویت از میکروارگانیسم‌ها که در اثر تقسیمات متوالی یک میکروارگانیسم ایجاد شود. افراد موجود در یک کلنی از نظر ژنتیکی یکسان بوده و خصوصیات ظاهری‌شان هم یکسان است پس خصوصیات ظاهری کلنی به شناسایی میکروارگانیسم کمک می‌کند.

موارد زیر را در کلنی بررسی می‌شود و در تشخیص باکتری و قارچ‌ها راه گشاست :

- (۱) شکل کلنی: موج - ریشه ایی - رشته ای - محدب الطرفین - نامنظم - گرد
 - (۲) اندازه کلنی
 - (۳) تعداد کلنی
 - (۴) رنگ‌های کلنی: البته برخی میکروب‌ها شکل ظاهری خود را در دماهای مختلف تغییر می‌دهند. مثلا سراسیا مارسینس در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد کلنی قرمز و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کلنی سفید تولید می‌کند. شایان ذکر است که رنگ کلنی باکتری‌ها در محیط مختلف فرق دارد.
 - (۵) قوام کلنی: موکوئیدی یا خشن بودن
 - (۶) سطح کلنی: صاف - محدب - فرورفته - نافدار
 - (۷) حاشیه کلنی: صاف - مژرس - ریشه ایی
 - (۸) ارتفاع کلنی
 - (۹) وجود یا عدم وجود حرکت:
- وجود کلنی‌های مختلف در یک محیط کشت می‌تواند بیانگر آلودگی محیط کشت باشد.
- انکوباسیون بیش از ۴۸ ساعت در باکتری‌های سریع‌الرشد کلنی را بزرگتر کرده و شکل کلنی را عوض می‌کند.

فصل ششم :

روش‌های شمارش باکتری‌ها

در خیلی از مطالعات باکتری شناسی از جمله در میکروبیولوژی مواد غذایی لازم است میکروب‌های موجود در واحد حجم شمارش شوند.

در نمونه‌های مایع این کار در هر میلی‌لیتر، و در نمونه‌های جامد در هر گرم تعیین می‌شود. برای این منظور از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود.

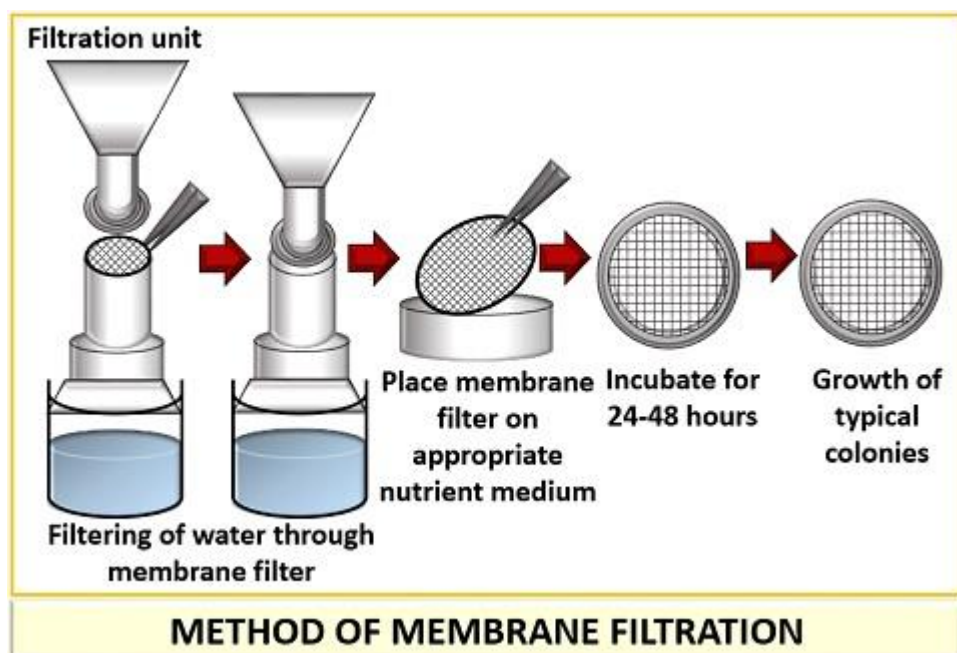
شمارش باکتری به روش اسپکتروفتومتری

این روش به منظور اندازه‌گیری کدورت موجود در یک محلول بر اساس میزان نور عبور کرده یا جذب شده توسط سوسپانسیون میکروبی به کار می‌رود.

در این روش بر اساس جذب نوری بدست آمده و مقایسه آن با محلول استاندارد می‌توان تعداد میکروارگانیسم‌های موجود در هر میلی‌لیتر نمونه را بطور تقریبی مشخص کرد.

شمارش باکتری‌ها توسط فیلترهای غشایی

فیلترهای غشایی با قطر منفذ 0.44 میکرون برای آب مناسب است که در حجم زیاد بار میکروبی کم ممکن است داشته باشد. در مورد شمارش میکروب‌های شیر می‌توان از فیلترهای اپی فلورسنت استفاده کرد که 80 درصد باکتری‌ها پشت غشاء جمع می‌شوند.



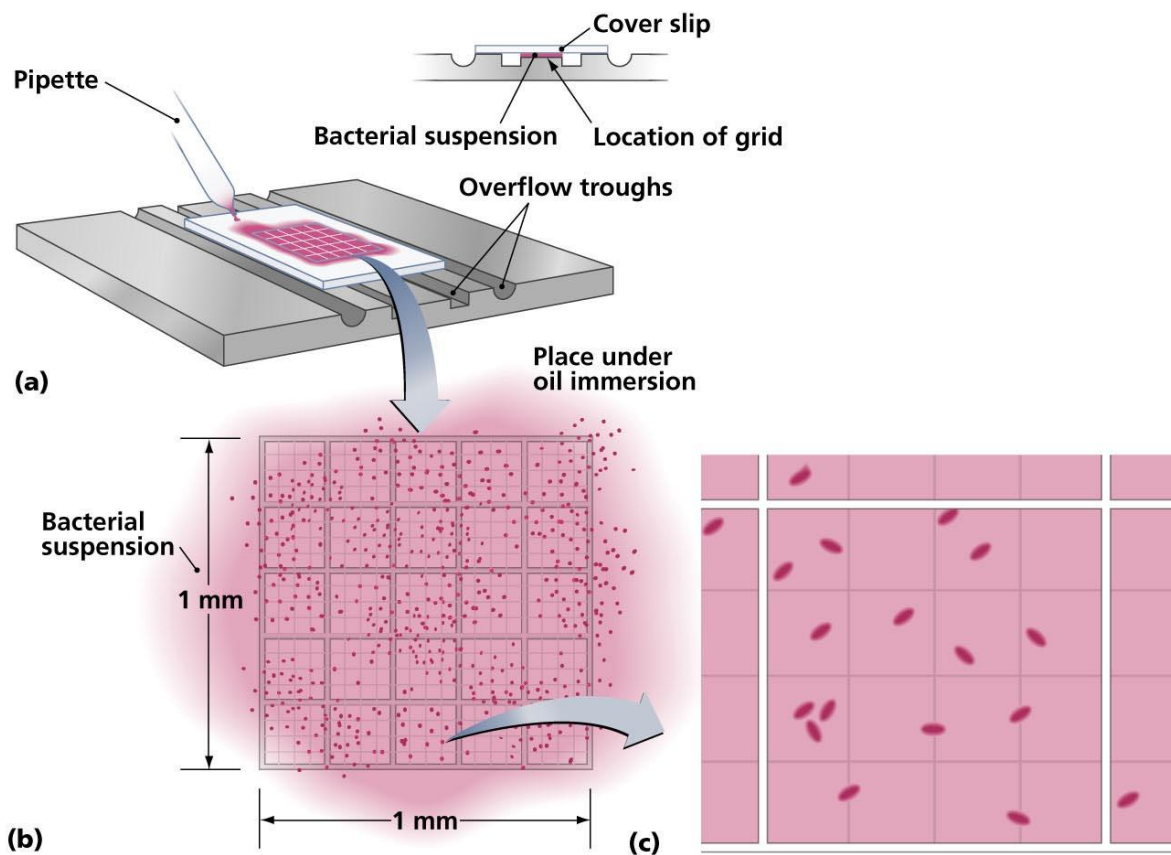
شمارش مستقیم میکروسکوپی (DMC) Direct Microscopic Count

این روش اولین بار توسط برید ابداع شده و برای تشخیص کیفی میکروب‌های شیرخام، لبنیات و محصولات خشک و منجمد کاربرد دارد.

برای این منظور ابتدا ۰/۱ میلی‌لیتر نمونه همگن شده به وسیله پی‌پت برداشته و روی لام برید (۱ سانتی‌متر مربع) ریخته و کاملاً پخش می‌شود. سپس لام در حرارت ۵۵ درجه سانتی‌گراد خشک شده و در مرحله بعد به روش رنگ آمیزی ساده یا گرم رنگ آمیزی شود. در نهایت شمارش با عدسی ۱۰۰ و روغن ایمرسیون انجام می‌شود.

مشاهده کپک و مخمرها با این روش ساده است ولی برای شمارش باکتری‌ها نیاز به پشتکار و دقت بالا می‌باشد.

مزیت این روش سرعت بالای آن و تشخیص وجود سلول‌های میکروبی در ماده غذایی است. معایب این روش بررسی نمونه کوچکی از بهرمواد غذایی است که دقت کمی دارد. همچنین خطای بالا، خستگی اپراتور و تجمع بالای میکروب‌ها در یک قسمت و احتمال خطا در شمارش تعداد کلی از معایب دیگر این روش است.



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

شمارش کلی میکروب‌های هوازی روش کشت سطحی Surface Plating

ابتدا رقت ۰/۱ از ماده مورد نظر با استفاده از سرم فیزیولوژی یا آب مقطر آماده می‌گردد. سپس ۱ میلی‌لیتر از رقت حاصل با ۹ میلی‌لیتر مایع رقیق کننده در داخل لوله آزمایش مخلوط می‌گردد تا رقت ۰/۱ به دست آید. به همین ترتیب و با انتقال یک

میلی لیتر از رقت حاصل به لوله های بعدی حاوی ۹ میلی لیتر مایع رقیق کننده، رقت های ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۱ و .. ایجاد می گردد. سپس از هر کدام از رقت ها ۰/۱ میلی لیتر برداشت و به سطح پلیت حاوی محیط کشت عمومی مثل نوترینت آگار یا BHI منقل و با لوله L شکل یا سواپ پخش می گردد. پس از چند دقیقه صبر به منظور جذب در محیط به پلیت ها انکوباتور ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی گراد منتقل می شوند.

پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوباسیون تعداد پرگنه های میکروبی ایجاد شده در هر پلیت شمارش می شود. بهتر است پرگنه ها با دستگاه کلنی کانتر شمارش شود و باید دقت نمود که هر پرگنه دو بار شمارش نشود.

پلیت هایی که حاوی ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی میکروبی باشند انتخاب و پس از شمارش کلنی با کلنی کانتر تعداد باکتری در هر گرم یا میلی لیتر نمونه با استفاده از فرمول زیر به دست می آید:

تعداد کلنی × عکس ضریب رقت پلیت

$$SPC = \text{Colonies/plate} \times DF \quad CFU/gr$$

شمارش کلی باکتری ها با روش کشت مخلوط یا پورپلیت Pour Plating

در روش قبلی احتمال اینکه باکتری های بی هوازی موجود در ماده مورد آزمایش رشد نکنند وجود دارد لذا از روش کشت مخلوط یا پورپلیت استفاده می شود.

در این روش رقت سازی به روشی که قبلاً ذکر شد انجام گرفته و از هر رقت یک میلی لیتر به داخل پلیت خالی استریل منتقل شود. سپس روی آن ۱۵-۱۸ میلی لیتر محیط کشت عمومی که استریل شده و به دمای ۴۵ درجه سانتی گراد رسانده شده است، اضافه می شود (محیط پلیت کانت آگار ارجحیت دارد).

