فصل سوم

رنگ‌آمیزی باکتری‌ها

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

۱ـ۳ـ رنگ‌ها

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

$$\text{متیلن بلو}^{(+)} + \text{کلرور}^{(-)} \rightarrow \text{کلرور متیلن بلو}$$

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

ـ **رنگ‌های بازی**[۱] : دارای بارالکتریکی 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.

ـ **رنگ‌های اسیدی**[۲] : دارای بار منفی (آنیونی)هستند بنابراین جذب ترکیبات سلولی با بار منفی نمی‌شوند و تنها برای رنگ‌آمیزی زمینه دید به کار می‌روند مانند رنگ نیکروزین.

ـ **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.

۲ـ۳ـ انواع رنگ آمیزی

۱ـ۲ـ۳ـ رنگ آمیزی ساده : در این نوع رنگ آمیزی تنها از یک نوع رنگ استفاده می‌شود. رنگ بازی برای رنگ‌آمیزی 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 رنگ‌آمیزی ساده با متیلن بلو.

۲ـ۲ـ۳ـ 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.

۱ـ basic stains

۲ـ acidic stains

۳ــ۲ــ۳ــ رنگ آمیزی اختصاصی : در این رنگ‌آمیزی نیز از دو یا چند رنگ استفاده می‌شود و برای تشخیص اجزای خاص سلول باکتری‌ها مانند اسپور، تاژک وکپسول به کار می‌رود.

مهم‌ترین کار پیش از رنگ‌آمیزی نمونه‌ها تهیه گسترش میکروبی مناسب از نمونه مورد نظر است. بسته به نوع رنگ‌آمیزی 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.

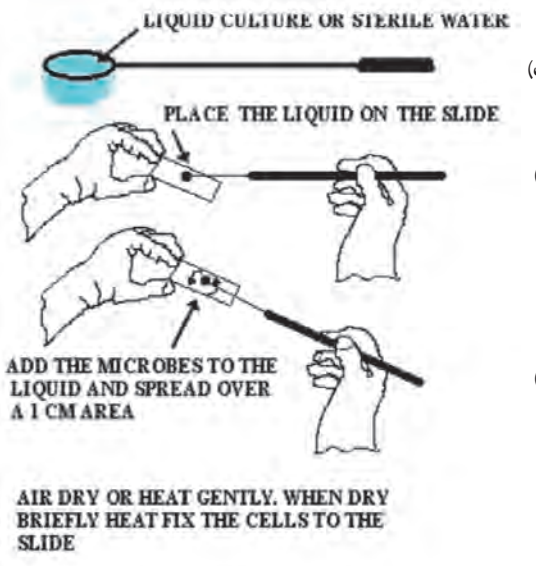
۳ــ۳ ــ تهیه گستره خشک از نمونه میکروبی

۱ــ۳ــ۳ــ یک قطره آب مقطر استریل در مرکز لام آزمایشگاهی قرار دهید.

۲ــ۳ــ۳ــ 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 ۱ــ۳).

۳ــ۳ــ۳ــ گستره تهیه شده را خشک کنید. برای خشک‌کردن گستره می‌توان آن را در دمای آزمایشگاه قرار داد و یا با استفاده از خشک‌کن‌ها، خشک کرد.

۴ــ۳ــ۳ــ 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.



شکل ۱ــ۳ــ 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 می شوند. پ : گستره خشک شده و سپس روی لام ثابت می‌گردد.)

نکته‌ها

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

✓ عمل تثبیت باعث می‌شود باکتری‌ها به لام چسبیده و در مراحل بعدی رنگ‌آمیزی 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.

۴ــ۳ــ تهیه گستره مرطوب از نمونه میکروبی

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

۵ــ۳ــ 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 ائورئوس و باسیلوس سرئوس
- میکروسکوپ نوری معمولی

روش کار

ــ ابتدا از هر کدام از نمونه باکتری‌ها به روشی که در پیش گفته شد بر روی لام میکروسکوپی گستره خشک تهیه کنید.

ــ گستره‌ها را با خشک کن خشک کنید.

ــ گستره‌های خشک شده را ۳ بار از روی شعله عبور دهید تا بر روی لام ثابت شود.

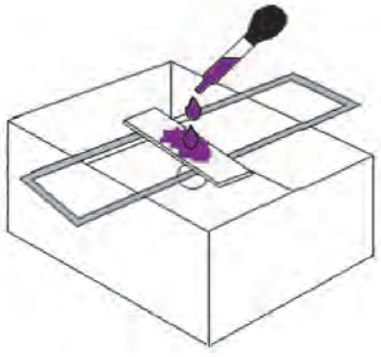
ــ لام گستره را روی تشتک رنگ‌آمیزی قرار داده و مانند شکل(۲ــ۳) روی گستره را با رنگ متیلن بلو بپوشانید.

ــ پس از ۱ دقیقه لام را شستشو دهید.

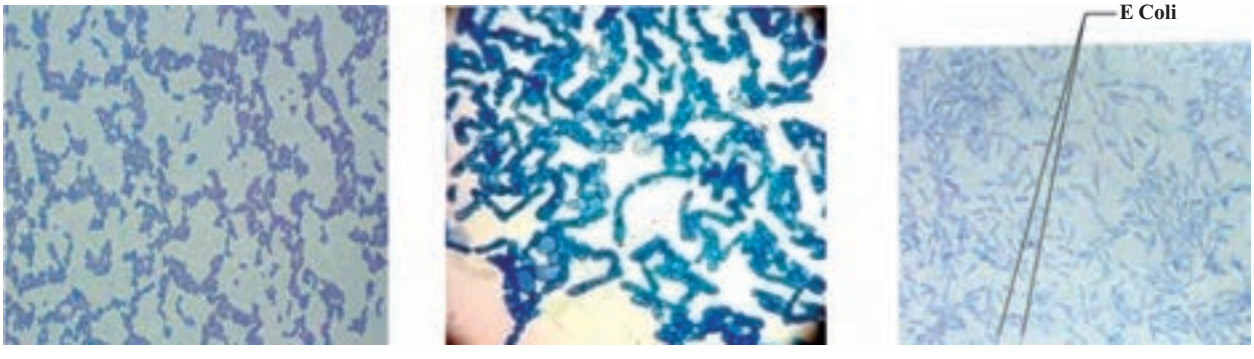
یادآوری : هنگام شستشوی لام با آب بهتر است از آب‌فشان (پیست) استفاده شود. با گیره چوبی لام را در یک دست به طرف پایین نگه داشته و با دست دیگر آب را با پیست به آرامی روی لام بریزید. با این کار از پاشیده‌شدن رنگ بر روی لباس و دست‌ها جلوگیری می‌شود.

ــ لام‌های شسته شده را با خشک کن خشک کنید.

