

۱۸-۲- روش‌های رنگ آمیزی باکتری‌ها

رنگ آمیزی باکتری‌ها، امکان شناخت شکل ظاهری آن‌ها را فراهم می‌کند، برای هر روش میکروب‌های خاصی انتخاب می‌شوند. برای مثال: در رنگ آمیزی ساده، باکتری‌هایی انتخاب می‌شوند که دارای دانه‌های متاکروماتیک، پلئومورفیسیم^۱ و ترتیب قرارگیری نردبانی^۲ باشند در رنگ آمیزی گرم، شما متوجه تفاوت بین کوکسی‌ها و باسیل‌ها می‌شوید.

۱-۱۸-۲- روش رنگ آمیزی منفی^۳: ساده‌ترین راه برای تهیه یک لام میکروبی، تهیه لام مرطوب است مثل آنچه که در مطالعه تک‌یاخته‌ها و الگ‌ها تهیه می‌شود. با این که این روش، روش سریعیست، ممکن است پیدا کردن باکتری‌ها در زیر میکروسکوپ مخصوصاً برای فرد مبتدی مشکل باشد زیرا باکتری‌ها بی‌رنگ و شفاف هستند و تنظیم آن در زیر میکروسکوپ مشکل است. رنگ آمیزی منفی و یا رنگ آمیزی زمینه روش خوبی برای مشاهده باکتری‌هاست. در این روش، باکتری‌ها را در روی لام با رنگ نیگروزین و یا مرکب چین مخلوط کرده، گسترش می‌دهند. چون این دو رنگ، رنگ‌های واقعی باکتریایی نیستند، به جسم باکتری نفوذ نمی‌کنند، بلکه زمینه را رنگ می‌کنند و باکتری‌ها شفاف می‌مانند و در زمینه سیاه قابل رؤیت می‌گردند. با این که این روش‌ها ساده و محدود هستند، برای بررسی شکل ظاهری و اندازه باکتری‌ها قابل استفاده می‌باشند و چون در آن از حرارت استفاده نمی‌شود، تغییری در شکل سلول حادث نمی‌گردد و بهتر می‌توان اندازه باکتری‌ها را بررسی کرد. هم‌چنین برای مطالعه اسپروکت‌هایی که با رنگ‌های معمولی به آسانی رنگ نمی‌گیرند، از این روش‌ها بهره می‌گیرند.

مواد و لوازم مورد نیاز:

لام‌های میکروسکوپی، میکروسکوپ

نیگروزین یا مرکب چین

لوپ، ماژیک و چراغ الکلی

محیط کشت حاوی استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس مگاتریوم

نحوه رنگ آمیزی: رنگ آمیزی منفی را می‌توان به روش‌های زیر انجام داد: در روش اول، در یک قطره سوسپانسیون میکروبی در رنگ نیگروزین و یا مرکب چین را در انتهای یک لام گذاشته، با انتهای لام دیگر آن را گسترش می‌دهند. در نتیجه، یک انتهای نمونه تهیه شده ضخیم و انتهای دیگر آن نازک است و بین این دو منطقه، محیط مناسبی برای مطالعه باکتری‌هاست. در روش دیگر، سوسپانسیون باکتریایی را در مرکز لام گذاشته، با یک آنس آن را به صورت دایره‌ای گسترش می‌دهند.

۱- Pleomorphism

۲- Palisade

۳- Negative staining

معلم شما، روش رنگ آمیزی را برایتان مشخص خواهد کرد.

۲-۱۸-۲- رنگ آمیزی ساده باکتری‌ها: استفاده از یک رنگ برای رنگ آمیزی باکتری‌ها

را «رنگ آمیزی ساده» می‌گویند. بعضی از رنگ‌های معمول مثل متیلن بلو، فوشین بازی و کریستال ویوله برای این منظور به کار می‌روند. زیرا همه این‌ها دارای یون‌های ناقل (یونوفرها) هستند که بار مثبت دارند (کاتیون). چنین رنگ‌هایی را «رنگ‌های بازی» می‌گویند. متیلن بلو (متیلن⁺ کلرور⁻) از این گروه است. رنگ‌هایی که دارای کروموفرهای آنیونی هستند رنگ‌های اسیدی نامیده می‌شوند. مثل اتوزین (سدیم⁺ اتوزینات⁻).

رنگ‌های ساده را معمولاً در عرض ۳۰ ثانیه تا یک دقیقه رنگ آمیزی می‌کنند و این رنگ‌ها برای بررسی شکل ظاهری و وجود رنگدانه‌های باکتریایی، مناسب هستند.

برای تمرین روش رنگ آمیزی ساده، یک روش کورینه باکتریوم ديفتريه غيربیماری‌زا استفاده می‌شود. فرم بیماری‌زای آن بیماری ديفتري ایجاد می‌کند. یکی از مراحل تشخیص آن، رنگ آمیزی ساده است تا خصوصیات ظاهری آن که شامل پلئومرفیسم، دانه‌های متاکروماتیک و ترتیب قرارگیری به صورت نردبانی است مشخص شود.