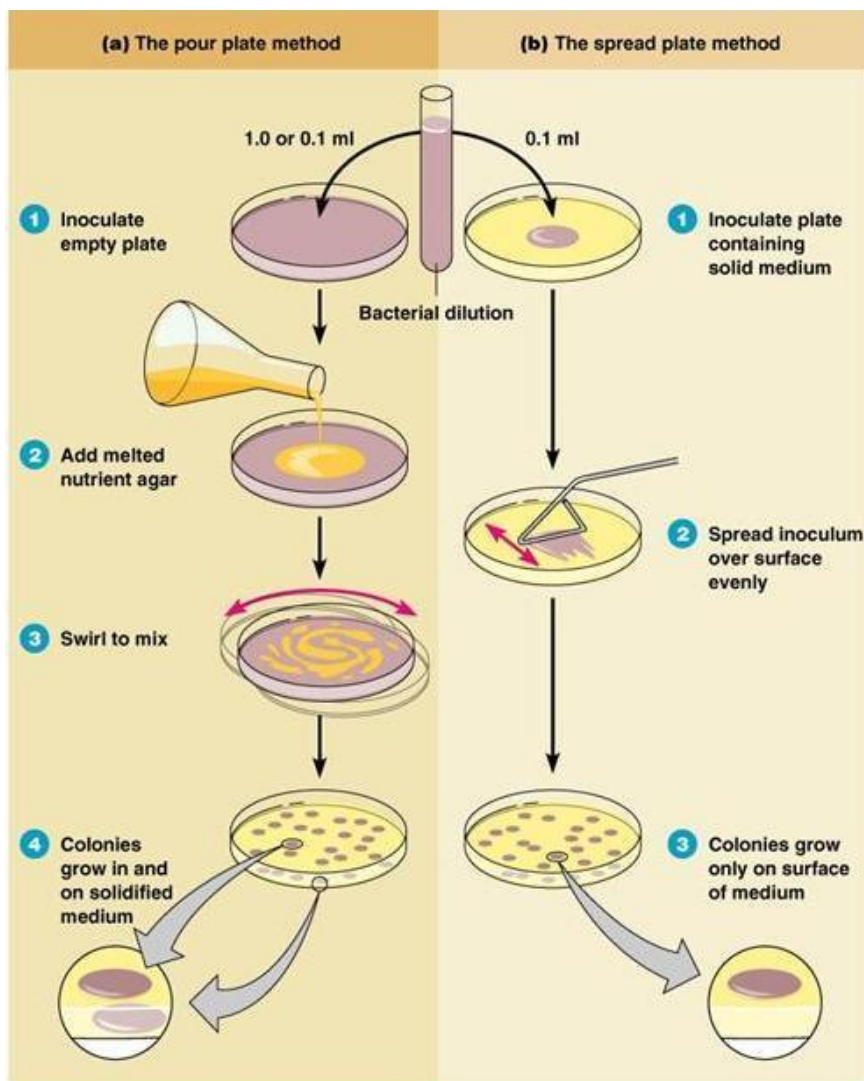
سپس درب پلیت بسته شده و با حرکت دادن آن به آرامی و به صورت ۸ لاتین در جهت و خلاف جهت عقربه های ساعت نمونه و محیط با هم مخلوط می گردد (ترجیحاً از هر رقت دو پلیت تهیه گردد). باید دقت نمود که هم زدن کم مانع پخش کامل میکروب می شود. ۱۰ تا ۱۵ دقیقه زمان لازم است تا محیط ها جامد گردند.

پس از آن محیط ها به انکوباتور ۳۱ تا ۳۵ درجه سانتی گراد منقل و پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوباسیون نتایج مثل روش کشت سطحی قرائت می گردد.

محیط پلیت کانت آگار Plate Count Agar

این محیط فاقد هر گونه بازدارنده یا نشانگر است. از این محیط برای شمارش کل میکروب ها در شیر ، محصولات لبنی و آب استفاده می شود.

طرز تهیه محیط: ۲۳/۵ گرم از محیط در یک لیتر محیط آب مقطر حل و سپس در ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردد. این محیط در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و pH هفت، شفاف و زرد رنگ هستند.



Copyright © 2007 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

شمارش بیشترین تعداد احتمالی (MPN (Most Probable Number)

این روش هم برای شمارش کلی و هم اختصاصی باکتری‌ها از جمله کلی‌فرم‌ها کاربرد دارد. این سیستم توسط دانشمندی به نام فیشر و بر اساس احتمالات آماری بناشده است. مزایای این روش این است که می‌توان تعداد کم باکتری را در نمونه تشخیص داد و نیازی به شمارش پرگنه نیست و سرعت کار نیز بالاست.

این آزمایش به صورت سیستم ۳، ۳، ۵ لوله‌ای اجرا می‌شود. در مورد نمونه‌های جامد ابتدا رقت یک دهم از نمونه تهیه می‌شود به این منظور ۲۵ گرم نمونه در ۲۲۵ میلی لیتر مایع رقیق کننده ریخته می‌شود تا رقت یک دهم به دست آید.

سپس با اضافه کردن یک میلی لیتر از محلول حاصل به لوله حاوی ۹ میلی لیتر مایع رقیق کننده رقت دوم که معادل یک صدم است، به دست می‌آید.

سپس سه سطح لوله سه تایی آماده شده و در سه لوله اول ۲۰ میلی لیتر محیط کشت مایع ریخته و ۱۰ میلی لیتر از رقت اول آماده شده ، اضافه می شود .

در سه لوله دوم که ۹ میلی لیتر محیط کشت وجود دارد، به هر کدام از آنها یک میلی لیتر از رقت اولیه اضافه می گردد به لوله های سه تایی سوم که حاوی ۹ میلی لیتر محیط کشت مایع هستند یک میلی لیتر از رقت دوم که معادل یک صدم بود اضافه می شود.

به این ترتیب لوله های سه تایی اول یک برابر، دوم یک دهم برابر و سوم یک صدم برابر نمونه دارند.

بسته هدف محیط می تواند عمومی و نوترینت براث یا اینکه لاکتوز براث باشد .

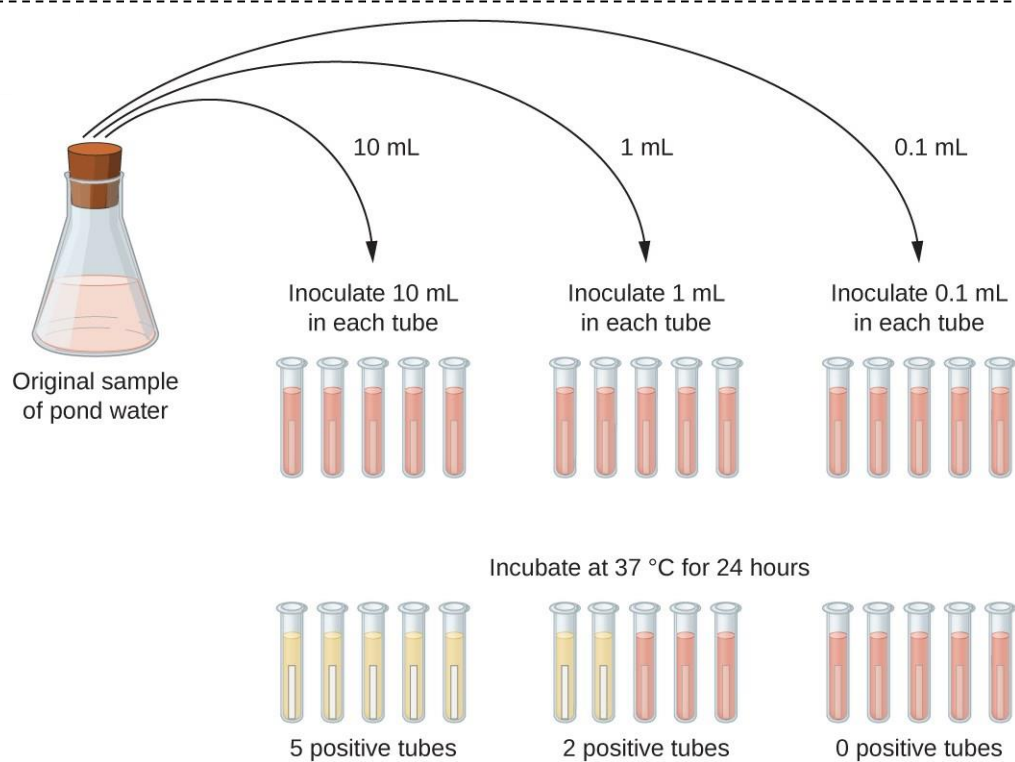
جهت بررسی کلی فرم ها یکی از ویژگی های آنها تولید گاز ، از تخمیر لاکتوز است می توان در داخل هر کدام از ست های سه تایی لوله یک لوله دورهام به صورت وارانه قرارداد.

سپس لوله ها به انکوباتور منتقل شده و پس از ۲۴ ساعت کدورت و تولید گاز بررسی می شود.

سپس تعداد لوله های مثبت در هر کدام از ست ها تعیین و با استفاده از جدول فیشر تعداد احتمالی باکتری در ۱۰۰ گرم از نمونه به دست می آید. وجود گاز در داخل لوله های دورهام نشان دهنده مثبت بودن لوله از نظر حضور کلیفرم ها می باشد.

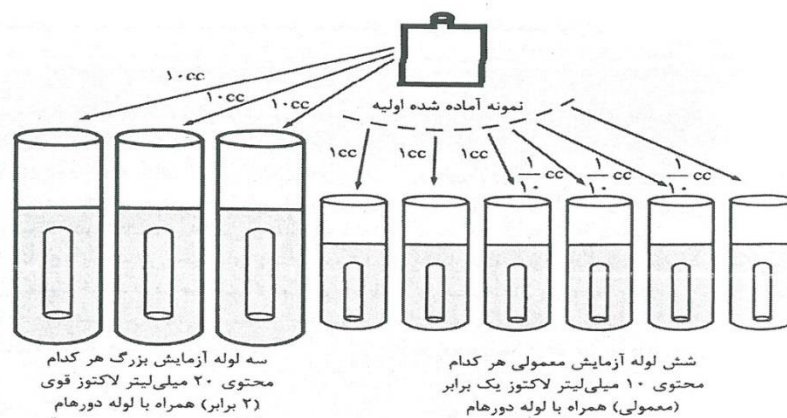
حضور کلی فرم ها و

باکتری E.coli در ماده مورد بررسی باید با آزمایشات تکمیلی مورد تایید قرار گیرد.



تصویر شماتیک از آزمایش MPN به روش ۵ لوله‌ای

جدول استاندارد: بیشترین تعداد احتمالی (MPN) در هر گرم از نمونه و با ۹۵ درصد حدود اطمینان					
روش ۳ لوله ای با مقادیر ۰/۰۰۱ و ۰/۰۱ و ۰/۱ گرم نمونه					
تعداد لوله های مثبت			MPN	حدود MPN	
لوله های حاوی			در هر گرم	پایین ترین	بالا ترین
۰/۰۰۱	۰/۰۱	۰/۱			
۰	۰	۰	۳	-----	۹
۰	۰	۱	۳	۰/۵	13
۰	۱	۰	۳	۰/۵	۲۰
۱	۰	۰	۴	۰/۵	۲۱
۱	۰	۱	۷	۱	۲۳
۱	۱	۰	۷	۱	۳۶
۱	۱	۱	۱۱	۳	۳۶
۱	۲	۰	۱۱	۳	۳۶
۲	۰	۰	۹	۱	۳۷
۲	۰	۱	۱۴	۳	۴۴
۲	۱	۰	۱۵	۳	۸۹
۲	۱	۱	۲۰	۷	۴۷
۲	۲	۰	۲۱	۴	۱۵۰
۲	۲	۱	۲۸	۱۰	۱۲۰
۳	۰	۰	۲۳	۴	۱۳۰
۳	۰	۱	۳۹	۷	۳۸۰
۳	۰	۲	۶۴	۱۵	۲۱۰
۳	۱	۰	۴۳	۷	۲۳۰
۳	۱	۱	۷۵	۱۴	۳۸۰
۳	۱	۲	۱۲۰	۳۰	۳۸۰
۳	۲	۰	۹۳	۱۵	۴۴۰
۳	۲	۱	۱۵۰	۳۰	۴۷۰
۳	۲	۲	۲۱۰	۳۵	۱۳۰۰
۳	۳	۰	۲۴۰	۳۶	۲۴۰۰
۳	۳	۱	۴۶۰	۷۱	۴۸۰۰
۳	۳	۲	۱۱۰۰	۱۵۰	-----
۳	۳	۳	۲۴۰۰	-----	-----



فصل هفتم :

تکنیک های ضد عفونی و استریلیزاسیون

پاستوریزاسیون

عملی است که فقط باعث از بین رفتن باکتری‌های پاتوژن می‌شود. در واقع نوعی استفاده از حرارت مرطوب است که به ۲ شکل انجام می‌شود:

(۱) LTHT: 63°C به مدت ۳۰ دقیقه

(۲) HTHT: 72°C به مدت ۱۵ ثانیه

استریلیزاسیون Sterilization

عملی است که در آن روش یا ماده مورد نظر موجب از بین رفتن کلیه میکروارگانیسم‌ها می‌شود و همه اشکال حیات از جمله سلول رویشی، اسپورها و ویروس‌ها نابود می‌شوند. استریلیزاسیون شرط ضروری کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی است. اگر حتی یک میکروب زنده باشد آن جسم استریل نیست. اجسام استریل تا وقتی که آلوده نشوند استریل باقی می‌مانند.

روش‌های مختلفی برای استریلیزاسیون وجود دارند از جمله استریلیزاسیون فیزیکی، استریلیزاسیون شیمیایی، استفاده از اشعه و استفاده از صافی وجود دارد که انتخاب روش استریلیزاسیون به ماهیت جسمی که باید استریل شود بستگی دارد.

استریلیزاسیون فیزیکی

به ۳ صورت استفاده از حرارت، اشعه‌ها و استفاده از فیلترهای میکروبی صورت می‌گیرد.

(۱) استفاده از حرارت:

مکانیسم اثر حرارت مربوط به تغییر ماهیت و انعقاد پروتئین‌ها می‌باشد و سکافی که در زنجیره DNA به وجود می‌آید. حرارت به ۲ شکل حرارت خشک و حرارت مرطوب مورد استفاده قرار می‌گیرد. حرارت هرچه بیشتر باشد زمان کمتری لازم داریم مثلاً اسپور بوتولیسیم ۴ دقیقه در 120°C مقاومت می‌کند در حالی که در 100°C به مدت ۵/۵ ساعت مقاومت می‌کند. البته باکتری‌ها عمل متفاوتی در مقابل حرارت دارند که به طور ژنتیکی تامین می‌شود. زمان استفاده از حرارت دو اصطلاح به کار می‌رود:

- زمان مرگ حرارتی TDT: زمان مورد نیاز برای کشتن باکتری‌های موجود در یک محیط کشت مایع در درجه حرارت معلوم

- نقطه مرگ حرارتی TDP: درجه حرارت مورد نیاز برای کشتن باکتری‌های موجود در در محیط مایع در ۱۰ دقیقه.

هاگ باکتری‌ها چون ماده دی پیکولینات کلسیم دارد و بی آب شده تحمل بیشتری نسبت به حرارت دارد.

