

به نام خدا



دستور کار آزمایشگاه مبانی میکروبی

ترم اول سال تحصیلی ۱۴۰۳-۱۴۰۴

جلسه چهارم :

کشت باکتری ها و آشنایی با مشخصات کلنی میکروارگانیسم ها

تعریف کشت :

هنگامی که باکتری ها در شرایط مناسبی قرار گیرند که قادر به تکثیر و رشد باشند، اصطلاحاً گفته می شود که باکتری کشت داده شده است. کشت و تکثیر باکتری ها در محیط های مصنوعی، از مهمترین روش های تشخیصی در باکتری شناسی است. هدف از کشت باکتری، به دست آوردن کلونی تک می باشد. در تمامی روش های کشت، رعایت شرایط استریل (آسپتیک) بسیار اهمیت دارد و دلیل آن اینست که اولاً شرایط استریل، مانع از آلودگی فرد آزمایشگر به میکروب می شود و ثانياً مانع از آلودگی باکتری مورد نظر به وسیله ی فرد آزمایشگر و سایر آلوده کننده های محیط می گردد. در آزمایشگاه میکروبیولوژی، محیط اطراف چراغ بونزن، استریل و فاقد هرگونه آلوده کننده ی میکروبی می باشد.

استفاده از معرف های رنگی در محیط های کشت :

برای کمک به تشخیص تغییرات اسیدی یا قلیایی (pH) که هنگام رشد میکروارگانیسم ها اتفاق می افتد، می توان به محیط های کشت معرف های رنگی مناسب افزود. در جدول زیر، برخی از رنگ های مورد استفاده به همراه تغییرات رنگی آنها آمده است.

تغییرات رنگ		گستره (pH)	رنگ
قلیایی	اسیدی		
ارغوانی	زرد	۵/۲-۶/۸	بروموکرزول ارغوانی
آبی	زرد	۶/۰-۷/۶	بروموتیمول بلو
قرمز	زرد	۶/۸-۸/۴	قرمز فنول
قرمز	زرد	۷/۲-۸/۸	قرمز کرزول
زرد	زرد	۶/۸-۸/۰	قرمز خنثی

انواع کشت باکتری^۱:

الف) کشت باکتری در محیط مایع (براث)

ب) کشت باکتری در محیط کشت جامد (آگار)

الف) روش کشت باکتری در محیط کشت مایع: این روش شامل مراحل زیر است:

- ۱- یک لوپ سرسوزنی (آنس) را برداشته و آن را در دست راست بگیرید. لوپ را روی شعله کاملاً استریل نمایید و بگذارید تا سرد شود.
- ۲- محیط حاوی باکتری (لوله یا پلیت) را در دست چپ بگیرید و درب آن را با دست راست در کنار شعله باز کنید. دقت کنید که درب محیط کشت را روی میزکار خود نگذارید.
- ۳- اگر محیط کشت در لوله است، دهانه‌ی آن را چندبار از روی شعله عبور دهید تا استریل شود. همچنین درب لوله را بیش از حد باز نگه ندارید.
- ۴- نوک آنس را وارد محیط کرده و یک لوپ از آن را بردارید.
- ۵- دهانه‌ی لوله را مجدداً با شعله استریل کرده و درب آن را بگذارید و محیط کشت را در جای خود قرار دهید.
- ۶- لوله حاوی محیط کشت جدید را در دست چپ بگیرید و نوک لوپ آلوده به باکتری مورد نظر را داخل محیط فرو برده و به آرامی تکان دهید تا باکتری‌ها در محیط پخش شوند.
- ۷- در صورتی که میکروب را از پلیت (محیط کشت جامد) برمی‌دارید، با نوک لوپ کمی از پرگنه را برداشته و با رعایت موارد گفته شده، آن را داخل محیط مایع فرو برده و به آرامی هم بزنید تا همگن شود.
- ۸- دهانه لوله حاوی محیط کشت جدید را با شعله استریل کرده و درب آنرا بگذارید و آنرا در داخل انکوباتور قرار دهید.
- ۹- نوک لوپ را مجدداً با شعله استریل کرده و در جای خود قرار دهید.

¹ Bacterial Culture

(ب) روش کشت باکتری در محیط جامد: محیط کشت جامد به ۲ صورت وجود دارد:

(۱) محیط کشت جامد در لوله (۲) محیط کشت جامد در پلیت

(۱) کشت در لوله: محیط کشت در لوله به ۲ صورت عمودی و شیبدار دیده می‌شود که هر کدام از آنها روش کشت مخصوصی دارند.

