

رنگ آمیزی باکتری‌ها

گستره‌های میکروبی در زیر میکروسکوپ به شکل عادی با وضوح مشاهده نمی‌شوند. شفافیت و وضوح شکل را می‌توان با رنگ آمیزی افزایش داد. بنابراین رنگ آمیزی برای تمایز نمونه از زمینه دید به کار می‌رود.

۱-۳- رنگ‌ها

رنگ‌های مورد استفاده در میکروب شناسی نمک‌های مواد شیمیایی و دارای بار مثبت و یا منفی هستند. برای نمونه :

متیلن بلو⁽⁺⁾ + کلرور⁽⁻⁾ → کلرور متیلن بلو

هنگام رنگ آمیزی، این رنگ‌ها با مواد شیمیایی موجود در ساختمان میکروب‌ها پیوند تشکیل داده و باعث رنگ آمیزی آنها می‌شوند. رنگ‌ها را به دو گروه تقسیم می‌کنند :

— رنگ‌های بازی^۱ : دارای بار الکتریکی مثبت (کاتیونی) هستند و می‌توانند به ترکیبات سلولی مانند اسیدنوکلئیک و پروتئین‌ها که دارای بار منفی هستند جذب شوند و آنها را رنگ کنند. مهم‌ترین رنگ‌های بازی متیلن بلو، کریستال ویوله، سافرانین و مالاشیت گرین می‌باشند.

— رنگ‌های اسیدی^۲ : دارای بار منفی (آنیونی) هستند بنابراین جذب ترکیبات سلولی با بار منفی نمی‌شوند و تنها برای رنگ آمیزی زمینه دید به کار می‌روند مانند رنگ نیکروزین.

— رنگ‌های خنثی : بدون بار الکتریکی هستند و برای رنگ کردن بخش‌های بدون بار سلول مانند چربی‌ها استفاده می‌شوند مانند رنگ سودان سیاه که در رنگ آمیزی دانه‌های چربی کاربرد دارند.

۲-۳- انواع رنگ آمیزی

۱-۲-۳- رنگ آمیزی ساده : در این نوع رنگ آمیزی تنها از یک نوع رنگ استفاده می‌شود. رنگ بازی برای رنگ آمیزی

سلول باکتری و رنگ اسیدی برای رنگ آمیزی زمینه به کار می‌روند.

این نوع رنگ آمیزی برای تشخیص شکل، اندازه و ترتیب قرار گرفتن باکتری‌ها کنار هم به کار می‌رود مانند رنگ آمیزی ساده با متیلن بلو.

۲-۲-۳- رنگ آمیزی مرکب : در این نوع رنگ آمیزی از دو یا چند رنگ و در طی چندین مرحله استفاده می‌شود. مانند

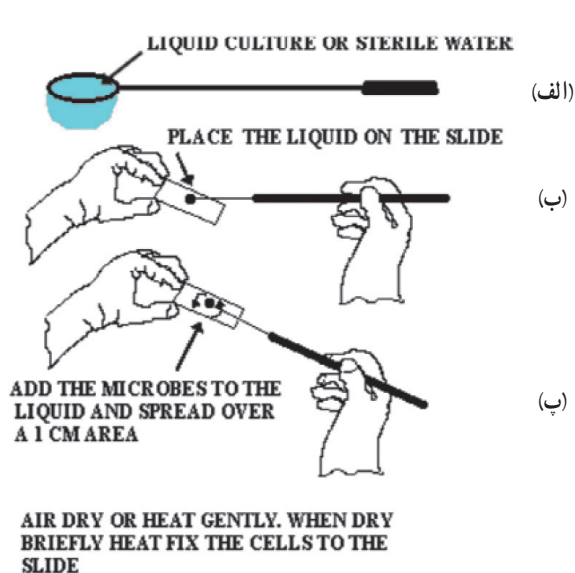
رنگ آمیزی گرم که جهت تمایز باکتری‌های گرم مثبت از گرم منفی به کار می‌رود.

۱- basic stains

۲- acidic stains

۳-۲-۳- رنگ آمیزی اختصاصی: در این رنگ آمیزی نیز از دو یا چند رنگ استفاده می‌شود و برای تشخیص اجزای خاص سلول باکتری‌ها مانند اسپور، تاژک و کپسول به کار می‌رود.

مهم‌ترین کار پیش از رنگ آمیزی نمونه‌ها تهیه گسترش میکروبی مناسب از نمونه مورد نظر است. بسته به نوع رنگ آمیزی دو نوع گستره میکروبی باید تهیه شود. برای رنگ آمیزی سلول باکتری‌ها از گستره خشک و برای رنگ آمیزی زمینه از گستره مرطوب استفاده می‌شود.



شکل ۳-۱- چگونگی تهیه گستره خشک میکروبی
(الف): یک قطره آب روی لام قرار داده می‌شود. ب: توسط حلقه کشت، میکروبها درون قطره روی لام به صورت حلقه‌ای به شکل یک سکه پخش می‌شوند. پ: گستره خشک شده و سپس روی لام ثابت می‌گردد.)

۳-۳- تهیه گستره خشک از نمونه میکروبی

۳-۳-۱- یک قطره آب مقطر استریل در مرکز لام آزمایشگاهی قرار دهید.

۳-۳-۲- با استفاده از لوپ استریل (به فصل دوم مراجعه شود) از کلنی باکتری مورد نظر در محیط کشت میکروبی برداشت کرده و داخل آب مقطر به خوبی پخش کنید و به اندازه یک سکه گستره تهیه کنید (شکل ۳-۱).

۳-۳-۳- گستره تهیه شده را خشک کنید. برای خشک کردن گستره می‌توان آن را در دمای آزمایشگاه قرار داد و یا با استفاده از خشک‌کن‌ها، خشک کرد.

۳-۳-۴- در مرحله آخر گستره خشک شده را ثابت کنید. برای این کار بهتر است لام را به پشت ۳ مرتبه به سرعت از روی شعله عبور داد.

نکته‌ها

✓ لام‌ها باید به طور کامل تمیز باشند. برای تمیز کردن لام‌ها می‌توان از پنبه آغشته به گزلیل استفاده کرد.

✓ عمل تثبیت باعث می‌شود باکتری‌ها به لام چسبیده و در مراحل بعدی رنگ آمیزی شسته نشده و از روی لام پاک نشوند.
✓ گستره باید بسیار نازک باشد، زیرا در گستره ضخیم، باکتری‌ها بر روی هم قرار می‌گیرند و پس از رنگ آمیزی و مشاهده با میکروسکوپ نمی‌توان شکل باکتری‌ها را به خوبی تشخیص داد.

۳-۴- تهیه گستره مرطوب از نمونه میکروبی

گستره مرطوب میکروبی برای رنگ آمیزی کپک‌ها، مشاهده حرکت باکتری‌ها در محیط مایع و رنگ آمیزی زمینه در رنگ آمیزی منفی به کار می‌رود که برای هر کدام از این موارد در جای خود شرح داده خواهد شد.

۳-۵- رنگ آمیزی ساده با متیلن بلو

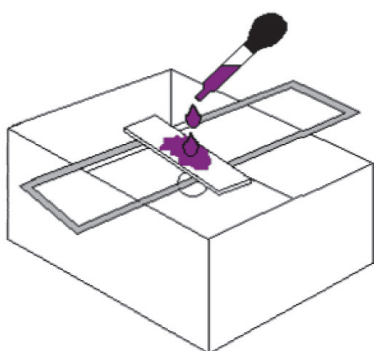
هدف: تشخیص شکل، اندازه و ترتیب قرار گرفتن باکتری‌ها در کنار هم

مواد و وسایل مورد نیاز

- لام میکروسکوپی
- لوپ یا فیلدوپلاتین
- چراغ گازی
- تشتک رنگ آمیزی
- رنگ متیلن بلو
- ظرف‌های دارای محیط‌های کشت میکروبی از سه گونه باکتری اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس
- میکروسکوپ نوری معمولی

روش کار

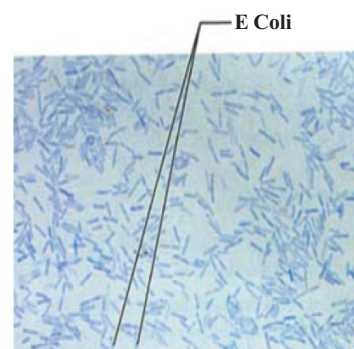
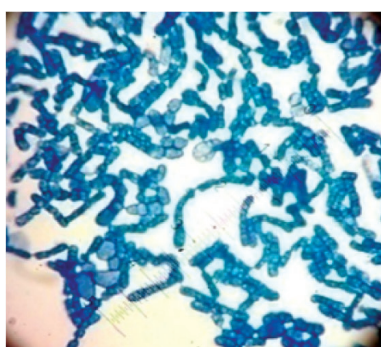
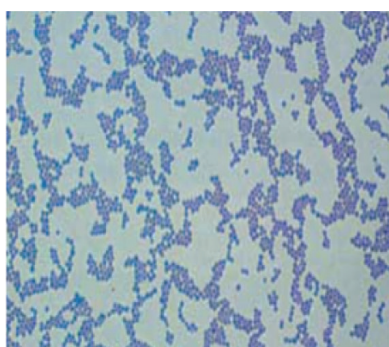
- ابتدا از هر کدام از نمونه باکتری‌ها به روشی که در پیش گفته شد بر روی لام میکروسکوپی گستره خشک تهیه کنید.
- گستره‌ها را با خشک کن خشک کنید.
- گستره‌های خشک شده را ۳ بار از روی شعله عبور دهید تا بر روی لام ثابت شود.
- لام گستره را روی تشتک رنگ‌آمیزی قرار داده و مانند شکل (۲-۳) روی گستره را با رنگ متیلن بلو بپوشانید.
- پس از ۱ دقیقه لام را شستشو دهید.



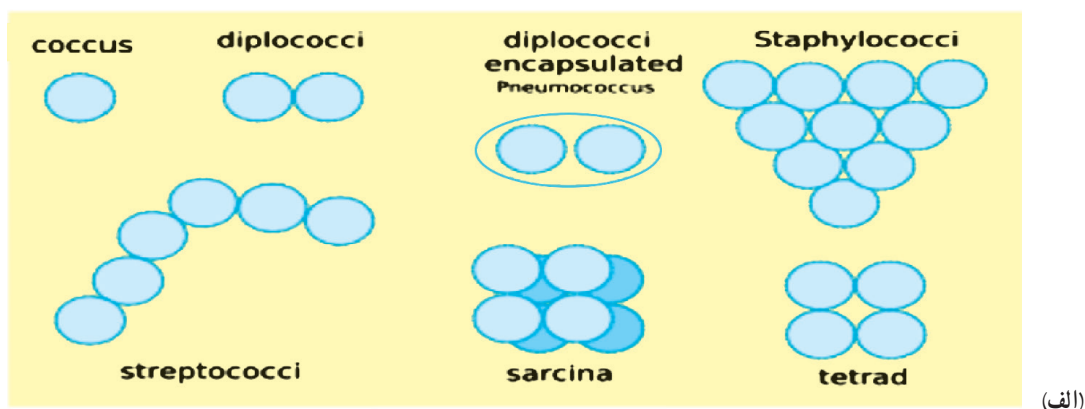
شکل ۲-۳ چگونگی ریختن رنگ بر روی گستره تهیه شده

یادآوری: هنگام شستشوی لام با آب بهتر است از آب فشان (پیست) استفاده شود. با گیره چوبی لام را در یک دست به طرف پایین نگه داشته و با دست دیگر آب را با پیست به آرامی روی لام بریزید. با این کار از پاشیده شدن رنگ بر روی لباس و دست‌ها جلوگیری می‌شود.