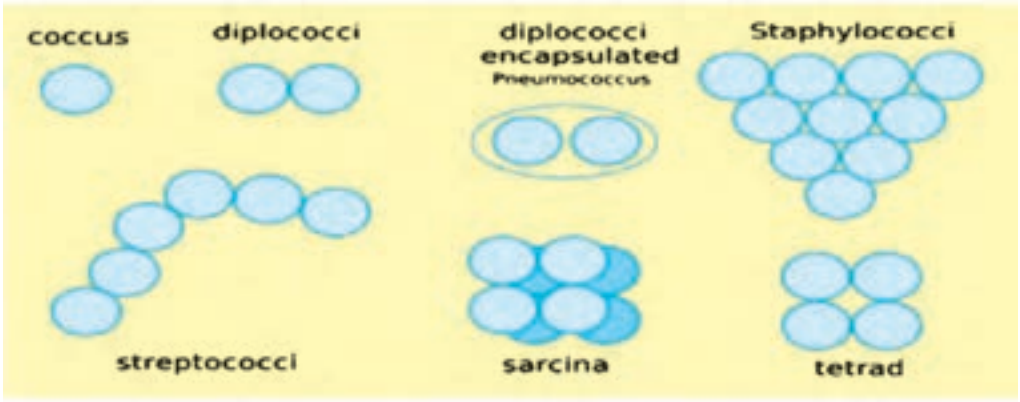
ــ نمونه زیر میکروسکوپ را اول با عدسی ۱۰x و ۴۰x و در آخر با عدسی ۱۰۰x و روغن ایمرسیون مشاهده کنید (برای آگاهی بیشتر به فصل دوم، طرز کار با میکروسکوپ نوری مراجعه کنید).



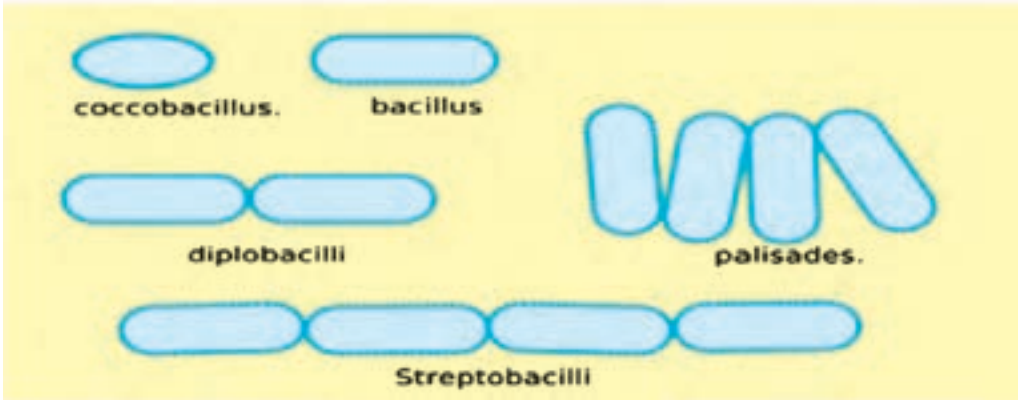
شکل۲ــ۳ــ چگونگی ریختن رنگ بر روی گستره تهیه شده



شکل۳ــ۳ــ از راست به چپ باکتری اشریشیاکلی به شکل کوکوباسیل، باکتری باسیلوس سرئوس به شکل باسیل زنجیره‌ای (استرپتوباسیل) و باکتری استافیلوکوکوس ائورئوس به شکل کوکسی خوشه‌ای



(الف)



(ب)

شکل ۴ــ۳ ــ (از چپ به راست)

(الف) :از چپ به راست Coccus (گرد تک)،diplococcus (گرد دو تایی)، diplococcus encapsulated (گرد دوتایی کپسول‌دار)، streptococci (گرد زنجیره‌ای)، sarcina (گرد هشت تایی)، tetrad(گرد چهار تایی)

(ب) :Coccobacillus(کوکوباسیل)، bacilus(میله‌ای)، diplobacilli(میله‌ای دوتایی)، 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 (۴ــ۳) نشان داده شده است.

۶ــ۳ــ 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

- تشتک رنگ آمیزی
- چراغ گازی
- رنگ های کریستال ویوله و سافرانین
- محلول لوگول
- محلول الکل استن
- تشتک‌های دارای محیط‌های کشت میکروبی از سه گونه باکتری استافیلوکوکوس ائورئوس،اشریشیاکلی و باسیلوس سرئوس
- میکروسکوپ نوری معمولی

روش کار

ــ ابتدا از کلنی باکتری‌های مورد نظر برداشت کرده و به روشی که در پیش گفته شد گستره خشک بر روی لام تهیه کنید.

ــ گستره را با خشک کن خشک کرده و با ۳ بار عبور دادن از روی شعله بر روی لام ثابت کنید.

ــ سطح گستره را با رنگ کریستال ویوله بپوشانید و ۱ دقیقه صبر کنید تا رنگ جذب سلول شود.

ــ پس از ۱ دقیقه لام را بشویید.

ــ سطح گستره را به مدت ۱ دقیقه با لوگول بپوشانید.

یادآوری : نقش لوگول، تثبیت رنگ کریستال ویوله در دیواره سلول باکتری‌ها است (نقش دندانه دارد).

ــ پس از ۱ دقیقه لام را با آب شستشو دهید.

ــ سپس با الکل استن به مدت ۳۰ ثانیه رنگ بری کنید.

یادآوری : الکل استن نقش رنگ بری برای رنگ کریستال ویوله دارد. اختلاف باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در همین مرحله است. (به قسمت بیشتر بدانیم توجه کنید.)

نکته‌ها

✓ هنگام استفاده از الکل استن بهتر است لام را به صورت کج نگه دارید و الکل استن را به آرامی‌به 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 ۱۰۰x نمونه را مشاهده نمایید.

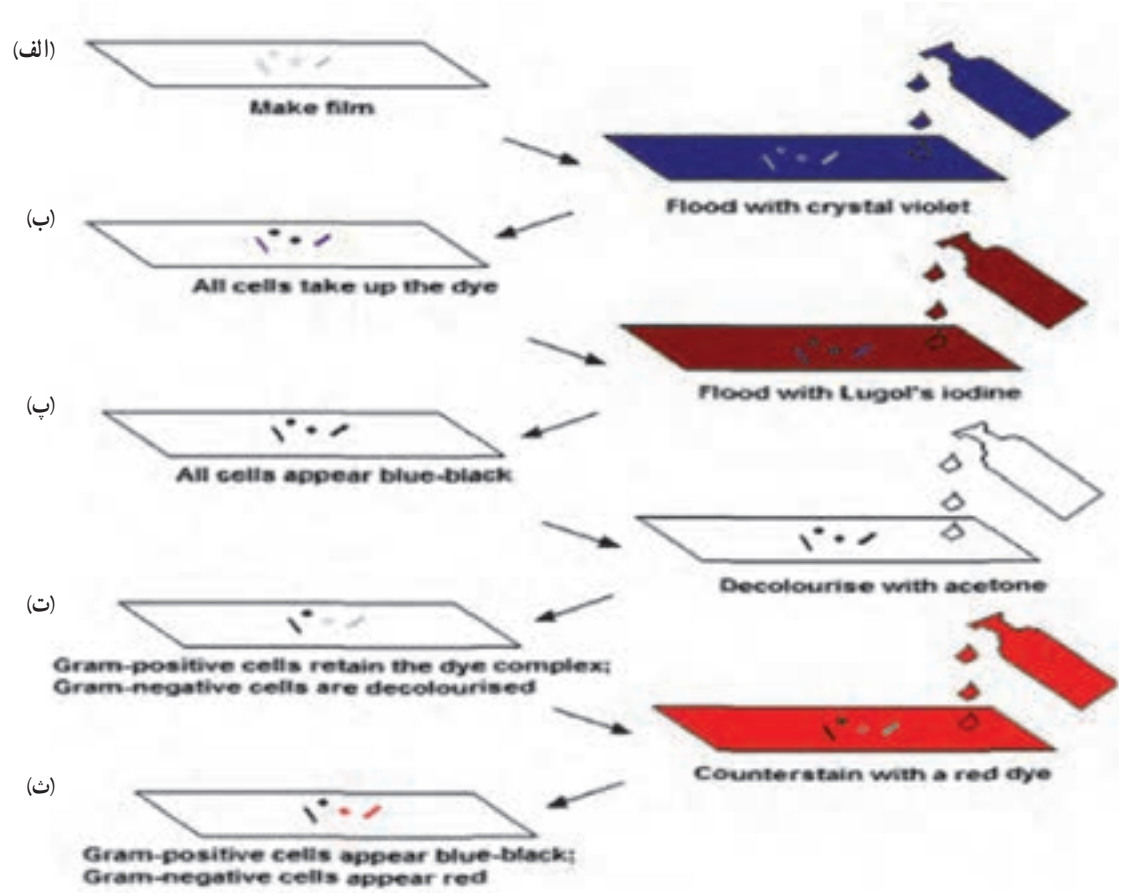
مراحل رنگ آمیزی گرم در شکل (۵ــ۳) نشان داده شده است.