۱-۱- کشت‌های عمودی (عمقی)^۲:

حدود ۵ الی ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت آگاردار (جامد) را با حفظ شرایط استریل، در حالت مذاب داخل لوله‌های آزمایش استریل ریخته و آن را به حالت عمودی در یک جای ساکن قرار دهید تا سرد شود. با لوپ نوک تیز (سوزنی) استریل شده در کنار شعله از پرگنه باکتری مقداری را برداشته و آن را به صورت عمودی در مرکز محیط جامد تا انتها فرو برده و بدون هیچ گونه تغییر حالتی، آن را از همان مسیر خارج کنید. سپس لوله را در انکوباتور قرار دهید. این روش کشت دارای خصوصیتی می‌باشد: هنگامی که نوک لوپ را در محیط فرو می‌برید، در ابتدای ورود لوپ به محیط، تراکم باکتری زیاد است و به تدریج که به عمق محیط فرو می‌رود، از تعداد باکتری‌ها کاسته می‌شود. به انتهای لوله که می‌رسد تراکم باکتری‌ها به حداقل می‌رسد. همچنین در انتهای محیط کشت لوله‌ای، اکسیژن کمتر از قسمت سطحی آن است و باکتری‌های وارد شده به محیط، براساس نیاز به اکسیژن (هوازی یا بی هوازی بودن) رشد متفاوتی دارند.

۱-۲- کشت شیب دار^۳:

حدود ۵ میلی لیتر از محیط کشت جامد (ذوب شده) در لوله آزمایش و یا لوله‌های کوچک دیگر ریخته می‌شود و پس از استریل کردن، آن‌ها را به صورت کج به گونه‌ای می‌خوابانند که سطح محیط کشت شیبدار باشد. با لوپ نوک تیز با حفظ شرایط استریل، از پرگنه‌های باکتری برداشته و در کنار شعله، نوک لوپ را ابتدا به صورت عمودی وارد قسمت عمودی محیط کشت کرده و بعد به آرامی آن را از همان مسیر خارج نموده و بدون اینکه نوک لوپ از محیط جدا شود، آن را به حالت زیگزاگ روی سطح شیبدار بکشید. همچنین می‌توانید به وسیله از طریق لوپ با انتهای حلقه‌ای فقط در سطح شیب‌دار عمل کشت را انجام دهید.

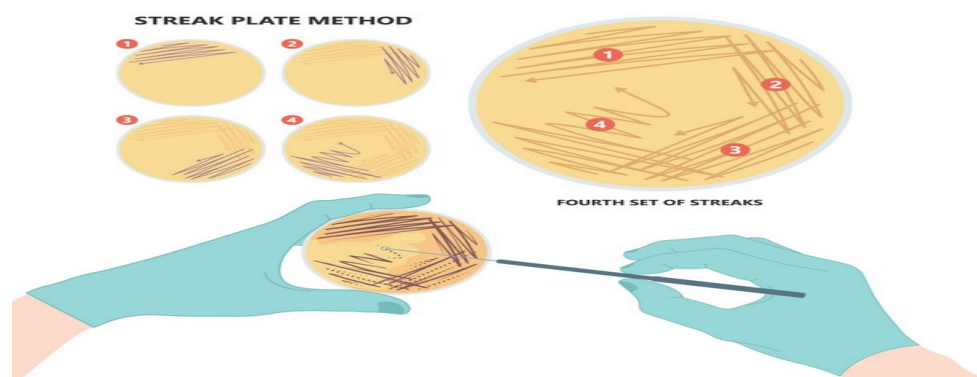
^۲ Stab Cultures

^۳ Slant Cultures

۲: کشت در پلیت: کشت در پلیت به سه روش قابل انجام است:

۱-۲: کشت خطی چهار مرحله‌ای:

با این روش می‌توان باکتری‌ها را به طور خطی توسط لوپ با نوک حلقه‌ای در سطح محیط جامد کشت داد. روش کار بدین صورت است که ابتدا به طور ذهنی و یا با مائیک، پلیت را به ۴ قسمت تقسیم کنید. در قسمت اول، نوک لوپ را که محتوی پرگنه باکتری است، به صورت خط‌های موازی کشیده و دوباره لوپ را روی شعله بگیرید. سپس خطوط را در منطقه دوم از انتهای خط انتهایی منطقه اول در جهت دیگر ادامه دهید و در منطقه سوم و چهارم نیز به همین صورت عمل کنید. سپس خطوط را در منطقه‌ی دوم از انتهای خط انتهایی منطقه‌ی اول در جهت دیگر ادامه دهید و در منطقه سوم و چهارم نیز به همین صورت عمل کنید. برای سهولت کار می‌توان پلیت را بعد از هر کشت در یک ناحیه، روی دست خلاف عقربه‌های ساعت چرخاند.



