آزمایشگاه میکروبیولوژی عمومی

تالیف:
مهرنوش تنگستانی

فهرست موضوعی:

اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

آشنایی با وسایل و ابزار کار آزمایشگاه میکروب شناسی

استریلیزاسیون در آزمایشگاه

استریلیزاسیون توسط دستگاه اتوکلاو

محیط های کشت باکتریایی

انواع تقسیم بندی محیط های کشت

آماده سازی واستریل کردن محیطهای کشت میکروبی

کشت باکتری

تهیه رقت یا رقیق کردن نمونه (Serial Dilution)

آزمایش مستقیم نمونه ها

رنگ آمیزی گرم Gram Staining

رنگ آمیزی کپسول (رنگ امیزی منفی یا زمینه سیاه)

رنگ آمیزی اسید فاست (روش زیل نیلسون)

رنگ آمیزی اسپور

رنگ آمیزی کپکها

اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

همچون هر محیط دیگری با ورود به آزمایشگاه میکروبیولوژی و آغاز کار در این محیط لازم است یک سری اصول اولیه مورد توجه قرار گیرند. بخشی از این اصول و قواعد مربوط به ایمنی فرد آزمایش کننده بوده و برخی نیز به ایمنی محیط و ابزار آزمایشگاه مربوط می باشند. برخی از این موارد در آزمایشگاه های دیگر به ویژه آزمایشگاه های شیمی نیز مورد توجه بوده و برخی مختص کارهای میکروبی می باشند. در ادامه مهمترین این اصول آورده شده اند :

۱ -هنگام ورود کیف، کتاب و کلیه لوازم غیر ضروری در محل تعیین شده قرار داده شوند و هرگز نباید آنها را روی میز آزمایشگاه (bench) قرار داد.

۲ -هنگام ورود و قبل از خروج از آزمایشگاه، دست-ها با یک شوینده مایع شسته و با دستمال کاغذی خشک شوند.

۳ -بستن و یا پوشاندن موهای بلند در آزمایشگاه ضروری است.

۴ -در هنگام کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی باید روپوش مخصوص با دکمه های بسته بر تن داشت.

۵ -هرگز نباید با روپوش کار میکروبیولوژی از آزمایشگاه خارج شد.

۶ -در آزمایشگاه همواره باید از کفش های بسته استفاده کرد و از پوشیدن صندل خودداری نمود.

۷ -در محیط آزمایشگاه از وسایل زینتی و نیز لنز چشمی استفاده نشود.

۸ -از نوشیدن، خوردن و یا سیگار کشیدن در آزمایشگاه میکروبیولوژی به شدت پرهیز شود.

۹ -پیش از آغاز و پس از پایان آزمایش سطح میز باید با محلول ضدعفونی کننده مناسب ضدعفونی شود.

۱۰ -هرگز محیطهای کشت، وسایل و به ویژه کشتهای باکتریایی از آزمایشگاه خارج نشوند.

۱۱ -درطی انجام آزمایش درها و پنجره ها بسته نگه داشته شوند تا از ورود میکروارگانیسمها توسط هوا و آلوده شدن کشتها جلوگیری شود.

۱۲ -بریدگی ها یا سوختگی های اتفاقی به سرعت به مربی آزمایشگاه اطلاع داده شوند.

۱۳ -هر شخصی که در آزمایشگاه میکروبیولوژی کار می کند باید از محل دقیق جعبه کمکهای اولیه، کپسول آتش نشانی و دوش ایمنی در آزمایشگاه اطلاع داشته باشد و نحوه استفاده از هر یک را نیز بداند.

۱۴ -هرگز کشت مایع و یا مواد شیمیایی را نباید با استفاده از دهان پیپت کرد بلکه باید به کمک وسایل مکانیکی تهیه شده بدین منظور صورت گیرد.

۱۵ -انتقال کشت های میکروبی در آزمایشگاه و همینطور زمانی که مورد نیاز نیستند باید در رَک (rack) مخصوص صورت گیرد.

۱۶ -درصورت بیرون ریختن و یا شکستن کشت های میکروبی باید به سرعت روی آن ها را با دستمال کاغذی یا کاغذ صافی پوشاند و سپس با محلول ضدعفونی کننده آن ها را ضدعفونی کرد. پس از حدود 15 دقیقه کاغذ صافیها برداشته شده و به روشی که توسط مربی آزمایشگاه توصیه میشود دور انداخته شوند.

۱۷ - اطلاعات مربوط به کشتهای میکروبی (نام کشت و تاریخ) توسط برچسب یا ماژیک بر روی ظروف کشت مشخص شود.

۱۸ -در محیط آزمایشگاه آهسته صحبت شود و از حرکت غیرضروری خودداری شود تا از پرت شدن حواس دیگران که منجر به اتفاقات ناخواسته میشود جلوگیری گردد.

۱۹ -در زمان کار با کشت قارچها باید علاوه بر دقت به سرعت نیز توجه کرد تا انتشار اسپورهای آنها در محیط آزمایشگاه به حداقل برسد.

۲۰ -پس از اتمام هر جلسه آزمایشگاه تمامی کشتها و مواد در محل یا ظرف مخصوص قرار داده شوند.

۲۱ -وسایل آلوده شده (از قبیل لوپ ها، نیدل ها و پیپت های تلقیح) هرگز روی سطح میز قرار داده نشود.

- لوپ ها و نیدل ها باید با استفاده از حرارت شعله استریل شوند.
- پیپت های آلوده باید در ظرف مخصوص خود قرار داده شوند.

آشنایی با وسایل و ابزار کار آزمایشگاه میکروب شناسی

مواد و ابزارهایی که در یک آزمایشگاه میکروبیولوژی برای آزمایش های عمومی و مقدماتی وجود دارند عبارتند از:

1- مواد شیمیایی: شامل انواع نمک های معدنی، مواد الی، حلال های مختلف ، اسید و باز ها، محلول های معرف و رنگ ها، روغن ها و مواردی از این نوع می باشد.

2- محیط های کشت: شامل پودر انواعی از محیط های کشت بوده که برای رشد دادن گروه ها میکروبی استفاده می شوند مانند نوترینت آگار، نوترینت براث، لاکتوز براث و غیره

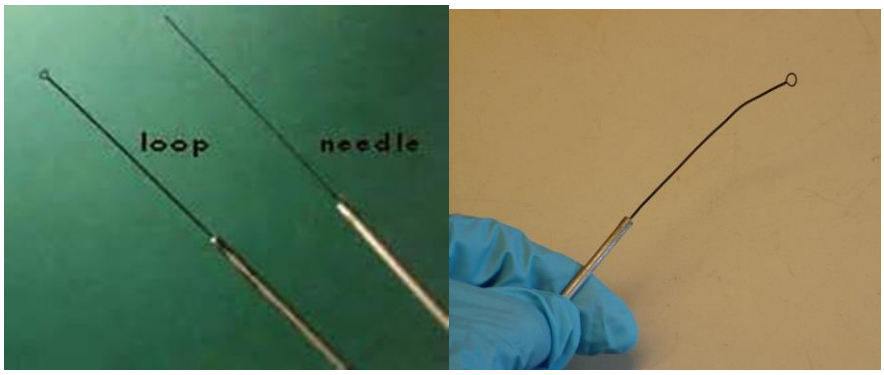
3- شیشه آلات :(glassware) شامل انواعی از وسایل شیشه ای که در برخی آزمایشگاه های دیگر و به ویژه در آزمایشگاه شیمی هم استفاده می شود از جمله انواع پیپت ها، ارلن مایر، بالن ژوژه، استوانه مدرج (مزور)، قیف شیشه ای، ظروف شیشه ای درپیچ دار، انواع لوله های آزمایش. همچنین برخی ابزارهای شیشه ای مخصوص استفاده در آزمایشگاه میکروبیولوژی هستند مثل ظروف پتری (Petri dishes) یا همان پلیت های شیشه ای.

4- ابزارهای انتقال کشت: وسایلی هستند که برای انتقال دادن کشت های میکروبی از محیط قدیمی به محیط جدید از آن ها استفاده می شود مانند لوپ میکروبیولوژی (فیلدوپلاتین)، نیدل (آنس)، پیپت مدرج، پیپت پاستور، سمپلر و سرسمپلر

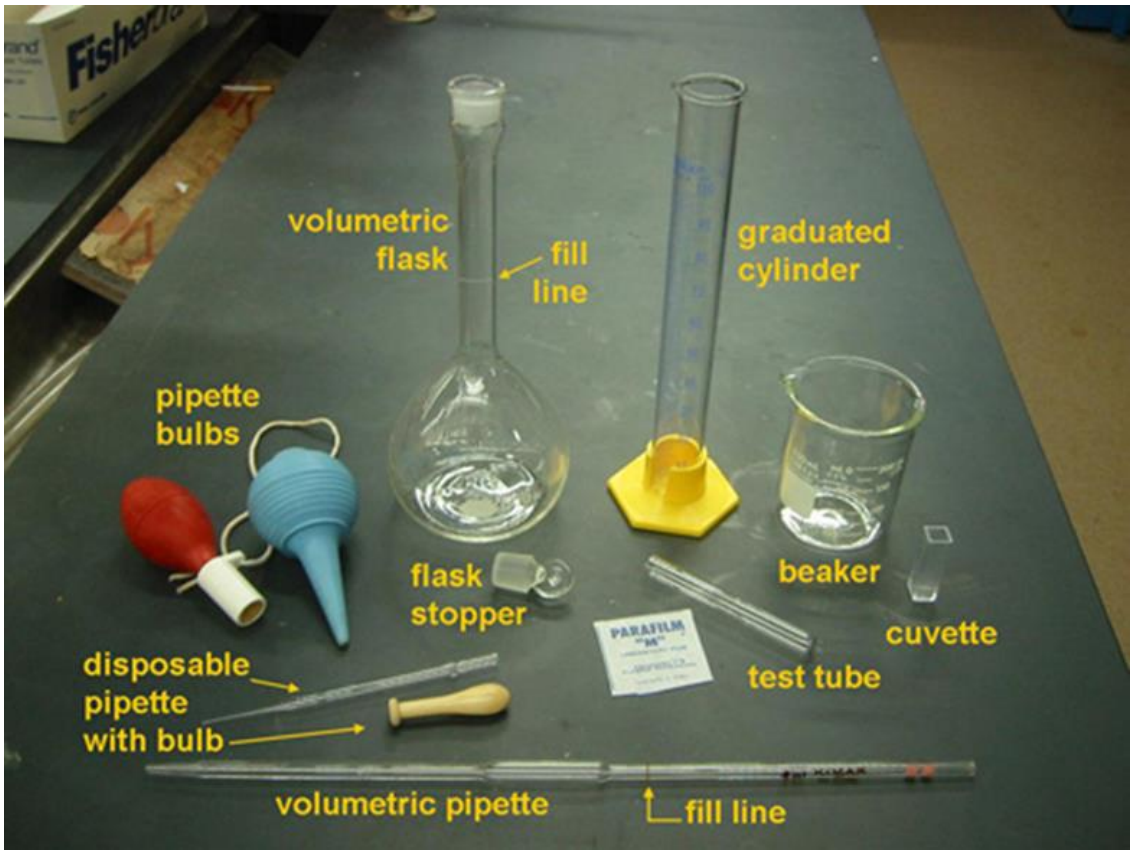
5- وسایل متفرقه: وسایلی مثل جالوله ای، پوآر (مکنده لاستیکی)، پوآر شارژی، شعله و کپسول گاز (درصورت نیاز) و غیره

6- وسایل و تجهیزات تخصصی میکروبیولوژی: میکروسکوپ ، اتوکلاو، فور (آون)، هود لامینار، کلنی کانتر، انکوباتور، شیکر، انکوباتور شیکردار، ورتکس، اسپکتروفتومتر، سانتریفیوژ، جار بی هوازی و غیره

آنس (فلیدوپلاتین) : وسیله ایست که از یک میله به طول 4 سانتی متر ساخته شده است و دارای سر و دسته می باشد. جنس سر آن از پلاتین یل کروم است. اگر چنانچه سر آن به صورت حلقه باشد به آن فیلدو پلاتین حلقوی (Loop) گفته می شود که از این وسیله برای کشت دادن باکتری ها در محیط های مختلف و یا برای انتقال مقداری از کلنی باکتری از یک محیط کشت به محیط کشت دیگر استفاده می شود. اگر سر فیلدوپلاتین نوک تیز باشد به آن فیلدوپلاتین سوزنی (Once) گفته می شود که از آن برای انتقال دادن باکتری ها و همچنین کشت دادن باکتری ها در محیط کشت های لوله ای استفاده می شود. در آزمایشگاه سر فیلدوپلاتین را پیش از کشت، روی شعله استریل و سپس سرد می کنند و بعد نمونه برداری و کشت باکتری را انجام می دهند.