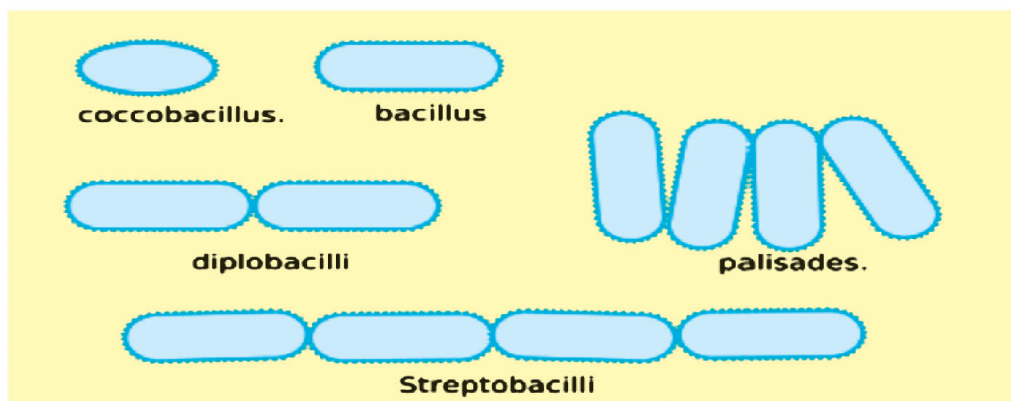
- لام‌های شسته شده را با خشک کن خشک کنید.
- نمونه زیر میکروسکوپ را اول با عدسی $10\times$ و $40\times$ و در آخر با عدسی $100\times$ و روغن ایمرسیون مشاهده کنید (برای آگاهی بیشتر به فصل دوم، طرز کار با میکروسکوپ نوری مراجعه کنید).



شکل ۳-۳ از راست به چپ باکتری اشریشیاکلی به شکل کوکوباسیل، باکتری باسیلوس سرئوس به شکل باسیل زنجیره‌ای (استریتوباسیل) و باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به شکل کوکسی خوشه‌ای



(الف)



(ب)

شکل ۳-۴ - (از چپ به راست)

(الف): از چپ به راست Coccus (گرد تک)، diplococcus (گرد دو تایی)، diplococcus encapsulated (گرد دو تایی کپسولدار)، streptococci (گرد زنجیره‌ای)، sarcina (گرد هشت تایی)، tetrad (گرد چهار تایی)، Coccobacillus (کوکوباسیل)، bacillus (میله‌ای)، diplobacilli (دو تایی)، streptobacilli (میله‌ای زنجیره‌ای).

بیشتر بدانیم

باکتری‌ها بر اساس شکل و ترتیب قرار گرفتن آنها در کنار هم به چندین گروه تقسیم می‌شوند که چندین نمونه آنها در شکل (۳-۴) نشان داده شده است.

۳-۶- رنگ آمیزی گرم

این نوع رنگ آمیزی مرکب برای تشخیص دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به کار می‌رود. اساس رنگ آمیزی گرم اختلاف ترکیبات دیواره سلولی باکتری‌ها است.

مواد و وسایل مورد نیاز

➤ لام آزمایشگاهی

➤ لوپ یا حلقه کشت

- تشک رنگ آمیزی
- چراغ گازی
- رنگ های کریستال ویوله و سافرانین
- محلول لوگول
- محلول الکل استن
- تشک های دارای محیط های کشت میکروبی از سه گونه باکتری استافیلوکوکوس، ائورتوس، اشریشیاکلی و باسیلوس

سرئوس

- میکروسکوپ نوری معمولی

روش کار

- ابتدا از کلنی باکتری های مورد نظر برداشت کرده و به روشی که در پیش گفته شد گستره خشک بر روی لام تهیه کنید.
- گستره را با خشک کن خشک کرده و با ۳ بار عبور دادن از روی شعله بر روی لام ثابت کنید.
- سطح گستره را با رنگ کریستال ویوله بپوشانید و ۱ دقیقه صبر کنید تا رنگ جذب سلول شود.
- پس از ۱ دقیقه لام را بشویید.
- سطح گستره را به مدت ۱ دقیقه با لوگول بپوشانید.
- یادآوری: نقش لوگول، تثبیت رنگ کریستال ویوله در دیواره سلول باکتری ها است (نقش دندان دارد).
- پس از ۱ دقیقه لام را با آب شستشو دهید.
- سپس با الکل استن به مدت ۳۰ ثانیه رنگ بری کنید.
- یادآوری: الکل استن نقش رنگ بری برای رنگ کریستال ویوله دارد. اختلاف باکتری های گرم مثبت و گرم منفی در همین مرحله است. (به قسمت بیشتر بدانیم توجه کنید).

نکته ها

- ✓ هنگام استفاده از الکل استن بهتر است لام را به صورت کج نگه دارید و الکل استن را به آرامی به مدت ۳۰ ثانیه از بالای لام روی آن بریزید.

- ✓ سطح گستره را با رنگ سافرانین به مدت ۱ دقیقه بپوشانید.

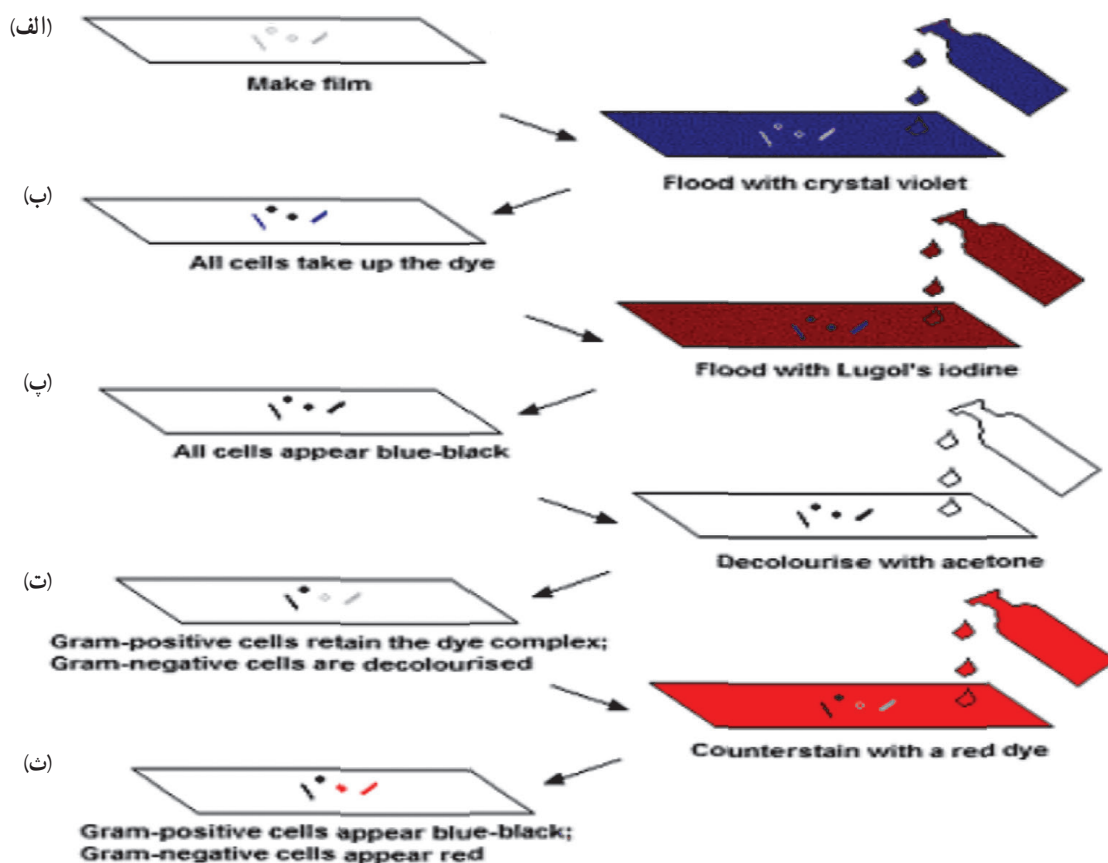
- ✓ پس از ۱ دقیقه لام را با آب بشویید.

- ✓ در آخر لام را خشک کرده و با میکروسکوپ نوری و عدسی $\times 100$ نمونه را مشاهده نمایید.

- مراحل رنگ آمیزی گرم در شکل (۳-۵) نشان داده شده است.

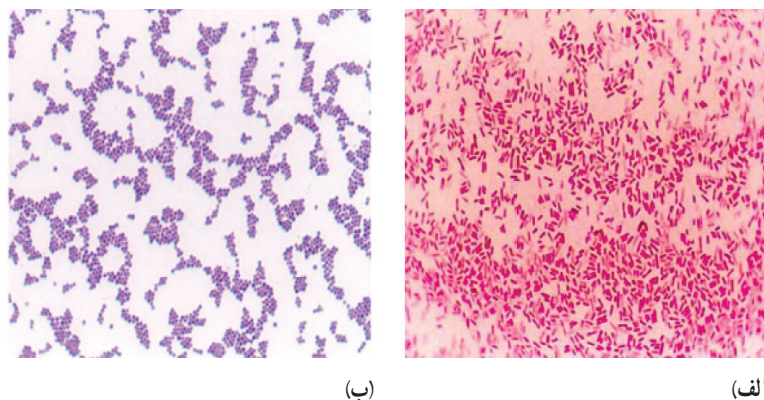
نکته ها

- ✓ در تمام مراحل هنگام استفاده از رنگ ها و محلول ها، لام باید روی تشک رنگ آمیزی قرار داده شود.
- ✓ هنگام شستشوی لام، آن را با گیره چوبی نگه دارید تا دست ها رنگی نشوند.
- ✓ لام را پایین نگه دارید و آب را با پیست به آرامی روی لام بریزید تا رنگ به لباس و دست و صورت نپاشد.