نکته‌ها

✓ در تمام مراحل هنگام استفاده از رنگ‌ها و محلول‌ها، لام باید روی تشتک رنگ‌آمیزی قرار داده شود.

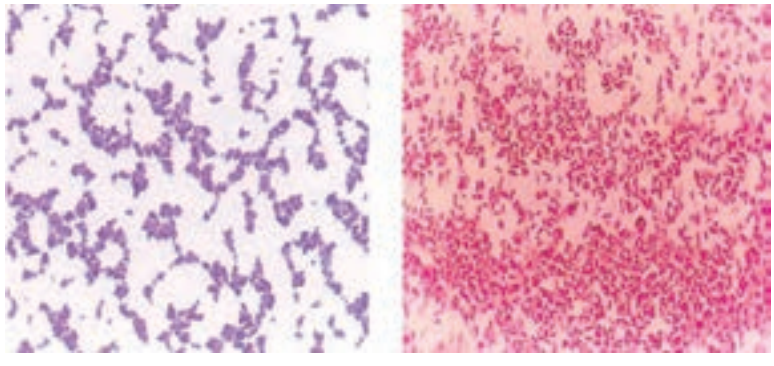
✓ هنگام شستشوی لام، آن را با گیره چوبی نگه دارید تا دست‌ها رنگی نشوند.

✓ لام را پایین نگه دارید و آب را با پیست به آرامی روی لام بریزید تا رنگ به لباس و دست و صورت نپاشد.



شکل۵ــ۳ــ (الف) تهیه گستره میکروبی (ب)گستره با رنگ کریستال ویوله به مدت ۱ دقیقه پوشانده می‌شود. در این مرحله همه باکتری‌ها رنگ کریستال ویوله را جذب می‌کنند. (پ)گستره با محلول لوگل پوشانده می‌شود. (ت)گستره با الکل استن رنگ بری می‌شود. در این مرحله باکتری‌های گرم مثبت رنگ را نگه می‌دارند ولی در باکتری‌های گرم منفی رنگ پاک می‌شود. (ث) گستره با رنگ سافرانین رنگ می‌شود. در این مرحله باکتری‌های گرم مثبت همان رنگ اول کریستال ویوله که بنفش است را حفظ می‌کنند ولی باکتری‌های گرم منفی که در مرحله اول رنگشان پاک شده رنگ قرمز سافرانین را جذب می‌کنند.

یافته‌ها : پس از رنگ آمیزی گرم، باکتری‌های گرم منفی به رنگ قرمز و گرم مثبت‌ها به رنگ بنفش مشاهده می‌شوند.



(الف) **(ب)**

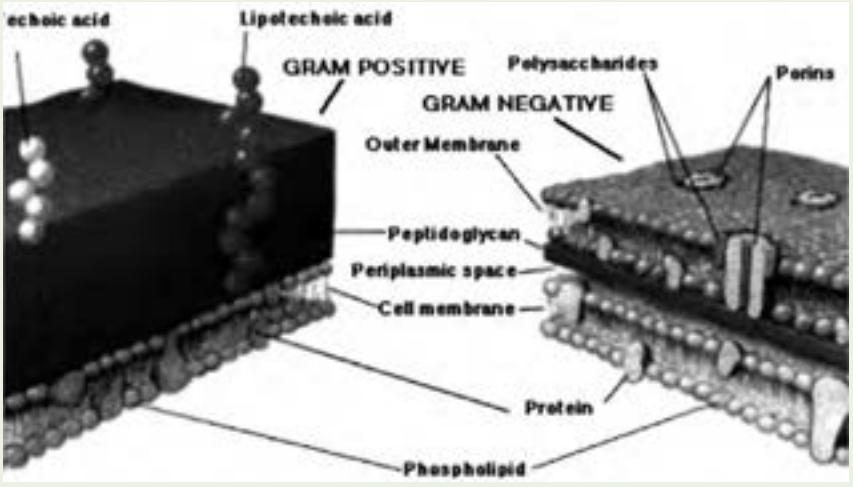
شکل۶ــ۳ــ (الف) باکتری اشریشیا کلی‌کوکوباسیل و گرم منفی (ب) باکتری استانیلوکوکوس اورئوس کوکسی خوشه‌ای و گرم مثبت

بیشتر بدانیم

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(۷ــ۳) تفاوت ساختمان دیواره باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داده شده است.

(ب)



(الف)

شکل۷ــ۳ــ (الف)ساختمان دیواره سلولی باکتری گرم منفی که شامل(cell membrane) غشای داخلی و غشای خارجی، (periplasmic space) فضای پری پلاسمیک، (peptidoglycan) پپتیدوگلیکان و لیپوپلی ساکارید است.(ب)ساختمان دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت که شامل پپتیدوگلیکان ضخیم و (lipotechoic acid) لیپوتایکوئیک اسید است.

۷ــ۳ــ 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 وکلستریدیوم، اسپوردار هستند.

مواد و وسایل مورد نیاز

- لام
- ارلن کوچک
- چراغ گازی
- رنگ مالاشیت گرین
- رنگ سافرانین
- محیط کشت باسیلوس سرئوس

روش کار

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

ــ از کلنی باکتری مورد نظر برداشت کرده و مانند آنچه در پیش گفته شد گستره تهیه و خشک و ثابت کنید.

ــ زمانی که آب داخل ارلن به جوش آمد لام را روی دهانه ارلن در حال جوش قرار دهید (مانند شکل۸ــ۳).

نکته‌ها

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

✓ هنگامی‌که 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 هنگامی‌که 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 دقیقهٔ 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.

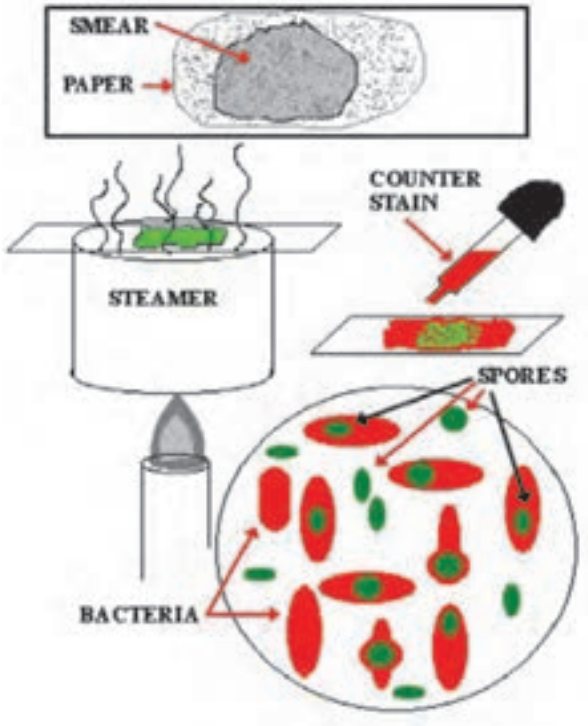
پ) هنگام ریختن رنگ روی گستره دقت شود که رنگ روی میز کار و لوازم ریخته نشود.