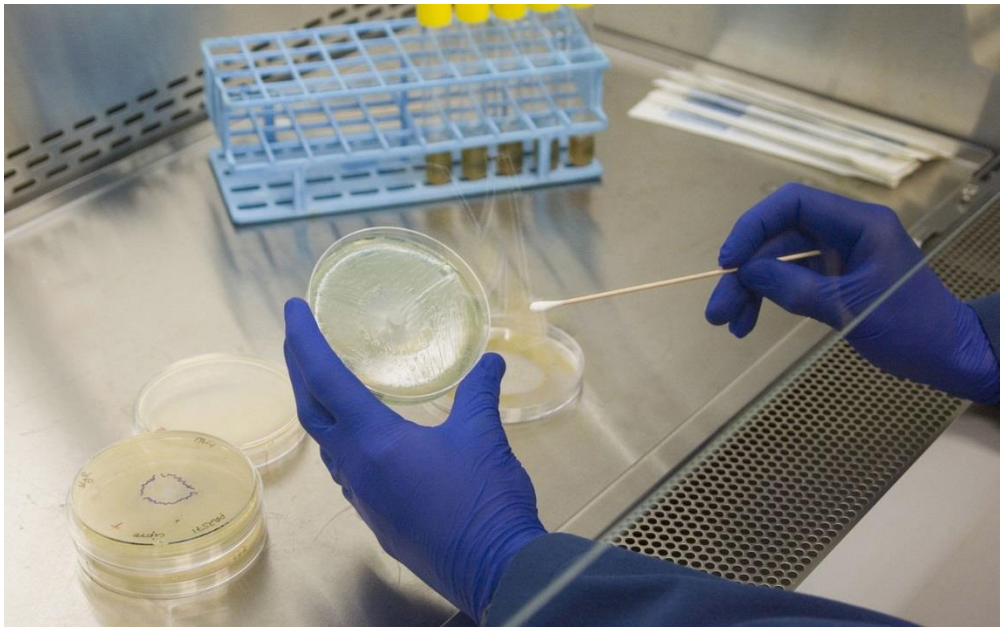
پیپت (Pipette) : یکی از وسایل شیشه ای یا پلاستیکی مفید در میکروب شناسی، پیپت است که برای انتقال مقدار معینی مایع از محیطی به محیط دیگر به کار می رود. مایع برای جلوگیری از آلودگی به وسیله پیپت منتقل می شود. پیپت لوله ای مدرجی است که نوک باریکی دارد. در طرف دیگر قسمت دهانی است که با مکش توسط **پوار** یا مکنده، مایع به داخل پیپت کشیده می شود. با کنترل پیپت توسط انگشت نشانه میتوان مقدار لازم از محلول مورد نظر را برداشت. پیپت ها در سایز ها و شکلهای متفاوت در ازمایشگاه کاربرد دارند.



پیپت اتوماتیک یا سمپلر : پیپتی بسیار حساس و دقیق می باشد که دارای تنظیمی در قسمت فوقانی خود می باشد که می تواند از 0.001 میلی لیتریک میلی لیتر یا بیشتر تنظیم شود. این دستگاه دارای سرهای پلاستیکی مجزا و یکبار مصرف می باشد که برای برداشتن مواد از آنها استفاده می شود و سر سمپلر نام دارند .

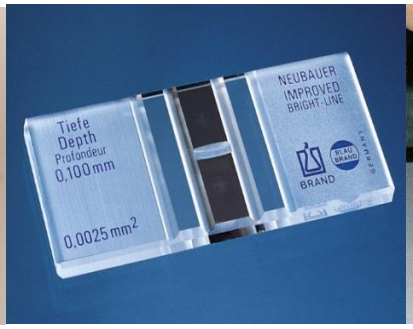
لوله های کشت (Culture tubes) : انواعی از لوله های آزمایش در آزمایشگاه میکروب شناسی مورد استفاده قرار می گیرد. یکی از آنها لوله آزمایش معمولی است که زیاد مورد استفاده قرار می گیرد، این لوله ها برای رشد و تکثیر میکروارگانیسم ها در محیط کشت مصنوعی (جامد یا مایع) بکار می رود. دهانه این لوله ها را با پنبه می بندند. دهانه بعضی از لوله ها به جای پنبه ممکن است با فلز زنگ نزن مسدود نمایند. برای بعضی لوله ها آزمایش، از درپیچ های لاستیکی و پلاستیکی استفاده می شود.

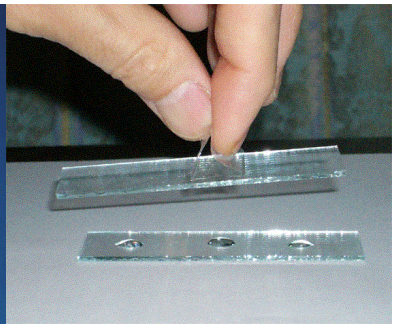
پتری دیش(Plate) : ظروف شیشه ای درب داری هستند که در انها محیط کشت باکتری ریخته می شود و پس از جامد شدن محیط، از انها برای کشت دادن باکتریها استفاده می شود. پلیت ها ممکن است پلاستیکی (یکبار مصرف) و یا شیشه ای (با مصرف مجدد) و در ابعاد متنوع ساخته شوند. محیط مذاب در پلیت ها سرد میشود و به صورت جامد در میاید که دارای سطح وسیع برای کشت میکروبها می باشند. پلیت ها پس از کشت به صورت وارونه انکوبه می شوند. این عمل از جمع شدن آب در محیط کشت و پخش شدن کلنی ها پیشگیری می کند.



سوآب (Swab): وسیله ای چوبی شبیه گوش پاک کن بلند که در یک سر دارای پنبه جهت نمونه برداری می باشد. بیشتر در آزمایشگاه تشخیص پزشکی جهت نمونه برداری از نمونه های زخم، ترشح و ... کاربرد دارد. سو آب ها قبل از نمونه برداری باید استریل شوند.

لام یا اسلاید (Slide) : در کارهای میکروب شناسی لام های مختلفی مورد استفاده قرار می گیرد. ساده ترین نوع لام از جنس شیشه و صاف است، که جهت رنگ آمیزی باکتری ها استفاده می شود. نوع دیگری از لام وجود دارد که دارای یه قسمت گود است و به آن لام گوده دار می گویند که برای دیدن باکتری های زنده به کار می رود. لام دیگری به نام لام شمارش وجود دارد که در قسمت وسط دارای مربعی است به ضلع یک میلی متر با تقسیمات 12تایی به عمق یک میلی متر، این لام نئوبار نام دارد و برای شمارش باکتری و گلبول های سفید و قرمز خون و یا شمارش میکروارگانیسم های کوچک در حجم مشخصی مورد استفاده قرار می گیرد و به نام لام نئوبار موجود است .





فور (Oven): دستگاهی شبیه فر های اشپزخانه است که با تنظیم حرارت در این دستگاه، پس از 2 ساعت وسایل استریل می شود. فور برای استریل کردن پلیت های شیشه ای، پیپت ها، لوله های آزمایش، لوازم دندانپزشکی کاربرد دارد.

انکوباتور (Incubator): دستگاهی است که درجه حرارت مناسب رشد، تکثیر و تشکیل کلنی را فراهم می کند . درجه حرارت آن قابل کنترل میباشد (حداکثر 60 تا 80 درجه سانتیگراد). چون اکثر باکتری های پاتوژن معمولا در درجه حرارتی تقریبا برابر دمای بدن انسان 37یعنی درجه سانتی گراد رشد میکنند، معمولا دمای انکوباتور در ازمایشگاه ها روی 37 درجه تنظیم می شود.

اتوکلاو (Autoclave) : این دستگاه ساختاری شیبه دیگ زودپزاشپزخانه دارد. در این دستگاه از حرارت بخار و فشار استفاده می شود. با بالا رفتن حرارت دستگاه تا 121 درجه سانتی گراد و افزایش فشار1.5 اتمسفر، وسایل و نیز محیطهای کشت را طی مدت 15 دقیقه استریل می نمایند. این وسیله حرارت مرطوب ایجاد میکند و از ان برای استریل کردن محیط های کشت، وسایل عمل جراحی، حوله ها و البسه بیماران استفاده می شود.

بن ماری یا حمام آب گرم (Water bath) : وسیله ای دارای یک محفظه است که تا نیمه از آب مقطر پر میشود و توسط دکمه تنظیم دما میتوان دمای اب را تا حد جوش بالا برد. زمانی که نیاز به حرارت غیر مستقیم باشد، از این دستگاه استفاده می شود که روی درجه حرارت های گوناگون برای هدف های مورد نظر تنظیم می شود .

سانتریفیوژ (Cectrifuge) : این دستگاه طبق قانون گریز از مرکز کار می کند که برای جدا کردن دو فاز و رسوب دادن فاز سنگین تر از آن استفاده می شود. مثلا برای جداسازی سرم خون و گلبولهای قرمز

صافی (Filter) : صافی ها از جنس های گوناگون بوده و برای استریل کردن برخی از مایعات مثل ویتامین ها که ممکن است در اثر حرارت تغییر شکل یابند و نمیتوان توسط حرارت و اتوکلاو انها را استریل نمود، کاربرد دارد. سایز منافذ صافی ها و نیز ابعاد صافی ها متنوع میباشد.

استریلیزاسیون در آزمایشگاه

استریلیزیاسیون یا همان سترون سازی به معنای از بین بردن تمامی اشکال زنده در یا روی یک محیط یا ماده است. این اشکال مختلف شامل سلول های زنده باکتری ها و یوکاریوت ها، اندوسپور باکتری ها، اسپور قارچ ها، ذرات ویروسی و کوچکتر از ویروس می باشد. استریلیزاسیون فرآیندی است مطلق، بدین معنی که یک محیط یا ماده یا استریل است یا غیراستریل و اصطلاحی به صورت نیمه استریل یا تقریباً استریل وجود ندارد. استریلیزاسیون به دو صورت خشک (فور) و مرطوب (اتوکلاو) صورت میگیرد.

روش های مختلف استریلیزاسیون که در آزمایشگاه میکروبیولوژی قابل انجام می باشند را می توان در دو گروه روش های فیزیکی و شیمیایی قرار داد.

روش های فیزیکی: سوزاندن، اتوکلاو کردن، استفاده از آون (فور)، فیلتراسیون و پرتوتابی

روش های شیمیایی: استفاده از مواد شیمیایی ضدعفونی کننده و گندزدا

1- **سوزاندن**: در آزمایشگاه میکروبیولوژی پس از انجام کشت و انتقال کشت با استفاده از لوپ سیمی و یا آنس (نیدل) با گرفتن و سرخ کردن این ابزارهای کشت روی شعله آن ها را استریل می کنند.

2- **اتوکلاو کردن**: دستگاه اتوکلاو از محفظه ای تشکیل شده که در آن فشار بخار آب ، دمای مناسب برای استریل شدن محلول های مقاوم به حرارت و محیط های کشت را تأمین می کند. معمولاً برای استریل کردن موارد مذکور در این

دستگاه دمای دستگاه روی ۱۲۱ درجه سانتیگراد و زمان سنج (تایمر) روی ۱۵ دقیقه تنظیم می شود. البته در مورد برخی محلول ها از قبیل محلول های قندی و برخی مواد این دما و یا زمان بر حسب دستورالعمل های موجود متفاوت خواهد بود.

3- **استفاده از آون (فور)**: اساس این دستگاه مشابه فر آشپزخانه می باشد و در آن از حرارت خشک برای استریل کردن ظروف شیشه ای، ظروف فلزی و موارد مشابه استفاده می شود. با توجه به اینکه قدرت نفوذ حرارت خشک کمتر از حرارت مرطوب می باشد دما و زمان لازم برای استریل شدن موارد فوق در آون بیش از اتوکلاو است. برای استریل کردن در آون می توان از دمای 160 تا 170 به مدت یک تا یک و نیم ساعت استفاده کرد. البته در مورد برخی وسایل از قبیل برخی ظروف نمونه برداری که دماهای بالا سبب تغییر حالت آن ها می شود باید از دماهای پایین تر استفاده کرد و درعوض مدت زمان استریلیزاسیون را افزایش داد.