پلئومرفیسم، عبارت است از اشکال نامنظم: یعنی مشاهده اشکال مختلف. مثلاً کورینه باکتریوم ديفتريه که استوانه‌ای شکل است، ممکن است به شکل چماقی، شکل اسپرم، و با شکل سوزنی دیده شود. دانه‌های متاکروماتیک: در رنگ آمیزی کورینه باکتریوم‌ها یا متیلن بلو، در داخل سلول‌ها گرانول‌های قرمز ارغوانی دیده می‌شوند که به دانه‌های کروماتیک معروف‌اند. این دانه‌ها، مملو از ولوتین هستند. ولوتین یک پلی‌فسفات است. ترتیب قرارگیری به شکل موازی^۱ سلول‌های استوانه‌ای در اکثر کورینه باکتری‌ها به شکل موازی قرار می‌گیرند.

مواد و لوازم مورد نیاز برای رنگ آمیزی ساده:

محیط کشت حاوی سوش غیربیماری‌زای کورینه باکتریوم ديفتريه

متیلن بلو، ظرف شست و شو، کاغذ صافی

نحوه رنگ آمیزی: پس از تهیه نمونه میکروبی در روی لام و ثابت کردن آن با حرارت، سطح

لام را با متیلن بلو بپوشانید و بگذارید یک دقیقه بماند. سپس رنگ لام را شسته، با کاغذ صافی آن

را خشک کنید و با قراردادن یک قطره روغن ایمرسیون بر روی لام، آن را زیر میکروسکوپ مطالعه

کنید و مشاهدات خود را در گزارش کار آزمایشگاهی خود رسم نمایید.

۳-۱۸-۲- رنگ آمیزی کپسول: بعضی از باکتری‌ها، به وسیله یک لایه ژلاتین به نام، کپسول احاطه شده‌اند. جنس این کپسول، گلیکوپروتئینی یا پلی پپتیدیست و در آب حل می‌شود. رنگ آمیزی کپسول باکتری، با روش‌های رنگ آمیزی ساده امکان پذیر نیست و اگر لام به روش‌های معمول تهیه شود و با حرارت تثبیت گردد، کپسول تخریب خواهد شد و چنانچه برای تثبیت کردن (فیکسه کردن) لام از حرارت استفاده نشود، باکتری‌ها به هنگام شست و شو از روی لام پاک خواهند شد، بنابراین برای رنگ آمیزی کپسول، ترکیبی از روش‌های رنگ آمیزی ساده و منفی به کار می‌برند. برای این منظور از کلبسیلا پنومونیه^۱ که یک باسیل کپسول دار است لام تهیه کنید.

مواد و لوازم مورد نیاز:

محیط کشت ۲۴ تا ۴۸ ساعته کلبسیلا پنومونیه

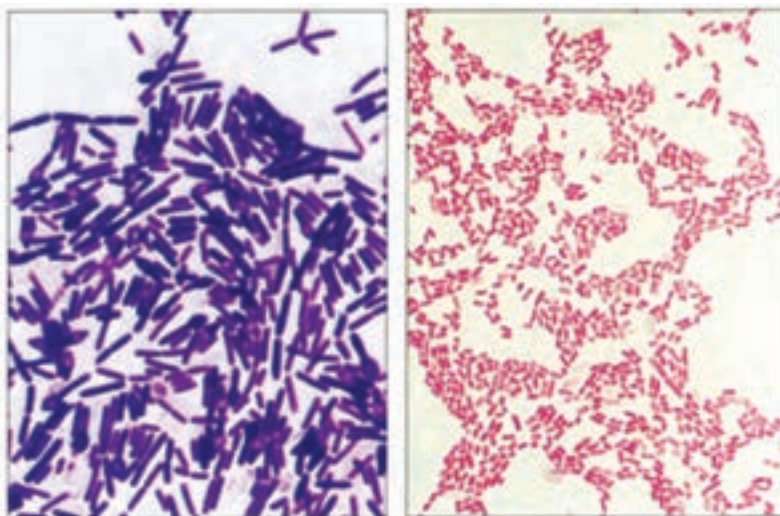
مرکب سیاه، کریستال ویوله

نحوه رنگ آمیزی:

- ۱- یک لوپ پر از باکتری را در روی لام در یک قطره مرکب سیاه به هم بزنید.
- ۲- سوسپانسیون مرکب و باکتری را روی لام گسترش داده، در هوای آزاد خشک کنید.
- ۳- لام را به آرامی روی شعله بگیرید تا تثبیت شود.
- ۴- روی لام رنگ کریستال ویوله بریزید و بگذارید یک دقیقه بماند.
- ۵- لام را با آب به آرامی بشوید تا کریستال ویوله از روی آن شسته شود.
- ۶- با کاغذ صافی لام را خشک کرده، یک قطره روغن ایمرسیون روی آن بگذارید.
- ۷- با عدسی شیء ۱۰۰ میکروسکوپ آن را مطالعه کرده، مشاهدات خود را در گزارش کار خود رسم نمایید.