A. حرارت خشک:

- استفاده از کوره الکتریکی: برای سوزاندن نمونه‌های پاتولوژی از آن استفاده می‌شود.

- شعله دادن، حرارت مستقیم، Flampase: حرارت به 1500°C می‌رسد.

- فور الکتریکی Oven

- اشعه مادون قرمز: حرارت تا 180°C بالا می‌برد.

این نوع حرارت بیشتر در مورد اشیاء و مواد بی جان که تحمل بیشتری به حرارت دارند به کار می‌رود. میزان حرارت $160-170^{\circ}\text{C}$ به مدت ۱,۵-۲ ساعت می‌باشد. داخل تمام دستگاه‌ها بخصوص فور باید دماسنج کالیبره بگذاریم.

فور الکتریکی Oven: این دستگاه $250-400^{\circ}\text{C}$ حرارت تولید می‌کند. برای استریل کردن شیشه آلات نشکن و وسایل جراحی به روش حرارت خشک از آن استفاده می‌شود. برخی از باکتری‌ها با تبدیل شدن به فرم اسپور می‌توانند از این دما جان سالم به در ببرند. برای استریل کردن وسایل با فور به اشیاء در کاغذ پیچیده شده و در دمای $170-180^{\circ}\text{C}$ بمدت ۹۰-۱۲۰ دقیقه حرارت داده می‌شود. وسایل قبل از استریل شدن تمیز و خشک می‌شوند به طوری که نباید کمترین رطوبت داشته باشند چون موجب شکستن می‌شود. برخی فورها ونتیلاتور دارند که وقتی وسایل مرطوب گذاشته می‌شود کمک می‌کنند که بخارات خارج شود.

از نوار چسب‌های معرف جهت تایید استریلیزاسیون استفاده می‌شود. در صورت نبود نوارهای معرف زرد شدن رنگ پنبه و کاغذ سفید نشانه سترون بودن است.

B. حرارت مرطوب:

این نوع حرارت قدرت نفوذ بیشتری نسبت به حرارت خشک دارد و برای استریل کردن لباس، محیط کشت و ... استفاده می‌شود.

- جوشاندن: آب 100°C در مدت ۱۰ دقیقه سلول‌های رویشی باکتری را می‌کشد و برای اسپورها ۴-۵ ساعت جوشاند. برای جلوگیری از زنگ زدن ۲٪ در آب کرینات کلسیم اضافه می‌شود.

- اتوکلاو: در این وسیله از حرارت بخار آب تحت فشار استفاده می‌شود. این وسیله حرارت 121°C تحت فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع را در مدت ۱۵-۲۰ دقیقه فراهم می‌کند. باید تمام هوا دستگاه قبل از کار کردن خارج شود چون درجه حرارت بخار آب در تماس با هوا کم می‌شود.

فصل هشتم :

اصول نمونه برداری

نمونه برداری Sampling

نمونه گیری مهمترین قدم در تشخیص عوامل بیماری‌زا در نمونه‌های بالینی و غذایی می‌باشد و هر اشتباهی در آن می‌تواند منجر به تشخیص غلط عامل بیماری‌زا گردد. نمونه باید به روش درست و دقیق اخذ گردد تا نتیجه حاصله مورد اعتماد و صحیح باشد.

نکات زیر هنگام نمونه برداری و حمل آن به آزمایشگاه بایستی مورد توجه قرار گیرد:

- (۱) نمونه باید از محل صحیح، به طور صحیح و به مقدار کافی و در شرایط استریل اخذ گردد.
 - (۲) نمونه‌ها باید عاری از آلودگی خارجی باشند.
 - (۳) نمونه‌ها باید قبل از استفاده از داروهای ضد میکروب (مثل آنتی بیوتیک‌ها) باشند.
 - (۴) نمونه‌ها باید سریعاً و در ظروف استریل در بسته به آزمایشگاه منتقل شوند. در صورت تاخیر باید از روش‌های استاندارد برای انتقال استفاده نمود از جمله می‌توان از محیط‌های انتقالی برای انتقال نمونه و سواب‌های مدفوع یا خلط و ... استفاده کرد.
 - (۵) نمونه‌های ارسالی باید یادداشت حاوی اطلاعات نمونه را به همراه داشته باشند که شامل ماهیت نمونه، تاریخ اخذ نمونه، مشخصات بیمار (در دامپزشکی صاحب دام یا خود دام)، نام فرستنده نمونه و آزمایشات درخواستی باشد.
- نمونه‌برداری از هر کدام از ارگان‌های بدن تابع مقررات خاصی است که در متن زیر به آن اشاره خواهد شد.

نمونه برداری از خون

قارچ‌ها، تک یاخته‌ها، ویروس‌ها و باکتری‌ها می‌توانند وارد خون شده و عفونت خون را ایجاد نمایند. در اثر ورود عوامل عفونی به خون چند حالت اتفاق می‌افتد:

- (۱) باکتری‌می Bacteriemi: حضور باکتری در خون بدون تکثیر
 - (۲) فونجمی Fungemi: حضور قارچ در خون
 - (۳) ویرمی Virami: حضور ویروس در خون
 - (۴) سپتی‌سمی Septicemia: باکتری یا قارچ یا ویروس وارد شده به خون تکثیر یافته و در اثر رشد آن و آزاد سازی فاکتورهای سمی واکنش التهابی ایجاد شده است. از جمله علائم سپتی‌سمی می‌توان به تب، لرز، آلكالوز تنفسی، ضایعات پوستی، تغییر در وضعیت هوشیاری، شوک و انعقاد منتشر داخل عروقی اشاره نمود.
- تشخیص دقیق عفونت‌های خونی به عواملی از قبیل زمان نمونه برداری، میزان باکتری موجود در خون، روش جمع آوری، حجم خون، زمان کشت و ... بستگی دارد.
- زمان نمونه برداری از خون: مهم ترین فاکتور برای تشخیص می‌باشد. بهترین زمان برای خونگیری زمان حادث شدن تب یا لرز است. البته در مورد افراد مبتلا به نقص ایمنی می‌توان در هر زمانی خونگیری را انجام داد. در برخی بیماری‌ها میکروب در دوره نخست بیماری (چند هفته اول) در خون حضور دارد و پس از آن جداسازی از خون بسیار سخت خواهد بود از جمله می‌توان به لپتوسپیروزیس، تب تیفوئید و ... اشاره کرد.

روش نمونه گیری از خون: در زمان نمونه گیری باید دقت نمود که خون گرفته شده با ارگانایسم‌های فلور نرمال پوست آلوده نشود. چند نکته:

- نمونه گیر باید دست‌ها را ضد عفونی کرده و از دستکش استریل استفاده کند.
- بهتر است از نمونه وریدی استفاده شود که دسترسی راحت تر بوده و درد کمتری دارد.
- شستشوی محل با قطر ۵ سانتی متر به وسیله الکل ۷۰٪ و پس از آن پوویدون-آیوداین (بتارین) ۲٪ بصورت دایره ای از داخل به خارج پس از این کار باید صبر شود تا بتادین کاملاً خشک شود.
- پس از برداشت نمونه مجدداً محل با الکل ۷۰٪ شسته شود وسیعی شود اندام مورد نظر بالا گرفته شده و فشار ملایم رویش باشد تا جریان خون سریع تر قطع شود.

حجم خون: برای انجام آزمایشات کشت خون، گرفتن ۳۰ سی سی خون برای بزرگسالان و برای کودکان ۱-۵ سی سی لازم است. در موارد عفونت خون یا سپتی‌سمی توصیه می‌شود خون در ۳ مرحله با فاصله نیم ساعت از ۳ رگ جدا و با ۳ ست خونگیری مجزا صورت گیرد.

محیط‌های کشت خون:

محیط‌های کشت اولیه به صورت بطری‌های شیشه ای حاوی محیط کشت مایع BHI و TSB (Trypticase Soy Broth) حاوی ضد انعقاد SPS (Sodium Polyanethol Sulfonate) به میزان ۰٫۰۲۵-۰٫۰۳۰٪ می‌باشد. برای جلوگیری از انعقاد نباید از هپارین، EDTA یا سیترات استفاده شود. برای افزایش حساسیت می‌توان سوکروز، مانیتول یا سوربوز به محیط کشت افزود تا محیط هایپر تونیک شود به این نوع محیط‌ها محیط‌های Isotonic گفته می‌شود. از محیط های دو فازی هم به منظور کشت خون استفاده می‌شود.

عفونت‌های ایجاد شده در سایر بافت‌ها یا ارگان‌های بدن می‌تواند منجر به سپتی‌سمی شود بطوریکه ۲۵٪ موارد سپتی‌سمی ناشی از عفونت ادراری تناسلی، ۲۰٪ ناشی از عفونت‌های تنفسی، ۱۰٪ به دنبال انتشار از آبسه‌ها، ۵٪ بدنبال عفونت‌های زخم ایجاد می‌شوند.

باکتری‌های ایجاد کننده عفونت خون: انتروباکتریاسه‌ها (از جمله سالمونلا)، سودوموناس‌ها، کوکسیلاها، استرپتوکوک ویریدانس، انتروکوک، باکترئیدی، استافیلو کوکوس اورئوس و استاف‌های کواگولاز منفی و هموفیلوس، بروسلاها

در اکثر موارد ابتلا به سپتی‌سمی به دنبال یکسری فاکتورهای زمینه ساز اتفاق می‌افتد که مهم ترین فاکتور سیستم ایمنی تضعیف شده می‌باشد. از بین رفتن پوست به دنبال سوختگی، اسپلنکتومی (برداشت طحال)، وجود کاتترهای وریدی یا دریچه‌های مصنوعی در قلب از جمله عوامل مستعد کننده وقوع سپتی‌سمی هستند.

نمونه برداری از زخم

عفونت زخم و آبسه متعاقب جراحی یا تروما یا عوامل تخریب کننده مخاط ایجاد می‌شود. بسته به نوع زخم (وزیکول، سوختگی، آبسه، میوزیت) نمونه برداری و شرایط کشت فرق دارد. گاه لازم است محل زخم تمیز و از پایه زخم نمونه برداری شود. گاه از ضایعه (آبسه یا وزیکول) اسپیراسیون می‌شود. نمونه‌ها در محیط‌های کشت مختلف در شرایط هوایی و بی‌هوایی کشت داده می‌شوند.

نمونه برداری از گلو

نمونه برداری از گلو با کمک سواب انجام می‌شود ولی بسته به نوع بیماری محل نمونه برداری متفاوت است.

جهت نمونه برداری از گلو از بیمار خواسته می‌شود دهان خود را باز و زبان خود را بیرون آورد. زبان را با اپیسلانک (قاشقک چوبی) به پایین فشار و سواب به خلف حلق منتقل و پس از نمونه گیری از لوزه‌ها با یک حرکت چرخشی خارج می‌شود.

برای تشخیص بیماری دیفتری (کورینه باکتریوم دیفتریه) نمونه برداری از غشاء کاذب ایجاد شده انجام می‌شود.

کشت روی محیط‌های آگار خون دار، شکلات آگار، یا محیط‌های اختصاصی مثل تلوریت پتاسیم انجام می‌شود.

مهمترین باکتری‌های جدا شده از عفونت‌های گلو عبارتند از:

- انواع/استرپتوکوکوس پایوژنز

- کورینه باکتریوم دیفتریه

- استافیلوکوکوس اورئوس

- نایسریا مننژیتیدیس

دستگاه تناسلی زن

در صورتی که التهاب در رحم باشد نمونه باید به طور مستقیم از اندوسرویکس به کمک اسپیکلوم به دست آید. در این روش می‌توان با داخل کردن نوک سواب استریل در کانال نمونه را برداشته و درصد آلودگی را کم کرد. در صورت وجود التهاب در مهبل لام مستقیم به روش لام مرطوب wet mount باید تهیه و از نظر تریکوموناس واژینالیس و کاندیدا آلبیکنس بررسی شود.

نمونه برداری از گوش:

با سواب استریل باریک انجام می‌شود. بیمار باید قبل از نمونه برداری از دارو یا قطره گوشی استفاده نکرده باشد و حمام نرفته باشد.

نمونه به محیط‌های غنی کننده و افتراقی منتقل و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط هوازی و بی‌هوازی انکوبه می‌شود.

نمونه برداری از ترشحات چشم:

باکتری‌هایی مثل نایسریا مننژیتیدیس، هموفیلوس آنفلوانزا، کورینه باکتریوم، کلامیدیا تراکوماتیس، استرپتوکوکوس و استافیلوکوکوس از جمله عوامل ایجاد کننده عفونت در چشم هستند.

برای نمونه برداری جهت کشت ترشحات چشم در در کراتوکونژیکتویت از قسمت ملتحمه چشم سواب استریل برداشته می‌شود.

نمونه برداری از آبسه‌ها یا زخم‌های باز در چشم یا زجاجیه بایستی توسط چشم پزشک متخصص صورت گیرد. قبل از اقدام تشخیصی و انجام کشت بهتر است رنگ آمیزی گرم انجام شده و سپس نمونه‌ها در محیط‌هایی مثل بلاد آگار کشت و در شرایط هوازی، بی‌هوازی و میکرو آيرو فیلک انکوبه شوند.

نمونه‌های هر دو چشم باید جداگانه کش داده شوند.

جهت تعیین حضور کلامیدیا تراکوماتیس از سواب خشک حاوی آلرژی نات کلسیم استفاده می شود. نمونه ها باید در محیط انتقالی مخصوص حمل شوند.