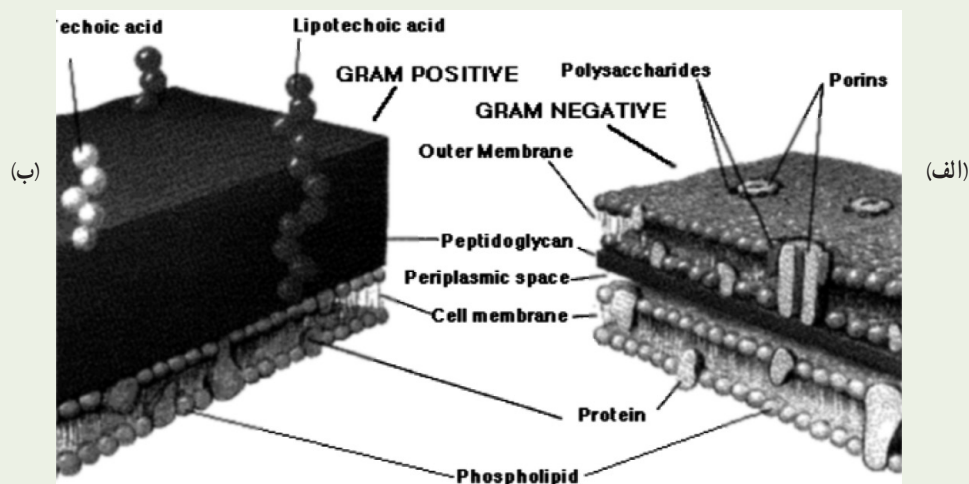
شکل ۳-۵ (الف) تهیه گستره میکروبی (ب) گستره با رنگ کریستال ویوله به مدت ۱ دقیقه پوشانده می شود. در این مرحله همه باکتری ها رنگ کریستال ویوله را جذب می کنند. (پ) گستره با محلول لوگل پوشانده می شود. (ت) گستره با الکل استن رنگ بری می شود. در این مرحله باکتری های گرم مثبت رنگ را نگه می دارند ولی در باکتری های گرم منفی رنگ پاک می شود. (ث) گستره با رنگ سافرانین رنگ می شود. در این مرحله باکتری های گرم مثبت همان رنگ اول کریستال ویوله که بنفش است را حفظ می کنند ولی باکتری های گرم منفی که در مرحله اول رنگشان پاک شده رنگ قرمز سافرانین را جذب می کنند.

یافته ها : پس از رنگ آمیزی گرم، باکتری های گرم منفی به رنگ قرمز و گرم مثبت ها به رنگ بنفش مشاهده می شوند.



شکل ۳-۶ (الف) باکتری اشریشیا کلی کوکوباسیل و گرم منفی (ب) باکتری استانیلوکوکوس اورئوس کوکسی خوشه ای و گرم مثبت

باکتری‌ها را بر اساس اختلاف در دیواره سلولی به دو گروه بزرگ گرم مثبت و گرم منفی تقسیم می‌کنند. مهم‌ترین اختلاف دیواره سلولی باکتری‌ها مربوط به ساختار دیواره و ضخامت لایه پپتیدوگلیکان (ترکیب اصلی دیواره سلولی) در دیواره سلولی آنها است. ساختمان دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی پیچیده‌تر از باکتری‌های گرم مثبت است و ضخامت لایه پپتیدوگلیکان نیز بسیار کمتر از لایه پپتیدوگلیکان گرم مثبت‌ها است. در شکل (۳-۷) تفاوت ساختمان دیواره باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داده شده است.



شکل ۳-۷- (الف) ساختمان دیواره سلولی باکتری گرم منفی که شامل (cell membrane) غشای داخلی و غشای خارجی، (periplasmic space) فضای پری پلاسمیک، پپتیدوگلیکان و لیپوپلی ساکارید است. (ب) ساختمان دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت که شامل پپتیدوگلیکان ضخیم و (lipoteichoic acid) لیپوتایکونیک اسید است.

۳-۷- رنگ آمیزی اسپور

رنگ آمیزی اسپور یک نوع رنگ آمیزی ویژه است که برای مشاهده اسپور باکتری‌ها به کار می‌رود. در بین باکتری‌ها دو جنس باسیلوس و کلستریدیوم، اسپوردار هستند.

مواد و وسایل مورد نیاز

➤ لام

➤ ارلن کوچک

➤ چراغ گازی

➤ رنگ مالاویت گرین

➤ رنگ سافرانین

➤ محیط کشت باسیلوس سرئوس

روش کار

– یک ارلن آب مقطر روی توری نسوز و شعله چراغ گازی قرار دهید تا آب به جوش آید.

- از کلنی باکتری مورد نظر برداشت کرده و مانند آنچه در پیش گفته شد گستره تهیه و خشک و ثابت کنید.
- زمانی که آب داخل ارلن به جوش آمد لام را روی دهانه ارلن در حال جوش قرار دهید (مانند شکل ۸-۳).

نکته‌ها

✓ اسپور شکل مقاوم باکتری‌ها است و نسبت به رنگ‌ها نفوذ ناپذیر است بنابراین باید از بخار آب جوش برای نفوذ پذیری اسپور و رنگ شدن آن استفاده کرد.

✓ هنگامی که زیر لام، بخار آب جوش جمع شد روی سطح گستره را با رنگ مالاشیت گرین به مدت ۱۰ دقیقه بپوشانید.
یادآوری:

الف) بخارات مالاشیت گرین سمی است، بنابراین هنگامی که رنگ روی لام در حال بخار کردن است باید دهان و بینی را دور نگه داشت و از استنشاق بخارات پرهیز نمود.

ب) رنگ روی لام نباید در مدت ۱۰ دقیقه لازم برای رنگ شدن اسپور خشک شود. برای این کار زمانی که رنگ در حال خشک شدن بود باید دوباره رنگ مالاشیت گرین روی گستره ریخته شود.

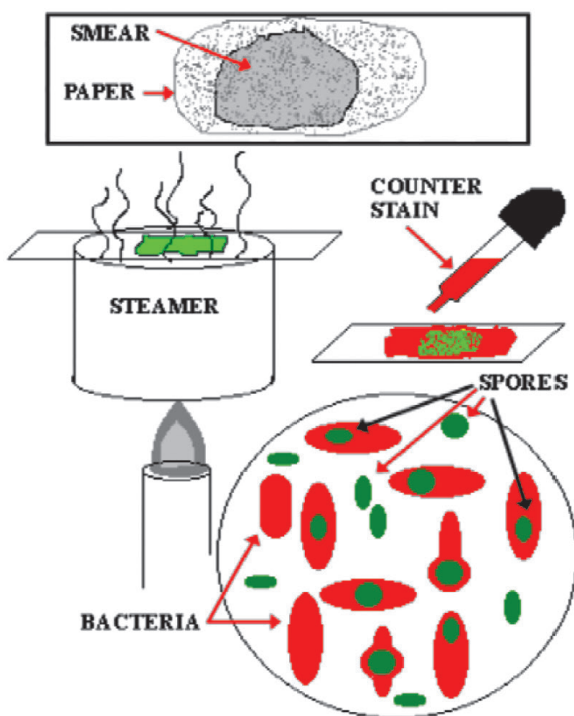
پ) هنگام ریختن رنگ روی گستره دقت شود که رنگ روی میز کار و لوازم ریخته نشود.

– پس از مدت ۱۰ دقیقه لام را با آب شستشو دهید.

– لام را روی تشتک رنگ قرار داده وسط گستره را با رنگ سافرانین به مدت ۱ دقیقه بپوشانید.

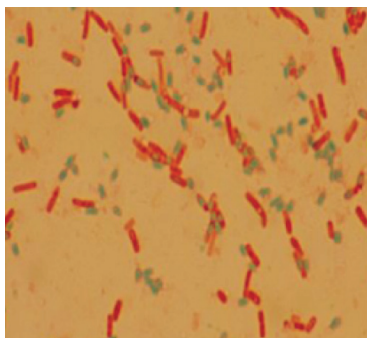
– لام را شسته و خشک کنید.

– لام را با میکروسکوپ نوری و عدسی $100\times$ مشاهده کنید.



شکل ۸-۳- مراحل رنگ آمیزی اسپور باکتری‌ها. ابتدا از نمونه باکتری مورد نظر گستره خشک تهیه شده و خشک می‌شود. سپس لام دارای گستره از پشت بر روی دهانه بشر دارای آب در حال جوش قرار داده شده و رنگ مالاشیت گرین روی آن افزوده می‌شود. در آخر پس از شستشو با سافرانین رنگ می‌شود. در زیر میکروسکوپ سلول‌های رویشی به رنگ قرمز و اسپورها سبز رنگ دیده می‌شوند.

نتیجه : با رنگ آمیزی اسپور، سلول‌های رویشی به رنگ قرمز و اسپور باکتری به رنگ سبز مشاهده می‌شود.

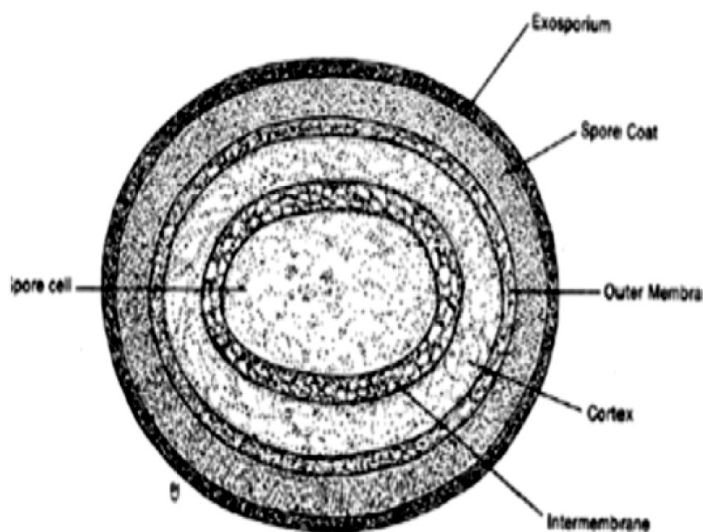


شکل ۹-۳- باکتری باسیلوس سرتوس (اسپور
باکتری سبز و سلول رویشی قرمز)

بیشتر بدانیم

اسپور (اندوسپور) شکل مقاوم باکتری‌ها است که در دو جنس مهم باسیلوس و کلوستریدیوم در شرایط نامساعد محیطی مانند کمبود مواد غذایی، خشکی و گرمای زیاد تشکیل می‌شود و باکتری را قادر می‌سازد مدت طولانی بتواند این شرایط را تحمل کند. تبدیل سلول رویشی به اسپور را اسپورزایی می‌گویند. اگر شرایط برای باکتری دوباره مساعد شود اسپور تبدیل به سلول رویشی می‌گردد که به این عمل جوانه زدن گفته می‌شود.

در شکل (۱-۳) ساختمان اسپور باکتری‌ها و لایه‌های مختلف آن نشان داده شده است.