۴-۱۸-۲- رنگ آمیزی گرم^۲: در سال ۱۸۸۴، کریستین گرم این روش رنگ آمیزی را ابداع کرد. با این روش رنگ آمیزی، باکتری‌ها به دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی تقسیم می‌شوند. این روش، بر پایه توانایی باکتری‌ها در نگهداری رنگ ارغوانی کریستال ویوله در طی رنگ زدایی با الکل، استوار است. باکتری‌های گرم منفی به وسیله الکل رنگ ارغوانی کریستال ویوله را از دست می‌دهند. باکتری‌های گرم مثبت این رنگ را از دست نمی‌دهند و ارغوانی می‌مانند. بعد از رنگ زدایی، سافرانین که یک رنگ قرمز زمینه است استفاده می‌شود تا باکتری‌های گرم منفی به رنگ صورتی درآیند. در رنگ آمیزی گرم، در مرحله اول کریستال ویوله باکتری‌های گرم مثبت و منفی را پس از ۲۰ ثانیه به رنگ ارغوانی درمی‌آورد، سپس رنگدانه ید (لوگل) به مدت یک دقیقه در روی

لام قرار می‌گیرد. در این مرحله نیز، باکتری‌های گرم مثبت و منفی به همان صورت باقی می‌مانند. در واقع، رنگ دانه در باکتری‌های گرم مثبت با کریستال ویوله ترکیب حل‌ناشدنی ایجاد می‌کند و هنگامی که معرف رنگ‌زدا (الکل ۹۵٪) ریخته می‌شود باکتری‌های گرم منفی رنگ ارغوانی خود را از دست می‌دهند ولی باکتری‌های گرم مثبت به همان رنگ ارغوانی باقی می‌مانند. در مرحله نهایی، رنگ زمینه سافرانین به روی لام ریخته می‌شود و باکتری‌های گرم منفی به رنگ صورتی درمی‌آیند بدون این که بر رنگ ارغوانی باکتری‌های گرم مثبت تأثیری داشته باشد.



گرم مثبت

گرم منفی

شکل ۱۳-۲

در بین تمام روش‌های رنگ‌آمیزی، روش رنگ‌آمیزی گرم بیشترین کاربرد را دارد. گرچه این روش به نظر ساده می‌آید ولی برای حصول نتیجه خوب، به تمرین و تجربه نیاز دارد و نباید نمونه گسترش‌شده در روی لام ضخیم باشد. توجه داشته باشید که به هنگام رنگ‌زدایی، نمونه‌های کهنه خیلی سریعتر رنگ خود را از دست می‌دهند و گرم منفی دیده می‌شوند. برای به دست آوردن نتیجه خوب باید محیط کشت ۱۶ ساعته باشد. در طی این دوره کار آزمایشگاه شما فرصت خواهید داشت از انواع مختلف باکتری‌ها نمونه تهیه کرده، رنگ‌آمیزی کنید. به یاد داشته باشید که اگر این روش رنگ‌آمیزی را به خوبی یاد نگیرید بعداً در برخورد با نمونه‌های مجهول دچار مشکل خواهید شد.

مواد و لوازم مورد نیاز:

لام تهیه شده از میکروب و تثبیت شده با حرارت

محلول‌های رنگ آمیزی

ظرف شست‌وشو، کاغذ صافی

نحوه رنگ آمیزی:

- ۱- روی لام تثبیت‌شده، رنگ کریستال ویوله بریزید و بگذارید 20° ثانیه بماند.
- ۲- به آرامی لام را با آب شسته آب روی آن را خالی کنید.
- ۳- محلول بد را روی لام بریزید و بگذارید یک دقیقه بماند.
- ۴- لام را با آب شسته، الکل ۹۵٪ بریزید و بگذارید 10° تا 20° ثانیه بماند. این مرحله، مرحله حساسی است.

برای رنگ‌زدایی، نمونه ضخیم، نسبت به نمونه نازک، به زمان بیشتری نیاز دارد. رنگ‌زدایی، زمانی خاتمه می‌یابد که محلول سرازیر شده از لام، بی‌رنگ شود.

- ۵- لام را با آب شسته، سافرانین بریزید و 20° ثانیه صبر کنید.
- ۶- آن را با آب بشوید، سپس با کاغذ صافی خشک کنید.
- ۷- روی لام رنگ‌شده یک قطره روغن ایمرسیون گذاشته، در زیر میکروسکوپ مطالعه کنید.

مواد و لوازم مورد نیاز:

کشت مایع حاوی استافیلوکوکوس اورئوس^۱ پseudomonas ائروژنوزا^۲ و موراکسلا (برانهاملا) کاتارالیس^۳، نوترینت آگار حاوی باسیلوس مگاتریوم^۴ و میکوباکتریوم اسمگماتیس^۵

نحوه عمل: سه لام بردارید. در سه قسمت هریک از آنها، سه نمونه میکروبی تهیه کنید. در قسمت چپ هر لام، استافیلوکوکوس اورئوس، در قسمت راست آن، پseudomonas ائروژنوزا و در وسط آن، مخلوط دو باکتری فوق را بمالید. لام اول را با گرم رنگ آمیزی کنید و دو لام دیگر را برای بعد نگه دارید. نمونه وسطی لام را آزمایش کنید. اگر درست رنگ شده باشد باید کوکسی‌های ارغوانی و باسیل‌های صورتی دیده شوند. از معلم خود بخواهید لام شما را زیر میکروسکوپ ببیند. اگر لام شما خوب رنگ نشده باشد معلمتان خواهد گفت که کجای کار اشتباه بوده است و اطلاعات کافی برای رنگ آمیزی صحیح را به شما ارائه خواهد کرد. نتایج کار خود و مشاهداتتان را در گزارش

۱- Staphylococci aureus

۲- Pseudomonas aeruginose

۳- Moraxella Catarrhalis

۴- Bacillus megaterium

۵- Mycobacterium smegmatis

کار آزمایشگاهی یادداشت نمایید.