نمونه برداری از حفره بینی:

استافیلوکوک اورئوس، استرپتوکوکوس پیوژن، نایسریا مننژیتس، بردوتلا پرتوسیسی، هموفیلوس آنفولانزا، کورینه باکتریوم دیفتریه از جمله میکروب های یافت شده در حفرات بینی هستند .

نمونه برداری به وسیله سواب استریل انجام می شود. محل نمونه برداری بر حسب نوع میکروارگانیسم مورد انتظار متفاوت است مثلاً بردوتلا پرتوسیسی در انتهای حفره بینی مستقر می شود.

محیط بلاد آگار از جمله محیط های مهم برای تکثیر دادن باکتریهای حفره بینی می باشد.

برای مشاهده رشد کورینه باکتریوم دیفتری

باید کشت در محیط تلوریت پتاسیم صورت گیرد.

نمونه برداری از مدفوع:

فصل نهم :

تعیین حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها

سنجش حساسیت باکتری‌ها نسبت به داروهای ضد میکروب (Antimicrobial Susceptibility Testing)

نقش اساسی آزمایشگاه‌های میکروب شناسی بالینی فراهم آوردن اطلاعات برای پزشکان جهت شناسایی و درمان بیماری‌های عفونی است. علاوه بر ارزشیابی و تشخیص عامل عفونی، انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب جهت درمان از دیگر وظایف آزمایشگاه‌هاست. انتخاب مناسب آنتی‌بیوتیک علاوه از کاهش میزان مرگ و میر در اثر بیماری‌های عفونی، تعداد روزهای بستری را کاهش داده و هزینه‌های درمان را نیز به شدت کاهش می‌دهد. بحث مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در میکروب‌شناسی مسئله بسیار جدی می‌باشد که درمان بیماری‌های عفونی را با چالش جدی مواجه کرده و به معضلی جهانی تبدیل شده است.

مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به صورت ذاتی یا اکتسابی می‌باشد. دلایل متعددی برای ایجاد مقاومت اکتسابی وجود دارد که مصرف خود سرانه و نابجای آنتی‌بیوتیک، عدم رعایت دوزاژ و دوره درمان، مصرف بی رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در دامپزشکی و عدم رعایت زمان منع مصرف فراورده‌های دامی، دام‌های تحت درمان با آنتی‌بیوتیک از جمله این دلایل می‌باشد.

مکانیسم‌های متعددی در ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها دخالت دارند از جمله:

- (۱) غیر فعال نمودن آنزیمی
- (۲) غیر مشکل هدف آنتی‌بیوتیک
- (۳) کاهش نفوذ پذیری به آنتی‌بیوتیک
- (۴) مسیر فرعی متابولیسم
- (۵) پمپ‌های ایفلاکس

مکانیسم‌های مقاومت ممکن است به صورت مونوژنوس (فقط یک فاکتور در ایجاد مقاومت دخالت داشته باشند) یا هتروژنوس (چند عامل در مقاومت نقش دارد) باشد

تعیین حساسیت باکتری به آنتی‌بیوتیک به اندازه تعیین هویت باکتری اهمیت دارد. البته با دانستن نوع عامل بیماری قسمت اساسی درمان با توجه به خصوصیات و سابقه میکروب را می‌توان انجام داد. ولی امروزه بحث مقاومت‌های دارویی لزوم استفاده از آزمون تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی را چند برابر ساخته است. تعیین نوع دقیق آنتی‌بیوتیک هم از نظر اقتصادی هم از نظر بهداشت فرد و محیط بسیار مهم است. روش‌های متعددی برای تعیین حساسیت باکتری‌ها و قارچ‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها وجود دارد.

روش انتشار از دیسک Disk Diffusion Method

متداولترین روش برای تعیین حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده از دیسک‌های حاوی غلظت مشخص آنتی‌بیوتیک یا روش کربی بائر است (Kirby – bauer Method) در سال ۱۹۹۶ و اولین بار شرکت سوئیسی با نام آنتی‌بیوگرام آنرا ارائه داد به همین علت این روش با نام آنتی‌بیوگرام شناخته می‌شود. محیط کشتی که بصورت روتین استفاده می‌شود محیط کشت مولر هینتون آگار می‌باشد که $pH=7/2 - 7/6$ است. علت این است که میزان مواد مهار کننده (سولفانامیدها و تتراسیکلین‌ها) در آن کم بوده و کاتیونهای Ca^{++} ، Mg^{++} در آن تنظیم شده است. محیطی که درست می‌شود، باید کمی عمیق بوده و ۴ میلی‌متر عمق داشته باشد تا عامل ضد میکروب در تمام جهات پخش شود.

برای این آزمایش نباید از محیط‌های حاوی مواد ممانعت کننده مثل مک کانکی استفاده کرد. این روش برای باکتری بی هوازی قابل استناد نیست.

این روش بیشتر برای باکتری زود رشد مثل آنتروباکتریاسه، استافیلوکوکوس، سودوموناس کاربرد دارد.

در این روش از دیسک‌های کاغذ صافی که آغشته به مقدار معینی آنتی‌بیوتیک هستند استفاده می‌شود. نام و غلظت دیسک روی آن نوشته شده است. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود. رطوبت مهمترین عامل از بین برنده دیسک است بخصوص اگر همراه حرارت باشد.

روش کار:

۱) ۳-۴ کلنی از محیط یا اندام ارسالی برداشته داخل لوله حاوی محیط تریتپتیکازسوی براث یا برین هارت براث یا نوترینت براث کشت داده و ۳-۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد تا ایجاد کدورت کند.

۲) کدورت با نیم مک فارلند یکسان سازی می‌شود تا مقدار باکتری $10^8 \times 1.5$ باشد. اگر کدورت کم بود به زمان انکوباسیون افزوده می‌شود اگر کدورت بیشتر باشد کمی محیط اضافه می‌شود. لوله‌های مک فارلند دارای کدورت استاندارد هستند و برای سنجش تعداد میکروب‌ها مناسبند. و با مخلوط کردن اسید سولفوریک ۱٪ (۰/۱۸ مولار) و کلرید باریوم ۱٪ (۰/۴۸ مولار) به ترتیب زیر بدست می‌آید:

۱۰	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	عدد استاندارد مک فارلن
۱	۰/۹	۰/۸	۰/۷	۰/۶	۰/۵	۰/۴	۰/۳	۰/۲	۰/۱	کلرورباریم
۹	۹/۱	۹/۲	۹/۳	۹/۴	۹/۵	۹/۶	۹/۷	۹/۸	۹/۹	اسید سولفوریک
۳	۲/۷	۲/۴	۲/۱	۱/۸	۱/۵	۱/۲	۰/۹	۰/۶	۰/۳	تعداد تقریبی سلول در ۱۰ به توان هشت

۳) با سواپ از محیط براث برداشت کرده با فشار سواپ به جدار لوله آب اضافه گرفته می‌شود سپس بصورت یکنواخت در سه جهت در تمام سطح پلیت مولر هینتون کشت داده می‌شود با چرخاندن سواپ دور پلیت حاشیه هم تلقیح می‌شود. سپس درب پلیت بسته و ۳-۵ دقیقه صبر می‌شود تا مایع جذب شود.

۴) با دستگاه دیسک دسپنسر Disk Dispenser یا فورسپس دیسک‌ها در سطح محیط کاشته می‌شود. این کار زیر هود یا مجاورت شعله صورت می‌گیرد. تعداد دیسک‌های کاشته شده بسته به قطر پلیت می‌باشد. فاصله دیسک‌ها از هم نباید کمتر از ۱۵ میلی‌متر و از لبه‌های پلیت نباید کمتر از ۱۲ میلی‌متر باشد. دیسک فقط باید یک بار با سطح آگار تماس یابد و از گذاشتن و برداشتن آن باید خودداری شود.

۵) بهتر است از پلیت ۱۵ سانتی‌متری استفاده شود تا بتوان دیسک بیشتری استفاده کرد. دیسک باید فقط یک بار با سطح آگار تماس داشته باشد از گذاشتن و برداشتن خودداری شود.

۶) پلیت‌ها به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد گذاشته می‌شود. کشت باکتری‌های سخت رشد Fastidious باید در مجاورت CO₂ باشد.

معیار های انتخاب دیسک آنتی بیوتیک:

با توجه به وجود انواع مخلف آنتی بیوتیک ها استفاده از دیسک همه آنتی بیوتیک ها برای آزمایش از لحاظ زمانی و هزینه مقرون به صرفه نمی باشد. لذا از یک سری معیارها انتخاب بهینه دیسک های آنتی بیوتیک مصرفی استفاده می شود.

- نوع باکتری مورد آزمایش (گرم مثبت یا گرم منفی)
- تجربه دامپزشک یا پزشک مسئول آزمایشگاه
- در دسترس بودن آنتی بیوتیک و مسائل اقتصادی
- وضعیت سیستم ایمنی (در بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی داروی باکتریواستات استفاده نمی شود)
- بارداری بیمار
- عملکرد کبد و کلیه
- محل عفونت و اینکه آیا آنتی بیوتیک در آن بافت به غلظت مناسب می رسد.
- وضعیت بیمار بستری یا سرپایی

بررسی نتایج آنتی بیوگرام

همزمان با رشد باکتری در محیط آنتی بیوتیک نیز از کاغذ صافی به محیط کشت نشت کرده و باعث عدم رشد باکتری و ایجاد هاله عدم رشد می شود. با دور شدن از دیسک غلظت آنتی بیوتیک کم می شود تا جایی که منطقه ممانعت از رشد کم شده و قطع می شود و دیگر آنتی بیوتیک قدرت جلوگیری از رشد باکتری را ندارد.

پس از طی زمان انکوباسیون ابتدا پلیت ها از نظر رشد مناسب، همکون و خالص بودن کلنی بررسی شده و سپس در صورت وجود هاله عدم رشد، بدون باز کردن درب پلیت قطر هاله با استفاده از کولیس یا خط کش از پشت پلیت اندازه گیری شده و با استفاده از استاندارد CLSI یا جدول راهنمای شرکت سازنده دیسک تفسیر و به صورت مقاوم (Resistance) R حساس (Sensitive) S یا نیمه حساس (Intermediate) I گزارش می شود.

اعداد ارائه شده توسط CLSI^۲ یا EUCAST^۴ برای محدوده اثر آنتی بیوتیک با آزمایشات دقیق و مختلف تعیین شده است که به آن Break Point می گویند.

قطر هاله عدم رشد به عوامل زیر بستگی دارد:

- غلظت دیسک آنتی بیوتیک
- میزان باکتری تلقیح شده
- قدرت انتشار آنتی بیوتیک
- حساسیت باکتری به آنتی بیوتیک

با توجه به موارد فوق این آزمایش حساسیت نسبی باکتری به دارو را نشان می دهد.

^۲Clinical Labortory Standard Institiue

^۴European Committee on Antimicrobial Suseptibility Testing

برخی نکات مهم در مورد روش دیسک دیفیوژن:

- در این آزمایش دیسک تتراسیکلین معرف تمام تتراسیکلین‌ها می‌باشد.
 - کلیستین و پلی میکسین B به سختی در آگار نفوذ می‌کنند و صحت این آزمایش در مورد آن‌ها مشکوک است.
 - پس از کاشت دیسک‌ها بهتر است پلیت یک ساعت داخل یخچال گذاشته شده و سپس به انکوباتور منتقل شود.
 - این روش برای سنجش حساسیت به سولفانامیدها مناسب نیست.
 - این روش معرف کامل از عملکرد دارو در بدن نمی‌باشد چون برخی عوامل مربوط به دارو مثل جذب و انتشار و متابولیسم دارو در بدن، اثر متقابل سایر داروها و برخی عوامل مربوط به میزبان مثل محل عفونت، شدت آن، مخلوط بودن عفونت، وضع ایمنی، بیماری همراه در عملکرد دارو در بدن نقش دارد.
 - برای بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری هموفیلوس، ۱٪، هموگلوبین و ایزو ویتاکس به محیط اضافه می‌شود.
 - از محیط‌های بلادآگار یا شکلات آگار بخصوص در مواردی که میکروب سخت رشد (Fastidious) مثل استرپتوکوکوس یا مننگوکوک مورد بررسی است، استفاده می‌شود.
 - برای آنتی بیوگرام نیسریا از محیط GC Agar استفاده می‌شود.
- منابع خطای احتمالی در انجام آزمایش آنتی‌بیوگرام :
- (۱) استفاده از کشت مخلوط (۲) برداشت ناصحیح نمونه (۳) از بین رفتن دیسک آنتی بیوتیک به دلیل نگهداری نامناسب
 - (۴) کم یا زیاد بودن زمان انکوباسیون و انکوباسیون نامناسب
 - (۵) استفاده از محیط خیلی مرطوب یا خیلی خشک



فصل دهم :

آشنایی با برخی روش‌های بیوشیمیایی تشخیص باکتری‌ها

شناسایی آنزیم‌های باکتری‌ها

خیلی از باکتری‌ها در چرخه حیات نقش تجزیه مواد آلی و بازگرداندن دوباره آنها به چرخه مواد در طبیعت را به عهده دارند (چرخه‌های زیست - زمین - شیمیایی)، این عمل به وسیله آنزیم‌های موجود در ساختار باکتری‌ها صورت می‌گیرد. آنزیم‌ها در باکتری‌های بیماری‌زا نیز نقش مهمی دارند و علاوه بر این که باعث نفوذ باکتری‌ها در سلول‌های میزبان و ایجاد واکنش‌های ناخواسته می‌شوند، بر روی قدرت مقاومت باکتری در برابر سیستم ایمنی میزبان نیز نقش اساسی دارند. با توجه به اینکه بسیاری از باکتری‌ها مورفولوژی سلولی و کلنی‌های مشابه هم دارند شناخت این آنزیم‌ها برای شناسایی و تعیین هویت باکتری‌ها بسیار مفید و موثر می‌باشد که در این فصل از کتاب حاضر به این موضوع پرداخته می‌شود.