شکل ۱-۳- لایه‌های مختلف اسپور. به ترتیب از داخل به خارج شامل: سلول اسپور و هسته مرکزی، غشای داخلی اسپور، کورتکس، پوشش اسپور یا (coat)، غشای خارجی و پوسته بیرونی یا اگزوسپوریوم (Exosporium)

۸-۳- رنگ آمیزی کپسول

در رنگ آمیزی اختصاصی برای مشاهده کپسول باکتری‌ها به کار می‌رود. در عمل رنگ آمیزی شرط رنگ گیری یک سلول، یونی بودن آن است چون وقتی سلول حالت یونی داشته باشد هنگام رنگ آمیزی بین نواحی یونیزه سطح سلول و اجزای یونیزه

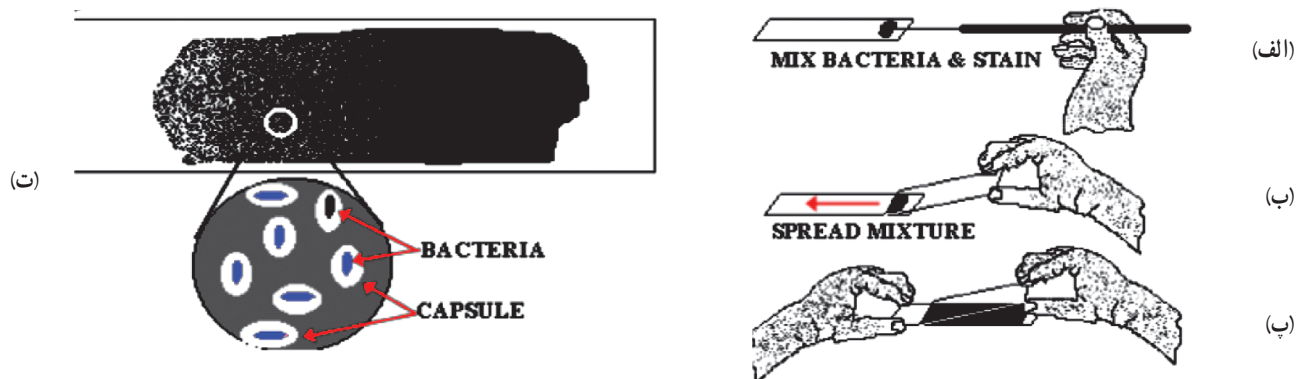
مولکول‌های رنگ پیوند بوجود می‌آید. در نتیجه بین بارهای مخالف موجود در سطح سلول و مولکول‌های رنگ پیوند یونی تشکیل می‌شود و باکتری رنگ می‌گیرد. اما چون کپسول به علت غیر یونی بودن آن رنگ نمی‌گیرد و برای دیدن آن در زیر میکروسکوپ زمینه باکتری رنگ آمیزی می‌شود، امکان دیدن کپسول باکتری بصورت بیرنگ فراهم می‌شود. این روش را رنگ آمیزی منفی می‌نامند. در این رنگ آمیزی تعدادی سلول از کلنی باکتری مورد نظر برداشت شده و در رنگ نکرورزین یا مرکب چین روی لام مخلوط می‌شود و سپس با لام دیگری که مانند شکل (۱۱-۳) با زاویه ۴۵ درجه سانتی‌گراد روی لام اول قرار می‌گیرد از یک انتهای لام اول به سمت انتهای دیگر لام کشیده می‌شود. سپس لام اول را در مجاورت هوا خشک کرده و برای مرحله بعدی آماده می‌شود. در این روش رنگ آمیزی برای تثبیت گستره از گرما استفاده نمی‌شود. چون در اثر گرما، باکتری در داخل کپسول از شکل طبیعی خود خارج می‌شود.

مواد و وسایل مورد نیاز

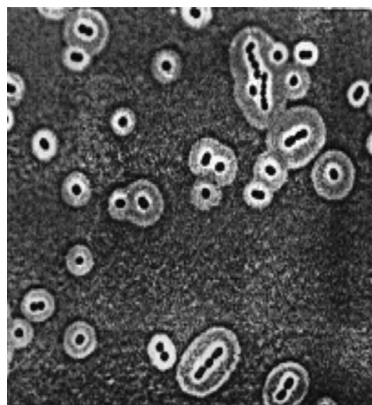
- لام ۲ عدد
- لوپ (فیلدوپلاتین)
- مرکب چینی
- رنگ متیلن بلو
- میکروسکوپ نوری معمولی
- محیط کشت باکتری کپسول دار مانند استرپتوکوکوس پنومونیا

روش کار

- روی یک لام تمیز مقداری رنگ مرکب چین بریزید و با لوپ (نوک آس) مقدار کمی از کشت باکتری به آن اضافه و مخلوط کنید تا سوسپانسیون به آرامی و به طور یکنواخت پخش شود.
- مانند روش رنگ آمیزی منفی گسترش تهیه شده را در هوا خشک کنید.
- یادآوری: هیچ‌گاه نباید کاغذ خشک کن را روی لام کشید.
- سطح گستره را با متیلن بلو به مدت ۳ دقیقه پوشانید. رنگ اضافی را خالی کرده با آب مقطر شستشو دهید.
- لام را خشک کرده و با میکروسکوپ نوری و عدسی $\times 100$ نمونه را مشاهده نمایید.
- نکته: هنگام مخلوط کردن کشت با رنگ، آن را به آرامی هم بزنید تا آرایش باکتری‌ها بهم نخورد.



شکل ۱۱-۳ مراحل رنگ آمیزی کپسول باکتری. (الف) باکتری درون یک قطره رنگ روی لام یکنواخت می‌شود. (ب) با لام دیگر که با زاویه ۴۵ درجه با لام اول در نقطه‌ای که رنگ و باکتری وجود دارند قرار داده می‌شود. (پ) با لام دوم از یک سر تا سر دیگر لام اول کشیده می‌شود. در آخر پس از خشک شدن لام نمونه دیده می‌شود. (ت) کپسول بی رنگ در یک زمینه دید تاریک.



نتیجه : در رنگ آمیزی باکتری های کپسول دار به روش رنگ آمیزی منفی، باکتری به رنگ آبی و کپسول به صورت روشن و بی رنگ در یک زمینه دید تیره مشاهده می شود.

شکل ۱۲-۳ کپسول به صورت یک هاله روشن در اطراف باکتری در یک زمینه تیره مشاهده می شود.

بیشتر بدانیم

برخی از باکتری ها ماده لزجی از خود ترشح می کنند که خارج از سلول و پیرامون آن جمع می شود و دیواره سلولی را می پوشاند. این لایه کپسول نامیده می شود که ضخامت و چسبندگی آن در گونه ها یکسان نیست. اندازه کپسول به محیط کشت میکروبی بستگی دارد و همچنین باکتری های بیماری زا، در بین باکتری های تولید کننده کپسول، کپسول های بزرگتری دارند. جنس این کپسول از پلی ساکارید است که در آب محلول و غیر یونی است.

کاربرد کپسول در باکتری ها : کپسول به عنوان یک سد اسمزی بین باکتری و محیط اطراف آن عمل می کند و در واقع نقش حفاظتی دارد. کپسول مانع از عمل بیگانه خواری گلبول های سفید می شود همچنین بعنوان مخزن ذخیره مواد غذایی یا دفع مواد زائد هم می تواند عمل کند.

در تعدادی از باکتری های بیماری زا، وجود کپسول شدت بیماری زایی و عفونت زایی را افزایش می دهد و ممکن است حتی این بیماری زایی به وجود کپسول بستگی داشته باشد. برای نمونه در استرپتوکوکوس پنومونیا اگر توانایی تولید کپسول در باکتری از بین برود این باکتری غیر بیماری زا می شود.

آلودگی‌زدایی و سترون‌سازی

واژه‌ها

استریلیزاسیون^۱: فرایند جداسازی و از بین بردن یا نابودی همه میکروارگانیسم‌ها و ویروس‌ها به شکل رویشی و اسپور، سترون‌سازی یا استریلیزاسیون نامیده می‌شود. نابودی میکروارگانیسم‌ها به این معنا است که نتوانند تکثیر کنند. واژه استریل، یعنی بدون میکروب.

ضدعفونی کردن^۲: فرایندی است که طی آن همه میکروارگانیسم‌ها یا دست کم میکروب‌های بیماری‌زا و ویروس‌ها از بین می‌روند اما برخلاف استریل کردن ممکن است برخی از میکروب‌ها زنده بمانند. واژه ضد عفونی کردن در عمل بیشتر در رابطه با مواد شیمیایی ضد میکروب است که برای ضدعفونی کردن سطوح بی‌جان کاربرد دارند.

آنتی‌سپتیک^۳: به مواد سترون کننده پوست به ویژه هنگام اعمال جراحی گفته می‌شود.

گندزدایی^۴: منظور از گندزدایی یا بهسازی، کاهش بار آلودگی میکروبی متناسب با استانداردهای ایمنی و بهداشتی است.

آلودگی‌زدایی^۵: عبارت است از کاهش تعداد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در حدی که سلامتی افراد را به خطر نیاندازد. آلودگی‌زدایی می‌تواند همراه با یک شستشوی ساده باشد و یا با استفاده از گرما یا ضدعفونی کننده‌ها.

روش‌های سترون‌سازی

۴-۱- روش‌های گرمایی

۴-۱-۱- گرمای خشک: گرمای بدون رطوبت است که برای نابودی میکروارگانیسم‌ها به کار برده می‌شود مانند گداختن لوپ‌های آزمایشگاهی روی شعله چراغ گازی. این روش گرمایی برای استریل کردن وسایل شیشه‌ای، فلزی، پودرها و سایر مواد خشک بدون آب به کار برده می‌شود. زمانی که از گرمای خشک استفاده می‌شود مدت زمان گرمادهی برای کشتن میکروارگانیسم‌ها هم باید بیشتر باشد. مهم‌ترین وسیله برای استفاده از گرمای خشک در از بین بردن میکروب‌ها و سترون‌سازی، آون^۶ است که با دمای

۱ - Sterilization

۲ - Disinfection

۳ - Antiseptic

۴ - Sanitization

۵ - Decontamination

۶ - Oven

۱۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ الی ۳ ساعت عمل می‌کند (برای جزئیات بیشتر به فصل دوم مراجعه شود).

۲-۱-۴- گرمای مرطوب: مانند استفاده از گرمای آب جوش در فشار اتمسفری که بیشتر برای سالم سازی آب آشامیدنی

به کار می‌رود ولی اسپور باکتری‌ها را از بین نمی‌برد. روش دیگر دمای بخار آب با فشار بالاتر از اتمسفریک است که برای از بین بردن اسپور باکتری‌ها هم مناسب است. این روش بیشتر برای استریل کردن وسایل کار و محیط‌های کشت میکروبی و سترون سازی تجارتی کنسروها کاربرد دارد. اتوکلاو بهترین وسیله برای استفاده از گرمای مرطوب با دمای بالاتر از 100°C و در بیشتر موارد 120°C با فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع است که مدت زمان لازم بسته به مورد ۱۵ دقیقه و بیشتر است (به فصل دوم مراجعه شود).