4- **فیلتر کردن**: در این روش محلول یا هوایی که قرار است استریل شود از میان یک صافی یا فیلتر عبور داده می شود. قطر منافذ این فیلتر به صورتی باید باشد که مانع عبور میکروارگانیسم ها شود. با این حال انواعی از میکروارگانیسم ها نیز وجود دارند که به دلیل کوچک بودن اندازه شان از فیلتر عبور خواهند کرد. ویروس ها و میکوپلاسماها به دلیل سایز کوچکی که دارند ، قادر به عبور از منافذ فیلتر هستند. بنابراین برخی منابع علمی روش فیلتراسیون را بیشتر به عنوان روشی برای کاهش بار میکروبی هوا و محلول های حساس به حرارت معرفی می کنند تا یک روش استریلیزاسیون. از روش فیلتراسیون در ساختار هودهای میکروبی (هود های لامینار) و نیز در فیلتر کردن محلول های حساس به حرارت همچون محلول گلوکز، آنتی بیوتیک ها، بیوتین، فنیل آلانین و غیره استفاده می شود.

5- **پرتوتابی**: در میکروبیولوژی از دو دسته پرتو ماورابنفش و گاما برای استریل کردن استفاده می شود. پرتوهای ماورابنفش به گروه پرتوهای غیریونیزه کننده تعلق دارند و با اثر اختصاصی روی DNA و ایجاد اختلال در آن سبب موتاسیون و مرگ سلول میکروبی می شوند. از پرتوهای ماورابنفش برای استریل کردن هوای آزمایشگاه و نیز فضای درونی هودهای میکروبی استفاده می شود. پرتوهای گاما به گروه پرتوهای یونیزه کننده تعلق داشته که به دلیل طول موج کوتاه، انرژی بالا و قدرت نفوذی که دارند برای استریل کردن سرنگ و ظروف آزمایشگاهی بسته بندی شده، در کارخانه های تولید ظروف آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می گیرند.

استریلیزاسیون توسط دستگاه اتوکلاو

اتوکلاو دستگاهی است که جهت سترون کردن مواد و وسائل ازمایشگاهی تحت گرما، بخار و فشار بالا، در حجم ها و اندازه های متنوع طراحی شده است. منبع گرمایی اتوکلاوها بصورت برقی یا گازی بوده و هر اتو کلاو شامل یک محفظه دوجداره بصورت یک دیگ میباشد. در پایین دیگ یک شیر تنظیم آب وجود دارد که میتوان از طریق آن آب اضافی را خارج نمود.

پس از تنظیم آب درون دیگ اتوکلاو، وسایلی را که میخواهند استریل کنند در داخل سبد فلزی مخصوص چیده و در دیگ قرار میدهند. سپس درب اتوکلاو را بسته و کاملا آن را محکم میکنند. در بالای درب دیگ، شیر تخلیه هوا قرار دارد که بعد از بستن درب اتوکلاو این شیر را باز میکنند. دستگاه را روشن کرده و دما را روی حداکثر تنظیم میکنند. آب داخل دستگاه جوش آمده و با تبخیر آن، هوای داخل دیگ از طریق شیر تخلیه هوا خارج میشود و سپس بخار شروع به خارج شدن میکند. زمانی که بخار بصورت ممتد در آمد، شیر تخلیه هوا را میبندند.

بر روی اتوکلاو یک فشارسنج قرار دارد که فشار داخل دیگ را بر حسب پوند و یا اتمسفر نشان میدهد. زمانیکه فشار به 15 پوند یا 1.5 اتمسفر رسید، درجه تنظیم دما را کم میکنیم تا عقربه فشارسنج روی 1.5 اتمسفر ثابت شود. از این لحظه زمان در نظر گرفته میشود و بعد از 15 دقیقه وسایل استریل میشوند و باید اتوکلاو را خاموش کرد.

بعضی از اتوکلاوها یک یا دو سوپاپ اطمینان دارند که بگونه ایی تنظیم شده تا زمانی که فشار از 1.5 اتمسفر بیشترشود، بخار اضافی را خارج میکند تا دیگ منفجر نشود.

بعد از خاموش کردن دستگاه، باید صبر کرد تا درجه فشار به صفر برسد سپس شیر تخلیه هوا را به آرامی باز کرده و نهایتا درب اتوکلاو را باز مینمایند.

محیط های کشت باکتریایی

برای مطالعه باکتریها باید آنها را بر روی محیطهای مناسب در شرایط فیزیکی مناسب کشت داد این محیطها شرایط شیمیایی لازم برای رشد باکتریها را فراهم میکنند. امروزه انواع زیادی از محیط های کشت میکروبی با ترکیبات متفاوت برای استفاده در آزمایشگاه های میکروبیولوژی، توسط کارخانجات بزرگ تهیه گردیده است .این محیطهای کشت اکثرا بطور پودر مصنوعی (سنتتیک) تهیه شده اند که با حل کردن مقادیر مشخصی از آن در آب مقطر و سپس استریل کردن آنها ، می توان سویه های میکروبی را در آن کشت داد.

محیط کشت (culture medium) : کشت وتکثیر باکتریها در محیطهای مصنوعی از مهمترین روشهای تشخیصی در باکتری شناسی است. برای کشت موفق باید شرایط مناسب برای رشد باکتری فراهم گردد. ازجمله این شرایط مواد غذایی، حرارت ورطوبت کافی، نمک، pH مناسب و حضور یاعدم حضوراکسیژن می باشد .
امروزه کشت باکتریها اغلب برروی محیطهای کشت مصنوعی صورت میگیرد. محیطهای کشت علاوه برتامین نیازهای غذایی وبسیاری نیازهای دیگر دارای ترکیباتی هستند که در تشخیص وشناسایی باکتریها نیزموثرند. زمانی که غلظت میکروارگانیسم کم باشد باانجام کشت تعداد باکتریها را میتوان افزایش داد. محیط کشت در واقع محلول، سوسپانسیون یا

مخلوطی است محتوی مواد غذایی (نوترینت های) مورد نیاز برای رشد میکروب هایی که قابل کشت هستند؛ با این توضیح که تعداد میکروبهایی که در طبیعت وجود دارند ولی در محیط های کشت رشد نمی کنند کم نیست!

این مواد غذایی یا اصطلاحاً نوترینت ها (nutrients) برای کشت باکتری های هتروتروف عمدتاً شامل موارد زیر هستند:

- منبع کربن (مثل انواع قندها)
- منبع نیتروژنی (مثل نمک آمونیم و یا پپتون، تریپتون و ....)
- ترکیبات نمکی (مثل NaCl و $MgSO_4.7H_2O$ و ...)
- ترکیبات ایجاد کننده حالت بافری (مثل KH_2PO_4، K_2HPO_4 و Na_2HPO_4)
- معرف های pH که با تغییر رنگ آنها میتوان به اسیدی یا قلیایی بودن محیط پی برد(مثل فِنُل رِد در محیط TSI agar)
- برخی عناصر کمیاب که به مقدار جزیی در برخی محیطهای خاص وارد می شوند (مثل نمک مولیبدن در محیط کشت تثبیت کنندگان نیتروژن)

لازم به توضیح است همه موارد فوق در همه محیط های کشت الزاماً وجود ندارند و بسته به نوع میکروب، ترکیبات موجود در محیط کشت متفاوت هستند. بااین وجود برای رشد میکروارگانیسم های هتروتروف (که منبع کربن آن ها ترکیبات آلی هستند) در محیط یک منبع کربنی لازم است. برای رشد اکثر میکروارگانیسم ها (به استثنای باکتری های تثبیت کننده نیتروژن) وجود یک منبع نیتروژنی هم در محیط ضروری است. گاهی در ساخت برخی محیط های کشت از عصاره های خاصی مانند عصاره مخمر(yeast extract) ، پپتون (peptone) و تریپتون (tryptone) نیز استفاده می شود. این ترکیبات تأمین کننده کربن و نیتروژن مورد نیاز برای رشد میکروب در محیط هستند.

انواع تقسیم بندی محیط های کشت

محیط های کشت را از جنبه های مختلف تقسیم بندی می کنند:

1- تقسیم بندی بر اساس میزان آگار در محیط

آگار ترکیبی است پلی ساکاریدی که از دیواره سلولی نوعی جلبک قرمز استخراج می شود. این پلیمر از زیرواحدهای گالاکتوز به صورت دو نوع پلیمر آگارز (agarose) و آگاروپکتین (agaropectin) ساخته شده است. این ترکیب به عنوان عامل سفت کننده (solifying agent) در محیط کشت استفاده می شود. زمانی که آگار در آب وارد شود برای حل شدن آن باید آب را به دمای 100 درجه سانتیگراد رسانید. پس از جوشاندن آب و حل شدن آگار با سرد شدن و

رسیدن دمای آن به حدود 46 درجه، آگار در محیط کشت شبکه ای ایجاد می کند که سبب جامد شدن محیط می شود.

اگر محیط کشت دارای 15 تا 20 گرم در لیتر (1.5 ٪) آگار باشد به آن محیط کشت جامد می گویند. در نامگذاری محیط کشت جامد، از کلمه آگار در انتهای نام محیط کشت استفاده می شود مثلاً نوترینت آگار (آگار مغذی)، ائوزین متیلن بلو آگار (EMB agar) ، بلاد آگار (Blood Agar) و غیره.

اگر در محیط کشت آگار وجود نداشته باشد به آن محیط کشت مایع گفته می شود که در نام محیط هم کلمه براث (broth)دیده می شود. مثال های معروف محیط کشت های مایع عبارتند از نوترینت براث (آبگوشت مغذی)، لاکتوز براث و غیره.

حالت دیگر محیط های کشت زمانی است که در یک محیط کشت مقدار آگار نسبت به محیط جامد کمتر باشد. به این نوع محیط کشت نیمه جامد (semi-solid) گفته می شود. از معروف ترین محیط های کشت نیمه جامد می توان محیط کشت SIM را نام برد.

2- تقسیم بندی بر اساس نوع کاربرد محیط کشت

بر این اساس محیط های کشت به چهار گروه عمومی، غنی کننده، انتخابی و افتراقی تقسیم بندی می شوند.

محیط های کشت عمومی (general) یا محیط کشت پایه(Basic Media)

این محیطها حداقل مقدار مواد غذایی لازم برای رشد باکتریها را دارند و مبنای تهیه انواع و اقسام محیطهای کشت می باشد. محیط هایی هستند که تقریباً تمامی باکتری ها و قارچ ها در آن ها رشد می کنند زیرا فاقد ماده ضد میکربی است. مثل نوترینت آگار، نوترینت براث، تریپتیکاز سوی آگار(TSA agar) و غیره. البته لازم به ذکر است که این به معنای رشد تمامی انواع باکتری ها روی چنین محیط هایی نیست بلکه تنها باکتری های هتروتروف قابل کشت قادر به رشد در چنین محیط هایی هستند.

محیط های کشت غنی کنند (enrichment Media) : محیطهای مقوی بوده که دارای مواد تغذیه ای زیادی نظیر ویتامین ها، لیپید ها و اسیدهای آمینه برای رشد باکتری است. بنابراین تعداد زیادی از باکتریها روی آن بخوبی رشد می کنند. این محیط ها چون غنی از مواد غذایی هستند، در روند جداسازی میکروارگانیسم ها برای افزایش تعداد آن ها در یک نمونه استفاده می شوند. به عنوان مثال در جداسازی باکتری مولد وبا یا Vibrio *Cholerae* از نمونه های آبی، نمونه قبل از تلقیح به محیط اختصاصی وارد آب پپتونه (peptone water) می شود. آب پپتونه در این مورد تعداد

این باکتری را افزایش میدهد به حدی که در رقابت با سایر باکتری ها که به تعداد زیاد در نمونه وجود دارند، مغلوب نشود و به این ترتیب به جداسازی این باکتری کمک می کند.