یک لام از مخلوط باسیلوس مگاتریوم و موراکسلا کاتارالیس تهیه کنید. در این لام باسیل‌ها (باسیلوس مگاتریوم) ارغوانی و کوکسی‌ها (موراکلا کاتارالیس) به صورت دیپلوکک‌های بزرگ صورتی دیده می‌شوند.

همان‌طور که آن لام را آزمایش می‌کنید، به قسمت روشن داخل جسم باسیل توجه کنید. آن جای خالی اندوسپور باسیل است. اندوسپورها نسبت به کریستال ویوله، نفوذناپذیر هستند. در نتیجه در داخل سلول شفاف دیده می‌شوند.

برای این که ببینید باسیل‌های اسیدفست در رنگ‌آمیزی گرم، چگونه دیده می‌شوند یک لام از میکوباکتریوم اسمگماتیس تهیه کرده، با روش گرم رنگ‌آمیزی کنید. اگر روش رنگ‌آمیزی شما صحیح باشد، باکتری‌ها گرم مثبت دیده خواهند شد. شکل آن‌ها را در گزارش کار خود رسم کنید.

۵-۱۸-۲- رنگ‌آمیزی اسپور: گونه‌های باکتریایی متعلق به جنس باسیلوس و کلسترییدیوم، ساختمان‌های مقاوم در برابر حرارت، تولید می‌کنند که «اندوسپور» نامیده می‌شوند. این ساختمان‌های خاص، علاوه بر حرارت، در برابر بیشتر مواد شیمیایی که باکتری‌های بدون اسپور را به راحتی از بین می‌برند مقاوم هستند. این مقاومت به حرارت و مواد شیمیایی، در وهله اول، به ضخیم بودن پوست اسپور مربوط است. در رنگ‌آمیزی گرم، اسپورها رنگ نمی‌گیرند. تنها هنگامی که حرارت مناسبی به جسم باکتری داده شود، رنگ خواهد توانست به اسپور نفوذ کند و پس از نفوذ، با معرف‌های رنگ‌زدا و یا آب از بین نمی‌رود. روش‌های زیادی برای نفوذ رنگ تحت حرارت به کار می‌رود. ولی باکتری‌شناسان دو روش شفر- فولتون^۱ و دورنر^۲ را بیشتر از هر روشی، به کار می‌برند.

۱۹-۲- طرز ساخت معرف‌های مختلف رنگ برای رنگ‌آمیزی

محلول کریستال ویوله:

محلول الف: ۲ میلی‌گرم کریستال ویوله (دارای ۰.۸۵٪ رنگ) را در ۲۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ حل کنید.

محلول ب: ۰/۸ میلی‌گرم اگزالات آمونیوم را در ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید. محلول A

و B را با هم مخلوط کنید.

ید گرم (لوگل): ۲ میلی‌گرم یدور پتاسیم را در ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده، ۱ میلی‌گرم

کریستال ید به آن اضافه کنید.

سافرانین (برای رنگ‌آمیزی گرم):

سافرانین O (۲/۵٪ در اتانول ۹۵٪) ۱۰ میلی‌لیتر

آب مقطر ۱۰۰ میلی لیتر رنگ فلاژل لیفسون:

محلول الف: ۹/۰ میلی گرم استات پاراوزآنیلین و ۳/۰ میلی گرم هیدروکلور باراوزآنیلین را در ۱۰۰ میلی لیتر اتانول حل کنید. بگذارید یک شب در دمای اتاق بماند تا کاملاً حل شود.
محلول ب: ۳ میلی گرم اسید تانیک را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید.
محلول ت: ۵/۱ میلی گرم کلرور سدیم را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید.
حجم مساوی از محلول‌های الف و ب و ت را با هم مخلوط کرده، بگذارید ۲ ساعت بماند. سپس، آن را در یک شیشه در سنباده‌ای ریخته، حدود ۲ ماه در یخچال نگهداری کنید در صورت ایجاد رسوب آن را دور بریزید. از صاف کردن و فریز کردن آن پرهیز کنید.

محلول نیگروزین (محلول دورنر):

نیگروزین حل شدنی در آب ۱۰ میلی گرم

آب مقطر ۱۰۰ میلی لیتر

۳۰ دقیقه بجوشانید. ۵/۰ میلی لیتر فرم‌آلدئید (۴۰٪) به عنوان نگه‌دارنده به آن اضافه کنید. دوبار از صافی دو لایه بگذرانید و در شرایط استریل نگه دارید.

۲-۲- شمارش باکتری‌ها^۱

در بیشتر مطالعات باکتری‌شناسی، لازم است تعداد میکروب‌های موجود در واحد حجم شمارش شوند. روش‌های زیادی برای شمارش آن‌ها وجود دارد. یکی از روش‌های پرکاربرد، تهیه رقت از میکروب‌ها و مشاهده آن‌ها با میکروسکوپ در روی لام است. آزمایش مستقیم نمونه‌های شیر با این روش، بسیار سریع انجام می‌شود و نتایج آن کاملاً مورد اعتماد است.
روش مشابه دیگر، روش پتروف‌هازر^۲ است که در آن، از یک شمارش‌گر مکانیکی استفاده می‌شود. باکتری‌های تولیدکننده گاز را می‌توان به تعدادی از لوله‌های آزمایش حاوی لاکتوزبراث تلقیح نمود و از روی جدول خاص آماری تعداد باکتری‌های موجود در آن را مشخص کرد. این روش، برای شمارش کلی فرم‌ها در نمونه‌های آب انجام می‌شود، ضمن این که بسیار ساده است، اما محدود به آزمایش آب، شیر و مواد غذایی است.