۳-۱-۴- پاستوریزاسیون^۱: این روش اولین بار توسط لویی پاستور دانشمند فرانسوی به کار برده شد. با این روش مواد

به طور کامل استریل نمی‌شوند بلکه تنها میکروب‌های بیماری‌زا از بین می‌روند. این روش بیشتر برای شیر و آب میوه‌ها کاربرد دارد و ماندگاری مواد غذایی را بالا می‌برد و باعث کشتن میکروب‌های عامل سل، تب مالت و تب تیفوئید می‌گردد.

۴-۱-۴- تیندالیزاسیون^۲: در این روش از گرمادهی متناوب استفاده می‌کنند. مواد مورد نظر ابتدا تا دمای 100°C

گرمادهی و بدون فاصله سرد می‌شوند. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری می‌شوند. این عمل سه روز متوالی تکرار می‌گردد. در دمای 100°C همه سلول‌های رویشی باکتری‌ها از بین می‌روند ولی اسپورها زنده می‌مانند. از طرفی اسپورها پس از شوک گرمایی وارد شده، با جوانه زدن تبدیل به سلول‌های رویشی می‌شوند که آنها هم در مراحل بعدی از بین می‌روند و به این ترتیب در دمای پایین سترون سازی انجام می‌شود و به مواد حساس به گرما آسیب کمتری وارد می‌شود.

۲-۴- مواد شیمیایی ضد میکروب یا سترون‌کننده‌ها

۱-۲-۴- فنول: یکی از قدیمی‌ترین سترون‌کننده‌ها است ولی امروزه به دلیل ایجاد حساسیت بر روی پوست افراد استفاده

از آن محدود شده است. ترکیبات فنولی غشای سیتوپلاسمی باکتری‌ها را تخریب می‌کند و اغلب باکتری‌های رویشی را از بین می‌برد. در غلظت‌های بالا می‌تواند اثر کشندگی بر روی باکتری عامل سل داشته باشد.

۲-۲-۴- الکل: از الکل اتیلیک و الکل ایزوپروپیلیک برای سترون کردن پوست و وسایل مختلف استفاده می‌کنند.

قدرت میکروب‌کشی الکل‌ها با افزایش وزن مولکولی آنها افزایش می‌یابد. از آنجایی که با افزایش وزن مولکولی الکل‌ها حلالیت آنها کاهش می‌یابد، بدین جهت به عنوان میکروب کش بکار نمی‌روند. از میان الکل‌ها، الکل اتیلیک و الکل ایزوپروپیلیک به عنوان مواد سترون‌کننده کاربرد بیشتری دارند و مصرف خارجی آنها سمی نیست. الکل متیلیک خیلی سمی است و موجب آسیب به چشم می‌گردد و به عنوان میکروب‌کش به کار نمی‌رود. الکل‌ها منعقدکننده پروتئین‌ها و حلال چربی‌ها می‌باشند. الکل‌های خیلی غلیظ ۱۰-۹۵٪ باعث جذب آب بیشتر از سلول باکتری‌ها شده و موجب می‌شوند که الکل نتواند به درون سلول باکتری نفوذ کند و عمل دهیدراتاسیون^۳ الکل باعث توقف رشد باکتری‌ها می‌گردد.

۳-۲-۴- الکل با غلظت ۹۰-۵۰ درصد باعث از بین بردن باکتری‌ها و قارچ‌ها و بعضی از ویروس‌ها می‌گردد ولی برای

اسپورباکتری‌ها اثر ندارد. در عمل بیشتر از الکل ۷۰٪ و یا همراه با مواد دیگر مانند ید و فرمالدهید استفاده می‌شود. خاصیت ضد میکروبی الکل ایزوپروپیلیک کمی بیشتر از الکل اتیلیک است، برای سترون کردن دماسنج‌ها بهتر است از الکل ایزوپروپیلیک استفاده شود. الکل‌ها به ویژه محلول‌های آبی الکل مانند اتانل ۷۰٪ به صورت آنتی‌سپتیک برای از بین بردن جرم‌های پوستی و

۱ – Pasturization

۲ – Tyndalization

۳ – Dehydration

به عنوان سترون کننده برای سالم سازی پوست، وسایل و سطوح به کار می روند. غیر سمی و ارزان بوده ولی به سرعت بخار می شود و زمان مؤثر تماس آنها و اثرشان را کاهش می دهد.

۴-۲-۴ آلدئیدها: میکروارگانسیم ها و ویروس ها را با غیر فعال کردن پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک آنها از بین می برند. ترکیباتی مانند گلو تار آلدئید و فرمالدئید از این گروه هستند. باید توجه کرد که گلو تار آلدئید سمی بوده و مواد سالم سازی شده با آن باید پیش از استفاده با آب مقطر شسته شوند. فرمالدئید ترکیبی است که به شکل محلول (Formaldehyde (37%)+10% Methanol) آبکی و یا جامد وجود دارد. فرمالدئید به صورت گاز یا محلول آبکی به نام فرمالین استفاده می شود. یادآوری:

الف) موقع کار کردن با فرمالدئید باید از تجهیزات حفاظتی مانند عینک محافظ، لباس کار، ماسک ویژه، دستکش و کفش مناسب استفاده شود.

ب) در صورت کار با محلول فرمالدئید باید از هود بخار استفاده شود.

پ) در صورت تماس پوست با فرمالدئید باید آن را به مدت ۱۵ دقیقه با آب معمولی شستشو داده و لباس آلوده شده با آن از تن خارج شود و در صورت لزوم به پزشک مراجعه شود.

۴-۲-۵ اکسیدکننده ها: این مواد با اکسید کردن آئیم های میکروب ها آنها را می کشند زیرا از سوخت و ساز آنها جلوگیری می کنند. مهم ترین اکسید کننده ها عبارتند از:

۴-۲-۶ ازن (O_3): که فرم غیر مقاوم اکسیژن و یک اکسید کننده قوی می باشد. امروزه در بسیاری از کشورها برای ضد عفونی کردن آب آشامیدنی، سالم سازی هوا و پساب ها از اوزون استفاده می شود.

۴-۲-۷ آب اکسیژنه (H_2O_2): یا پراکسید هیدروژن که اکسید کننده ای قوی و استریل کننده ای مناسب می باشد که اثرات سمی ندارد و برای استریل کردن ظرف های فلزی و پلاستیکی به کار می رود.

۴-۲-۸ هالوژن ها: عناصر غیر فلزی هستند و در برابر سلول های رویشی، قارچ ها و ویروس ها مؤثرند در حالی که اسپور باکتری ها را در غلظت های عادی مصرف از بین نمی برند. مانند محلول ید و کلر که بیشتر برای سترون کردن آب به کار می روند. البته باید توجه کرد به کار بردن کلر برای دستگاه تنفسی و پوست بدن سمی است.

۴-۲-۹ سورفکتانت ها (فعال کننده های سطحی):^۱ این مواد با اثر بر روی غشای سلول باکتری ها موجب لغزندگی و جداسدن آنها از سطوح می شوند مانند صابون های خانگی و انواع شوینده ها.

۴-۲-۱۰ گاز ها: مانند اکسید اتیلن یا اکسید پروپیلن برای استریل کردن وسایلی که با گرما، مواد شیمیایی یا اشعه به راحتی استریل نمی شوند مانند بالشک ها، تشک ها، غذاهای خشک و ظرف های پلاستیکی و مصارف عمومی بیمارستان ها کاربرد دارد. همه این ها در یک فضای بسته قرار داده شده و با گاز اکسید اتیلن سالم سازی شوند.

۴-۳ تابش اشعه یا پرتو دهی

تابش اشعه اثرات زیادی بر سلول ها می گذارد که به طول موج، شدت و زمان در معرض بودن آن بستگی دارد. پرتوهایی که برای از بین بردن میکروب ها به کار می روند دو نوع هستند:

– پرتوهایی که قدرت یونیزه کنندگی دارد مانند پرتو گاما و پرتوی ایکس.

– پرتوهایی که قدرت یونیزه کنندگی ندارند ولی طول موج بلندتر از پرتوهای یونیزه کننده دارند مانند اشعه فرا بنفش.

اشعه گاما که از برخی مواد رادیواکتیو مانند کبالت ساطع می شود قدرت نفوذ بالایی دارد ولی برای استریل کردن توده های زیاد زمان زیادی برای نفوذ اشعه فرابنفش به DNA سلولی که در معرض آن قرار دارد، لازم است. اشعه با ایجاد بازهای تیمین دوتایی در زنجیره DNA باعث اختلال در همانند سازی آن می شود. طول موج پرتوی فرابنفشی که بیشتر برای کشتن میکروارگانیسم ها مؤثر بوده، حدود ۲۶۰ نانومتر است. برای از بین بردن میکروب ها از پرتوهای با طول موج کوتاه و قدرت نفوذ زیاد استفاده می شود. از میان انواع اشعه، اشعه فرابنفش (UV) با طول موج ۲۰۰-۳۵۰ نانومتر قدرت میکروب کشی مناسب دارد. بزرگترین عیب پرتوی فرابنفش قدرت نفوذ پایین آن است بنابراین برای اینکه این اشعه بتواند میکروارگانیسم ها را از بین ببرد، می بایست آنها را در معرض مستقیم این اشعه قرار داد. مشکل دیگر این اشعه این است که می تواند به چشم انسان آسیب برساند.

یادآوری:

- (الف) در اتاق های انجام آزمون های میکروبی بهتر است لامپ های UV برای استریل کردن فضای اتاق در سقف نصب شود.
- (ب) هنگام کار با UV باید از دستکش محافظ و پیراهن آستین بلند استفاده شود.
- (پ) هنگام روشن بودن UV در زیر هود بیولوژیک باید دریچه جلویی آن بسته باشد.
- (ت) در صورتی که چشم یا پوست توسط UV آسیب دیده باشد فرد باید توسط پزشک معاینه شود.
- (ث) به دلیل خطر ناشی از روشن بودن لامپ UV برای انسان و کارکنان آزمایشگاه، لازم است سالم سازی با UV زمانی انجام شود که کارکنان و هنرآموزان در محل حضور ندارند.

۴-۴- نحوه کاربرد مواد و روش های سترون کننده

- برای سترون سازی تجهیزات و وسایل مقاوم به گرمای خشک مانند وسایل فلزی (جای پی پت ها و جای لوله های آزمایش) و شیشه ای (ارلن، بشر، استوانه های مدرج و پی پت ها) از آون با دمای ۱۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت استفاده می شود.
- پیش از دور انداختن وسایل یکبار مصرف مانند تشتک های یک بار مصرف لازم است آنها را سالم سازی نمود.
- مواد و وسایل شیشه ای را باید پیش از استفاده با گرمای مرطوب (اتو کلاو) و یا گرمای خشک (آون) سترون کرد.
- برای آلودگی زدایی و دفع مواد بهتر است آنها را درون کیسه های پلاستیکی مقاوم به گرما قرار داده و سپس اتو کلاو کرد.
- پیش از شستشوی وسایل شیشه ای آلوده با میکروب ها، باید آنها را اتو کلاو کرد.
- در طی آزمون، وسایل کوچکی مانند پی پت ها، میله های شیشه ای یا همزن، میله شیشه ای سرکج، پنس و... را باید در محلول سترون کننده (الکل اتانل ۷۰٪) یا محلول فتل قرار داد.
- برای سترون سازی پی پت های تمیز شده باید آنها را درون جا پی پتی قرار داده و در آون با دمای ۱۷۰ °C به مدت دو ساعت سترون نمود.