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

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

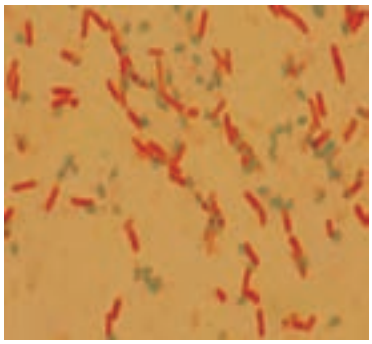
ــ لام را شسته و خشک کنید.

ــ لام را با میکروسکوپ نوری و عدسی ۱۰۰x مشاهده کنید.



شکل۸ ــ۳ــ 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 سلول های 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.

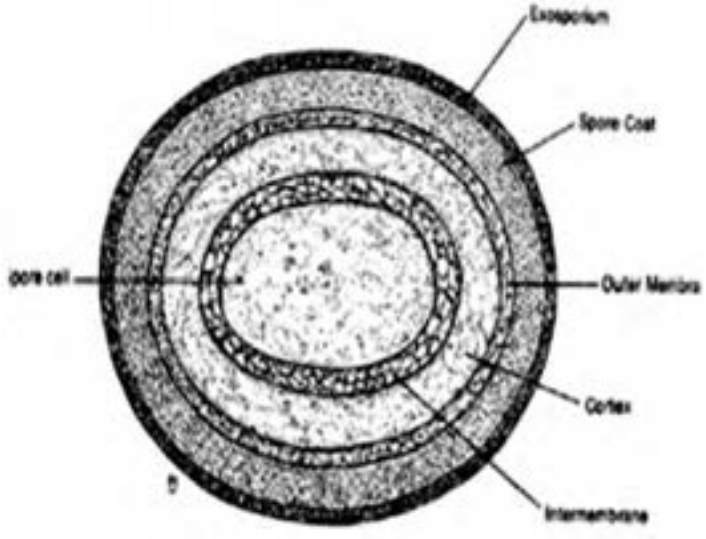


شکل ۹ــ۳ــ باکتری باسیلوس سرئوس(اسپور باکتری سبز و سلول رویشی قرمز)

بیشتر بدانیم

اسپور(اندوسپور) شکل مقاوم باکتری ها است که در دو جنس مهم باسیلوس و کلستریدیوم 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[1] می‌گویند. اگر شرایط برای باکتری دوباره مساعد شود اسپور تبدیل به سلول رویشی می‌گردد که به‌این عمل جوانه زدن گفته می‌شود.

در شکل (۱۰ــ۳) ساختمان اسپور باکتری‌ها و لایه‌های مختلف آن نشان داده شده است.



شکل ۱۰ــ۳ــ 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)

۸ــ۳ــ رنگ آمیزی کپسول

در رنگ آمیزی اختصاصی برای مشاهده کپسول باکتری ها به‌کار 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

۱ــ Sporalation

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 **رنگ‌آمیزی منفی** می‌نامند.

در این رنگ آمیزی تعدادی سلول از کلنی باکتری مورد نظر برداشت شده و در رنگ نکروزین یا مرکب چین روی لام مخلوط می‌شود و سپس با لام دیگری که مانند شکل(۱۱ـ۳) 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 رنگ‌آمیزی 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 ۲عدد
- لوپ (فیلدوپلاتین)
- مرکب چینی
- رنگ متیلن بلو
- میکروسکوپ نوری معمولی
- محیط کشت باکتری کپسول دار مانند استرپتوکوکوس پنومونیا

روش کار

ـ روی یک لام تمیز مقداری رنگ مرکب چین بریزید و با لوپ (نوک آنس) مقدار کمی‌از کشت باکتری به آن اضافه و مخلوط کنید تا سوسپانسیون به آرامی و به طور یکنواخت پخش شود.

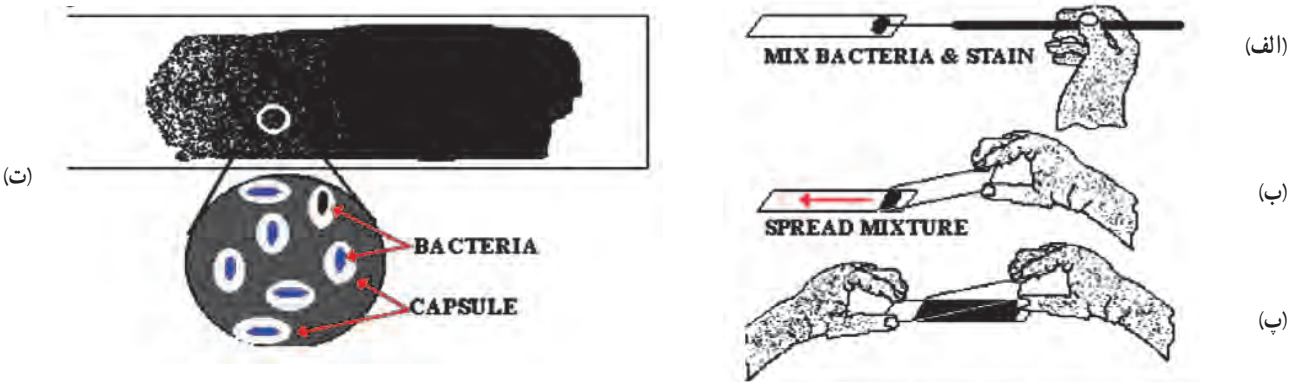
ـ مانند روش رنگ آمیزی منفی گسترش تهیه شده را در هوا خشک کنید.

یادآوری : هیچ‌گاه نباید کاغذ خشک کن را روی لام کشید.

ـ سطح گستره را با متیلن بلو به مدت ۳ دقیقه بپوشانید. رنگ اضافی را خالی کرده با آب مقطر شستشو دهید.

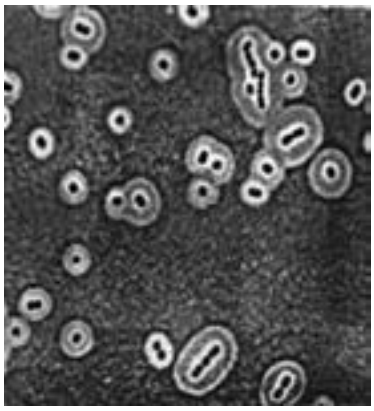
ـ لام را خشک کرده و با میکروسکوپ نوری و عدسی ۱۰۰x نمونه را مشاهده نمایید.

نکته : هنگام مخلوط کردن کشت با رنگ، آن را به آرامی‌هم بزنید تا آرایش باکتری‌ها بهم نخورد.



شکل۱۱ـ۳ـ 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 رنگ‌آمیزی باکتری‌های کپسول‌دار به روش رنگ‌آمیزی منفی، باکتری به رنگ آبی و کپسول به صورت روشن و بی رنگ در یک زمینه دید تیره مشاهده می‌شود.



شکل۱۲ــ۳ــ کپسول به صورت یک هاله روشن در اطراف باکتری در یک زمینه تیره مشاهده می‌شود.