در این تمرین، از پلیت‌های کمی (پلیت‌های شمارش استاندارد، یا SPC^۳ و اندازه‌گیری کدورت، تعداد باکتری‌ها را مشخص خواهیم کرد. گرچه نتایج دو روش فوق، موازی هم‌اند ولی

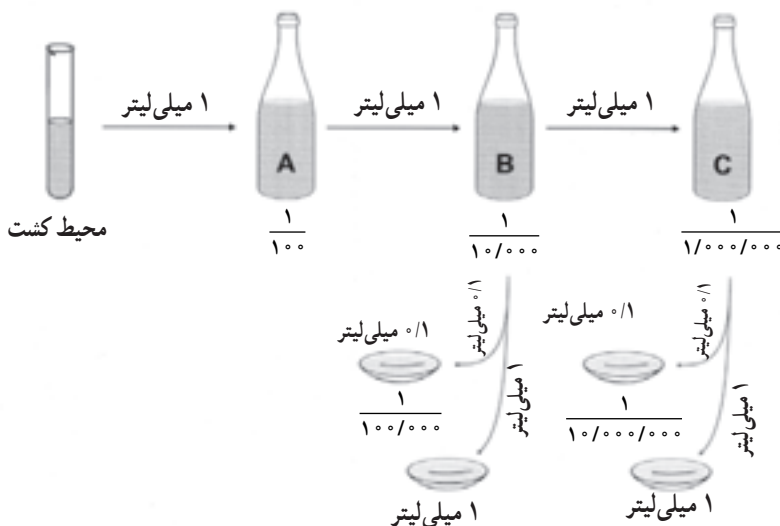
۱- Bacterial population counts

۲- Petrof Hauser

۳- Standard Plate Count (SPC)

تفاوت‌های واضحی نیز دارند. SPC تنها اطلاعات مربوط به میکروبی‌های زنده را آشکار می‌کند، یعنی پرگنه‌ها بعد از گرم‌خانه‌گذاری نشانگر میکروبی‌های زنده هستند. از طرف دیگر، نتایج کدورت‌سنجی وجود کلیه میکروبی‌ها، اعم از زنده و مرده در محیط کشت را مشخص می‌کند.

۱-۲-۲- روش پلیت کمی (شمارش با پلیت استاندارد): در تعیین تعداد میکروبی‌های موجود در آب، شیر و مواد غذایی، شمارش با پلیت استاندارد در همه جای عالم به کار می‌رود. انجام این روش نسبتاً آسان است و نتایج خوبی به دست می‌آید. هم‌چنین، از این روش پایه می‌توان برای محاسبه تعداد میکروبی‌های محیط کشت، باکتریایی سود جست. روش آزمایش، شامل تهیه رقت از میکروبی‌ها در آب مقطر به صورت گروهی است که در شکل ۱۴-۲ نشان داده شده است.



شکل ۱۴-۲- روش شمارش کمی با پلیت

برای این آزمایش، تنها سه شیشه نیاز است. اما اگر لازم باشد، باید از شیشه‌های بیشتری

استفاده شود. با استفاده از روش رقت، رقت نهایی $\frac{1}{1,000,000}$ در شیشه C حاصل می‌شود. از

شیشه B و C به پلیت‌های خالی انتقال داده می‌شود. نوترینت آگار خنک شده 5° درجه سانتی‌گراد به پلیت‌ها ریخته می‌شود. پس از این که نوترینت آگار سفت شد، 24 تا 48 ساعت گرم‌خانه‌گذاری می‌شود و سپس آزمایش می‌شود. پلیتی که 30° تا 300° پرگنه داشته باشد، برای شمارش انتخاب می‌گردد. با شمارش آن، محاسبه تعداد میکروبی‌ها در هر میلی‌لیتر محیط کشت اولیه، امکان‌پذیر است. باید توجه داشت که لازم است از هر رقت دو پلیت تهیه گردد و در شمارش، از تعداد آن‌ها میانگین گرفته شود.

۲-۲۰-۲- استفاده از پيپت: موفقیت در این آزمایش، به روش پيپت کردن صحیح بستگی دارد. در گذشته، محلول میکروبی را با دهان به داخل پيپت می کشیدند ولی به لحاظ خطر آشکار آن، امروزه برای این منظور از مکندہ های دستی استفاده می کنند. معلم شما، روش استفاده از آن را به شما یاد خواهد داد.

اگر برای اولین بار است که از پيپت استریل استفاده می کنید به نکات زیر توجه کنید:

- وقتی می خواهید یک پيپت از جاپیپی درآورید این کار را طوری انجام دهید که انگشتان شما، انتهای پيپت های دیگر را آلوده نکنند. با تکان دادن جاپیپی، یک پيپت از بقیه جدا شده، بیشتر بیرون می آید.

- پس از برداشتن پيپت، درپوش جاپیپی را بگذارید تا بقیه پيپت ها استریل بمانند.
- بدنه پيپت را با انگشتان نگیرید و قبل و بعد از استفاده، آن را روی میز نگذارید و در طی کاربرد آن، استریل نگه دارید و روی میز و یا خودتان را با آن آلوده نکنید.
- برای کشیدن محلول به پيپت، همیشه از یک مکندہ مکانیکی استفاده کنید.
- اگر سه عدد پيپت نیاز است، آن ها را یکی یکی از جاپیپی درآورید.
- وقتی کارتان با پيپت تمام شد آن را در داخل ظرف حاوی مایع ضد عفونی کننده قرار دهید. در انتهای کار، پيپت های قابل شست و شو را شسته، استریل کنید و پيپت های یک بار مصرف را دور بریزید.