- پس از استفاده از پی پت ها به ویژه هنگام کار با مایعات آلوده باید از طرف نوک، آنها را در یک ظرف استوانه ای بزرگ دارای محلول سترون کننده قرار داد تا سالم سازی شود، سپس آنها را شسته و درون آون سترون کرد.
- لوله های آزمایش را باید پیش و پس از آزمون های میکروبی در آون با دمای ۱۷۰ °C سترون کرد.
- هنگام کار با میله های شیشه ای باید از قسمت سر، درون ظرف دارای الکل اتانل ۷۰ درصد قرار داده شوند و موقع استفاده یکبار از روی شعله عبور داده شوند. با این عمل و سوختن الکل میله ها سترون می شوند.
- یادآوری: اتو کلاو بهترین وسیله برای سترون سازی و آلودگی زدایی است.

آماده‌سازی محیط‌های کشت میکروبی

محیط‌های کشت^۱

با شناخت فاکتورهای محیطی و مواد مغذی مورد نیاز رشد باکتری‌ها، ایجاد شرایط ویژه برای کشت آنها امکان پذیر می‌باشد. این شرایط شامل تعادل گازهای اتمسفر، مواد مغذی، دما و رطوبت نسبی هوا است.

۵-۱- انواع محیط‌های کشت آزمایشگاهی

۵-۱-۱- محیط کشت ساده: ساده‌ترین نوع محیط‌های کشت آزمایشگاهی هستند که دارای ترکیبات ساده مغذی مانند کربوهیدرات، مواد معدنی، ویتامین‌ها، پروتئین و آب می‌باشند.

۵-۱-۲- محیط‌های پیچیده یا کمپلکس: معمول‌ترین محیط‌های کشت آزمایشگاهی بوده که دارای انواع مختلفی از مواد مانند عصاره گوشت، پروتئین‌ها، مواد مغذی، ویتامین‌ها و سایر مواد غذایی می‌باشند. معروف‌ترین این محیط‌های کمپلکس نوترینت برات^۲ یا آبگوشت مغذی نام دارد که دارای ۵ گرم پپتون، ۱۰ گرم عصاره گوشت، ۵ گرم کلورور سدیم و الیتر آب مقطر است. چنانچه آگار به محیط کشت افزوده شود، محیط کشت جامد می‌گردد. مانند نوترینت آگار^۳ یا آگار مغذی. بیشتر باکتری‌هایی که رشد آسان دارند مانند اشریشیاکلی در این محیط به راحتی رشد می‌کنند.

یادآوری: آگار یک پلی‌ساکارید است که از نوعی جلبک دریایی به دست می‌آید و در محیط‌های کشت تنها نقش سفت کننده دارد نه مغذی.

۵-۱-۳- محیط‌های کشت اختصاصی یا غنی کننده^۴: بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا به ویژه آنهایی که در پزشکی دارای اهمیت هستند به سادگی رشد نمی‌کنند و نیاز به محیط‌های کشت غنی‌تر از محیط‌های کمپلکس مانند آگار مغذی دارند. دو نمونه از محیط‌های کشت غنی که در آزمایشگاه‌ها کاربرد بیشتری دارد عبارتند از:

الف) آگار خون دار^۵: که علاوه بر ترکیبات محیط کمپلکس دارای خون به عنوان ماده غنی کننده و فاکتور رشد مناسب هستند

۱ – Culture media

۲ – Nutrient broth

۳ – Nutrient Agar

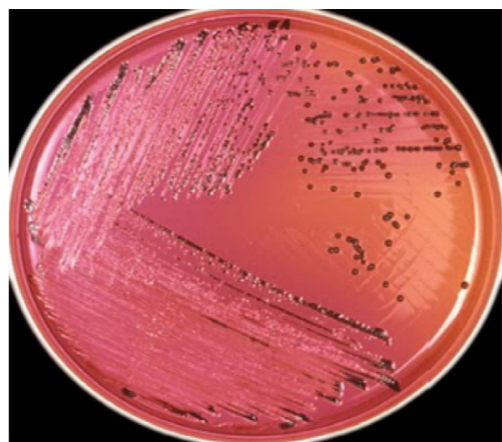
۴ – Enrichment media

۵ – Blood agar

و برای کشت گونه‌های باکتری استرپتوکوکوس پایوزنز^۱ که عامل عفونت گلو هستند به کار می‌رود.

ب) شکلات آگار^۲: علاوه بر ترکیبات محیط کمپلکس دارای گویچه‌های قرمز خونی لیز شده و مواد مغذی اضافی است.

۴-۱-۵- محیط‌های کشت انتخابی^۳: محیط‌های کشتی که از رشد یک گروه از میکروارگانیسم‌ها نسبت به گروه دیگر جلوگیری می‌کنند و تنها باعث رشد میکروب مورد نظر در محیط کشت می‌شوند، محیط کشت انتخابی نامیده می‌شوند. ترکیباتی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، برخی رنگ‌ها مثل کریستال و بوله و نمک‌های صفراوی جزء مواد انتخابی هستند که اگر به محیط کشت کمپلکس افزوده شوند آنها را تنها برای تکثیر پاره‌ای از باکتری‌ها مساعد می‌کنند. معروف‌ترین محیط‌های کشت انتخابی مک کانکی آگار^۴

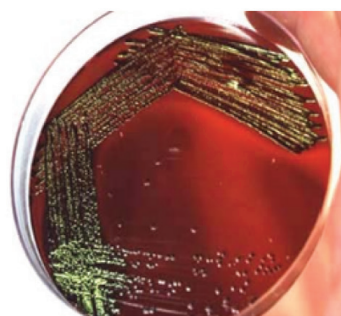


شکل ۱-۵- کلنی باکتری سالمونلا در محیط کشت مک کانکی آگار

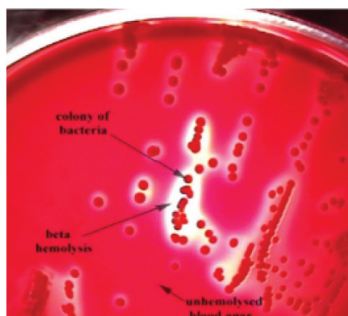
است. این محیط دارای رنگ کریستال و بوله (برای جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم مثبت) و املاح صفراوی (برای جلوگیری از رشد گرم منفی‌های غیر روده‌ای) می‌باشد. در نتیجه در محیط مک کانکی آگار تنها باکتری‌های گرم منفی روده‌ای مانند سالمونلا، شیگلا و اشریشیاکلی می‌توانند رشد کنند. در شکل (۱-۵) کلنی باکتری سالمونلا در محیط کشت انتخابی مک کانکی آگار نشان داده شده است.

۵-۱-۵- محیط‌های کشت افتراقی^۵:

این نوع محیط کشت برای تشخیص کلنی میکروارگانیسم‌های مورد نظر از کلنی سایر باکتری‌ها به کار می‌رود که یا از روی رنگ کلنی مانند کلنی‌های سبز با جلای فلزی و براق باکتری اشریشیاکلی در محیط افتراقی EMB (اوزین متیلن بلو) و یا از روی میزان همولیز در محیط‌های افتراقی خون‌دار استفاده می‌شود. باکتری‌های همولیزکننده خون از باکتری‌های بدون همولیز تشخیص داده می‌شوند (از روی هاله همولیز اطراف کلنی).



(ب)



(الف)

شکل ۲-۵- (الف) کلنی‌های دارای هاله روشن همولیز بر روی محیط کشت Blood agar و

(ب) کلنی سبز براق اشریشیاکلی در محیط EMB

۶-۱-۵- محیط‌های کشت متابولیکی یا بیوشیمیایی: محیط‌های کشتی که بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی و فعالیت متابولیکی باکتری‌ها تهیه می‌شوند و بیشتر برای تعیین جنس و گونه باکتری‌ها به ویژه باکتری‌های گرم منفی به کار برده می‌شوند، محیط کشت متابولیکی یا بیوشیمیایی نام دارند. مکانیسم عمل این محیط‌ها و نحوه بررسی یافته‌های آنها یکی از مهم‌ترین تست‌های آزمایشگاهی برای شناسایی باکتری‌های کشت شده در محیط‌های کشت به ویژه باکتری‌های گرم منفی است و نیاز به آگاهی و دقت

۱ - Streptococcus pyogenes

۲ - Chocolate agar

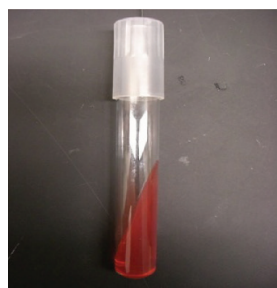
۳ - Selective media

۴ - Mac - Conky agar

۵ - Differential media

زیادی دارد. بنابراین در این بخش به طور کامل در مورد مهم ترین این تست ها و مکانیسم عملشان شرح داده خواهد شد. فرمول کامل محیط های کشت مورد استفاده، در فصل آخر ارائه می شود.

مهم ترین تست های متابولیکی به عنوان تست های ایموکی (IMVIC) معروفند و شامل ۴ محیط بیوشیمیایی مهم با نام های :



شکل ۳-۵ - محیط کشت قرمز رنگ و مورب TSI

الف) TSI agar^۱ : این محیط دارای سه نوع قند گلوکز، لاکتوز و ساکارز به نسبت (۱-۱-۱) همراه با یک ترکیب آهن دار (سولفات فروس) و معرف فنل رد به عنوان شناساگر اسیدی و پپتن می باشد. همانطور که در شکل (۳-۵) نشان داده شده است این محیط قرمز رنگ به صورت کج درون لوله های آزمایش تهیه می شود (به آماده سازی محیط های جامد مراجعه شود). همانطور که در شکل نشان داده شده محیط TSI دارای یک بخش سطحی و یک بخش عمیق است.

روش کشت : هنگام تلقیح محیط ابتدا باید با استفاده از لوپ از کلنی های تک باکتری مورد نظر در محیط کشت جامد برداشت، و لوپ را در عمق محیط فرو کرده، سپس با همان لوپ روی سطح شبیدار محیط نیز به صورت زیگزاگ از بالا تا پایین کشت داده در پوش لوله را بسته و آن را در گرمخانه با دمای 35°C به مدت ۲۴-۴۸ ساعت قرار داد.

نکته ها

✓ تمام مراحل باید در کنار شعله با فاصله 3° سانتی متری انجام شود.

✓ لوپ باید پیش و پس از انجام تست با شعله استریل شود.