بیشتر بدانیم

برخی از باکتری‌ها ماده لزجی از خود ترشح می‌کنند که خارج از سلول و پیرامون آن جمع می‌شود و دیواره سلولی را می‌پوشاند. این لایه کپسول نامیده می‌شود که ضخامت و چسبندگی آن در گونه‌ها یکسان نیست. اندازه کپسول به محیط کشت میکروبی بستگی دارد و همچنین باکتری‌های بیماری‌زا، در بین باکتری‌های تولیدکننده کپسول، کپسول‌های بزرگتری دارند. جنس این کپسول از پلی‌ساکارید است که در آب محلول و غیر یونی است.

کاربرد کپسول در باکتری‌ها : کپسول به عنوان یک سد اسمزی بین باکتری و محیط اطراف آن عمل می‌کند و در واقع نقش حفاظتی دارد. کپسول مانع از عمل بیگانه خواری گلبول‌های سفید می‌شود همچنین بعنوان مخزن ذخیره مواد غذایی یا دفع مواد زائد هم می‌تواند عمل کند.

در تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا، وجود کپسول شدت بیماری‌زایی و عفونت‌زایی را افزایش می‌دهد و ممکن است حتی این بیماری‌زایی به وجود کپسول بستگی داشته باشد. برای نمونه در استرپتوکوکوس پنومونیا اگر توانایی تولید کپسول در باکتری از بین برود این باکتری غیر بیماری‌زا می‌شود.

فصل چهارم

آلودگی‌زدایی و سترون‌سازی

واژه‌ها

استریلیزاسیون[1] : فرایند جداسازی و از بین بردن یا نابودی همه میکروارگانیسم‌ها و ویروس‌ها به شکل رویشی و اسپور، سترون سازی یا استریلیزاسیون نامیده می‌شود. نابودی میکروارگانیسم‌ها به این معنا است که نتوانند تکثیر کنند. واژه استریل، یعنی بدون میکروب.

ضدعفونی کردن [2] : 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 ضدمیکروب است که برای ضدعفونی کردن سطوح بی‌جان کاربرد دارند.

آنتی‌سپتیک[3] : به مواد سترون کننده پوست به ویژه هنگام اعمال جراحی گفته می‌شود.

گندزدایی[4] : منظور از گندزدایی یا بهسازی، کاهش بار آلودگی میکروبی متناسب با استانداردهای ایمنی و بهداشتی است.

آلودگی زدایی[5] : 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

۱ــ۴ــ روش‌های گرمایی

۱ــ۱ــ۴ــ 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 سترون سازی، آون[6] است که با دمای

---

۱ ــ Sterilization

۲ ــ Disinfection

۳ ــ Antiseptic

۴ ــ Sanitization

۵ ــ Decontamination

۶ ــ Oven

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

۲ــ۱ــ۴ــ 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 ۱۰۰ °C و در بیشتر موارد ۱۲۰ °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).

۳ــ۱ــ۴ــ پاستوریزاسیون[1] : 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 می‌رود. 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.

۴ــ۱ــ۴ــ تیندالیزاسیون[2] : در این روش از گرمادهی متناوب استفاده می‌کنند. مواد مورد نظر ابتدا تا دمای ۱۰۰ °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 ۱۰۰ °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.

۲ــ۴ــ مواد شیمیایی ضدمیکروب یا سترون‌کننده‌ها

۱ــ۲ــ۴ــ فنول : یکی از قدیمی‌ترین سترون کننده‌ها است ولی امروزه به دلیل ایجاد حساسیت بر روی پوست افراد استفاده از آن محدود شده است. ترکیبات فنولی غشای سیتوپلاسمی‌باکتری‌ها را تخریب می‌کند و اغلب باکتری‌های رویشی را از بین می‌برد. در غلظت‌های بالا می‌تواند اثر کشندگی بر روی باکتری عامل سل *داشته باشد*.

۲ــ۲ــ۴ــ 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 سمی‌نیست. الکل متیلیک خیلی سمی‌است و موجب آسیب به چشم می‌گردد و به عنوان میکروب‌کش به کار نمی‌رود. الکل‌ها منعقدکننده پروتئین‌ها و حلال چربی‌ها می‌باشند. الکل‌های خیلی غلیظ ٪۱۰۰ــ۹۵ باعث جذب آب بیشتر از سلول باکتری‌ها شده و موجب می‌شوند که الکل نتواند به درون سلول باکتری نفوذ کند و عمل دهیدراتاسیون[3] الکل باعث توقف رشد باکتری‌ها می‌گردد.

۳ــ۲ــ۴ــ الکل با غلظت ۹۰ ــ 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 ضدمیکروبی 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 آنتی سپتیک برای از بین بردن جرم‌های پوستی و

---

۱ ــ Pasturization

۲ ــ Tyndalization

۳ ــ Dehydration

به‌عنوان سترون‌کننده برای سالم سازی پوست، وسایل و سطوح به کار می‌روند. غیرسمی و ارزان بوده ولی به سرعت بخار می‌شود و زمان مؤثر تماس آنها و اثرشان را کاهش می‌دهد.

۴ــ۲ــ۴ــ آلدییدها : میکروارگانیسم‌ها و ویروس‌ها را با غیر فعال کردن پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلییک آنها از بین می‌برند. ترکیباتی مانند گلوتارآلدیید و فرمالدیید از این گروه هستند. باید توجه کرد که گلوتارآلدیید سمی بوده و مواد سالم سازی شده با آن باید پیش از استفاده با آب مقطر شسته شوند. فرمالدیید ترکیبی است که به شکل محلول (Formaldehyde (37٪)+10٪ Methanol) آبکی و یا جامد وجود دارد. فرمالدیید به صورت گاز یا محلول آبکی به نام فرمالین استفاده می‌شود.

یادآوری :

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

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

پ) در صورت تماس پوست با فرمالدیید 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.

۵ــ۲ــ۴ــ اکسیدکننده‌ها : این مواد با اکسید کردن آنزیم‌های میکروب‌ها آنها را می‌کشند زیرا از سوخت وساز آنها جلوگیری می‌کنند. مهم‌ترین اکسید کننده‌ها عبارتند از :

۶ــ۲ــ۴ــ ازن (O_3) که فرم غیر مقاوم اکسیژن و یک اکسید کننده قوی می‌باشد. امروزه در بسیاری از کشورها برای ضدعفونی کردن آب آشامیدنی، سالم سازی هوا و پساب‌ها از اوزون استفاده می‌شود.

۷ــ۲ــ۴ــ آب اکسیژنه (H_2O_2) یا پراکسید هیدروژن که اکسید کننده‌ای قوی و استریل کننده‌ای مناسب می‌باشد که اثرات سمی ندارد و برای استریل کردن ظرف‌های فلزی و پلاستیکی به‌کار می‌رود.

۸ــ۲ــ۴ــ هالوژن‌ها : عناصر غیر فلزی هستند و در برابر سلول‌های رویشی، قارچ‌ها و ویروس‌ها مؤثرند در حالی که اسپور باکتری‌ها را در غلظت‌های عادی مصرف از بین نمی‌برند. مانند محلول ید و کلر که بیشتر برای سترون کردن آب به کار می‌روند. البته باید توجه کرد به کار بردن کلر برای دستگاه تنفسی و پوست بدن سمی است.

۹ــ۲ــ۴ــ سورفکتانت‌ها (فعال‌کننده‌های سطحی)[1] : این مواد با اثر بر روی غشای سلول باکتری‌ها موجب لغزندگی و جداشدن آنها از سطوح می‌شوند مانند صابون‌های خانگی و انواع شوینده‌ها.