روش تهیه رقت:

مواد و وسایل لازم برای هر چهار دانش آموز:

یک عدد شیشه (۴۰ میلی لیتری) محیط کشت براث اشرشیاکلی برای هر دانش آموز

یک عدد شیشه (۸۰ میلی لیتری) نوترینت آگار

چهار عدد پلیت

پيپت های ۱/۱ میلی لیتری

سه شیشه شست و شو شده استریل ۹۹ میلی لیتری

ظرف مناسب برای پيپت های دور انداختنی

نحوه کار:

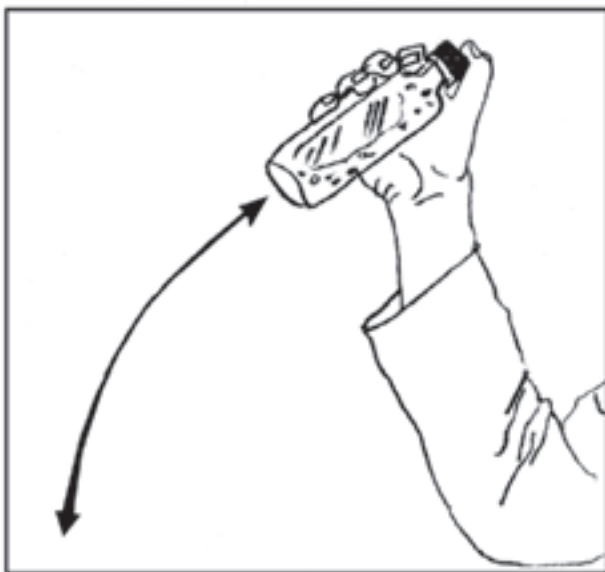
۱- نوترینت آگار موجود در یک شیشه را ذوب کنید. سه شیشه استریل ۹۹ میلی لیتری بردارید و روی آن ها را با حروف A، B و C علامت گذاری نمایید. هم چنین پشت چهار عدد پلیت به ترتیب

$\frac{1}{10/000/000}$ ، $\frac{1}{100/000}$ ، $\frac{1}{1000/000}$ و $\frac{1}{10000/000}$ بنویسید. به علاوه، میزان حجم

سوسپانسیون باکتری را که پلیت ریخته می‌شود در پشت پلیت یادداشت کنید. (۱/ میلی لیتر و یا ۱ میلی لیتر).

۲- محیط کشت اشرشیاکلی را به هم بزنید و با یک پیپت ۱/۱ میلی لیتری، یک میلی لیتر از آن را به شیشه A منتقل کنید. سپس پیپت استفاده شده را در ظرف حاوی ماده ضدعفونی کننده قرار دهید.

۳- شیشه A را مطابق شکل ۱۵-۲، در عرض ۷ ثانیه ۲۵ بار به هم بزنید. به هم زدن شدید نه تنها کدورت خوبی تولید می‌کند بلکه باعث باز شدن توده‌های باکتری می‌شود.



شکل ۱۵-۲- نحوه بهم زدن استاندارد محلول با استفاده از آرنج ثابت شده در روی میز

۴- با یک پیپت ۱/۱ میلی لیتری، یک میلی لیتر از محتویات شیشه A را به شیشه B منتقل کنید.

۵- محتویات شیشه B را ۲۵ بار به هم بزنید.

۶- با یک پیپت استریل دیگر، ۱/۱ میلی لیتر از محتویات شیشه B را به پلیت $\frac{1}{100000}$ منتقل کنید و یک میلی لیتر به پلیت $\frac{1}{10000}$ بریزید. با همان پیپت یک میلی لیتر نیز به شیشه C بریزید.

۷- شیشه C را ۲۵ بار به هم بزنید.

۸- با یک پیپت استریل دیگر، از محتویات شیشه C، ۱/۱ میلی لیتر برداشته، به پلیت

$\frac{1}{100000000}$ و یک میلی لیتر به پلیت $\frac{1}{10000000}$ بریزید.

۹- پس از آن که شیشه حاوی نوترینت آگار برای مدت ۸ دقیقه جوشانده شد، آن را در داخل یک بن‌ماری ۵۰ درجه، حداقل ده دقیقه سرد کنید.

۱۰- یک چهارم نوترینت آگار (۲۰ میلی‌لیتر) را به هر پلیت بریزید و به آرامی محتویات پلیت‌ها را به هم بزنید. این مرحله، مرحله حساسی است زیرا به هم زدن کم، مانع از پخش کامل میکروب‌ها می‌شود و به هم زدن زیاد، موجب می‌گردد محیط کشت از لبه‌های پلیت بیرون بریزد.

۱۱- پس از آن که محیط کشت کاملاً سرد شد، آن را به مدت ۴۸ ساعت به طور وارونه در ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری کنید.