✓ هنگام کشت دادن نباید هرگز در پوش لوله را بر روی سطح میز کار قرار داد زیرا باعث انتقال آلودگی به درون لوله تست شده و نتیجه آزمایش دچار اشکال می گردد. بهتر است در پوش لوله را با انگشت کوچک دست راست گرفته و لوله را با دست چپ نگه داشت و همزمان با لویی که در دست راست است کشت داد.

✓ پس از انجام کشت باید سر لوله را یکبار به سرعت از روی شعله عبور داده تا از آلودگی در لوله های تست جلوگیری شود.

✓ هنگام کشت باکتری درون لوله دارای محیط بیوشیمیایی باید از صحبت کردن خودداری شود.

بررسی یافته های/انجام تست TSI : یافته های به دست آمده از کشت باکتری در محیط TSI مربوط به ویژگی های تخمیر قندها توسط باکتری، تولید یا عدم تولید گاز و تولید یا عدم تولید رسوب سیاه رنگ نمک های H_2S است.

- ویژگی های تخمیری : برای تخمیر قندها در محیط TSI

سه حالت وجود دارد که بسته به نوع باکتری می تواند یکی از این سه حالت را نشان دهد.

۱- سطح قرمز رنگ (قلیایی)، عمق محیط قرمز (قلیایی)

K/K (الف)

۲- سطح قرمز (قلیایی)، عمق محیط زرد (اسیدی) K/A (پ)

۳- سطح زرد (اسیدی)، عمق محیط زرد (اسیدی) A/A

(ت)



شکل ۴-۵ - (الف) K/K، (ب) K/K و تولید رسوب سیاه رنگ H_2S

(پ) K/A و (ت) A/A

در شکل (۴-۵) این سه حالت نشان داده شده است.

—**تولید گاز:** به وجود آمدن شکاف، ترک خوردگی، حباب و خالی شدن ته لوله آزمایش در محیط TSI نشانه وجود گازهایی مانند دی اکسید کربن و هیدروژن است (شکل ۴-۵ قسمت ت).

—**تولید H_2S :** تولید رسوب سیاه رنگ دی سولفید هیدروژن به شرایط اسیدی نیاز دارد که به صورت لکه سیاه در محیط دیده می شود (شکل ۴-۵ قسمت ب).

(ب) **محیط SIM^1 :** این محیط کشت دارای اسید آمینه تریپتوفان است و سه ویژگی حرکت، تولید H_2S و تولید اندول توسط باکتری ها را نشان می دهد.

روش کشت: از کلنی تک همان باکتری که برای تست TSI به کار رفته، با سوزن کشت یا آنس برداشت کرده و به طور عمودی در محیط SIM فرو کرده و کشت دهید.

نکته هایی که برای کشت در TSI گفته شد در این جا هم باید مورد توجه قرار گیرد.

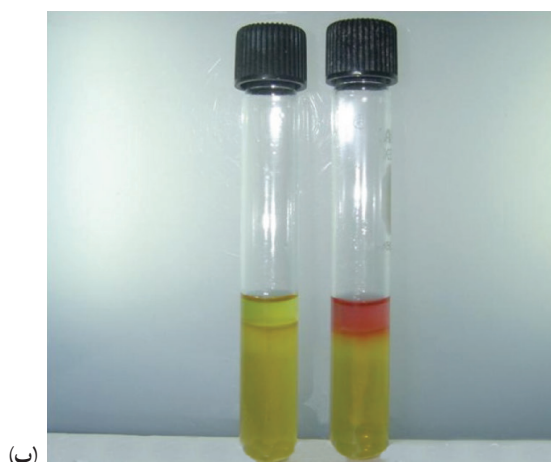
بررسی یافته های کشت باکتری در محیط SIM

—**تولید رسوب نمک های H_2S :** به صورت لکه سیاه رنگ در محیط دیده می شود، همانند شکل (۵-۵ قسمت الف).

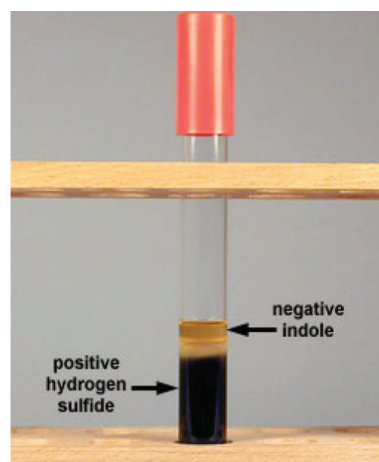
—**حرکت باکتری:** اگر در مسیری که سوزن کشت فرو رفته و اطراف آن در محیط کدورت ایجاد شود نشانه حرکت باکتری است در غیر این صورت باکتری فاقد حرکت است. (شکل ۵-۵ قسمت ب)

—**تولید اندول:** باکتری هایی که از اسید آمینه تریپتوفان استفاده می کنند قادر به تجزیه تریپتوفان و تولید اندول هستند که با افزودن ۵ قطره معرف کواکس و ایجاد حلقه قرمز رنگ در سطح محیط قابل تشخیص است. (شکل ۵-۵ قسمت ب).

(پ) **محیط سیمون سیترات^۲:** در محیط سیمون سیترات که سبز رنگ و کج است، ترکیب سیترات و معرف پروموتیمول بلو وجود دارد و این محیط برای تعیین این که آیا باکتری قادر به استفاده از سیترات به عنوان منبع کربن است یا خیر به کار می رود.



(ب)



(الف)

شکل ۵-۵. (الف) نمونه اندول منفی ولی دارای رسوب سیاه H_2S ، (ب) در سمت راست نمونه اندول مثبت و در سمت چپ نمونه دارای حرکت است.

روش کشت: از کلنی همان باکتری که در آزمون پیشین استفاده شد با لوپ برداشت کرده و در سطح کج محیط به صورت زیگزاگ از بالا تا پایین کشت دهید.

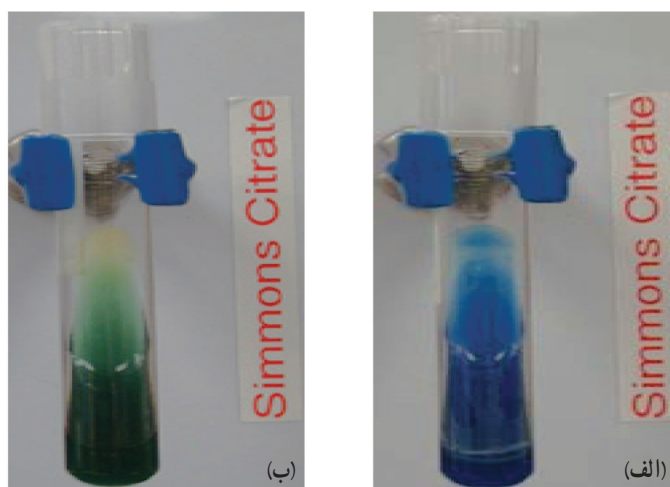
نکته هایی که برای دو محیط پیش گفته شد در اینجا نیز باید مورد توجه قرار گیرد.

۱ – Sulfide Indole Motility medium

۲ – Simon Citrate agar

بررسی یافته‌های کشت باکتری‌ها در محیط

سیمون سیترات : باکتری‌هایی که قادر به استفاده از سیترات باشند رنگ معرف موجود در محیط را تغییر داده و از سبز به آبی تبدیل می‌کنند، (شکل ۵-۶ قسمت الف) باکتری‌هایی که قادر به استفاده از سیترات نیستند رنگ محیط را تغییر نمی‌دهند (شکل ۵-۶ قسمت ب).



شکل ۵-۶ — (الف) نمونه سیترات مثبت و (ب) نمونه سیترات منفی

ث) محیط^۱ MRVP : این محیط کشت ساده و از گلوکز، پپتن و برخی از املاح ساخته می‌شود و برای شناسایی تفاوت بین باکتری‌هایی که از مسیر متابولیسم اسیدی استفاده می‌کنند (متیل رد) از باکتری‌هایی که از مسیر بوتیلن گلیکول آزاد کننده استن یا وژپروسکوئر استفاده می‌کنند به کار می‌رود.

روش کشت : از کلنی تک همان باکتری با لوپ برداشت کرده و در داخل محیط مایع MRVP به شکل سوسپانسیون درآورده می‌شود.

بررسی یافته‌های کشت باکتری در محیط MRVP : برای تعیین مسیر MR و یا مسیر VP، محیط موجود در لوله را بین دو لوله آزمایش تقسیم کرده، یک بخش محیط برای تست MR و بخش دیگر برای تست VP به کار برده می‌شود.



شکل ۵-۷ — (الف) نمونه MR مثبت و (ب) نمونه MR منفی

MR — : به یکی از دو لوله آماده شده بالا ۶

قطره معرف متیل رد اضافه می‌شود. اگر رنگ محیط قرمز رنگ شد یعنی باکتری از مسیر متیل رد استفاده می‌کند، (شکل ۵-۷ قسمت الف) و اگر تغییر نکرد از مسیر دیگر مانند (شکل ۵-۷ قسمت ب).

VP — : به لوله دوم آماده شده ۵ قطره آلفانفتول ۶٪

و KOH اضافه می‌شود پس از ۲۰ دقیقه نتیجه بررسی می‌گردد. اگر در لوله دو فاز تشکیل شود که فاز رویی قرمز رنگ باشد یعنی مسیر باکتری VP است.

نکته : در بیشتر موارد این دو مسیر از هم متفاوت

هستند و باکتری‌ها تنها یکی از این دو مسیر را استفاده می‌کنند بنابراین اگر نتیجه یکی از این دو تست مشخص شود، دیگری عکس آن خواهد بود.

در زمانی که همه آزمون‌های بیوشیمیایی انجام شد یافته‌ها بررسی و با توجه به جدول تست‌های بیوشیمیایی باکتری‌های گرم منفی می‌توان گونه باکتری را مشخص کرد.

۲-۵- آماده سازی و سترون سازی محیط‌های کشت آزمایشگاهی

محیط‌های کشت آزمایشگاهی یا به صورت پودرهای آماده مصرف تجارتي بسته‌بندی شده در قوطی‌ها در اختیار آزمایشگاه‌ها قرار می‌گیرند یا باید در آزمایشگاه، با توجه به ترکیبات محیط کشت آنها را تهیه نمود. در این فصل روش آماده‌سازی محیط‌های کشت آماده شرح داده می‌شود و روش تهیه محیط‌های کشت غیر آماده با توجه به محیط‌های کشتی که در این کتاب مورد نیاز است در فصل آخر شرح داده خواهد شد.

۱-۲-۵- تهیه محیط‌های کشت آماده : همانطور که گفته شد، محیط‌های آماده به صورت پودر تهیه و به شکل بسته‌بندی شده در اختیار آزمایشگاه‌ها قرار می‌گیرد. برای آماده سازی آنها ابتدا باید برچسب روی بسته که دستور کار تهیه محیط کشت مورد نظر روی آن گنجانده شده است، خوانده و مراحل تهیه محیط را به ترتیب زیر انجام داد.

