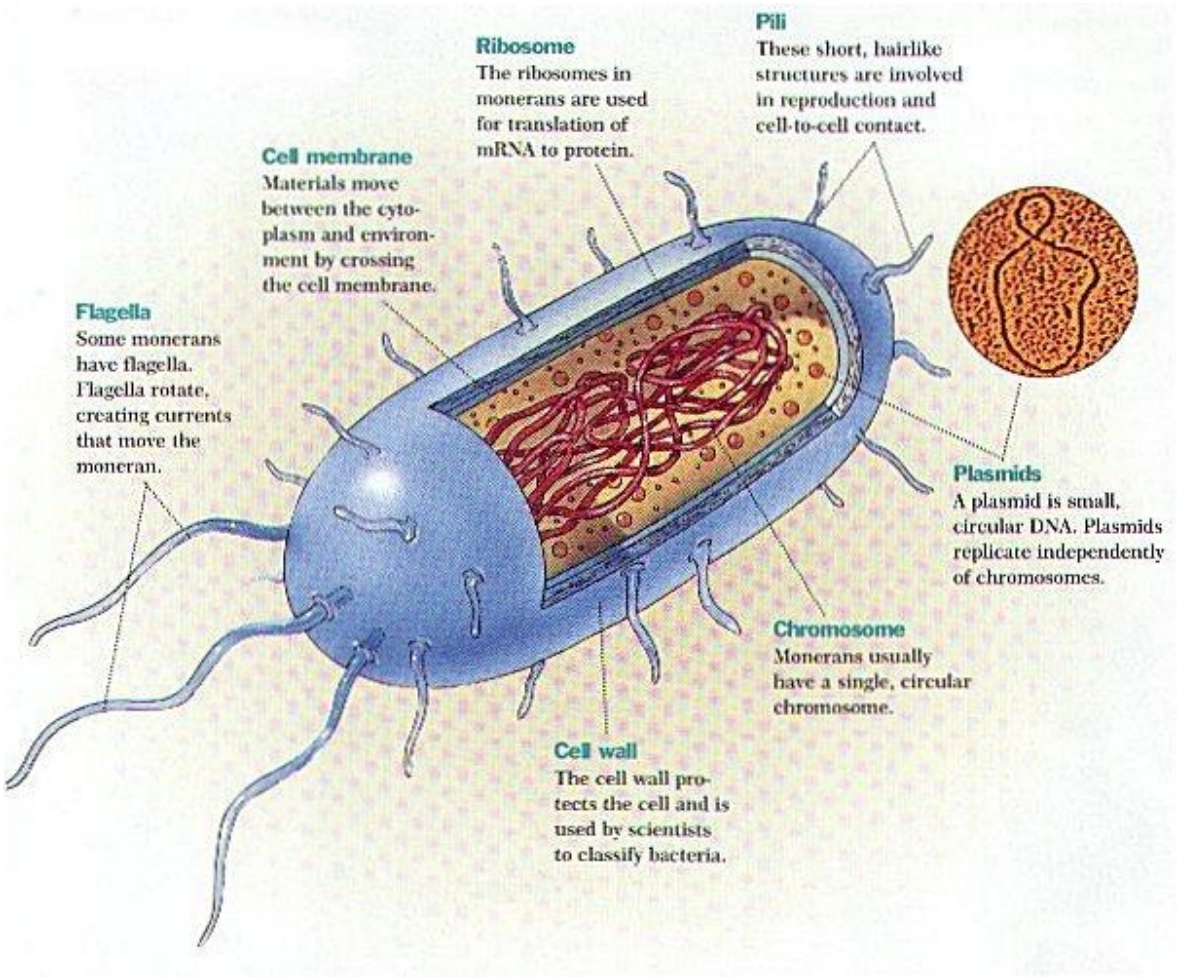
آزمایشگاه میکروب شناسی



گروه مامایی و پرستاری

مدرس : دکتر مرجان شاه ایلی

عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان

باسمه تعالی

جلسه اول :آشنائی باتجهیزات آزمایشگاهی, میکروسکوپ و رنگ آمیزی ساده

قبل ازهرچیزمی بایست به این نکات اشاره کردکه اولاحضوریک دانشجودرمحیط آزمایشگاه می بایست همراه باروپوش آزمایشگاه باشدتاازهرگونه آلودگی وانتقال آن به محیط بیرون جلوگیری شودوثانیاهنگام خروج بایددست هارابامادہ ضدعفونی کننده مناسب شست وحتی الامکان تامی توان ناخن هارا می بایست کوتاه نگه داشت تاازآلودگی های بعدی جلوگیری شود.علاوه برمواردبالایک فردآزمایش کننده زمانی درکارهای خودموفق می باشدکه بتواندوسایل موجوددرآزمایشگاه رابخوبی شناخته ودرزمان مناسب ازآنها به طورمناسب استفاده نماید.