آزمایش اکسیداز Oxidase Test

سیتوکروم‌ها پروتئین‌های حاوی آهن هستند که در زنجیره تنفس مسئول واکنش اکسیداتیو فسفریلاسیون است و الکترون را به اکسیژن مولکولی منتقل می‌کنند. تاکنون ۴ رده از سیتوکروم‌های باکتریایی شناخته شده است که آنزیم سیتوکروم اکسیداز، سیتوکروم C را اکسید می‌کند.

این آنزیم در باکتری‌هایی که اکسیژن را به عنوان گیرنده نهایی الکترون در متابولیسم به کار می‌برند (باکتری‌های هوازی) وجود و در باکتری‌های بی‌هوازی اجباری وجود ندارد.

آزمایش اکسیداز برای پی بردن به وجود سیتوکروم C طراحی شده است.

در این تست از ترکیب ۰/۵-۱٪ تترامتیل پارافنیل دی آمین دی هیدروکلراید استفاده می‌شود، که در حضور سیتوکروم اکسیداز به اندوفنل اکسید می‌شود که ارغوانی رنگ است.

این آزمایش از جمله آزمایش‌های کاربردی در افتراق استافیلوکوکوس‌ها از سایر کوکسی‌های گرم مثبت کاتالاز مثبت می‌باشد. استافیلوکوکوس‌ها اکسیداز منفی و میکروکوکوس‌ها اکسیداز مثبت می‌باشند.

همچنین در تفریق اعضاء خانواده انتروباکتریاسه (اکسیداز منفی) از سودوموناس‌ها، ویبریوها، نیسریاها، پاستورلاها و کمپیلوباکترها (اکسیداز مثبت) نقش کلیدی دارد.

این آزمایش به چند روش اجرا می‌شود که در بخش زیر به آن‌ها اشاره می‌شود:

استفاده از کاغذ صافی به روش مرطوب:

الف) یک قطعه کاغذ صافی روی لام گذاشته و با محلول اکسیداز آغشته گردد.

ب) از کلنی ۱۸ تا ۲۴ ساعته باکتری با لوپ استریل برداشت و روی کاغذ صافی کشیده شود.

اگر ظرف ۱۵ تا ۳۰ ثانیه رنگ ارغوانی ظاهر شود نشانه حضور آنزیم اکسیداز می‌باشد.

استفاده از کاغذ صافی به روش خشک:

الف) کاغذ صافی آماده آغشته به محلول اکسیداز با سرم فیزیولوژی آغشته شود.

ب) از کلنی ۱۸ تا ۲۴ ساعته باکتری با فیلدوپلاتین استریل برداشت و روی کاغذ صافی کشیده شود.

چنانچه ظرف ۵ تا ۱۰ ثانیه و گاه به صورت تاخیری تا ۶۰ ثانیه تغییر رنگ به بنفش ارغوانی دیده شود نشانه حضور آنزیم اکسیداز و عدم تغییر رنگ نشانه منفی بودن واکنش است.

روش مستقیم روی پلیت یا لوله:

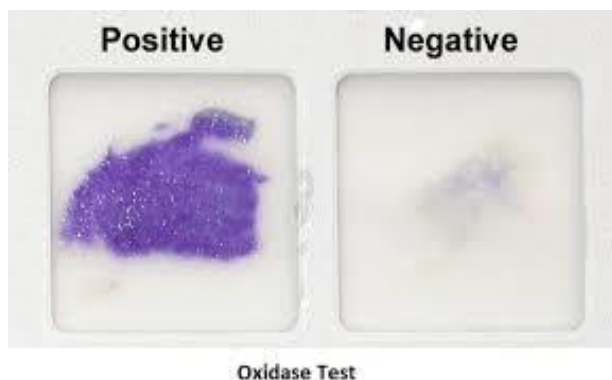
باکتری روی محیط آگار در پلیت یا در محیط براث داخل کشت داده شده سپس روی آن محلول اکسیداز ۱٪ ریخته شود به طوری که سطح پلیت کاملاً به مدت ۱۵ ثانیه پوشانده شود. سپس مایع روی به ظرف دیگری منتقل گردد.

اگر باکتری اکسیداز مثبت باشد کلنی‌ها به سرعت ارغوانی می‌شود در غیر این صورت تغییر رنگ مشاهده نمی‌شود.

در این روش محلول اکسیداز باعث مرگ باکتری می‌شود و پس از آن تفسیر کشت امکان پذیر نیست لذا اگر هدف ادامه آزمایشات و یا نگهداری طولانی مدت جدایه باکتری است.

نکات مهم:

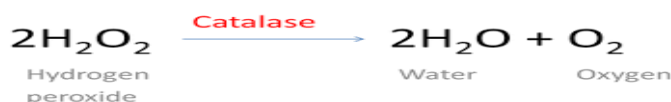
- ماده مصرفی تترا متیل پارا فنیل دی آمین دی هیدروکلراید باید تازه باشد چون در مجاورت هوا اکسید می‌شود.
- برای برداشتن باکتری جهت انجام آزمایش اکسیداز بهتر است از لوپ از جنس پلاتین یا از پیپت پاستور استفاده شود چون لوپ نیکروم که نیکل و کروم دارد باعث اکسید شدن معرف و نتیجه مثبت کاذب می‌شود.
- برای انجام این آزمایش بهتر است نمونه باکتری از محیط های رنگی مثل مکانکی برداشت نشود، چرا که احتمال ایجاد نتیجه مثبت کاذب وجود دارد.



تصویر سمت راست تست اکسیداز در پلیت سمت چپ تست اکسیداز روی کاغذ صافی

آزمایش کاتالاز Catalase Test

کاتالاز آنزیمی است که در اثر واکنش با آب اکسیژنه H_2O_2 باعث تولید اکسیژن و آب می‌شود.



این ماده در داخل گرانول‌های نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها تشکیل و باعث از بین رفتن باکتری‌های مهاجم به بدن می‌شوند. آب اکسیژنه به عنوان ماده ضد عفونی کننده و باکتری کش بخصوص در زخم‌های عمیق به کار می‌رود، همچنین در خلال تنفس هوازی اتم‌های اکسیژن و هیدروژن ممکن است با هم ترکیب شده ایجاد آب اکسیژنه نمایند که برای سلول کشنده است.

بنابراین اکثر باکتری‌های هوازی و برخی از بی‌هوازی‌های اختیاری آنزیم کاتالاز دارند، که از آن برای تجزیه H_2O_2 استفاده می‌کنند. باکتری‌های بی‌هوازی اجباری فاقد آنزیم کاتالاز هستند.

آزمایش کاتالاز به منظور تعیین حضور این آنزیم در باکتری‌ها طراحی شده است و از جمله آزمایشات کلیدی در تفریق بعضی از باکتری‌های مشابه از هم، مثل تفریق استافیلوکوکوس‌ها (کاتالاز مثبت) از استرپتوکوکوس‌ها (کاتالاز منفی) و کلستریدیوم‌ها (کاتالاز منفی) از باسیلوس‌ها (کاتالاز مثبت) می‌باشد.

از جمله دیگر خانواده‌های کاتالاز مثبت باکتریایی می‌توان به اعضاء خانواده انتروباکتریاسه و میکوباکتریوم‌ها اشاره کرد. روش انجام آزمایش:

این آزمایش را می‌توان داخل لوله یا روی لام انجام داد که روش روی لام راحت‌تر می‌باشد و به شرح زیر انجام می‌گیرد:

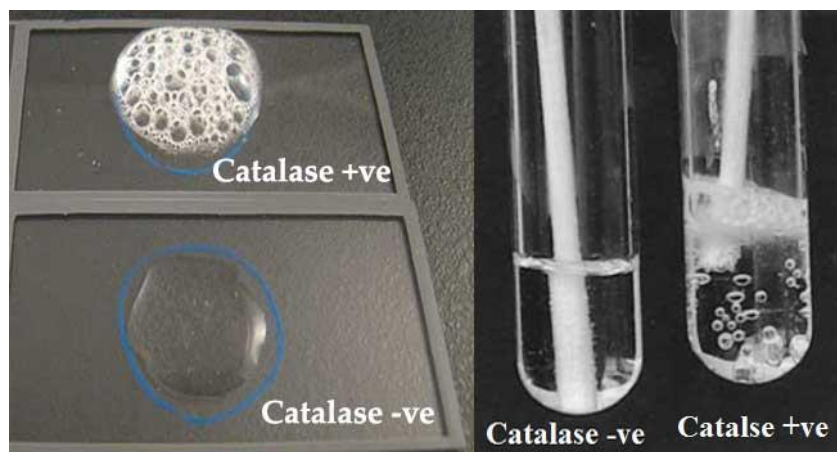
- ۱- یک قطره آب اکسیژنه ۳٪ روی لام تمیز گذاشته شود.
- ۲- توسط اپلیکاتور یا فیلدوپلاتین از جنس نیکو کروم از پرگنه تازه باکتری برداشت و در آب اکسیژنه حل شود. اگر ظرف چند ثانیه حباب هوا تشکیل شد نشانه متساعد شدن گاز اکسیژن است و باکتری کاتالاز مثبت می‌باشد. در صورتی که حباب تشکیل نشود باکتری کاتالاز منفی است.

نکات مهم:

- آب اکسیژنه به شدت سوز آور می‌باشد لذا از تماس دست با محلول پرهیز شود. در صورت تماس سریعاً با الکل اتیلیک شسته شود و از آب برای شستشوی محل استفاده نشود.
- آب اکسیژنه در مقابل نور تجزیه شده و بی‌ثبات است و بهتر است در صورت عدم استفاده در ظروف دارای پوشش آلومینیومی در یخچال نگهداری شود.
- گلبول‌های قرمز آنزیم کاتالاز دارند، لذا برداشت پرگنه از محیط کشت خون دار ممکن است باعث پاسخ مثبت کاذب شود.
- آنزیم کاتالاز در باکتری زنده و کشت تازه وجود دارد، لذا انتخاب پرگنه مسن احتمالاً باعث پاسخ منفی کاذب می‌شود.
- در تشخیص میکوباکتریوم‌های تپیک از آتپیک تست کاتالاز در داخل لوله و در دو دمای، درجه حرارت محیط آزمایشگاه و دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد صورت می‌گیرد به این صورت که دو سوسپانسیون از باکتری در لوله آزمایش حاوی سرم

فیزیولوژی تهیه و روی یکی آزمایش کاتالاز صورت می‌گیرد و لوله دوم به مدت نیم ساعت در بن ماری ۶۸ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد. سپس آب اکسیژنه اضافه می‌شود که تشکیل حباب نشان کاتالاز مثبت بودن می‌باشد. در میکوباکتریوم‌های آتیپیک آنزیم کاتالاز با این کار از بین رفته و کاتالاز منفی می‌شوند.

- واکنش کاتالاز در باسیلوس سرئوس به کندی صورت می‌گیرد و برای دیدن آن چند دقیقه باید صبر کرد.



تصویر سمت راست آزمایش کاتالاز داخل لوله و سمت چپ کاتالاز روی لام

آزمایش کواگولاز Coagulase Test

کواگولاز نوعی آنزیم پروتئینی می باشد که در سطح دیواره سلولی برخی باکتری ها از جمله برخی گونه های استافیلوکوکوس ها وجود دارد. این آنزیم عملی شبیه ترومبین داشته و با اتصال به فیبرینوژن و در حضور پلاسما موجب لخته و انعقاد پلاسما و همچنین تجمع پلاکت ها می شود. در نتیجه با تبدیل فیبرینوژن به فیبرین و ایجاد لخته باعث مقاومت و پایداری باکتری در برابر عوامل دفاعی بدن مانند فاگوسیتوز شدن می شود. این پروتئین به دو صورت در باکتری ها یافت می شود.

الف- فاکتور تجمع دهنده یا (Clumping Factor):

این فاکتور به دیواره سلول باکتری متصل بوده و مستقیماً با فیبرینوژن پلاسما واکنش داده، فیبرینوژن به فیبرین تبدیل و در نتیجه باکتری در شبکه فیبرینی به دام افتاده و لخته دیده می شود.

ب- آنزیم کواگولاز آزاد :

این آنزیم پروتئینی خارج سلولی است که فاکتور واکنش دهنده با کواگولاز پلاسما (CRF(Coagulase Reactive Factor را فعال کرده و کمپلکس کواگولاز - CRF، فیبرینوژن را به لخته فیبرینی تبدیل می کند.

برای شناسایی هر کدام از انواع کواگولاز در ساختار باکتری ها نیاز به آزمایش مستقل می باشد. کواگولاز متصل به دیواره باکتری با روش روی لام (Slide test) و کواگولاز آزاد با روش لوله ای (Tube Test) آزمایش می شود. البته روش لوله ای توانایی تشخیص کواگولاز متصل را هم دارد.

الف- روش روی لام

الف) یک قطره پلاسمای خرگوش روی لام ریخته می شود.

ب) یک قطره سرم فیزیولوژی در کنار پلاسما ریخته می شود.

ج) یک لوپ از سوسپانسیون باکتری در هر دو قطره، به ترتیب اول در کنترل و سپس در پلاسما مخلوط می شود.

د) لام به مدت ۱۰-۵ ثانیه به آرامی تکان داده شده و ایجاد کلامپ و آگلوتیناسیون بررسی می شود.

در صورت مشاهده کلامپینگ در پس زمینه شفاف کواگولاز مثبت و در صورت مشاهده سوسپانسیون یکنواخت شیری رنگ نتیجه آزمایش منفی است. در موارد منفی و مشکوک انجام آزمایش لوله ای الزامی است.