شمارش و محاسبه

مواد و وسایل لازم:

۴ عدد پلیت، شمارش‌گر پرگنه، شمارش‌گر دستی

۱- پلیت‌ها را به ترتیب رقت روی میز بگذارید و با هم مقایسه کنید. پلیت‌هایی را که تعداد پرگنه‌های آن‌ها بین ۳۰ تا ۳۰۰ عدد است برای شمارش انتخاب کنید. پلیت‌هایی که تعداد پرگنه‌های آن‌ها بیش از ۳۰۰ عدد و یا کمتر از ۳۰ عدد است از نظر آماری مناسب نیستند.

۲- پلیت را روی صفحه شمارش‌گر زیر ذره‌بین قرار دهید. شمارش را از بالای پلیت شروع کنید، با یک شمارش‌گر مکانیکی دستی، هر پرگنه را بدون توجه به بزرگی و کوچکی آن شمارش کنید و برای این که پرگنه‌ای دو بار شمرده نشود از پرگنه‌های روی خطوط راست یا چپ صرف‌نظر کنید. نتیجه را در گزارش کار خود بنویسید.

۳- با استفاده از اطلاعات به‌دست‌آمده، تعداد باکتری‌ها را در میلی‌لیتر محیط کشت رقیق نشده محاسبه کنید، برای این کار، تعداد پرگنه‌های شمرده شده را به ضریب رقت ضرب کنید.

مثال: اگر تعداد پرگنه‌های شمارش‌شده در پلیت حاوی یک میلی‌لیتر از رقت $\frac{1}{1/000/000}$

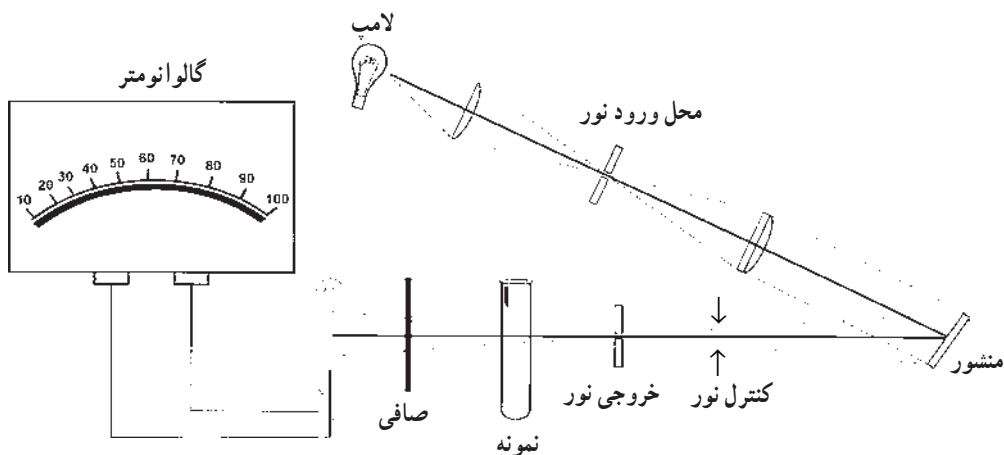
برابر ۲۲۰ عدد باشد، تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر برابر خواهد بود با $220 \times 10^8 = 2/2 \times 10^8$

اگر ۲۲۰ عدد پرگنه در پلیتی که ۱/۰ میلی‌لیتر از رقت $\frac{1}{1/000/000}$ شمرده شود، نتیجه به‌دست‌آمده

از محاسبه بالا، باید در ۱۰ نیز ضرب شود تا تعداد باکتری در ۱/۰ میلی‌لیتر به یک میلی‌لیتر تبدیل شود

($2/2 \times 10^9$). اگر تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر ۲۲۷۰۰۰۰۰۰ عدد باشد آن را ۲۳۰۰۰۰۰۰۰ عدد

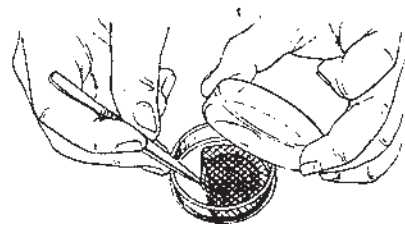
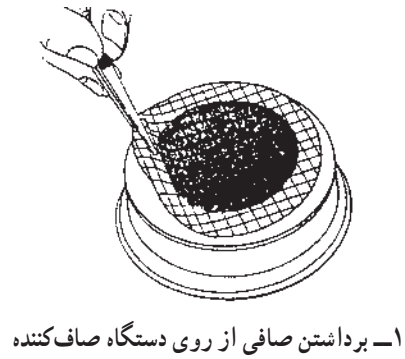
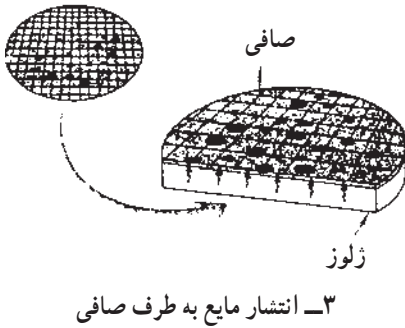
و یا $2/3 \times 10^8$ عدد ثبت کنید.