محیط های کشت افتراقی (differential Media) : محیط کشت تشخیصی بوده که کلنی باکتریهای مختلف روی آن را می‌توان از نظر برخی مشخصات کاملا از همدیگر متمایز می گردد. این محیط ها برای رشد باکتریهای گرم منفی روده ای (انتروباکتریاسه) مناسب هستند. چون وجود املاح صفراوی در محیط مانع از رشد باکتریهای گرم مثبت در محیط می شوند. در این محیط ها ترکیباتی وجود دارد که منجر به شناسایی گروه خاصی از میکروب ها میگردد. مثلا در محیط انتخابی مک کانکی آگار، سویه هایی که میتوانند لاکتوز را مصرف کنند کلنی قرمز و انهایی که نمیتوانند لاکتوز را مصرف کنند کلنی زرد رنگ ایجاد میکنند.

محیط های کشت اختصاصی (Special Media) : در این محیط ها امکان تشخیص بین گروه های میکروبی وجود دارد. این محیطها برای رشد باکتریهای خاصی مناسبند. از این محیطها برای جدا کردن نوع خاصی از باکتری در یک مخلوط میکربی استفاده می شود. مانند محیط SS آگار که برای جدا کردن سالمونلا و شیگلا بکار می رود یا مانیتول سالت آگار که برای تشخیص گونه بیماریزای استافیلوکوکوس اورئوس استفاده می شود.

محیط کشت انتخابی:(Selective Media) : محیط هایی وجود دارند که دارای یک ماده مهار کننده رشد می باشند این مواد رشد تمام ارگانیسم ها بجز ارگانیسم مورد نظر را مهارمی کنند مانند رنگ هایی که دارای خواص ضد میکروبی هستند، املاح صفراوی و آنتی بیوتیک ها. از آنجائیکه این محیط ها جهت ارگانیسم مورد نظر انتخاب شده اند و برای سایر ارگانیسم ها مضر می باشند آنها را محیط های انتخابی می نامند.

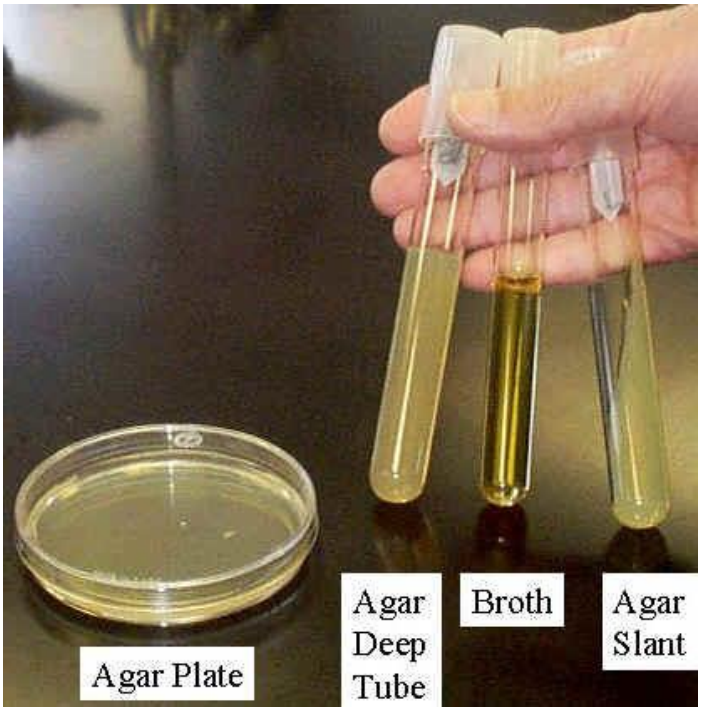
آماده سازی واستریل کردن محیطهای کشت میکروبی

برای ساختن محیط های کشت باکتری، از پودر مخصوص که در ظروفی به طور تجاری تهیه شده‌اند و قابل خریداری میباشند، استفاده می شود. در روی این ظروف ترکیب فرمولاسیون محیط بطور کامل و همچنین طرز ساخت آن توسط کمپانی تولید کننده نوشته شده است. مثلا برای ساختن نوترینت آگار ابتدا مقدار لازم از پودر آن را وزن کرده ودر مقدار معینی آب مقطر که قبلا در یک ارلن مایر یا بطری ریخته شده اضافه نموده و آنرا کاملا حل می کنند. معمولاً حجم ارلن باید دو برابر حجم محلول محیط کشت باشد که در زمان حرارت و به جوش آمدن، سرریز نگردد. آگار در 94 درجه سانتیگراد حل می‌شود، پس برای انحلال کامل آن باید محلول را تا حد جوشیدن حرارت دهیم. بهترین روش برای جلوگیری از ته گرفتن محیط کشت وانحلال بهینه، قرار دادن آن در بن ماری جوش است. حرارت دادن باید تا شفاف شدن کامل محلول ادامه یابد. پس از آن درب ارلن را با فویل آلومینیومی یا پنبه یا گاز استریل مسدود می‌نماییم وجهت استریل کردن

کامل، ارلن را در اتوکلاو قرار می‌دهیم تا در فشار 15 پوند بر اینچ مربع و حرارت 121 درجه سانتیگراد به مدت 15 دقیقه استریل شود. بعد از استریل کردن، محیط ها باید تا حدود ۴۰ تا ۴۵ درجه سانتیگراد خنک شوند. سپس محیط را در کنار شعله به پلیتهای استریل انتقال می‌دهیم به طوری که حدود دوسوم حجم پلیت را پرکند و بلافاصله درب پلیتها را می‌بندیم. پس از جامد شدن محیط کشت که چند دقیقه‌ای طول می‌کشد، محیط مذکور جهت انتقال میکروبها و کشت آنها آماده است. پلیتها را تا زمان استفاده در یخچال 4 درجه سانتی گراد نگهداری می کنند.

طرز ساختن سایر محیطهای کشت نیزهمینطور می‌باشد منتهی بعضی از محیطهای جامد پس از جوشاندن، در لوله ریخته شده و بعد استریل می‌شوند که این محیطها را پس از استریل شدن، به طور ایستاده و یا کج (slant) قرار مدهند تا سرد و سفت شوند.

برای ساختن محیط مایع (Broth) پس از جوشاندن، محیط را در لوله ها با ارلن ها تقسیم کرده و سپس با پنبه ای درب آنها را مسدود و جهت استریل داخل اتوکلاو قرار می‌دهیم. محیط های مایع همیشه داخل لوله تهیه می شوند .



کشت باکتری

هنگامی که باکتری ها در شرایطی مناسب، قرار گیرند که قادر به تکثیر و رشد باشند، اصطلاحا گفته می شود باکتری کشت داده شده است. کشت می‌تواند برای مشاهده‌ی تغییری باشد که کلنی روی محیط‌کشت افتراقی ایجاد می‌کند، یا

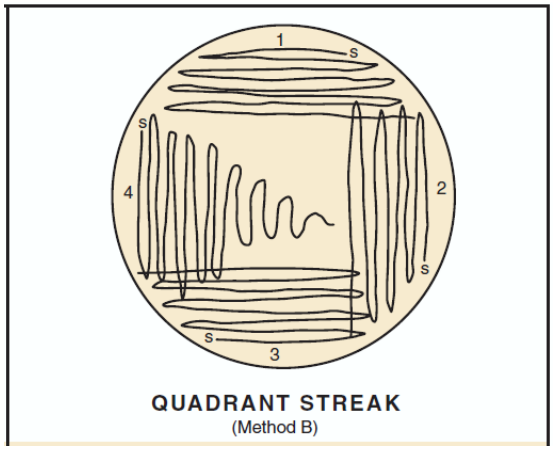
میتواند برای گرفتن کلنی تک باشد، یا تنها برای ازدیاد باکتری، تجدید کشت و نگه‌داری آن باشد. بعضی کاربرد ها برای کشت باکتریها عبارتند از:

- ایزوله کردن یا جدا کردن و خالص سازی باکتری. مثلا با جدا کردن باکتری های مولد بیماری از افراد بیمار و شناسایی عوامل بیماریزا میتوان به ماهیت بیماری پی برد و جهت درمان ان اقدام نمود.
- استفاده از کشت باکتریایی برای درمان بیماری مانند تست آنتی بیوگرام. در این تست با در دست داشتن باکتری خالص شده میتوان تاثیرآنتی بیوتیک ها و داروها را روی باکتری بررسی نمود و بر اساس نتایج حاصله انتی بیوتیک یا داروی مناسب را برای بیمار تجویز کرد.
- تهیه واکسن. با داشتن کشت های خالص باکتریها ، میتوان آنتی ژنهای آن باکتری ها را جدا کرده و از آنها برای تهیه واکسن استفاده نمود.

برای انجام کشت در محیط مایع کافی است مقداری از نمونه باکتری را به محیط کشت اضافه نماید. باکتری درمحیط مایع پس از مدت زمان لازم ، بسته به نوع میکروب ، به صورت کدورت یکنواخت ، غیریکنواخت ویا بصورت پرده ظریفی درسطح محیط کشت ظاهر میشود. در صورتیکه باکتری در محیط جامد کشت داده شود پس از مدت لازم (حدود شانزده الی هجده ساعت) ، بجز بعضی از مایکوباکترها (سه تا شش هفته)، به صورت توده هایی درسطح محیط ظاهر میشود که کلنی نامیده می شوند.

کشتِ چهارمرحله‌ای یا کشت خطی: روشی پرکاربرد می‌باشد که برای به دست آوردن تک‌کلنی و مشاهده‌ی تغییرات ناشی از رشد باکتری در محیط‌کشت (مثل همولیز) روش مناسبی است .

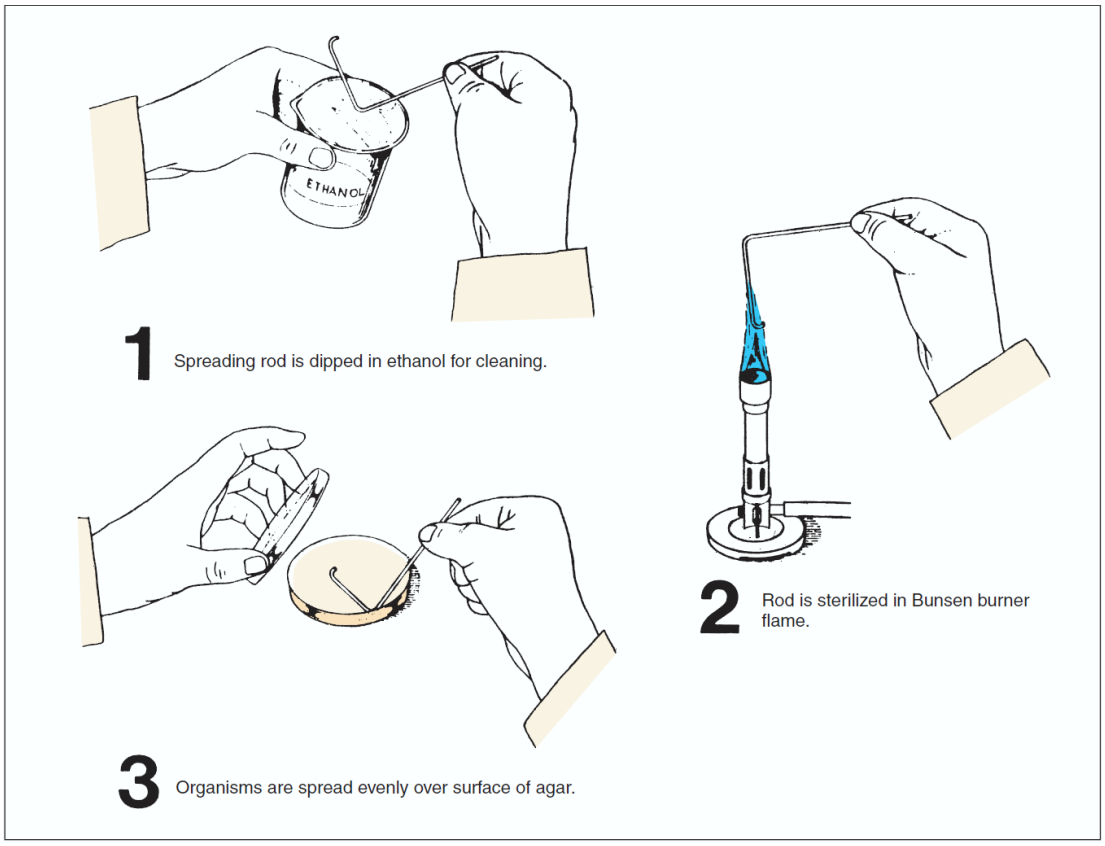
در این روش مطابق شکل، ابتدا به وسیله یک آنس حلقوی سترون شده مقداری از کلنی باکتری را برداشته و آن را روی سطح محیط به صورت خط های موازی و در چند جهت می کشید از یک طرف پلیت شروع کرده و چند بار پلیت را به اندازه‌ی 60 تا 90 درجه می‌چرخانیم. در این روش از سوآپ استفاده نمی‌شود، چون با جذب باکتری به درون پنبه، در مقدار باکتری منتقل‌شونده ایجاد خطا می‌کند.