ب- روش لوله ای (Tube test)

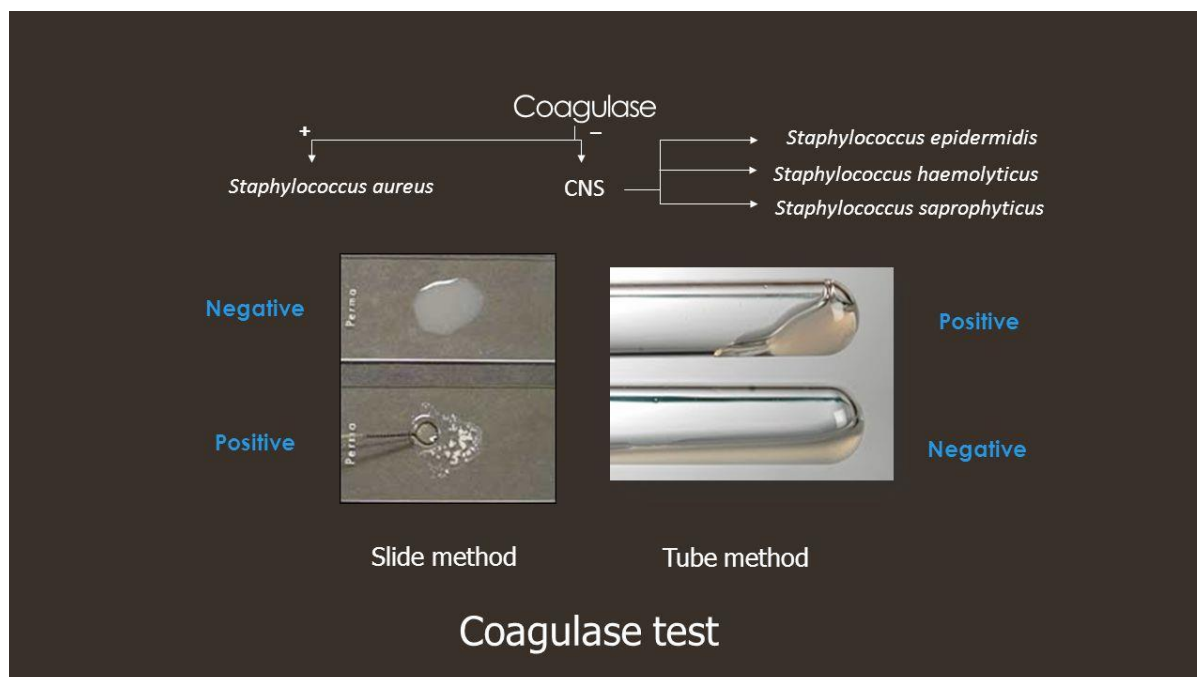
الف) ابتدا پلاسمای سیترا نه یا EDTA دار خرگوش با سرم فیزیولوژی به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شود. برای این منظور ۴۰ میکرولیتر از پلاسمای خرگوش با ۳۶۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی در یک لوله آزمایش کوچک مخلوط می شود.

ب) چند کلنی از باکتری مورد مطالعه با لوپ استریل به لوله حاوی ۱ میلی لیتر پلاسمای خرگوش منتقل و سوسپانسیون تهیه گردد. (در صورتیکه باکتری در محیط مایع کشت شده است می توان ۰/۲ میلی لیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری را به لوله حاوی پلاسمای خرگوش افزود).

ج) لوله ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شده و تا ۴ ساعت هر نیم ساعت یک بار با خم کردن آرام لوله تشکیل از نظر لخته بررسی شود. در صورتی که پاسخ منفی بود، مجدداً به انکوباتور منتقل و در ساعت ۶ پس از انکوباسیون

تشکیل لخته بررسی شود. اگر مجدداً لخته تشکیل نشد لوله تا ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفته و مجدداً از نظر تشکیل لخته بررسی شود.

تشکیل لخته نشانگر واکنش مثبت کواگولاز و عدم تشکیل آن نشانه کواگولاز منفی بودن باکتری مورد مطالعه است.



تصویر سمت راست آزمایش کواگولاز لوله‌ای بالا مثبت و پایین منفی سمت چپ کواگولاز روی لام

نکات مهم :

پرگنه‌های باکتری نباید از محیط نمکی مثل مانیتول سالت آگار برداشته شود چون ممکن است باعث نتیجه مثبت کاذب بشود.

در تست لوله‌ای نباید لوله‌ها به شدت تکان داده شود چون ممکن است لخته، تکه تکه شده و نتیجه منفی کاذب ایجاد شود.

بهتر است پلاسمای خرگوش EDTA دار باشد تا پلاسمای سیتراته چراکه برخی باکتری‌ها مثل انتروکوکوس ممکن است سیترات را متابولیزه و نتیجه مثبت کاذب بدهند.

پلاسمای سیتراته به صورت ویال آماده لیوفیلیزه تهیه و در یخچال نگهداری می‌شود که موقع استفاده باید ابتدا از یخچال خارج شود تا به دمای اتاق برسد سپس ۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به ویال اضافه و کاملاً تکان داده می‌شود تا محتویات حل شود. در لوله‌های آزمایش استریل نیم میلی‌لیتر از این پلاسما آماده ریخته می‌شود.

این محلول تا پنج روز در یخچال و تا یک ماه در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قابلیت نگهداری دارد.

کواگولاز در استافیلوکوکوس‌ها کواگولاز عامل حدت محسوب شده و این باکتری‌ها به دو گروه کواگولاز مثبت و کواگولاز منفی تقسیم می‌شوند. از جمله استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اینترمدیوس و از جمله استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی می‌توان به استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس اشاره کرد.

آزمایش ذوب ژلاتین (Gelatin Liquefaction)

برخی باکتری‌ها آنزیم ژلاتیناز که نوعی اگزوانزیم است را تولید کرده و قادر به ذوب یا هیدرولیز ژلاتین هستند. وجود یا عدم وجود این آنزیم باکتری، در جداسازی و شناسایی بسیاری از گونه‌های باکتری مثل سودوموناس، استافیلوکوکوس‌ها، خانواده آنتروباکتریاسه، کلستریدیوم‌ها کاربرد دارد.

در بافت پیوندی پروتئین نامحلولی بنام کلاژن وجود دارد که ساختمان آن شبیه ژلاتین بوده و در اثر جوشیدن به ژلاتین تبدیل می‌شود که سرشار از اسیدآمینه‌های پرولین و گلیسین است. باکتری‌هایی که این آنزیم را دارند کولاژن را تجزیه می‌کنند.

ژلاتین در دمای بالا ذوب شده و مایع است اما در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بصورت ژله‌ای و جامد است. باکتری‌هایی که آنزیم ژلاتیناز دارند ژلاتین را جوری به اسیدهای آمینه سازنده‌اش، هیدرولیز می‌کنند که حتی در دمای ۴۰ هم بحالت جامد در نمی‌آید.

برای این آزمایش باید از محیط کشت ژلاتین تازه استفاده کرد چرا که چسبندگی ژلاتین اتوکلاو شده در اثر نگهداری در آزمایشگاه بیشتر شده نتیجه آزمایش را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

روش انجام آزمایش:

(۱) به لوله حاوی محیط کشت نوترینت براث یا برین هارت براث ۱۰-۱۲٪ ژلاتین استریل اضافه شود. اگر هدف آزمایش بررسی حضور ژلاتیناز در باکتری بی‌هوازی می‌باشد بهتر است از محیط تیوگلیکولات که ۱۰-۱۲٪ ژلاتین دارد، استفاده شود.

(۲) باکتری تهیه شده از کشت تازه در عمق لوله حاوی محیط ژلاتین دار کشت داده و در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت گذاشته شود. (۱۴-۱ روز). یک لوله تلقیح نشده نیز به عنوان کنترل منفی استفاده شود.

(۳) پس از طی زمان انکوباسیون هر دو لوله به مدت نیم ساعت در یخچال گذاشته شده سپس نتیجه ذوب ژلاتین بررسی شود.

در صورت منفی بودن لوله‌ها را ۳-۲ هفته درون انکوباتور گذاشته هر روز یک بار از نظر ذوب ژلاتین بررسی شود.

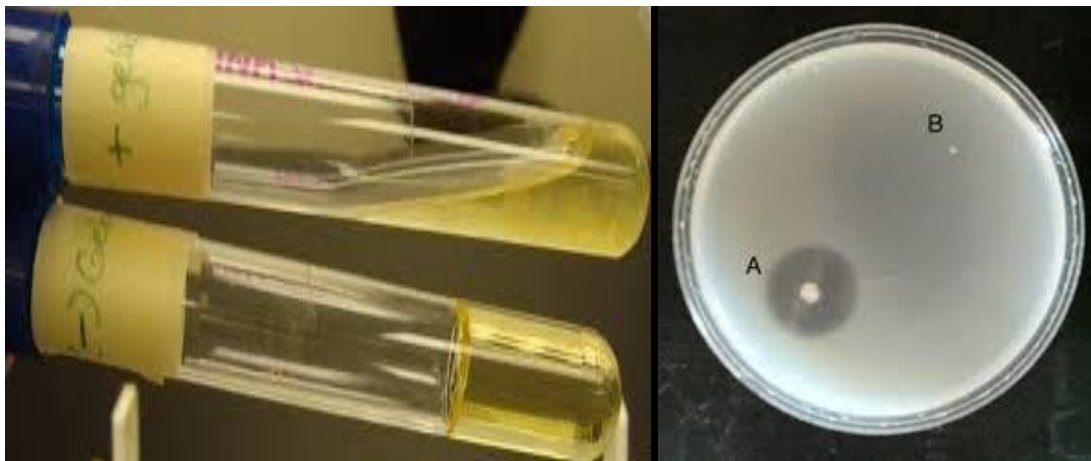
*می‌توان این آزمایش را در پتری دیش که حاوی محیط ژلاتین دار بوده در یخچال جامد شده انجام داد که ابتدا ارگانیسم به صورت نقطه‌ای کشت داده شده سپس در حرارت اتاق ۲۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته می‌شود (در این آزمایش نباید پلیت‌ها را وارونه گذاشت) پس از ۷۲ ساعت چند ساعت به یخچال منتقل شده و پتری دیش‌های مایع شده بررسی می‌گردد.

قرائت نتیجه :

برخی باکتری‌ها توانایی بالا در ذوب ژلاتین دارند قبل از ۷۲ ساعت ژلاتین را ذوب می‌کنند. سریشیا، پروتئوس، اروینیا از جمله این باکتری‌ها هستند.

برخی باکتری‌ها آنزیم ژلاتیناز ندارند قادر به ذوب ژلاتین نیستند. کلستریدیوم پرفرنجنس، اسینتوباکتریومانی، اشرشیاکولای از جمله این باکتری‌ها هستند.

برخی باکتری‌ها توانایی کمتری داشته پس از ۳ تا ۳۰ روز ژلاتین را ذوب می‌کنند. آریزونا و کلبسیلا از جمله این باکتری‌ها محسوب می‌شوند.



تصویر سمت راست آزمایش ذوب ژلاتین در پلیت سمت راست ذوب ژلاتین در لوله : لوله بالا ذوب مثبت ژلاتین ، لوله پایین عدم توانایی ذوب ژلاتین را نشان می دهد.

آزمایش هیدرولیز اوره Urea Hydrolysis Test

اوره محصول هضم پروتئین در مهره داران است که با ادرار دفع می شود. برخی از باکتری ها دارای آنزیمی به نام اوره آز هستند که بر روی اوره موجود در محیط کشت اثر کرده و آن را به آمونیاک، دی اکسید کربن CO_2 و آب تبدیل می کنند و در نتیجه تولید آمونیاک باعث قلیایی شدن محیط می گردند.

بنابراین با استفاده از معرف PH مناسب می توان قلیایی شدن محیط در نتیجه تولید آمونیاک و حضور این آنزیم در باکتری مورد مطالعه را نشان داد. رایج ترین معرف PH در این آزمایش فنل رد می باشد که در $\text{PH}=6/8$ به رنگ زرد و در شرایط قلیایی $\text{pH}=8/1$ به رنگ صورتی می باشد. از این آزمایش برای افتراق اعضای خانواده آنتروباکتریاسه، افتراق بروسلاها، شناسایی کورینه باکتریوم ها استفاده می شود. برای شناسایی مخمر کریپتوکوکوس نئوفورمنس نیز این آزمایش مورد استفاده قرار می گیرد.

برای بررسی وجود این آنزیم از دو نوع محیط جامد و مایع حاوی اوره استفاده می شود.

محیط های اوره دارای پپتون، گلوکز، معرف فنول رد می باشند. در این محیط چون عصاره مخمر yeast extract وجود دارد باکتری هایی که قادر به تولید اوره از نیستند توانایی رشد ندارند.

(۱) محیط مایع (اوره براث) : از این محیط برای شناسایی باکتری های که به سرعت اوره را هیدرولیز می کند مثل پروتئوس ها و هلیکوباکتریلوری استفاده می شود.

(۲) محیط جامد (christensens urea Agar) : از این محیط برای شناسایی میکروارگانیسم هایی که به طور ضعیف و مختصر آنزیم اوره آز تولید می کنند مثل: کلبسیلا، آنتروباکتر، کریپتوکوکوس ها، پروتئوس استفاده می شود. محیط جامد اوره داخل لوله آزمایش و به صورت تمام شیب تهیه می شود.