خصوصیت این روش اینست که وقتی خطوط موازی را روی سطح محیط می‌کشیم، به ترتیب از تراکم باکتری‌ها کاسته می‌شود و به انتهای خط که می‌رسیم تراکم باکتری کمتر است و در منطقه‌ی دیگر، وقتی از انتهای خط قبلی منطقه قبلی استفاده می‌کنیم، در واقع تراکم بسیار کمتر از تراکم باکتری‌ها در ابتدا می‌باشد و در نتیجه در مناطق دیگر هم به ترتیب از تعداد باکتری‌ها کاسته می‌شود تا جایی که در منطقه چهارم، می‌توانیم پرگنه‌های تکی داشته باشیم که کلنی خالص نامیده می‌شوند. بنابراین انجام درست کشت خطی، منجر به ایجاد کلنی خاص می‌شود. باکتری‌های منفرد را باکتری‌های مادر می‌نامند که این باکتری‌ها، پس از کشت خطی و جداسدن سلول‌های باکتری از یکدیگر به وجود می‌آیند.

نکته ۱: دلیل استریل کردن متوالی لوپ کشت بین قسمت‌های مختلف پلیت اینست که باکتری‌های باقی مانده روی لوپ از بین بروند و بدین ترتیب، تراکم باکتری‌ها برای کشت در مناطق بعدی، به تدریج کاهش یابد.

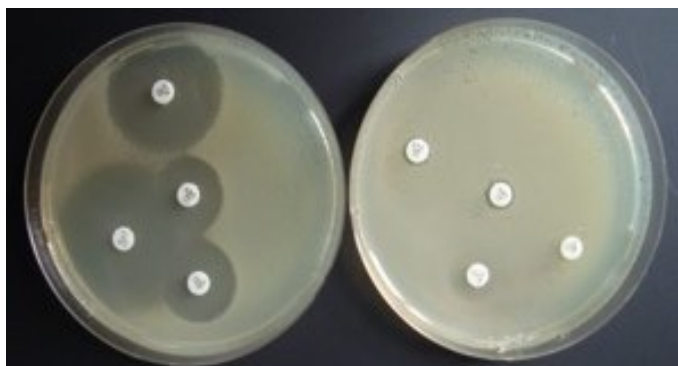
نکته ۲: عمل کشت روی سطح را به آرامی انجام دهید به طوری که لوپ فقط در سطح کشت حرکت کند و در محیط کشت، شیار و شکاف ایجاد نکند.

۲-۲: کشت در سطح محیط (کشت سطحی):

این روش کشت بیشتر برای برداشت و کشت از نمونه حاصل از محیط‌های مایع میکروبی کاربرد دارد و یا اگر محیط مایعی مانند شیر مشکوک به آلودگی میکروبی باشد، می‌توان آن را به این روش کشت داده و میکروارگانیسم‌های موجود در آن را مشخص نمود. برای اینکار ابتدا رقت معینی از محیط تهیه نمایید. سپس با استفاده از پی‌پت استریل، مقدار مشخصی از آن رقت را برداشته، در سطح جامد ریخته و توسط میله‌ی پخش کننده یا نوک لوپ پخش نمایید. بعد از انکوباسیون می‌توانید کلنی‌های رشد یافته در سطح محیط کشت را مشاهده کنید. توجه داشته باشید که هنگام انجام کشت سطحی باید سطح محیط کشت خشک باشد.

۲-۳: کشت چمنی یا کشت یکنواخت سطحی:

بیشتر برای آنتی‌بیوگرام و سنجش هاله عدم رشد اطراف مواد مهارکننده رشد استفاده می‌شود. در این روش بیش‌تر از سوآپ یا پیپت پاستور شیشه‌ای برای پخش یکنواخت باکتری استفاده می‌شود. اگر کشت اولیه باکتری به صورت مایع باشد، می‌توان با سمپلر نمونه‌ی مایع را روی محیط کشت جامد ریخت و بعد با یک پخش کننده (Spreader) استریل، سوسپانسیون را همه جای محیط کشت پخش کرد. بعد نمونه را در انکوباتور به مدت یک شبانه روز قرار می‌دهیم.



مواد و وسایل مورد نیاز جهت کشت های جامد و مایع :

چراغ الکلی یا گازی، پیپت پاستور یا سواپ جهت کشت چمنی، لوپ سوزنی و حلقه ای جهت کشت خطی، محیط کشتهای آماده شده (نوترینت آگار، نوترینت براث، مولر هینتون آگار)



فکر کنید (۶) :

۱. بهترین نوع کشت جهت بدست آوردن تک کلونهای مربوط به باکتری مادر کدام است؟
۲. کشت خطی چهار مرحله ای دلیل تماس خطوط هر مرحله با مرحله قبل چیست؟ تعداد دفعات استریل کردن لوپ را بیان کرده و علت آن را بنویسید؟

آموزش نحوه کشت خطی باکتری به صورت تصویری : کشت یک

چهارم