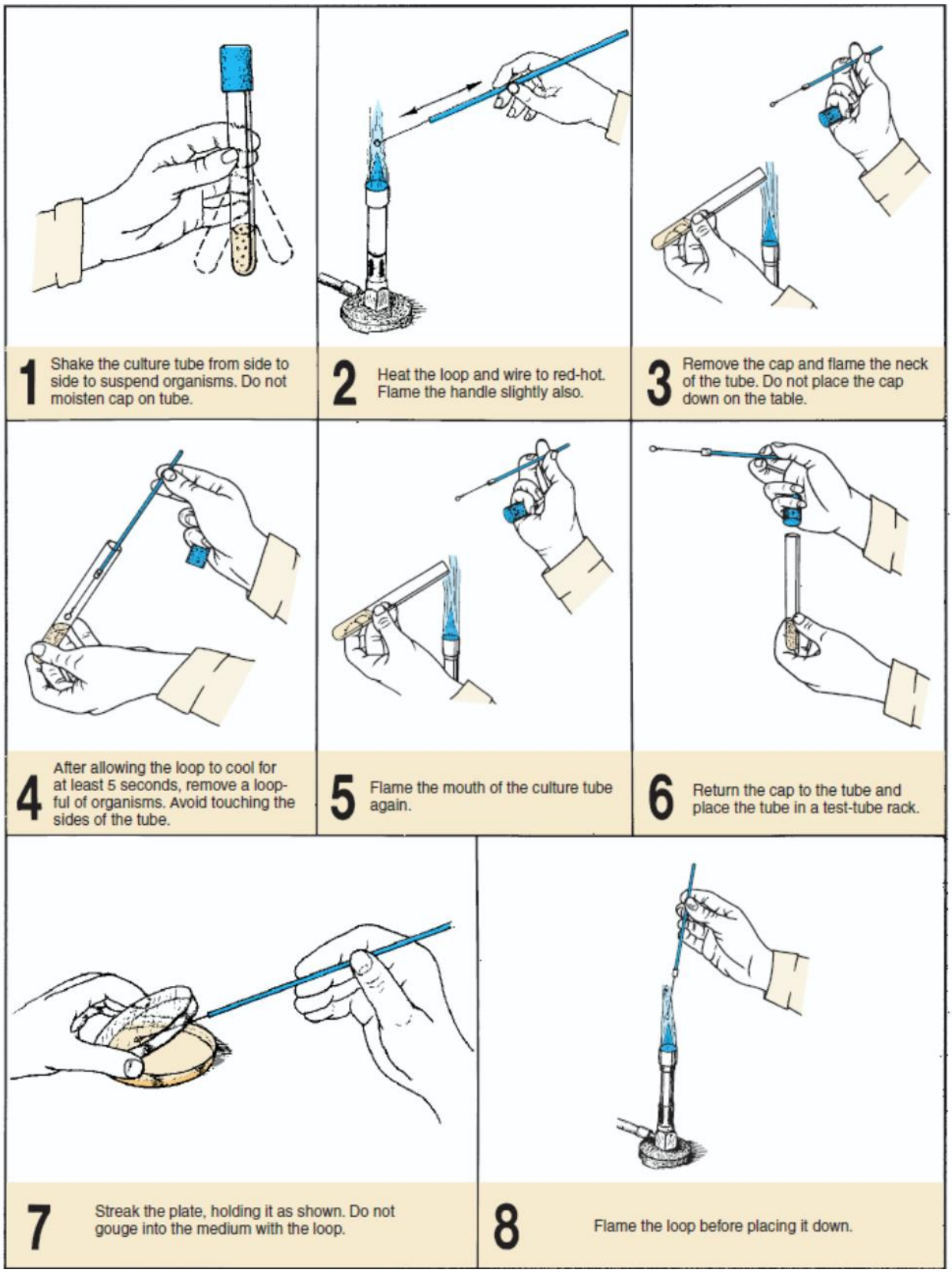


خصوصیت این روش این است که وقتی خطوط موازی را روی سطح محیط می کشید به ترتیب از تراکم باکتریها کاسته می شود و در انتهای خط، تراکم باکتری کمتر از ابتدای آن است و در منطقه دیگر وقتی از انتهای خط منطقه قبلی استفاده می کنید در واقع تراکم بسیار کمتر از تراکم باکتریها در ابتدا می باشد و در نتیجه در مناطق دیگر هم به ترتیب از تعداد باکتری ها کاسته می شود تا جایی که در منطقه چهارم شما می توانید کلنی های تکی داشته باشید که کلونی خالص نامیده می شود. بنابراین انجام درست کشت خطی منجر به ایجاد کلنی خالص می شود.

برای گرفتن تک کلنی پیش از هر مرحله لوپ را می‌سوزانیم و با گوشه‌ای از محیط کشت که با باکتری در تماس نیست سرد می‌کنیم. سپس یک بار از درون خطوط کشت مرحله‌ی قبل شروع می‌کنیم و تنها در آخرین مرحله از کشت لوپ را نمی‌سوزانیم.

کشت چمنی یا کشت یک‌نواخت سطحی: بیش‌تر برای آنتی‌بیوگرام و سنجش هاله‌ی عدم رشد اطراف مواد مهارکننده‌ی رشد استفاده می‌شود. در این روش بیش‌تر از سوآپ برای پخش یک‌نواخت باکتری استفاده می‌شود. اگر کشت اولیه‌ی باکتری به صورت مایع باشد، می‌توان با سمپلر نمونه‌ی مایع را روی محیط‌کشت جامد ریخت و بعد با یک پخش‌کننده (spreader) ی استریل، سوسپانسیون را در همه‌جای محیط‌کشت پخش کرد.




1 Shake the culture tube from side to side to suspend organisms. Do not moisten cap on tube.
2 Heat the loop and wire to red-hot. Flame the handle slightly also.
3 Remove the cap and flame the neck of the tube. Do not place the cap down on the table.
4 After allowing the loop to cool for at least 5 seconds, remove a loop-ful of organisms. Avoid touching the sides of the tube.
5 Flame the mouth of the culture tube again.
6 Return the cap to the tube and place the tube in a test-tube rack.
7 Streak the plate, holding it as shown. Do not gouge into the medium with the loop.
8 Flame the loop before placing it down.

تهیه رقت یا رقیق کردن نمونه (Serial Dilution)

رقیق کردن نمونه باعث کاهش تعداد میکروارگانیسمها در یک حجم خاص میشود. از این کار هم برای شمارش تعداد باکتریها در نمونه (آب، شیر، غذا و ...) و هم برای جداسازی باکتریها استفاده میشود. روش کار بر مبنای رقیق کردن نمونه در اب مقطر یا سرم فیزیولوژی استریل میباشد.

1-برای این کار در ده لوله ازمایش هر کدام 9ml سرم فیزیولوژی استریل اضافه کنید و انها را شماره گذاری کنید.

2-یک گرم از نمونه جامد اولیه (مثلا خاک) یا یک میلی لیتر از نمونه مایع (مثلا شیر) را به 9 ml سرم فیزیولوژی استریل (لوله شماره 1) اضافه کنید. در این صورت در این لوله یک محلول ده برابر رقیق شده دارید که آن را بصورت رقت 1:10 یا رقت 10^{-1} نامگذاری میکنند.

3- لوله را بخوبی تکان داده و به هم بزنید.

4- یک میلی لیتر از محلول فوق را به لوله شماره 2 منتقل کنید. حالا در این لوله رقت 1:100یا 10^{-2} دارید.

5- لوله را بخوبی تکان داده و به هم بزنید.

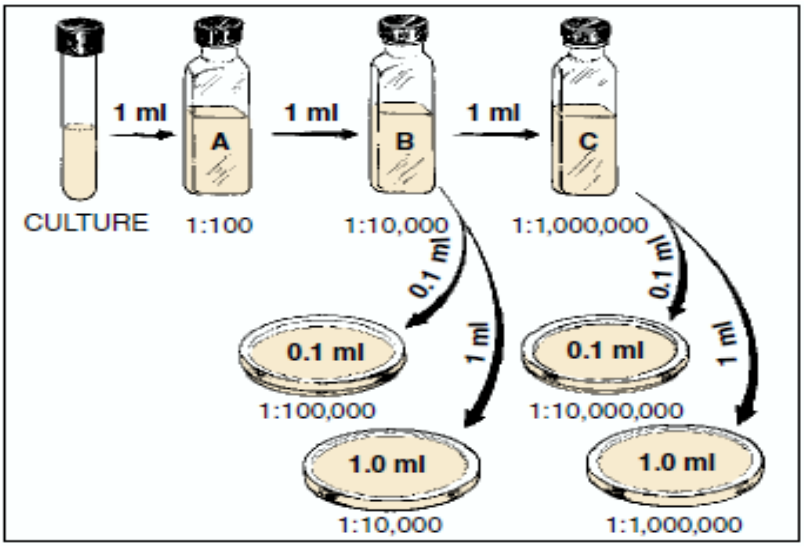
6- یک میلی لیتر از لوله شماره 2 را به لوله شماره 3 منتقل کنید. حالا در این لوله رقت 1:1000 یا10^{-3} دارید.
به همین ترتیب کار رقیق سازی در لوله ها ادامه پیدا میکند و در هر مرحله نمونه ده برابر رقیق میشود.

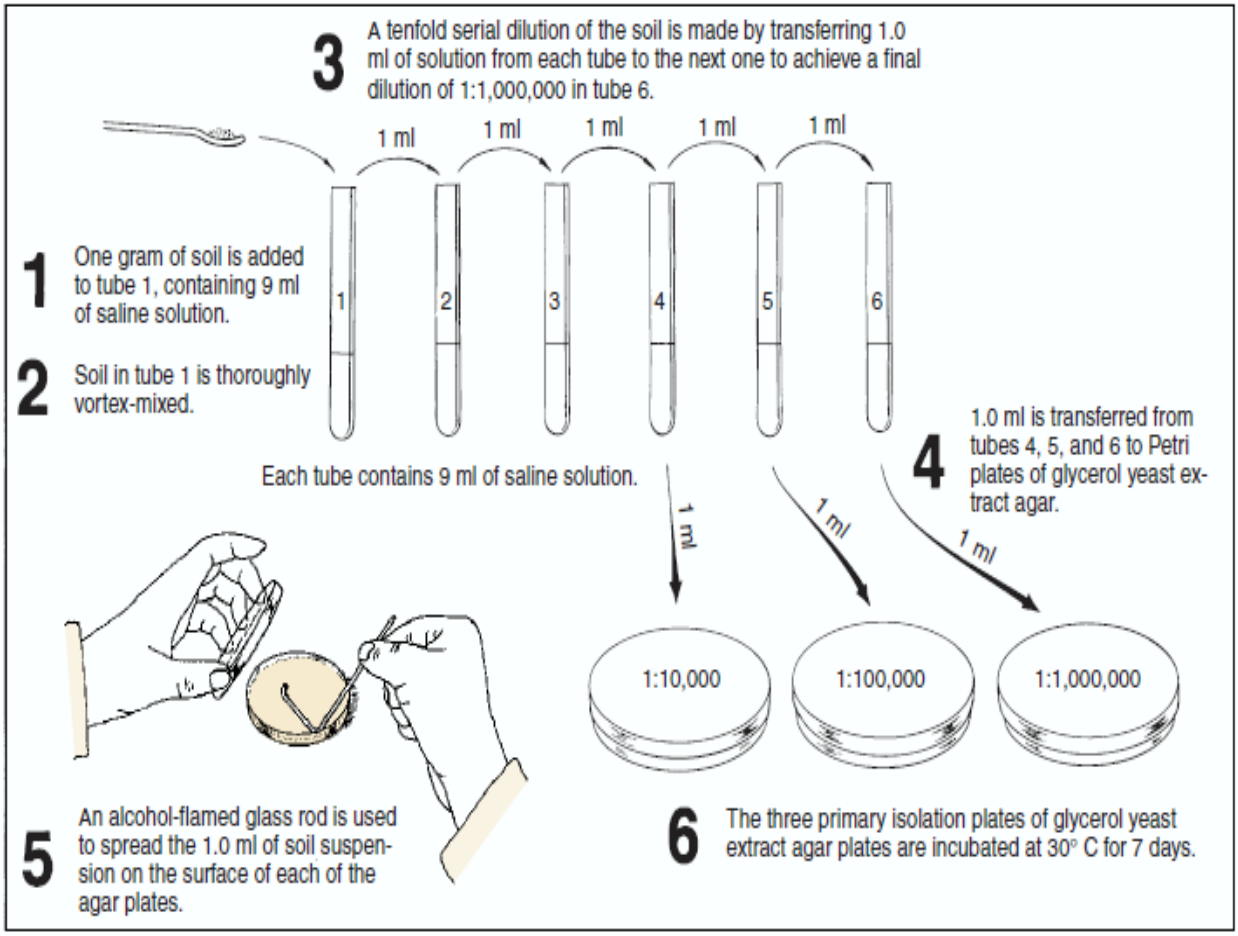
7- سپس از هر کدام از رقت هایی که میخواهیم (معمولا رقت 4 به بعد)، یک میلی لیتر برداشته و روی پلیت مناسب ریخته و با یک ویسله شیشه ای L مانند استریل به نام Spreader ، این محلول را روی محیط کشت پخش می کنیم.