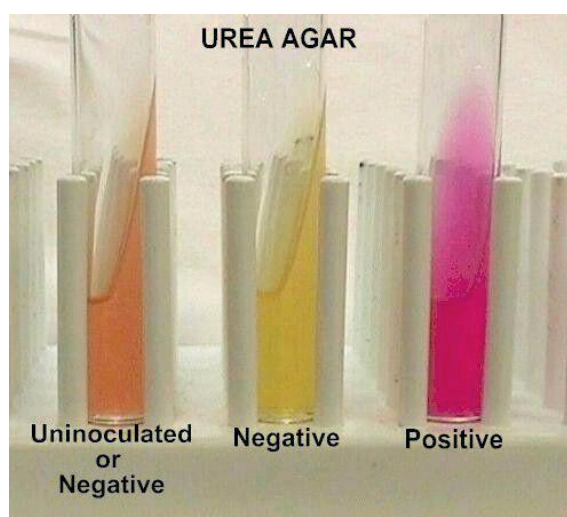
محیط های اوره زرد رنگ هستند که اگر باکتری توانایی هیدرولیز اوره را نداشته باشد مثل اشرشیا کلای و سالمونلا محیط زرد باقی می ماند ولی اگر باکتری اوره آز مثبت باشد، مثل: کلبسیلا و پروتئوس رنگ محیط صورتی می شود.

برخی از باکتری‌ها مثل پروتئوس و هلیکوباکتریلوری اوره آز قوی هستند و ظرف دو ساعت محیط را به رنگ صورتی درمی‌آورند در حالیکه برخی باکتری‌ها مثل کلبسیلا اوره آز ضعیف هستند و برای این کار نیاز به زمان بیشتری دارند.

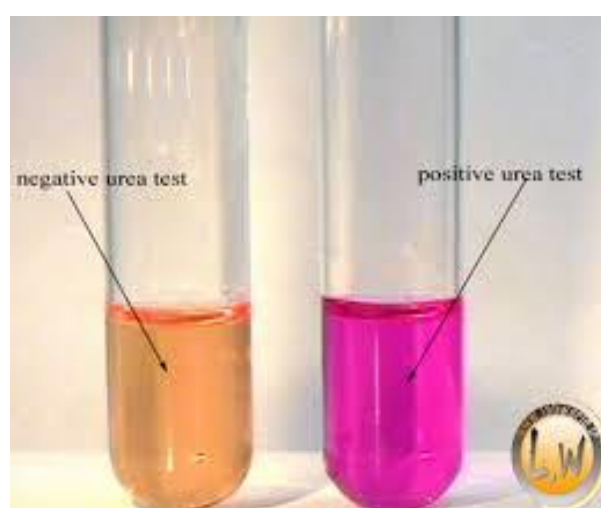
- ✓ در جنس یرسینیا گونه های توبرکلوزیس، انتروکولیتیکا، اینترمدیا، اوره آز+ هستند.
- ✓ در جنس بروسلا : گونه سوئیس سریعا اوره را هیدرولیز می‌کند، ولی گونه آبورتوس و گونه ملی تن سیس این عمل را کند و پس از چند روز انکوباسیون انجام می‌دهند.
- ✓ اکثر مایکوباکتریوم ها اوره آز مثبت هستند.
- ✓ اوره آ پلاسما ها ، اوره آز مثبت هستند.

روش تهیه محیط اوره:

اوره را نمی‌توان با اتوکلاو استریل کرد لذا برای تهیه محیط کشت ابتدا محیط پایه تهیه و اتوکلاو می‌شود. به این منظور ۱۸/۷ گرم از محیط پایه در ۹۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل جوشانده شده ، سپس در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو می‌گردد ، وقتی محیط پایه تا 50° سرد شد، اوره با فیلتر صاف شده به محیط اضافه می‌گردد (به ازای هر لیتر محیط ۵۰ سی سی از محلول اوره ۴۰٪ لازم است).



تصویر ۲ : لوله سمت راست اوره آز مثبت و لوله وسط و سمت چپ اوره آز منفی می‌باشد.



تصویر ۱ : لوله سمت راست محیط اوره براث مثبت و لوله سمت چپ اوره براث منفی می‌باشد.

آزمایش DNase یا هیدرولیز DNA (Production of Deoxyribonuclease)

این آزمایش به منظور ارزیابی فعالیت دزوکسی ریبونوکلاز باکتری‌ها و قارچ خصوصاً عنوان کمک در تشخیص استافیلوکوکوس‌های بیماری‌زا به کار می‌رود.

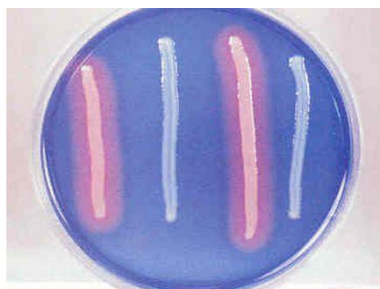
این آزمایش در تشخیص گونه‌های سریشیای بدون پیگمان که ممکن است به اشتباه به عنوان گونه آنتروباکتر و کلبسیلا تشخیص داده شوند و تشخیص موراکسلاها از نیسریاها نیز کاربرد دارد.

باکتریهای واجد آنزیم DNase چنانکه در محیط حاوی DNA کشت داده شوند توانند اسید نوکلئیک را هیدرولیز نمایند و اگر سطح محیط با اسید کلریدریک یک نرمال آغشته شود هاله شفاف در اطراف کلنی تشکیل می‌شود.

۹۹ درصد استافیلوکوک‌های کوآگولاز مثبت و ۲۰ درصد از استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی DNase مثبت هستند.

روش انجام آزمایش:

- ۱- نمونه مورد نظر به صورت خطی یا ترجیحاً نقطه‌ای در پلیت‌های حاوی محیط DNA Agar تلقیح گردد.
 - ۲- پلیت‌ها به مدت تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۵-۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردد.
 - ۳- روی پلیت اسید کلریدریک یک نرمال ریخته شود طوری که سطح پلیت را کاملاً بپوشاند سپس پلیت روی یک زمینه تیره قرار گرفته و وجود یا عدم وجود هاله شفاف اطراف کلانی بررسی شود.
 - ۴- همچنین می‌توان روی محیط کشت معرف تولوئیدین بلو ۰/۱٪ ریخت که در این صورت در باکتری‌های دارای آنزیم DNase هاله‌های شفاف صورتی اطراف کلنی یا محل تلقیح را احاطه و بقیه محیط به رنگ آبی خواهد بود.
- تذکر: برخی از محیط‌های کشت DNase خود حاوی تولوئیدین بلو هستند (مقدار آن نباید از ۰/۰۵٪ تجاوز کند چون در غلظت‌های بالا شناسایی فعالیت آنزیم را دچار مشکل می‌کند) که رنگ اولیه محیط آبی روشن می‌باشد و نیازی به افزودن تولوئیدین بلو نمی‌باشد. اگر باکتری آنزیم مذکور را داشته باشد به علت تجزیه DNA محیط اسیدی شده و رنگ تولوئیدین بلو صورتی می‌شود بنابراین هاله صورتی رنگ را می‌توان در اطراف کلنی‌های باکتری مشاهده کرد.



DNase test

0.1% Toluidine blue O
(+): Pink



1N HCl (+) :

استافیلوکوکوس/اورئوس در این محیط رشد متوسط تا زیاد داشته و کلنی‌ها با هاله شفاف صورتی یا بی رنگ بسته به نوع معرف مصرفی احاطه می شود در حالیکه استافیلوکوکوس/پیدرمیدیس رشد متوسط داشته و هاله در اطراف کلونی تشکیل نمی شود.

سراسیا مارسینس در این محیط رشد متوسط تا زیاد داشته کلنی با هاله شفاف یا صورتی ایجاد می کند در حالیکه کلبسیلا پنومونیه در این محیط رشد کرده ولی هاله بی رنگ یا صورتی اطراف کلنی تشکیل نمی شود.

آزمایش هیدرولیز نشاسته Starch Hydrolysis Test

نشاسته نوعی کربوهیدرات با وزن مولکولی بالاست که در حالت طبیعی حلالیت کمی در آب دارد. آنزیم های تجزیه کننده نشاسته آلفا آمیلاز و الیگو ۶ و گلوکوزیداز نام دارند که pH مناسب برای فعالیت این آنزیم ۶/۸ - ۷/۲ می باشد.

این آنزیم با شکستن پیوندهای گلیکوزیدی بین واحدهای گلوکز، نشاسته را هیدرولیز می کند و اجازه می دهد محصولات هیدرولیز نشاسته وارد سلول شوند.

روش آزمایش:

در پلیت حاوی نشاسته آگار Starch Agar از باکتری به صورت یک خط در وسط کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد گرما گذاری شود.

روی کلنی مقداری لوگول یا معرف ید ریخته شود.

اگر اطراف کلنی رشد باکتری به رنگ آبی در آید ، دلیل بر عدم وجود آمیلاز و در صورتی که اطراف کلنی رشد باکتری محیط بی رنگ دیده شود دلیل بر وجود آنزیم آمیلاز است در باکتری می باشد.

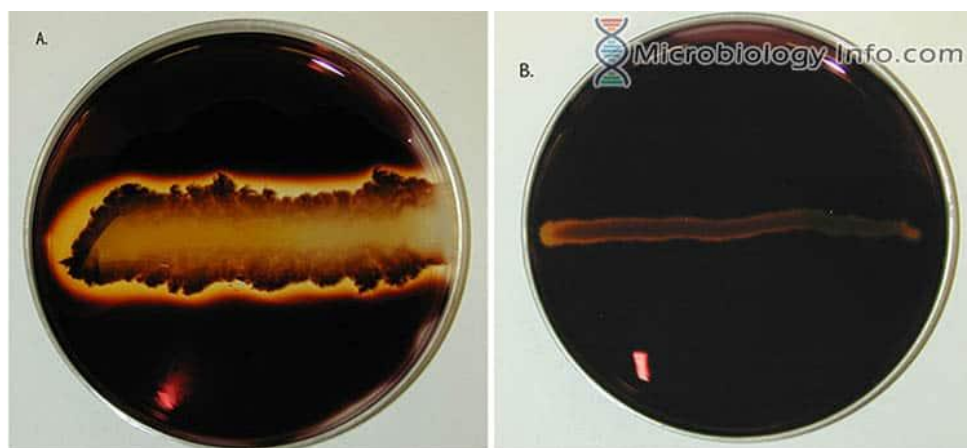
نکات مهم:

محیط مصرفی باید تازه بوده و حداکثر دو هفته از زمان تولید آن گذشته باشد.

هنگام تهیه محیط حرارت زیاد نباید داده شود چون ممکن است سبب شکسته شدن نشاسته به آمیلوز و آمیلوپکتین شود.

این آزمایش در تمایز اعضای جنس های مختلفی باکتری ها از جمله استرپتوکوکوس، کلستریدیوم، فوزوباکتریوم، انتروکوکوس، سودوموناس و باسیلوس نقش دارد.

از جمله باکتری های مهم دارای آنزیم آمیلاز می توان به اعضای خانواده باسیلاسه اشاره کرد.



Starch hydrolysis (+ve)

Starch hydrolysis (-ve)

آزمایش اندول Indole Test

این آزمایش قدرت کاتابولیسم پروتئین توسط باکتری را نشان می‌دهد. برخی باکتری‌ها مثل /شرشیاکلای دارای آنزیم تریپتوفاناز هستند و توانایی تجزیه اسید آمینه تریپتوفان و تولید اندول را دارند.

آمونیاک + اسیدپرویک + اندول $\geq$ تریپتوفاناز === تریپتوفان

البته ۲ در این مسیر متابولیت اسکاتول skatul و اندول استیک هم تولید می‌شود که رنگ آن نارنجی است.

از این آزمایش برای تمایز باکتری‌های دارای این توانایی از باکتری‌های فاقد توانایی استفاده می‌شود. از جمله آزمایشات کلیدی در تشخیص اعضاء خانواده انتروباکتریاسه به خصوص اشرشیا کلای (اندول مثبت) از کلبسیلا و آنتروباکتر (اندول منفی) می‌باشد.

برای انجام این آزمایش باید از محیط کشتی استفاده شود که حاوی پپتون به عنوان منبع تریپتوفان باشد و بهتر است این محیط فاقد گلوکز باشد زیرا وجود گلوکز ظاهراً مانع تولید اندول می‌شود. به این منظور از محیط‌های پپتون واتر، اندول نیترات، MFO, SIM می‌توان استفاده کرد.

تولید اندول (بنزوپیرول) به وسیله معرف کوکس kovacs یا ارلیش Erlich بررسی می‌شود که در واکنش با اندول رنگ قرمز تولید می‌کنند. علت تولید رنگ قرمز این است که اندول با محلول اسید الکل پارا دی متیل بنزالدئید مخلوط شده رنگ قرمز را باعث می‌شود.

روش سریع تشخیص تولید اندول:

یک قطعه کاغذ صافی به معرف پارا آمینو دی متیل بنزالدئید آغشته و در پلیت گذاشته شود، سپس یک لوپ از میکروارگانیزم که در محیط دارای تریپتوفان رشد کرده روی کاغذ صافی قرار گیرد اگر ظرف چند ثانیه رنگ قرمز ایجاد شود اندول مثبت است در غیر این صورت اندول منفی می‌باشد. در این روش برخی پروتئوس‌ها و آئروموناس‌ها نتایج منفی کاذب می‌دهند به همین دلیل این روش توصیه نمی‌شود.

تشخیص تولید اندول با استفاده از محیط SIM

SIM محیط نیمه جامدی است (۳/۰٪ آگار دارد) که برای بررسی احیاء گوگرد S، تولید اندول I و حرکت باکتری M از آن استفاده می‌شود. این محیط واجد پپتون تریپتیکاز می‌باشد که داری تریپتوفان است. کشت در این محیط بصورت نیزه ای با آنس نوک تیز استریل صورت می‌گیرد.