۱۰ــ۲ــ۴ــ گازها : مانند اکسیداتیلن یا اکسید پروپیلن برای استریل کردن وسایلی که با گرما، مواد شیمیایی یا اشعه به راحتی استریل نمی‌شوند مانند بالشتک‌ها، تشتک‌ها، غذاهای خشک و ظرف‌های پلاستیکی و مصارف عمومی بیمارستان‌ها کاربرد دارد. همه این‌ها در یک فضای بسته قرار داده شده و با گاز اکسید اتیلن سالم سازی شوند.

۳ــ۴ــ تابش اشعه یا پرتودهی

تابش اشعه اثرات زیادی بر سلول‌ها می‌گذارد که به طول موج، شدت و زمان در معرض بودن آن بستگی دارد. پرتوهایی که برای از بین بردن میکروب‌ها به کار می‌روند دو نوع هستند :

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

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

---

۱ ــ Surfactant (Surface active agents)

اشعه گاما که از برخی مواد رادیواکتیو مانند کبالت ساطع می‌شود قدرت نفوذ بالایی دارد ولی برای استریل کردن توده‌های 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 می‌شود. طول موج پرتوی فرابنفشی که بیشتر برای کشتن میکروارگانیسم‌ها مؤثر بوده، حدود ۲۶۰ نانومتر است. برای از بین بردن میکروب‌ها از پرتوهای با طول موج کوتاه و قدرت نفوذ زیاد استفاده می‌شود. از میان انواع اشعه، اشعه فرا بنفش(UV) با طول موج ۳۵۰ـ۲۰۰ نانومتر قدرت میکروب کشی مناسب دارد. بزرگترین عیب پرتوی فرابنفش قدرت نفوذ پایین آن است بنابراین برای اینکه این اشعه بتواند میکروارگانیسم‌ها را از بین ببرد، می‌بایست آنها را در معرض مستقیم این اشعه قرار دارد. مشکل دیگر این اشعه این است که می‌تواند به چشم انسان آسیب برساند.

یادآوری :

الف) در اتاق‌های انجام آزمون‌های میکروبی بهتر است لامپ‌های 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.

۴ـ۴ـ نحوه کاربرد مواد و روش‌های سترون کننده

ـ برای سترون‌سازی تجهیزات و وسایل مقاوم به گرمای خشک مانند وسایل فلزی (جای پی‌پت‌ها و جای لوله‌های آزمایش) و شیشه‌ای (ارلن،بشر، استوانه‌های مدرج و پی‌پت‌ها) از آون با دمای ۱۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت استفاده می‌شود.

ـ پیش از دور انداختن وسایل یکبار مصرف مانند تشتک‌های یک بار مصرف لازم است آنها را سالم سازی نمود.

ـ مواد و وسایل شیشه‌ای را باید پیش از استفاده با گرمای مرطوب (اتوکلاو) و یا گرمای خشک (آون) سترون کرد.

ـ برای آلودگی‌زدایی و دفع مواد بهتر است آنها را درون کیسه‌های پلاستیکی مقاوم به گرما قرار داده و سپس اتوکلاو کرد.

ـ پیش از شستشوی وسایل شیشه‌ای آلوده با میکروب‌ها، باید آنها را اتوکلاو کرد.

ـ در طی آزمون، وسایل کوچکی مانند پی‌پت‌ها،میله‌های شیشه‌ای یا همزن، میله شیشه‌ای سرکج، پنس و... را باید در محلول سترون کننده (الکل اتانل ۷۰٪) یا محلول فنل قرار داد.

ـ برای سترون سازی پی‌پت‌های تمیز شده باید آنها را درون جا پی‌پتی قرار داده و در آون با دمای $170^{\circ}C$ به مدت دو ساعت سترون نمود.

ـ پس از استفاده از پی‌پت‌ها به ویژه هنگام کار با مایعات آلوده باید از طرف نوک، آنها را در یک ظرف استوانه‌ای بزرگ دارای محلول سترون کننده قرار داد تا سالم‌سازی شود، سپس آنها را شسته و درون آون سترون کرد.

ـ لوله‌های آزمایش را باید پیش و پس از آزمون‌های میکروبی در آون با دمای $170^{\circ}C$ سترون کرد.

ـ هنگام کار با میله‌های شیشه‌ای 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 میله‌ها سترون می‌شوند.

یادآوری : اتوکلاو بهترین وسیله برای سترون سازی و آلودگی‌زدایی است.

فصل پنجم

آماده‌سازی محیط‌های کشت میکروبی

محیط‌های کشت[1]

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.

۱ــ۵ــ انواع محیط‌های کشت آزمایشگاهی

۱ــ۱ــ۵ــ محیط کشت ساده : ساده‌ترین نوع محیط‌های کشت آزمایشگاهی هستند که دارای ترکیبات ساده مغذی مانند کربوهیدرات، مواد معدنی، ویتامین‌ها، پروتئین و آب می‌باشند.

۲ــ۱ــ۵ــ محیط‌های پیچیده یا کمپلکس : معمول‌ترین محیط های 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[2] یا آبگوشت مغذی نام دارد که دارای ۵ گرم پپتون، ۱۰گرم عصاره گوشت، ۵ گرم کلرور سدیم و ۱لیترآب مقطر است. چنانچه آگار به محیط کشت افزوده شود، محیط کشت جامد می‌گردد. مانند نوترینت آگار[3] 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.

۳ــ۱ــ۵ــ محیط‌های کشت اختصای یا غنی کننده[4] : 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[5] *:* که علاوه بر ترکیبات محیط کمپلکس دارای خون به عنوان ماده غنی‌کننده و فاکتور رشد مناسب هستند

---

۱ ــ Culture media

۲ ــ Nutrient broth

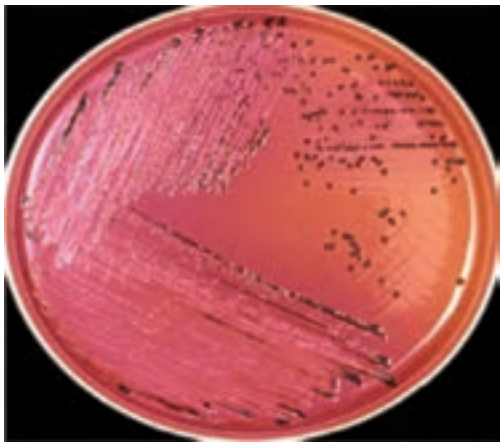
۳ ــ Nutrient Agar

۴ ــ Enrichment media

۵ ــ Blood agar

و برای کشت گونه‌های باکتری استرپتوکوکوس پایوژنز[1] که عامل عفونت گلو هستند به کار می‌رود.

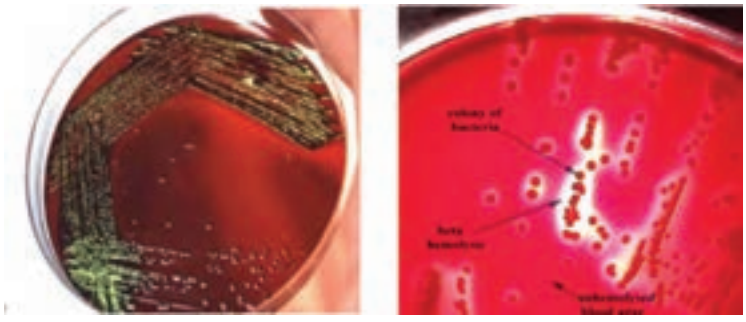
ب) شکلات آگار[2]: علاوه بر ترکیبات محیط کمپلکس دارای گویچه‌های قرمز خونی لیز شده و مواد مغذی اضافی است.