8- پلیت ها را به مدت 24 ساعت در دمای مناسب انکوبه میکنیم.

9- بعد از ظاهر شدن کلنی ها بر روی پلیت ها، کلنی ها را شمارش کرده و گزارش میکنیم.
اگر مثلا روی پلیت 4- هفتاد کلنی دیده شود، به این معنا است که در یک میلی لیتر از نمونه اولیه، 70×10^{4} عدد باکتری وجود داشته است.

همچنین در این روش چون تعداد باکتریها کم میشود، کلنی ها بصورت تک تک روی پلیت ظاهر میشوند. بنابراین از روی ظاهر کلنی ها میتوان حدس زد که چند نوع باکتری در نمونه اولیه وجود دارد.


1 ml
1 ml
1 ml
A
B
C
CULTURE
1:100
1:10,000
1:1,000,000
0.1 ml
1 ml
0.1 ml
1 ml
0.1 ml
0.1 ml
1:100,000
1:10,000,000
1.0 ml
1.0 ml
1:10,000
1:1,000,000


3 A tenfold serial dilution of the soil is made by transferring 1.0 ml of solution from each tube to the next one to achieve a final dilution of 1:1,000,000 in tube 6.
1 ml
1 ml
1 ml
1 ml
1 ml
1 One gram of soil is added to tube 1, containing 9 ml of saline solution.
2 Soil in tube 1 is thoroughly vortex-mixed.
1
2
3
4
5
6
Each tube contains 9 ml of saline solution.
4 1.0 ml is transferred from tubes 4, 5, and 6 to Petri plates of glycerol yeast extract agar.
1 ml
1 ml
1 ml
1:10,000
1:100,000
1:1,000,000
5 An alcohol-flamed glass rod is used to spread the 1.0 ml of soil suspension on the surface of each of the agar plates.
6 The three primary isolation plates of glycerol yeast extract agar plates are incubated at 30° C for 7 days.

آزمایش مستقیم نمونه ها

مشاهده مستقیم لام یکی از مهمترین و اصلی ترین مراحل تشخیص در آزمایشگاه باکتریولوژی است . در حالت کلی در آزمایشگاه در دو حالت لام تهیه میشود:

الف) تهیه لام از محیط کشت بعد از کشت باکتری و مشاهده کلنی ها: معمولا بعد از جداسازی باکتری ها در محیط کشت و رشد کلنی های خاص در محیط کشت، برای تشخیص نوع باکتری و تصمیم گیری برای ادامه مراحل ازمایش، باید لام تهیه شود و رنگ آمیزی گرم انجام گیرد.

ب) تهیه لام از نمونه بیماران فرستاده شده به آزمایشگاه قبل از کشت(نمونه مایع نخاع ، نمونه زخم و...): در برخی موارد خاص باید بعد از دریافت نمونه ها هر چه سریع تر از آنها لام مستقیم تهیه کرد

آزمایش مستقیم نمونه ها شامل تهیه لام و رنگ آمیزی می باشد .

تهیه اسمیر یا گسترش

برای استفاده از روش های رنگ آمیزی برای دیدن باکتریها، اولین مرحله تهیه اسمیر(smear) یا فروتی یا گسترش است.هنگام تهیه لام باید قبل از هر کاری شماره نمونه را بر روی لام درج کنیم. قبل از رنگ آمیزی باید باکتریها به صورت یک لایه نازک بر روی لام قرار گیرند .برای تهیه لام از سرم فیزیولوژی استفاده می شود. از آب مقطر برای تهیه لام استفاده نمی شود زیرا آب مقطر فشار اسمزی را تغییر داده و باعث لیز شدن (شکستن و ترکیدن) باکتری ها می شود. ابتدا یک قطره سرم فیزیولوژی روی لام قرار داده و سپس با فیلدوپلاتین کمی از کلنی را برداشته و در سرم فیزیولوژی روی لام حل میکنند. سپس لام را در هوای آزمایشگاه خشک کنید. لازم است که تناسب بین مقدار نمونه ای که از کلنی برداشته میشود و مقدار سرم فیزیولوژی حفظ شود.

اگر تعداد باکتریها نباید خیلی زیاد باشد به دلیل جمعیت زیاد باکتریها ،نور به خوبی از آنها عبور نمیکند و مطالعه آنها مشکل خواهد بود. در این حالت ، لام پس از رنگ آمیزی گرم بسیار تیره و کدر بوده و بررسی عوامل باکتریایی را با مشکل روبه رو می سازد. اما اگر میزان کلنی کم باشد لام تهیه شده رقیق خواهد بود و در پیدا کردن عوامل باکتریایی در زیر میکروسکوپ دچار مشکل خواهیم شد .لام تهیه شده نباید وسیع باشد به عبارت دیگر اسمیر تهیه شده بهتر است در وسط لام و به میزان مناسب تهیه شود.

قبل از تهیه لام باید به نوع محیط کشت توجه کرد. برای نمونه؛ در محیط کشت بلاد اگار هیچ وقت باکتری گرم مثبت و گرم منفی قابل تشخیص از یکدیگر نبوده و هر دو در این محیط رشد می کنند. اما در محیط SS همیشه کلنی های گرم منفی رشد می کنند .

فیکس کردن لام

پس از مخلوط کردن کلنی و سرم فیزیولوژی بر روی سطح لام و ایجاد یک اسمیر هموژن، باید اسمیر تهیه شده کاملا خشک شود وپس از آن ، نمونه لام تهیه شده را به دلایل زیر فیکس یا ثابت کنیم :

۱ - باکتری ها کشته می شوند و در این صورت احتمال آلودگی تکنسین از بین می رود.

۲ - باکتری ها بر روی سطح لام تثبیت شده و به سطح لام می چسبند.

۳ - طی عمل فیکساسیون باکتری ها کشته شده و رنگ پذیر می شوند.

برای فیکس کردن لام ها در آزمایشگاه می توان از حرارت (دمای 60- 45 درجه سانتیگراد) و یا الکل (متانول) استفاده کرد. معمولا در ازمایشگاه لام را با پنس گرفته و یک تا دوبار سریع از روی شعله عبور میدهند بطوریکه سطح لام کمی گرم شود ولی نه در حدی که دست را بسوزاند.

رنگ آمیزی گرم Gram Staining

یکی از انواع رنگ آمیزی ها در میکروبیولوژی که به جرأت می توان آن را پرکاربردترین رنگ آمیزی به حساب آورد روش رنگ آمیزی گرم است. این روش در سال 1884 برای اولین بار توسط محققی دانمارکی به نام «Christian Gram» انجام شد و بعدها با تغییراتی برای دسته بندی باکتری ها مورد استفاده قرار گرفت.

پس از انجام این رنگ آمیزی طبق روش آن که در ادامه بحث خواهد شد باکتری هایی که ضخامت لایه پپتیدوگلیکان در دیواره آن ها زیاد است در زیر میکروسکوپ به رنگ بنفش دیده می شوند و باکتری هایی که ضخامت لایه پپتیدوگلیکان ان ها اندک است به رنگ قرمز دیده می شوند. به صورت قراردادی به باکتری هایی که سلول آن ها پس از این رنگ آمیزی بنفش دیده می شود باکتری های گرم مثبت (Gram-positive) و به باکتری هایی که سلول آن ها در زیر میکروسکوپ، به رنگ قرمز دیده می شوند باکتری های گرم منفی (Gram-negative) گفته می شود.

امروزه اولین آزمونی که معمولاً برای شناسایی یک باکتری ناشناس انجام می شود رنگ آمیزی گرم می باشد. در نتیجه انجام این روش، علاوه بر پی بردن به گرم مثبت یا منفی بودن یک باکتری می توان شکل آن (باسیل، کوکسی و یا اسپریل) را نیز تشخیص داد.

لازم به ذکر است که برخی باکتری ها در روش گرم رنگ نمی گیرند. این گروه ها به عنوان استثناهایی در این زمینه ذکر می شوند. از جمله این باکتری ها می توان مایکوباکتریوم ها مانند عامل بیماری سل را نام برد. برای رنگ آمیزی این باکتری ها روش های خاصی وجود دارد.

پیش از شروع توضیح روش کار لازم به ذکر است که چهار محلول مورد استفاده در رنگ آمیزی گرم (کریستال ویوله، لوگول، الکل، فوشین یا سافرانین) یا در آزمایشگاه و طبق دستورالعمل های موجود تهیه می شوند و یا اینکه هر چهار محلول مورد نیاز به صورت آماده با عنوان «کیت رنگ آمیزی گرم» خریداری می شوند.

مراحل کار:

1ـ استریل کردن لوپ روی شعله

2ـ برداشتن نمونه با لوپ

3ـ تهیه گسترش روی یک لام تمیز

4ـ فیکس کردن لام در کنار شعله

5ـ پوشاندن گسترش با محلول کریستال ویوله (بنفش) به مدت یک دقیقه

6ـ شستشو با آب مقطر

7ـ افزودن محلول لوگول(Lugol's solution) به گسترش و قراردادن آن به مدت یک دقیقه

8ـ شستشو با آب مقطر

9ـ افزودن الکل استن به مدت 10 تا 15 ثانیه

10ـ شستشو با آب مقطر

11ـ پوشاندن گسترش با سافرانین یا فوشین (قرمز) به مدت یک دقیقه

12ـ شستشو با آب مقطر، خشک شدن لام در هوای ازاد و مشاهده در زیر میکروسکوپ (پس از رنگ آمیزی گرم باکتریهای گرم مثبت به رنگ بنفش یا آبی و باکتریهای گرم منفی به رنگ قرمز یا صورتی مشاهده می‌شوند).

مکانیسم رنگ امیزی گرم

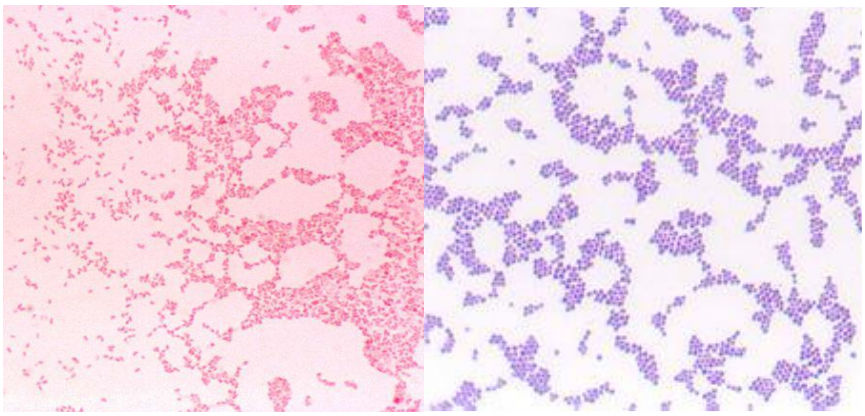
1- در مرحله اول رنگ کریستال ویوله با نفوذ در دیواره باکتری ها، همه باکتری ها را به رنگ بنفش در می اورد.