در صورت تولید سولفید هیدروژن H₂S توسط باکتری که با آهن موجود در محیط ترکیب شده و رنگ محیط سیاه می‌شود: گونه‌های پروتئوس H₂S مثبت و اشریشیا کلای H₂S منفی می‌باشد.

به دلیل نیمه جامد بودن حرکت باکتری در این محیط راحت است که تحرک به صورت منظره کدورت در کل محیط دیده می‌شود (باسیلوس سرئوس منظره شبیه کاج وارونه و لیستریا منوسیتوزنز ایجاد منظره چتر مانند می‌کند). اگر باکتری متحرک نباشد فقط اطراف منطقه ورود آنس رشد باکتری دیده می‌شود.

تولید اندول همانگونه که پیشتر اشاره شد با تولید رنگ قرمز در سطح محیط پس از افزودن معرف کوکس یا معرف ارلیش مشخص می‌شود.

نکته:

در مورد باکتری‌های بی‌هوازی توصیه می‌شود از معرف ارلیش به جای کواکس استفاده شود چون حساس‌تر است.

طرز تهیه محلول کواکس : ۱۰ گرم پودر پارادی متیل آمینو بنزالدئید در ۱۵۰ میلی‌لیتر الکل آمیلیک حل کرده سپس ۵۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک اضافه گردد این محلول بیرنگ بوده در یخچال نگهداری می‌شود.



تصویر نتایج کشت باکتری در محیط SIM : لوله اول سمت چپ دارای حرکت و اندول مثبت ، لوله دوم فاقد حرکت و اندول منفی، لوله سوم تولید H_2S و اندول منفی، لوله چهارم متحرک و اندول منفی و لوله پنجم از چپ متحرک، تولید کننده اندول و H_2S می‌باشد.

تست اکسیداسیون و فرمانتاسیون قندها OF

خانواده آنتروباکتریاسه کربوهیدرات‌های مختلف را از طریق فرمانتاسیون (تخمیر) مورد استفاده قرار می‌دهند. در صورتیکه باکتری‌هایی مثل سودوموناس‌ها به روش اکسیداسیون از کربوهیدرات‌ها استفاده می‌کنند.

برخی از باکتری‌ها مثل آلکالیژنس فکالینس *Alcaligenes faecialis* به هیچ کدام از روش‌های اکسیداسیون یا احیاء قادر به استفاده از قند نیستند برخی باکتری‌ها هم از روش اکسیداسیون و هم از روش تخمیر برای استفاده از کربوهیدرات‌ها استفاده می‌کنند.

به منظور تعیین توانایی باکتری‌ها در استفاده از روش‌های اکسیداسیون یا احیاء از آزمایش OF استفاده می‌شود. این آزمایش در سال ۱۹۵۳ توسط Hugh و Leifson ابداع شد بدین منظور از محیطی به نام محیط OF که آگار جامد سبز رنگ می‌باشد و در داخل لوله تهیه می‌شود استفاده می‌گردد. در این محیط قند گلوکز، ۱۰٪، پپتون هم با غلظت ... وجود دارد. معرف شیمیایی این محیط برمو تیمول بلو است که به آن رنگ سبز می‌دهد. این آزمایش بیشتر در مورد باکتری‌های گرم منفی کاربرد دارد.

روش انجام آزمایش :

- ۱) با استفاده از آنس استریل مقادیر کمی از باکتری مورد آزمایش در دو لوله حاوی محیط OF تلقیح می‌گردد.
- ۲) پس از کشت دادن روی یکی از ۲ لوله پارافین استریل ریخته می‌شود.
- ۳) لوله‌ها به انکوباتور ۳۷ درجه منتقل گردیده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری می‌شود.

قرائت نتیجه :

- ✓ لوله فاقد پارافین زرد و لوله حاوی پارافین سبز رنگ باشد نشان دهنده اکسیداتیو بودن باکتری می‌باشد که در شرایط هوازی قند موجود در محیط را مورد استفاده قرار داد. باکتری سودوموناس آئروژینوزا از جمله باکتری‌های اکسیداتیو محسوب می‌شود.
- ✓ لوله حاوی پارافین زرد و لوله بدون پارافین سبز رنگ باشد باکتری فرمانتاتیو خواهد بود. کلستریدیوم‌ها از جمله این باکتری‌ها محسوب می‌شوند.
- ✓ اگر هر دو لوله به رنگ زرد در بیاید نشان‌دهنده توانایی باکتری در تخمیر قندها به روش اکسیداسیون و فرمانتاسیون می‌باشد باکتری‌های هوازی ، بی‌هوازی اختیاری از جمله خانواده آنتروباکتریاسه و استافیلوکوکوس‌ها از جمله این باکتری‌ها می‌باشند.
- ✓ اگر هر دو لوله سبز رنگ باقی مانده باشد نشان‌دهنده عدم رشد باکتری در این محیط می‌باشد.
- ✓ اگر هر دو لوله به رنگ آبی درآمده باید نشانگر قلیایی شدن محیط می‌باشد و این که باکتری کشت داده شده قادر به استفاده از قندها نبوده و از پپتون موجود در محیط استفاده کرده است.

نحوه ساخت محیط OF :

۱۱ گرم پودر محیط در ۹۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل و حرارت داده شود تا کاملاً حل شود سپس در ۱۲۱° به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شود وقتی دما به ۵۰ درجه رسید ۱۰۰ میلی لیتر منبع قند مثل گلوکز ۱۰٪ اضافه گردد و سپس در لوله‌های استریل تقسیم گردد.

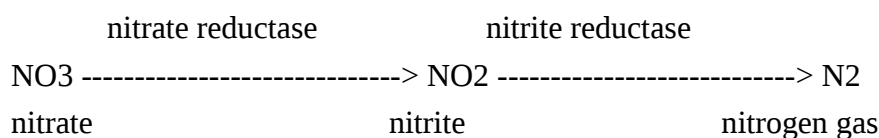
O-F tests



تصویر نتایج آزمایش OF : دو لوله اول سمت چپ عدم رشد باکتری را نشان می‌دهد. لوله ۳ و ۴ مربوط به باکتری اشرشیاکولای می‌باشد که اکسیداتیو و فرمنتاتیو می‌باشد. لوله های ۵ و ۶ نشان دهنده حالت اکسیداتیو و مربوط به باکتری سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد. لوله های ۷ و ۸ نشان دهنده استفاده از پپتون و ناتوانی باکتری در استفاده از قندها می‌باشد.

آزمایش احیاء نیتрат Nitrate Reduction Test

برخی باکتری‌ها دارای آنزیم نیترات ردوکتاز هستند که می‌توانند نیترات را به نیتريت یا فراورده‌های انتهایی مثل اسید نیترو یا ازت تبدیل کند.



نیترات توسط باکتری‌ها به ۳ روش مورد استفاده قرار می‌گیرد:

- (۱) ماده سازی (Assimilation) : نیترات طی چند مرحله به آمونیاک تبدیل شده و نیتريت به عنوان ماده حد واسط تولید می‌شود آمونیاک حاصل به مصرف ساخت اسید آمینه می‌رسد.
- (۲) تنفس (Respiration) : نیترات یا نیتريت به عنوان پذیرنده نهایی الکترون در غیاب یا کمبود اکسیژن آزاد عمل می‌کند و به باکتری هوازی اجازه می‌دهد تا در شرایط بی‌هوازی هم رشد کند.
- دنیتریفیکاسیون (Denitrification) : تعدادی از باکتری‌ها نیترات را به فراورده‌های نهایی گازی شکل مثل ازت و اسید نیترو تبدیل می‌کنند.

برای انجام تست نیترات هم می توان از محیط جامد نیترات آگار که به صورت مایل (اسلنت) تهیه می شود و هم محیط نیترات دار مایع استفاده کرد (این محیط دارای ۱٪ KNO_3 می باشد) که محیط جامد ترجیحا برای باکتری هوازی و محیط مایع ترجیحا برای باکتری بی هوازی به کار می رود.

روش انجام آزمایش:

(۱) مقدار زیادی از کلنی باکتری در محیط کشت نیترات کشت داده شده و ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوباسیون می شود.

(۲) پس از طی زمان انکوباسیون ۵ قطره اسیدسولفانلیک (معرف A) اضافه می شود.

(۳) پس از چند دقیقه ۵ قطره دی متیل آلفا نفتیل آمین (معرف B) به لوله مورد آزمایش اضافه می گردد. اگر ظرف ۱ تا ۲ دقیقه رنگ قرمز در محیط ظاهر شد نشانه احیاء نیترات و تبدیل آن به نیتريت است. پس از افزودن معرف اول در محیط دیازونیوم تشکیل می شود که افزودن معرف دوم باعث تشکیل آزو در محیط می شود و رنگ محیط قرمز می شود. بنابر این پدیدار شدن رنگ قرمز پس از افزودن دو معرف نشانه تشکیل نیتريت در محیط و مثبت بودن آزمایش است.

در صورتی که بعد از اضافه کردن معرف ها رنگ قرمز تشکیل نشد می تواند به ۲ دلیل باشد:

- ✓ تمامی نیترات به N_2 یا NH_3 تبدیل شده که در صورت قرار دادن لوله های دورهام به صورت حباب تجمع می یابد.
- ✓ نیترات موجود در محیط دست نخورده باقی مانده است

لذا برای شناساندن آن و جلوگیری از جواب منفی کاذب مقدار ناچیزی از پودر روی Zn به محیط اضافه می شود که نقش آن احیاء نیترات به نیتريت است. در صورتی که در محیط نیترات موجود باشد (باکتری نیترات را احیا نکرده باشد) نیترات توسط روی به نیتريت احیا شده و رنگ قرمز پدید می آید پس جواب منفی است. در غیر این صورت باکتری تمام نیترات را به آمونیاک یا ترکیبات دیگر احیاء کرده و پاسخ مثبت است. در هنگام افزودن پودر روی به محیط کشت باید توجه داشت که افزودن بیش از حد پودر روی ممکن است موجب اشتباه شود. زیرا در صورت زیاد بودن روی، اکسیژن تولید شده، نیتريت حاصل از نیترات احیاء نشده را به آمونیاک تبدیل می کند که مانع از پیدایش رنگ و یا فقط یک واکنش رنگی ضعیف خواهیم داشت.

- ✓ آنتروباکتریاسه ها، استافیلوکوکوس ها، نیترات مثبت هستند. درحالی که استرپتوکوکوس ها نیترات منفی می باشند.



طرز تهیه معرف های تست نیترات :

محلول A: ۱۰/۸ گرم اسید سولفانلیک در ۱۰۰ میلی لیتر اسید اسیتیک ۵ نرمال حل شود.

محلول B: ۰/۶ میلی لیتر دی متیل آلفانفتوآمین در ۱۹ میلی لیتر اسید اسیتیک ۵ نرمال حل شود.

آزمایش تخمیر قندها

تخمیر فرایندی است که طی آن انرژی تولید شده و مولکول‌های آلی هم به عنوان گیرنده و هم پذیرنده الکترون عمل می‌کنند. باکتری‌ها توانایی تخمیر بعضی قندها را دارند درحالی‌که توانایی تخمیر برخی قندها را ندارند. تعدادی از باکتری‌ها به طور کلی غیرتخمیری بوده و توانایی تخمیر هیچ قندی را ندارند، این باکتری‌ها انرژی مورد نیاز خود را از پروتئین‌ها بدست آورده و اصطلاحاً پروتئولیتیک هستند. از این خاصیت برای شناسایی باکتری‌ها استفاده می‌شود.

فرآورده‌های نهایی تخمیر بسته به نوع میکروارگانیسم دخیل در آن می‌تواند الکل، اسید، گاز یا سایر ترکیبات آلی باشد. قندهایی که بطور معمول مورد بررسی قرار می‌گیرند: گلوکز، آرابینوز، رامنوز، فرکتوز، مانوز، گالاکتوز، ساکاروز، مالتوز، لاکتوز، رافینوز، تری هالوز، انولین، دکستروز هستند.

طرز تهیه محیط کشت قندی:

۱/۵ تا ۱٪ از قند مورد آزمایش را به محیط کشت پایه قندی اضافه می‌کنند محیط کشت پایه آماده فنل رد براث بیس است. این محیط معمولاً قرمز رنگ می‌باشد. در اثر تخمیر قند و تولید اسیدهای آلی از قند مورد آزمایش PH محیط کشت کاهش یافته بر اثر این تغییر PH معرف فنل رد هم تغییر رنگ باعث تغییر رنگ محیط از قرمز به زرد می‌شود. در این آزمایش اگر داخل محیط از لوله‌های دورهام (به افتخار Herbert Edward Durham باکتری شناسی انگلیسی) استفاده شود، می‌توان تولید گاز توسط باکتری مورد آزمایش را نیز بررسی کرد.



تصویر نتایج تخمیر قندها: توسط باکتری‌ها لوله وسط مثبت و لوله‌های اطراف از نظر تخمیر قند مورد بررسی منفی هستند.

طرز تهیه برخی رنگ‌های مورد استفاده از میکروپوشناسی:

قرمز کنگو: یک گرم پودر کنگو رد در ۱۰۰ سی سی آب مقطر

معرف کواکس: پارا دی متیل بنزالدئید ۵ گرم + ایزوامیل الکل ۷۵ میلی لیتر + اسید کلریدریک غلیظ ۲۵ میلی لیتر

در بن ماری ۵۰ تا ۶۰ درجه سانتی گراد آلدئید در الکل حل شده و به آهستگی اسید اضافه می گردد. معرف در محل تاریک نگهداری گردد.