تهیه محیط کشت جامد نوترینت آگار: بر روی برچسب قوطی نوشته شده که ۲۳ گرم در ۱ لیتر، اگر تنها به نصف این مقدار ۵۰۰ سی سی محیط احتیاج باشد مقدار پودر هم نصف می‌شود. برای هر مقدار به سادگی می‌توان از تناسب استفاده کرد :

$$\frac{500 \times 23}{1000}$$

برای وزن کردن پودر، ابتدا باید یک تکه کاغذ تمیز و کوچک یا فویل آلومینیوم را روی ترازو قرار داده و عدد ترازو را با آن صفر کرد. سپس پودر را کم کم روی صفحه ریخته تا عدد ترازو اندازه مورد نظر را نشان دهد.

مقدار پودر وزن شده را باید در حجم مناسب آب مقطر که با استوانه مدرج اندازه‌گیری می‌شود، حل نمود و برای این که از گلوله شدن پودر محیط در آب مقطر جلوگیری شود، باید ابتدا مقدار کمی از پودر را در ظرف مناسب (ارلن با حجم مناسب) ریخت. سپس آب مقطر و بقیه پودر را کم کم به آن اضافه کرد و همزمان ظرف دارای پودر و آب مقطر را تکان داد. در این مرحله باید دقت کرد که محیط کشت با توجه به نامش جزء کدام محیط‌ها است مایع (broth)، جامد (آگار) یا نیمه جامد (Medium).

✓ اگر محیط مایع باشد برای یکنواخت کردن و شفاف شدن محیط نیازی به گرمادهی نیست.

✓ اگر محیط جامد و نیمه جامد باشد باید آن را گرم کرد تا شفاف گردد.

یادآوری: برای گرمادهی محلول دارای محیط و آب مقطر، ابتدا باید درپوش ظرف را برداشت. این عمل موجب می‌شود که اگر هنگام گرمادهی دما به حد جوش برسد در اثر فشار زیاد، محیط داخل ظرف با شدت به خارج پرتاب نشود و خطری برای کارکنان و یا هنجریان ایجاد نکند. به علاوه ارلن نباید به مدت طولانی روی شعله مستقیم قرار گیرد؛ بلکه باید از سه پایه و توری نسوز استفاده کرد و پس از چند دقیقه ارلن را کنار گرفت و به آرامی تکان داد یا مشعل را از زیر آن خارج نمود.

یادآوری: عمل گرمادهی تا زمانی انجام می‌شود که محیط به خوبی و به طور کامل شفاف گردد.

سترون سازی محیط‌های کشت: مهم‌ترین مرحله در آماده سازی محیط‌های کشت سترون سازی آنها است. برای سترون سازی

محیط‌های کشت آزمایشگاهی باید از اتوکلاو با دمای 121°C و با فشار ۱۵ پوند بر اینچ به مدت زمان لازم استفاده نمود. زمان ۱۵ دقیقه از هنگامی است که خارج شدن بخار از اتوکلاو به صورت پیوسته و یا به اصطلاح دم روباهی بوده و سوپاپ خروج هوا و بخار بسته می‌شود.

نکته‌ها

✓ ارلن دارای محیط کشت تهیه شده باید درپوش گذاری شود. (برای این منظور از چوب پنبه‌هایی که به طور محکم با چسب بر روی دهانه ارلن قرار داده می‌شوند استفاده می‌گردد). این عمل باعث می‌شود که طی گرمادهی محیط در اتوکلاو در اثر فشار ایجاد شده محتوی ارلن به بیرون از آن نریزد.

✓ پس از مدت زمان اتوکلاو کردن با رعایت تمام نکته‌های ایمنی، ارلن دارای محیط کشت باید از اتوکلاو خارج شود.

✓ دمای محیط کشت باید تا حدود 45°C کم شود.

✓ سرد شدن محیط کشت باید در حدی باشد که محیط‌های آگار دار و جامد، سفت نشوند، بلکه به صورت مذاب باشند. برای این منظور بهتر است ارلن دارای محیط کشت را درون حمام بخار آب با دمای 42°C قرار داد. (برای آگاهی بیشتر درباره استفاده از حمام آب به فصل اول مراجعه شود)

یادآوری: تا زمان استفاده از محیط کشت نباید درپوش آن را برداشت زیرا ممکن است محیط کشت آلوده شود.

۲-۲-۵- پخش محیط‌های کشت آماده شده درون لوله‌ها و تشتک‌ها: محیط‌های کشت آماده شده بسته به جامد، مایع

و نیمه جامد بودن به صورت زیر در ظرف‌های مربوط پخش می‌گردند.

— محیط جامد (آگار دار) درون تشتک‌ها: این نوع محیط برای کشت باکتری‌ها، جداسازی و روش‌های شمارش میکروب‌ها

به کار می‌رود. اگر محیط‌ها جامد باشند پس از سترون سازی ابتدا باید دمای آنها به 42°C برسد (دمای مذاب) برابر آنچه گفته شد تا زمان پخش محیط درون تشتک‌ها باید به حالت مذاب بماند (برای این منظور بهتر است از حمام بخار آب استفاده شود). مراحل و پخش محیط در تشتک‌ها باید به صورت زیر انجام گیرد:

الف) تشتک‌های خالی شیشه‌ای یا یکبار مصرف پلاستیکی را باید به تعداد مناسب و با توجه به حجم محیط تهیه شده در روی سطح صاف درکنار هم قرار داد به طوری که پشت تشتک روی سطح و در آن به بالا قرار گیرد تا بتوان به راحتی درب آن را برداشت. یادآوری:

۱- پیش از قرار دادن تشتک‌های خالی بر روی سطح، باید ابتدا همه سطح را با پنبه آغشته به الکل سترون سازی کرد.

۲- ارلن دارای محیط کشت مذاب (دمای 42°C) را از حمام بخار آب خارج کرده و پس از برداشتن درپوش حدود ۱۵ تا ۲۵ میلی لیتر از محتوی آن را در مجاورت شعله به درون هر یک از تشتک‌های خالی ریخت.

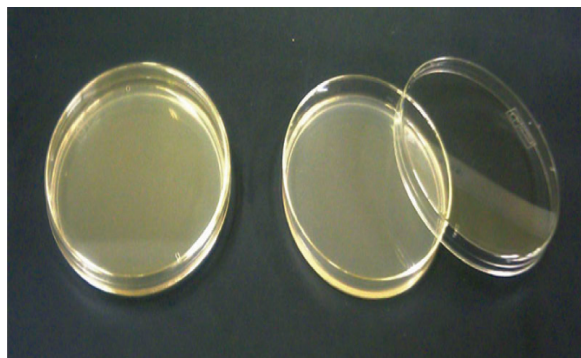
۳- برای ریختن محیط درون تشتک‌ها بهتر است با دست چپ درب تشتک را تنها به اندازه ۴۵-۶۰ درجه برداشته و با دست راست محیط مایع درون ارلن را به داخل تشتک منتقل کرد.

۴- با توجه به اینکه تعیین حجم ۲۵-۱۵ میلی لیتر محیط

تنها با وسایل حجم سنجی امکان پذیر بود، و زمان گیر می‌باشد، بهتر است محیط را به اندازه‌ای درون تشتک افزود که به اندازه نصف سطح آن را در برگیرد و به آرامی همه سطح تشتک با محیط کشت مذاب پوشانده شود (شکل ۸-۵).

۵- گاهی اوقات با افزودن محیط کشت درون تشتک‌ها

در سطح آنها حباب‌های هوا تشکیل می‌شود که در صورت باقی ماندن می‌تواند در رشد میکروب‌ها مشکل ایجاد کنند. برای از بین بردن این حباب‌ها بهتر است با برداشتن در تشتک، سطح محیط



شکل ۸-۵- اندازه محیط ریخته شده درون تشتک

کشت را چند لحظه در برابر شعله قرار داد تا حباب‌ها ترکیده شوند.

ب) پس از تمام شدن کار و بستن درب تشتک‌ها، باید آنها را در دمای آزمایشگاه قرار داد تا محیط سفت شود و بدون این که محیط کشت داخل آنها تکان داده شود، جابه‌جا گردند.

ت) تشتک‌های دارای محیط کشت جامد سفت شده را باید در یخچال قرار داد تا در زمان آزمون از آن استفاده شود.
یادآوری:

۱- محیط‌های کشت را نباید مدت طولانی در یخچال نگهداری کرد زیرا کهنه شده و باکتری‌ها به خوبی در آنها رشد نمی‌کنند. بهتر است همیشه از محیط‌های کشت تازه تهیه شده استفاده شود.

۲- محیط‌های کشت آماده شده و کشت داده نشده را باید در یخچالی نگهداری نمود که نمونه‌های میکروبی و محیط‌های آلوده در آن نگهداری نمی‌شوند.

— **محیط‌های جامد و نیمه جامد (آگار دار) درون لوله‌های آزمایش:** این گونه محیط کشت بیشتر جزء محیط‌های متابولیکی یا بیوشیمیایی هستند (به فصل محیط‌های کشت آزمایشگاهی مراجعه گردد)، مانند محیط TSI و SIM که باید در لوله آزمایش تهیه شوند و با توجه به مکانیسم عمل محیط باید به صورت مورب در لوله تهیه شوند مانند TSI و سیمون سیرتات. برای آماده کردن این محیط‌ها ارلن دارای محیط جامد مذاب را از حمام بخار آب خارج کرده و محیط داخل آن را درون لوله‌های آزمایش با اندازه‌های مناسب و یکسان پخش کرده و پس از بستن درپوش در یخچال نگهداری کرد.

یادآوری:

۱- بهتر است لوله‌ها در جالوله‌ای قرار داده شوند.

۲- تمام لوله‌های آزمایش باید سترون شده و درپوش دار باشند.

۳- ریختن محیط کشت درون لوله‌ها را باید در کنار شعله انجام داد و از قرار دادن در لوله روی میز خودداری کرد زیرا باعث انتقال آلودگی به داخل محیط می‌شود.

۴- اگر محیط باید در لوله به صورت شیب‌دار باشد باید لوله دارای محیط مذاب را به صورت کج روی سطح قرار داد تا به همان حالت سفت گردد.

— **محیط‌های کشت مایع:** این نوع محیط باید در لوله‌های آزمایش تهیه شود

و در بیشتر موارد برای رشد باکتری‌ها و تست‌های بیوشیمیایی مانند MRVP به کار برده می‌شود. محیط‌های مایع را بهتر است پیش از سترون‌سازی ابتدا درون لوله‌های آزمایش به اندازه مناسب ریخته و پس از قرار دادن درپوش، آنها را در اتوکلاو سترون کرده و پس از سترون‌سازی از اتوکلاو خارج و خنک نموده و در یخچال نگهداری کرد.



شکل ۹-۵ - نمونه‌ای از یک لوله آزمایش دارای محیط کشت مایع