2- پس از شستشوی گسترش با آب، سطح اسمیر با محلول لوگل به مدت یک دقیقه پوشانده می شود. لوگل حاوی ید بوده و با تشکیل کمپلکس های کریستال ویوله- ید در دیواره سلولی باکتری، باعث تثبیت رنگ کریستال ویوله در سلول باکتری می شود. پس ازاین مرحله نیزکماکان همه باکتریها به رنگ بنفش مشاهده می شوند.

3- مرحله رنگ زدایی مهمترین مرحله رنگ آمیزی است دراین مرحله پس از شستشوی لام با آب، لام به مدت 15 تا20 ثانیه در معرض موادرنگ زدا مانند الکل استون قرار می گیرد سپس با آب شستشو داده میشود. البته برای استفاده از محلول رنگ بر می توان لام را به صورت مورب گرفت و محلول رنگ بر را قطره قطره روی سطح اسمیر ریخت و این کار را تا زمانی که در قطراتی که از پایین لام ریخته می شوند رنگ آبی مشاهده نشد ادامه داد. محلول رنگ بری که در رنگ آمیزی گرم استفاده می شود ممکن است استون-الکل، اسید-الکل و یا الکل اتیلیک 96 درصد باشد. در هر صورت الکل موجود در این محلول با منعقد کردن پروتئین ها و نیز حل کردن لیپیدها در پوشش سلولی باکتری ها، کمپلکس های کریستال ویوله-ید را از سلول هایی که لایه پپتیدوگلیکان دیواره آن ها نازک است بیرون می کشد و آن ها را بی رنگ می کند (این سلول ها در مرحله بعد رنگ سافرانین را به خود می گیرند). سلول هایی که لایه پپتیدوگلیکان دیواره آن ها ضخامت بیشتری دارد کمپلکس های رنگی کریستال ویوله-ید را از دست نمی دهند. [نکته قابل توجه: اگر در این مرحله زمان استفاده از محلول رنگ بر بیش از حد شود ممکن است باکتری های با دیواره ضخیم نیز کمپلکس های رنگی خود را از دست داده و در نتیجه در مرحله بعد رنگ سافرانین را به خود بگیرند و نتیجه رنگ آمیزی اشتباه شود]. درباکتریهای گرم منفی که دارای لایه های پپتیدو گلیکان محدود وغشای خارجی غنی از چربی هستند، این حلال باعث حذف این لایه ها می گردد وباکتری رنگ را ازدست می دهد . ولی درباکتریهای گرم مثبت به علت تعداد زیاد لایه های پپتیدوگلیکان در غشا ، رنگ مرحله قبل ازغشا خارج نمی شود .درنتیجه پس ازاین مرحله باکتریهای گرم منفی بی رنگ ولی باکتریهای گرم مثبت کماکان بنفش باقی خواهند ماند .

4- در انتها سطح گسترش را با رنگ سافرانین یا فوشین (قرمز رنگ) به مدت یک دقیقه می پوشانیم سپس باآب شستشو میدهند. این رنگ باکتری هایی که در مرحله رنگ بری به دلیل ضخامت کمتر در پوشش سلولی خود بی رنگ شده اند را قرمز می کند.

5- با مشاهده لام در زیر میکروسکوپ باکتری هایی که دیواره ضخیم تری داشته اند و کمپلکس های کریستال ویوله-ید را درمرحله رنگ بری از دست نداده اند، بنفش دیده می شوند که به آن ها باکتری های گرم-مثبت گفته می شود و باکتری هایی که دیواره نازک تری داشته اند و کمپلکس های کریستال ویوله-ید را در مرحله رنگ بری از دست داده اند رنگ قرمز سافرانین را گرفته اند و لذا قرمز دیده می شوند که به آن ها باکتری های گرم منفی گفته می شود.



Gram Negative: E.coli Gram Positive: Staphylococcus aureus

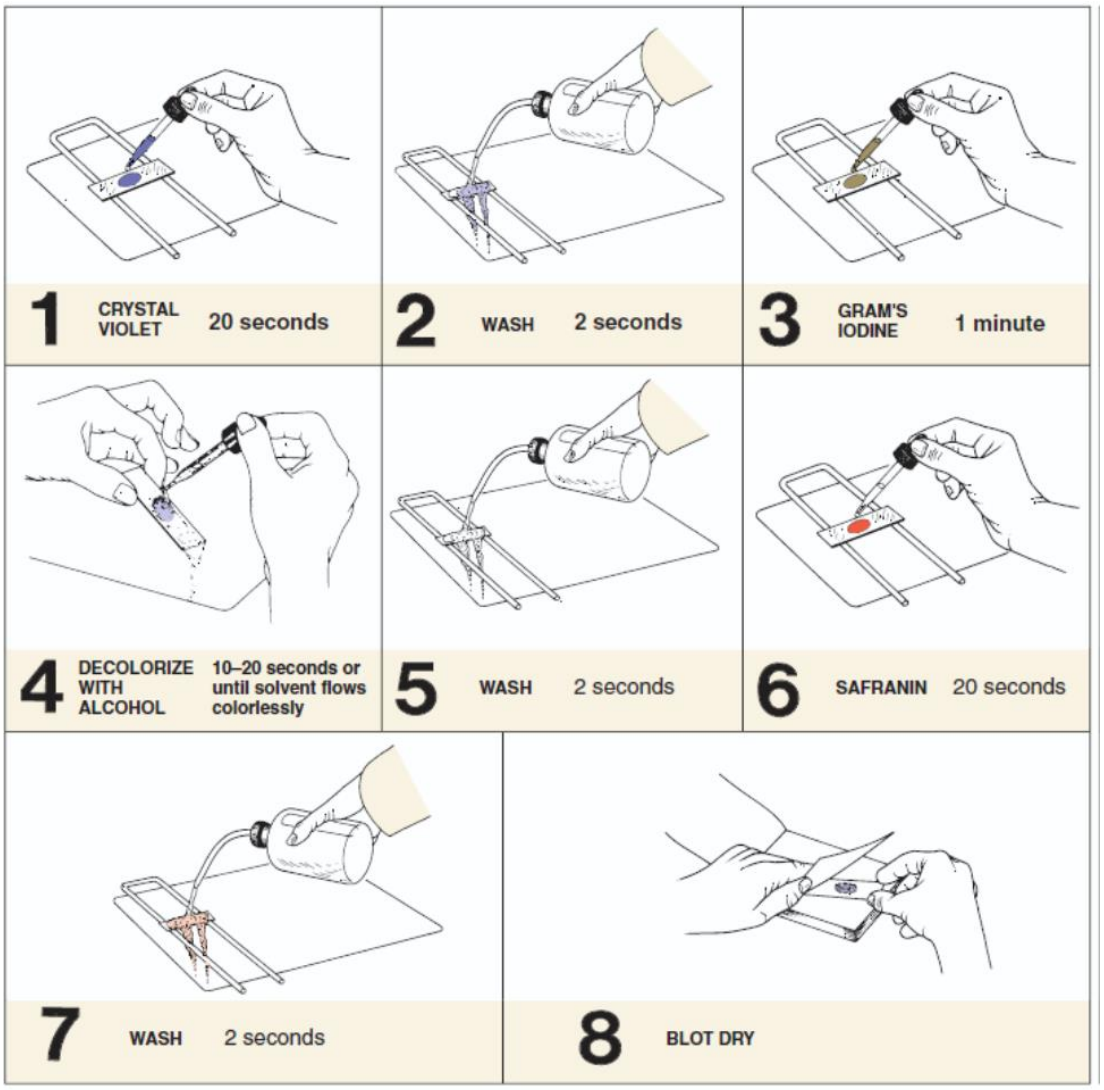


Figure 15.2 The gram-staining procedure

رنگ آمیزی کپسول (رنگ امیزی منفی یا زمینه سیاه)

بعضی از باکتریها ماده لزج پلی ساکاریدی از خود ترشح می کنند که خارج از سلول و پیرامون آن جمع می شود و دیواره سلولی را می پوشاند و تشکیل یک لایه میدهد. این لایه کپسول نامیده می شود که در سویه های مختلف باکتریها دارای ضخامت متفاوت و چسبندگی متغیر میباشد. اندازه کپسول به محیط کشت میکروبی نیز بستگی دارد و همچنین باکتریهای بیماریزا ، در بین باکتریهای تولید کننده کپسول ، کپسولهای بزرگتری دارند.

کاربرد کپسول در باکتریها

کپسول بعنوان یک سد اسمزی بین باکتری و محیط اطراف آن عمل می کند و در واقع نقش حفاظتی دارد. کپسول مانع از عمل بیگانه خواری (فاگوسیتوز) گلبولهای سفید علیه باکتری می شود. همچنین بعنوان مخزن ذخیره مواد غذایی یا دفع مواد زائد هم می تواند عمل کند. در تعدادی از باکتریهای بیماریزا، وجود کپسول شدت بیماریزایی و عفونت زایی را افزایش می دهد و ممکن است حتی این بیماریزایی به وجود کپسول بستگی داشته باشد، مثلا در استرپتوکوکوس پنومونیا اگر توانایی تولید کپسول در باکتری از بین برود این باکتری غیر بیماریزا می شود.

مکانیسم رنگ امیزی کپسول

در عمل رنگ آمیزی، شرط رنگ گیری یک سلول یونی بودن یا قطبی بودن آن می باشد یعنی هنگام رنگ آمیزی بین بارهای مخالف موجود در سطح سلول و مولکولهای رنگ پیوند یونی تشکیل می شود و باکتری رنگ می گیرد، اما چون کپسول را بعلت غیر یونی بودن آن نمی توان رنگ آمیزی کرد در نتیجه برای دیدن آن در زیر میکروسکوپ ، زمینه لام را رنگ آمیزی میکنند و در نتیجه امکان دیدن کپسول باکتری که بصورت بیرنگ ظاهر می شود ، فراهم می شود. این روش را رنگ آمیزی منفی می نامند.

در این رنگ آمیزی از رنگ های اسیدی مانند مرکب چین یا هندی و یا نیگروزین (Nigrosin) استفاده میشود. رنگ های اسیدی با داشتن رنگدانه با بار منفی قادر به نفوذ به درون سلول نمی باشد زیرا بار الکتریکی سطح سلول باکتری ها نیز منفی می باشد. بنابراین در این نوع رنگ آمیزی سلول های باکتری بدون رنگ مانده و زمینه رنگ تیره میگیرد. این نوع رنگ آمیزی بررسی باکتری هایی را که به سختی رنگ می گیرند را ممکن می سازد.

در این روش عمل ثابت کردن گسترش توسط حرارت لازم نیست و چون سلولها در معرض اثرات خاص مواد شیمیایی و حرارت قرار نمی گیرند بنابراین اندازه و شکل سلول ها به صورت طبیعی مشاهده می شود.

روش کار در رنگ آمیزی کپسول

1- روی یک انتهای لام ، یک قطره مرکب چین یا قطره کوچکی از نیگروزین قرار داده و با لوپ (نوک آنس) مقدار کمی از کشت باکتری را به آن اضافه کنید ، سوسپانسیون را به آرامی و کاملا مخلوط کنید.

2- یک لام دیگر برداشته و روی قطره رنگ حاوی باکتری ها قرار داده و بوسیله آن گسترش را روی لام پخش کنید.

3- بگذارید لام در مجاورت هوا خشک شود. هیچگاه برای خشک کردن لام ، کاغذ خشک کن یا دستمال را روی آن نکشید.

4- مشاهده در زیر میکروسکوپ

در این رنگ آمیزی کپسول باکتری ها بصورت بیرنگ و شفاف و در زمینه ای سیاه رنگ مشاهده می شوند.