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

۴ــ۱ــ۵ــ محیط‌های کشت انتخابی[3]: 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 ویوله 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[4] است. این محیط دارای رنگ کریستال ویوله (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(۱ــ۵) کلنی باکتری سالمونلا در محیط کشت انتخابی مک کانکی آگار نشان داده شده است.

۵ــ۱ــ۵ــ محیط‌های کشت افتراقی[5]: 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 اشریشیا کلی در محیط افتراقی EMB (ائوزین 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).



(الف) (ب)

شکل۲ــ۵ ــ (الف)کلنی‌های دارای هاله روشن همولیز بر روی محیط کشت Blood agar و (ب) کلنی سبز براق اشریشیا کلی در محیط EMB

۶ــ۱ــ۵ ــ 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 به‌کار 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 ــ Streptococcus payogenesis

۲ ــ Choclate agar

۳ ــ Selective media

۴ ــ Mac – Conky agar

۵ ــ Differential media

زیادی دارد. بنابراین در این بخش به طور کامل در مورد مهم ترین این تست‌ها و مکانیسم عملشان شرح داده خواهد شد. فرمول کامل محیط‌های کشت مورد استفاده، در فصل آخر ارائه می‌شود.

مهم‌ترین تست‌های متابولیکی به عنوان تست‌های ایمویک (IMVIC) معروفند و شامل ۴ محیط بیوشیمیایی مهم با نام‌های :

الف) TSI agar [۱] : این محیط دارای سه نوع قند گلوکز، لاکتوز و ساکارز به نسبت (۱ــ۱۰ــ۱۰) همراه با یک ترکیب آهن‌دار (سولفات فروس) و معرف فنل رد به عنوان شناساگر اسیدی و پپتن می‌باشد. همانطور که در شکل (۳ــ۵) نشان داده شده است این محیط قرمز رنگ به صورت کج درون لوله‌های آزمایش تهیه می‌شود (به آماده سازی محیط‌های جامد مراجعه شود). همانطور که در شکل نشان داده شده محیط TSI دارای یک بخش سطحی و یک بخش عمیق است.

شکل۳ــ۵ ــ محیط کشت قرمز رنگ و مورب TSI

روش کشت : هنگام تلقیح محیط ابتدا باید با استفاده از لوپ از کلنی‌های تک باکتری مورد نظر در محیط کشت جامد برداشت، و لوپ را در عمق محیط فرو کرده، سپس با همان لوپ روی سطح شیبدار محیط نیز به صورت زیگزاگ از بالا تا پایین کشت داده درپوش لوله را بسته و آن را در گرمخانه با دمای $35\ ^{\circ}C$ به مدت ۴۸ــ۲۴ ساعت قرار داد.

نکته‌ها

✓ تمام مراحل باید در کنار شعله با فاصله ۳۰ سانتی‌متری 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 می‌گردد. بهتر است در پوش لوله را با انگشت کوچک دست راست گرفته و لوله را با دست چپ نگه‌داشت و همزمان با لوپی 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 لوله‌های تست جلوگیری شود.

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

بررسی یافته‌های انجام تست TSI : یافته‌های به دست آمده از کشت باکتری در محیط TSIمربوط به ویژگی‌های تخمیرقندها توسط باکتری، تولید یا عدم تولید گاز و تولید یا عدم تولید رسوب سیاه رنگ نمک‌های H_2S است.

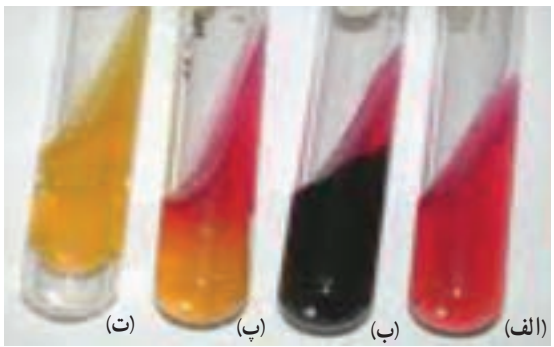
ــ ویژگی‌های تخمیری : برای تخمیر قندها در محیط TSI سه حالت وجود دارد که بسته به نوع باکتری می‌تواند یکی از این سه حالت را نشان دهد.

۱ــ سطح قرمز رنگ (قلیایی)، عمق محیط قرمز (قلیایی) **K/K (الف)**

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

۳ــ سطح زرد (اسیدی)،عمق محیط زرد(اسیدی) **A/A (ت)**

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



شکل۴ــ۵ ــ (الف) K/K، (ب)K/K و تولید رسوب سیاه رنگ H_2S، (پ) K/A و (ت) A/A

۱ ــ Triple Sugar Iron agar

ـ ***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 ۴ـ۵ قسمت ت).

ـ ***تولید H_2S :*** تولید رسوب سیاه رنگ دی سولفید هیدروژن به شرایط اسیدی نیاز دارد که به صورت لکه سیاه در محیط دیده می‌شود (شکل۴ـ۵ 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 باکتری‌ها را نشان می‌دهد.

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

نکته‌هایی که برای کشت در TSI گفته شد در این‌جا هم باید مورد توجه قرار گیرد.

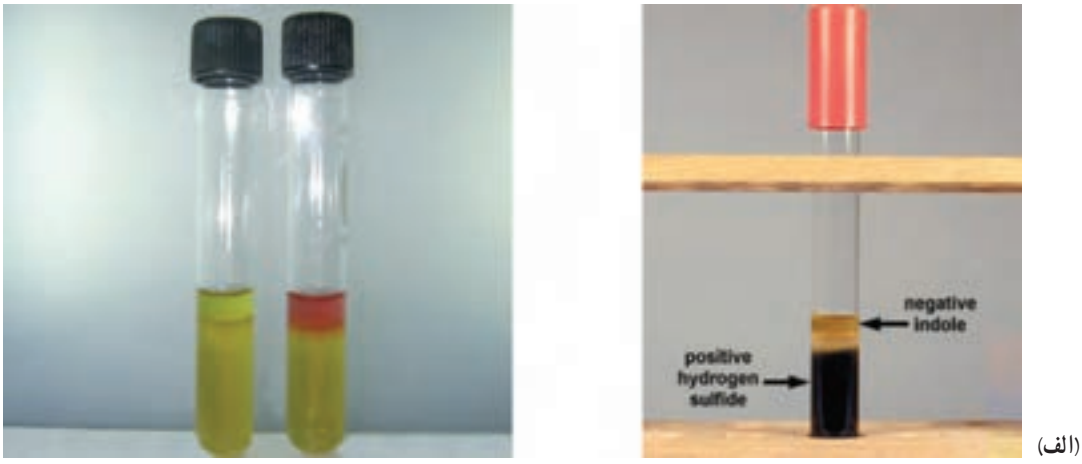
بررسی یافته‌های کشت باکتری در محیط SIM

ـ ***تولید رسوب نمک‌های H_2S :*** به صورت لکه سیاه رنگ در محیط دیده می‌شود، همانند شکل (۵ـ۵ قسمت الف).

ـ ***حرکت باکتری :*** اگر در مسیری که سوزن کشت فرورفته و اطراف آن در محیط کدورت ایجاد شود نشانه حرکت باکتری است در غیر این صورت باکتری فاقد حرکت است. (شکل ۵ـ۵ قسمت ب)

ـ ***تولید اندول :*** باکتری‌هایی که از اسید آمینه تریپتوفان استفاده می‌کنند 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 ۵ـ۵ قسمت ب).