شکل ۱۶-۲- شماتیک اسپکتروفوتومتر

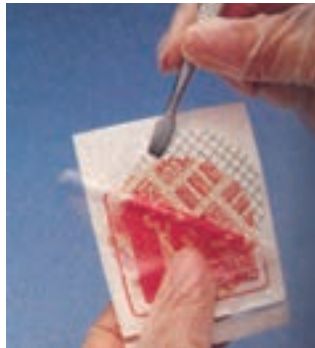
۳-۲۰-۲- شمارش باکتری‌ها به کمک کاغذ صافی: کاغذهای صافی مخصوص

میکروب‌شناسی در صنعت ساخته شده‌اند که به دلیل داشتن منافذ بسیار ریز، میکروب‌ها را در خود نگه می‌دارند. از این کاغذ صافی‌ها برای سترون کردن مایعات و محلول‌های مختلف حساس به حرارت استفاده می‌شود. برخی از کارخانه‌های سازنده وسایل آزمایشگاهی نوعی از این کاغذها با قیف‌های مخصوصی که در برابر حرارت مقاوم‌اند و قابل سترون شدن هستند برای شمارش و جستجوی باکتری‌ها در آب و فرآورده‌های دارویی ساخته‌اند و حتی بعضی از سازندگان، ظروف پتری مخصوصی را که قطر آن‌ها متناسب با کاغذهای صافی است و محیط‌های کشت آماده در آمپول‌های کوچک برای یک بار کشت و حتی گرم‌خانه‌های کوچک که با برق اتومبیل و یا با باتری کار می‌کنند برای عملیات صحرائی تهیه و عرضه کرده‌اند از این صافی‌ها برای جستجو و شمارش میکروب‌ها در آب آشامیدنی و دیگر آشامیدنی‌هایی که تعداد باکتری‌های آن‌ها کم است و لازم است که حجم زیادی از نمونه برای شمارش و جستجوی باکتری به کار رود استفاده می‌شود، به این ترتیب که مقدار کافی مثلاً یک لیتر آب و یا نمونه مایع، از صافی عبور داده می‌شود تا کلیه باکتری‌های موجود در آن حجم در منافذ کاغذ به دام بیفتند. سپس کاغذ صافی روی محیط کشت جامد قرار داده می‌شود، در صورت لزوم ممکن است روی آن نیز با یک لایه نازک از محیط کشت مذاب که حرارت آن کمتر از ۴۵ درجه سانتی‌گراد است پوشانده شود. سپس این ظرف، در گرم‌خانه گذارده شده پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تعداد پرگنه‌های مورد نظر شمارش می‌شود.



شکل ۱۷-۲- نمایش شمارش میکروارگانسیم ها به کمک صافی

اگر منظور فقط جستجوی یک نوع میکروب، مثلاً سالمونلا در یک آشامیدنی مانند آب یا شربت دیگر باشد می توان حجم مناسبی از نمونه را از کاغذ صافی گذراند، سپس کاغذ صافی را در محیط کشت مایع قرار داد و پس از گرم خانه گذاری، از آن محیط برای جستجو و تشخیص میکروب مورد نظر استفاده نمود. از این روش در کارخانه های داروسازی برای کنترل سترونی محلول های دارویی مانند محلول های تزریقی استفاده می شود. هم چنین این روش، در بهداشت محیط و کنترل آب و فاضلاب و بررسی های همه گیرشناسی، بسیار ارزشمند می باشد.



شکل ۱۸-۲- نمونه ای از صافی مدرج جهت شمارش میکروارگانسیم ها

۴-۲۰-۲- روش شمارش مستقیم: از این روش به دلیل سرعت زیاد، می‌توان در موارد فوری مانند تحویل گرفتن شیر و یا موارد فوری دیگر استفاده نمود. البته دقت این روش به مراتب از روش قبلی کمتر است. در روش شمارش مستقیم، می‌توان از لام‌های مخصوص نئوبار^۱ و یا لام‌توما^۲ که معمولاً برای شمارش گلبول‌های خون به کار می‌رود استفاده نمود. بدین ترتیب که نمونه مورد آزمایش به نسبت‌های معینی با آب مقطر و یا سرم فیزیولوژی و یا هر رقیق‌کننده مناسب دیگر، رقیق می‌شود. (برای بهتر دیدن میکروارگانیسم‌ها، مواد رنگی مانند آبی متیلن و یا یوبله ژانینی و یا رنگ دیگری به مایع رقیق‌کننده افزوده می‌شود) سپس از محلول تهیه شده، روی لام‌توما ریخته و یک لامل سنگینی روی آن قرار می‌دهند. پس از چند دقیقه با عدسی ۴۰ میکروسکوپ میکروارگانیسم‌ها در حجم معینی (سانتی‌متر مکعب) شمارش می‌شوند.

خودآزمایی

- ۱- تفاوت‌های استافیلوکوک‌ها و کوکسی‌ها را توضیح دهید.
 - ۲- واژه‌های زیر را تعریف کنید.
اسپریل، پروتوپلاست، مرحله رشد لگاریتمی، باکتری‌های مزوفیل، فتواتوتروف.
 - ۳- تمام یون‌های فلزی مورد نیاز را می‌توان به شکل ... به‌عنوان غذا در اختیار میکروارگانیسم‌ها قرار داد.
 - ۴- تقسیم دوتایی باکتری‌ها را توضیح دهید.
 - ۵- مراحل مختلف اسپور در باکتری‌ها را شرح دهید. (به‌طور مختصر)
 - ۶- نحوه انتقال بیماری سی-آر-دی چگونه است؟
 - ۷- علائم بیماری سل در دام‌ها را نام ببرید.
 - ۸- تشعشعات یونیزه‌کننده را نام ببرید.
 - ۹- محیط‌های کشت نیمه جامد را شرح دهید.
-