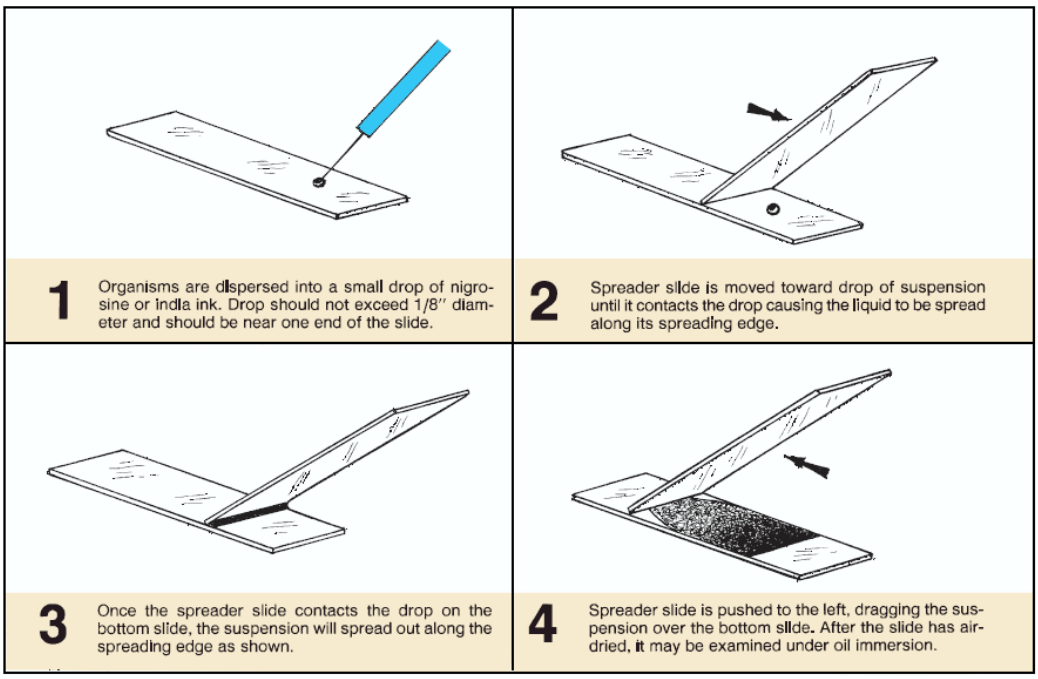
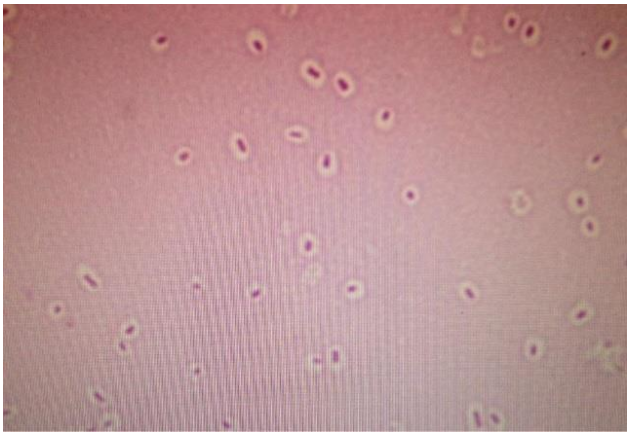


Figure 11.1 Negative staining technique, using a spreader slide



رنگ آمیزی اسید فاست (روش زیل نیلسون)

مکانیسم

اسید فاست بمعنای مقاومت در مقابل رنگ بری با یک رنگ بر اسیدی می باشد. برخی از باکتری‌ها بخصوص باکتری‌های مربوط به جنس مایکو باکتریوم ها به سختی رنگ گرفته و پس از رنگ شدن به سختی رنگ خود را از دست می دهند. این باکتری ها را مقاوم به اسید می نامند. این خاصیت در باکتریها بسیار نادر است و فقط باکتریهای جنس مایکوباکتریوم (عامل مولد سل و جذام) و بعضی گونه های جنس نوکاردیا ، اسید فاست هستند.

بطور کلی در دیواره سلولی باکتریهای اسید فاست مقدار چربی بسیار زیاد است (اسید میکولیک) و آنها مقادیر نسبتا زیادی مواد چربی ، مثل اسیدهای چرب ، مومها و چربیهای پیچیده دارند. دیواره سلولی این ارگانیسمها شبیه موم بوده بنابراین نسبتا غیر قابل نفوذ هستند. این نفوذ ناپذیری در برابر مواد ضد عفونی کننده هم به این باکتریها مقاومت بیش از حدی می دهد. همچنین آنها را در برابر خشک شدن مقاوم می کند و برای مدتهای طولانی می توانند در خلط یا دیگر مایعات خشک شده بدن باقی بمانند. دراین رنگ آمیزی بخاطر وجود دیواره سلولی نفوذ ناپذیر، با حرارت و حلال‌های آلی یا دترجنت‌ها نفوذ رنگ را می توان آسان نمود. در اینجا برای نفوذ دادن رنگ اولیه که کربول فوشین می باشد ازحرارت بعنوان یک عامل نفوذ دهنده رنگ در سلول باکتری استفاده میشود. وقتی که رنگ به دیواره سلولی نفوذ کرد ، سلول باکتری بخاطر خاصیت اسید فاست بودن ، علی رغم بکار بردن رنگ برهای قوی رنگ خود را حفظ می کند. سلولهای اسید فاست رنگ اولیه را حفظ می کنند در زیر میکروسکوپ برنگ قرمز دیده می شوند، در حالیکه میکروبهای غیر اسد فاست رنگ ثانویه را جذب کرده و به رنگ آبی در می آیند.

روش رنگ آمیزی اسید فاست

1- ابتدا یک گسترش از باکتری روی لام تهیه کنید و آن را فیکس نمایید.

2- سطح لام را با رنگ کربول فوشین (قرمز) آغشته کنید.

3- لام را حرارت دهید (شعله را وارونه کنید و از روی رنگ بطور مکرر عبور دهید) با شروع تبخیر رنگ از روی لام، دوباره شعله را از روی رنگ عبور دهید و بعد آنرا دور کنید و اجازه ندهید رنگ بجوشد. به موازات تبخیر رنگ از روی لام ، کربول فوشین بیشتری به آن اضافه کنید. این عمل باید 5 دقیقه ادامه یابد.

4- لام را سرد کنید بعد با آب شستشو دهید.

5- سطح لام را با اسید- الکل (محلول رنگ بر) آغشته کنید و بگذارید 15 تا 30 ثانیه بماند.

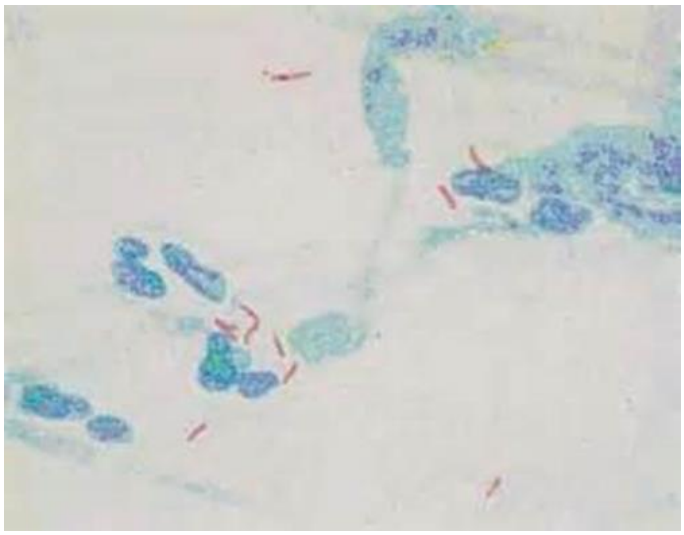
6- لام را با اب شستشو دهید.

7- سطح لام را با رنگ متیلن بلو (رنگ ثانویه آبی رنگ) آغشته کنید و بگذارید 1 دقیقه بماند.

8- رنگ را خالی کرده و لام را بشوئید.

9- خشک شدن لام و مشاهده در زیر میکروسکوپ

در مرحله اول تمام میکروبها رنگ قرمز کربول فوشین را به خود می‌گیرند. در مرحله دوم باکتری های اسید فاست در مقابل رنگ‌بری با اسید الکل مقاومت کرده و رنگ قرمز را حفظ می‌کنند ولی باکتری های غیر اسید فاست در اثر اسید الکل رنگ قرمز را از دست میدهند و سپس تحت تاثیر متیلن بلو به رنگ سبز آبی در میایند.



رنگ آمیزی اسپور

اسپور حالت مقاوم سلول باکتری است. بعضی از باکتری ها در شرایط نامساعد محیط، قابلیت تشکیل سلول مقاوم از سلول رویشی را دارند. این سلول مقاوم چون در درون سلول رویشی تشکیل می شود به آن اندوسپور گفته می شود هنگامیکه این فرم از سلول خارج می گردد به آن اسپور گفته می شود. اسپور زایی یک مرحله زایشی در چرخه سلول باکتری به حساب نمی آید بلکه یک مرحله استراحت (کمون) بوده که در آن متابولیسم سلول بسیار کند میشود. در صورت مساعد شدن شرایط محیطی، اسپور قادر است دوباره به فرم رویشی تبدیل شود. اسپور به دلیل داشتن پوششهای غیر قابل نفوذ در برابر شرایط نامساعد همچون خشکی، دمای نا مناسب، نور، امواج رادیویی، مواد شیمیایی، انجماد و اشعه ها مقاوم می باشد. اسپور نسبت به عومل فیزیکی و شیمیایی مقاوم است و به آسانی رنگ را به خود نمیگیرد. به همین دلیل برای رنگ آمیزی و نفوذ رنگ به داخل اسپور، به آن حرارت میدهند.

روش رنگ آمیزی اسپور

1-ابتدا یک گسترش از باکتری روی لام تهیه کنید و آن را فیکس نمایید.

2-سطح لام را با محلول مالاشیت گرین ۵ ٪ (سبز) پوشانده و لام را به مدت 3 تا 5 دقیقه حرارت می دهند تا بخار متساعد شود اما رنگ نجوشد.

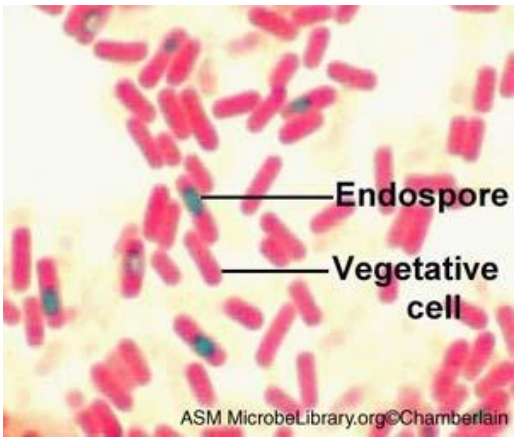
3-لام را سرد کنید بعد با آب شستشو دهید.

4-رنگ سافرانین (قرمز) را به گسترش اضافه کرده و بگذارید ۳۰ ثانیه روی آن بماند.

5-رنگ را خالی کرده و لام را بشوئید.

6-خشک شدن لام و مشاهده در زیر میکروسکوپ

در این روش رنگ آمیزی اسپورها به رنگ سبز و فرم های دیگر سلول باکتری به رنگ قرمز دیده خواهند شد.



رنگ آمیزی کپکها

با مشاهده میکروسکوپی کپکها میتوان به شناسایی کپکها پرداخت. برای این منظور کپکها را رنگ میکنند اما بدون رنگ آمیزی میتوان ساختمان انها را زیر میکروسکوپ دید.در رنگ آمیزی کپکها از رنگ لاکتو فنل کاتن بلو (آبی رنگ) استفاده می شود . ابتدا رنگ را در روی لام گذاشته و بعد با لوپ مقداری از کلنی قارچ یا کپک را برداشته و در محلول رنگی گذاشته و با رنگ بهم میزنند تا کاملا رنگ را به خود بگیرد. سپس لامل را روی آن قرار داده و زیر میکروسکوپ مطالعه میکنند. دقت کنید در این روش نوک آنس که آغشته به پرگنه است را به آرامی در محلول رنگی قرار دهید و از هم زدن و تکان دادن آن خودداری کنید چون با این کار باعث متلاشی شدن ساختمان کپک می شوید. شما می توانید از کشتهای کپک یک گستره روی لام تهیه کرده و آنرا مستقیما و بدون رنگ آمیزی هم زیر میکروسکوپ مشاهده کنید و رنگ آمیزی فقط بخاطر شفافیت و بهتر دیدن ساختمان کپک است. اگر با استفاده از چسب کانادابالزام لامل را به لام بچسبانیم ، این لام را می توان برای مدت طولانی نگهداری کرد.