پ) محیط سیمون سیترات[2] : در محیط سیمون سیترات که سبز رنگ و کج است، ترکیب سیترات و معرف بروموتیمول بلو وجود دارد و این محیط برای تعیین این که آیا باکتری قادر به استفاده از سیترات به عنوان منبع کربن است یا خیربه کار می‌رود.



(ب) (الف)

شکل۵ـ۵ـ (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.

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

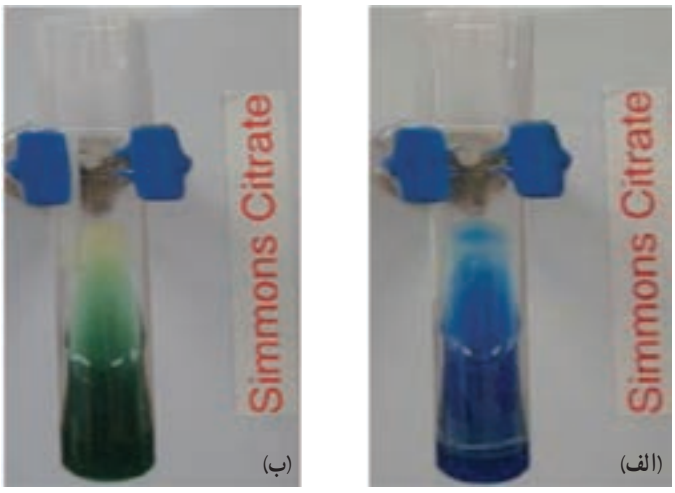
---

۱ ـ Sulfide Indole Motility medium

۲ ـ 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، (شکل۶ـ۵ قسمت الف) باکتری‌هایی که قادر به استفاده از سیترات نیستند رنگ محیط را تغییر نمی‌دهند (شکل۶ـ۵ قسمت ب).

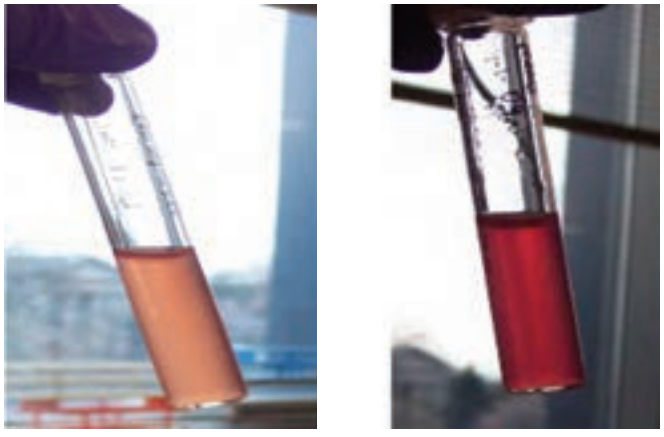


شکل۶ـ ۵ ـ (الف)نمونه سیترات مثبت و(ب)نمونه سیترات منفی

ث) محیط MRVP[1] : 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 یافته کشت باکتری در محیط MRVP : برای تعیین مسیر MR ویا مسیرVP، محیط موجود در لوله را بین دو لوله آزمایش تقسیم کرده، یک بخش محیط برای تست MR و بخش دیگر برای تست VPبه کاربرده می‌شود.



شکل۷ـ ۵ ـ (الف) نمونه MR مثبت و (ب) نمونه MR منفی

ـ 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، (شکل۷ـ۵ قسمت الف) و اگر تغییر نکرد از مسیر دیگر مانند (شکل ۷ـ۵ قسمت ب).

ـ VP : به لوله دوم آماده شده ۵ قطره آلفانفتول۶٪ 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.

---

۱ ـ Methyl Red Vogese Preosquer

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.

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

محیط‌های کشت آزمایشگاهی یا به صورت پودرهای آماده مصرف تجارتی 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.

۱ــ۲ــ ۵ ــ 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 :

$$\frac{۵۰۰ \times ۲۳}{۱۰۰۰}$$

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 کمی‌از 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 هنرجویان 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.

سترون‌سازی محیط‌های کشت : مهم‌ترین مرحله در آماده سازی محیط‌های کشت سترون سازی آنها است. برای سترون‌سازی محیط‌های کشت آزمایشگاهی باید از اتوکلاو با دمای $۱۲۱^{\circ}C$ 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 ویا 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 $45^{\circ}C$ 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 $42^{\circ}C$ قرار داد. (برای آگاهی بیشتر درباره استفاده از حمام آب به فصل اول مراجعه شود)

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

۲ــ۲ــ۵ــ 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.

ــ محیط جامد (آگاردار) درون تشتک‌ها : این نوع محیط برای کشت باکتری‌ها، جداسازی و روش‌های شمارش میکروب‌ها به‌کار می‌رود. اگر محیط‌ها جامد باشند پس از سترون سازی ابتدا باید دمای آنها به $42^{\circ}C$ 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 :

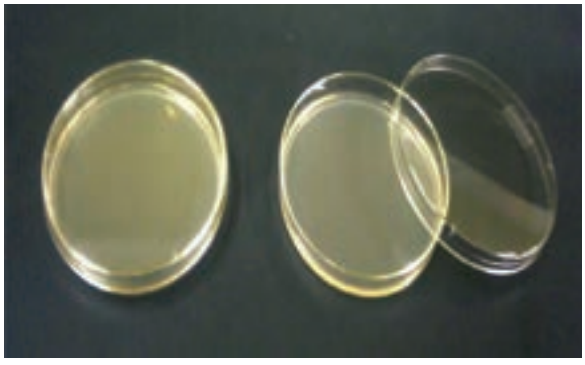
۱ــ پیش از قرار دادن تشتک‌های خالی بر روی سطح، باید ابتدا همه سطح را با پنبه آغشته به الکل سترون سازی کرد.

۲ــ ارلن دارای محیط کشت مذاب (دمای $42^{\circ}C$) را ازحمام 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.

۳ــ برای ریختن محیط درون تشتک‌ها بهتر است با دست چپ درب تشتک را تنها به اندازه ۴۵ــ۶۰ درجه برداشته و با دست راست محیط مایع درون ارلن را به داخل تشتک منتقل کرد.

۴ــ با توجه به اینکه تعیین حجم ۲۵ــ ۱۵میلی 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 ــ ۵).

۵ــ گاهی اوقات با افزودن محیط کشت درون تشتک‌ها در سطح آنها حباب‌های هوا تشکیل می‌شود که در صورت باقی‌ماندن می‌تواند در رشد میکروب‌ها مشکل ایجاد کنند. برای از بین‌بردن این حباب‌ها بهتر است با برداشتن در تشتک، سطح محیط



شکل۸ــ ۵ ــ 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 :

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

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

ــ 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 وSIM 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 سیترات. 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 :

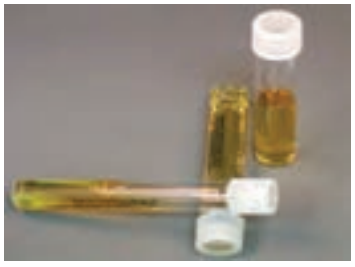
۱ــ بهتر است لوله‌ها در جالوله‌ای قرار داده شوند.

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

۳ــ 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.

۴ــ 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.

ــ محیط‌های کشت مایع: این نوع محیط باید در لوله‌های آزمایش تهیه شود و در بیشتر موارد برای رشد باکتری‌ها و تست‌های بیوشیمیایی مانندMRVP به‌کار 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.



شکل۹ــ۵ ــ نمونه‌ای از یک لوله آزمایش دارای محیط کشت مایع