۱- Autoclave :

ازاین وسیله جهت استریل کردن محیط کشت های آزمایشگاهی ومنسوجات استفاده می شود.این ظرف دیگ مانندکه ازدوجداره برخوردارمی باشدباتولیدبخاروایجادفشارباعث نابودی تمام اجرام زنده می شود.دربین دوجداراین وسیله یک المنت حرارتی قرارداده شده است که برروی آن آب ریخته می شودسپس موادکه قراراست استریل گرددروسط آن گذاشته می شود.لازم به ذکراست که لایه وسط ازتماس موادووسایل باآب جلوگیری می کند.درادامه درظرف رابسته وبه وسیله پیچ های تعبیه شده فوقانی درب آن رامحکم می کنیم.دستگاه راروشن کرده واجازه می دهیم تاباگرم شدن المنت وبه جوش آمدن آب دردرون دستگاه بخارایجادشود.برروی تنه دستگاه یک شیرخروجی قرارداده شده است که درزمان جوش آمدن بایدبازباشدتاتمام هوای موجوددرآن خارج شودوجای آن رابخارآب بگیردزمانی که ازاین شیریک دودسفیدکه به دم روباه تشبیه شده است خارج گردیدآن رامی بندیم.دستگاه رابرروی دمای ۱۲۱ درجه قرارداده واجازه می دهیم تافشاردرون دستگاه که بوسیله یک درجه که برروی دستگاه قرارداده شده است به ۱۵ پوندبرسدوازهمین لحظه ۱۵ دقیقه زمان می گیریم.

درصورتی که دستگاه سالم باشدبه بوسیله ترموستات درونی دماوفشارتنظیم شده وبطوراتوماتیک دمابرروی ۱۲۱ درجه وفشاربرروی ۱۵ پوندباقی می ماندرغیراین صورت می بایست مرتبادستگاه راکنترل نمودتاازشرایط استانداردخارج نشود.

پس ازپایان ۱۵ دقیقه دستگاه راخاموش کرده وشیرخروجی رابه آرامی بازمی کنیم تاتمام بخارموجوددرآن خارج گردد.لازم به ذکراست که دردمای ۱۲۱ درجه وفشار۱۵ پوندموادمایع درون دستگاه به هیچوجه به جوش نمی آیدودرصورتی که فشاررابوسیله شیرتخلیه به یکباره کم کنیم موادرونی به جوش آمده واحتمال خروج آنهاازدرون ظروف وجوددارد.

هرازمدتی می بایست سالم بودن دستگاه راکنترل نمودکه این عمل بااستفاده ازچسب های مخصوصی که دردمای ۱۲۱درجه وفشار۱۵ پوندبه رنگ قهوه ای درمی آیندانجام می شودویاازباکتری باسیلوس استروترموفیلوس که اسپورش مقاوم ترین اسپوربه حرارت می باشداستفاده نموده , درصورتی که اسپور این باکتری دراتوکلاوازبین برودنشانه سالم بودن دستگاه اتوکلاومی باشد.

۲- Oven :

ازاین وسیله که تولیدکننده حرارت خشک می باشدجهت استریل کردن ظروف شیشه ای , فلزی وگاه دربرخی ازآزمایشات جهت خشک کردن کاغذصافی استفاده می شود.این دستگاه قابلیت این راداردکه تا ۲۰۰درجه حرارت ایجادکند.برای استریل کردن ظروف ، پودرها وروغن ها دمای ۱۷۰-۱۵۰ درجه به مدت ۳-۱ ساعت کفایت دارد.ازقراردادن ظروف پلاستیکی دراین وسیله بطورجدی می بایست خوداری نمود.

۳- Water bath :

این وسیله که دراصل یک تانک آب مجهزبه یک موتورجهت چرخش آب , المنت حرارتی جهت تولیددما وترموستات جهت کنترل دمامی باشددرمیکروبیولوژی ازآن جهت قراردادن لوله های حاوی سوسپانسیون میکروبی ورشدمیکروب استفاده می شود.علت استفاده ازموتوردراین دستگاه این است که آب به گردش درآمده تادمای تمام قسمتهای یکنواخت گردد.

٤- Incubator :

ازاین دستگاه جهت گرمخانه گذاری محیط کشت های میکروبی برای چند ساعت , یک روز , یک هفته ویامدت زمان طولانی تری استفاده می شود.دستگاه انکوباتوربه یک ترموستات مجهزمی باشدتادمای تنظیم شده جهت رشدمیکروب ثابت باقی بماند.درانواع پیشرفته این دستگاه می توان رطوبت , نور , تابش اشعه وحتی میزان CO_2 رانیزدرمواردخاص کنترل نمود.دربرخی مواردجهت گرمخانه گذاری نیازی به این دستگاه نمی باشد وصرفاازدمای اطاق یادراصطلاح Room temperature استفاده می شود.

٥- Balance :

ترازورادراصطلاح مادرآزمایشگاه می گویند.هرچه تعدادصفرهای ترازوی دیجیتالی بیشترباشددقت محاسبه آن بیشتراست.درهنگام وزن کردن یک ماده باترازوهای آزمایشگاهی بخصوص انواع دیجیتالی آن بایددقت گرددکه ابتداآنرااستانداردنمودوزمان استانداردنمودن آن نیزمی بایست کاغذی ویاظرفی راکه می خواهیم با آن ماده

راوزن کنیم راروی دستگاه گذاشته تاوزن آن ازقبل کسر شده باشدودرضمن نبایدباکاغذبزرگ ویادرمقابل جریان باداقدام به وزن نمودن کرد.

٦- Petri dish :

به ظروف گرد , تخت , پلاستیکی ویاشیشه ای باقطر ۱۰ سانتی مترویاکمترگفته می شودکه به علت فضای کاسه مانندی که داردجهت تهیه محیط کشت جامدمیکروبی ازآن استفاده می شود. جهت استریل کردن این ظروف که به صورت یک خانه ای ودربعضی مواقع چندخانه ای می باشندازاشعه گامااستفاده می شود.

۷- Shaker :

ازاین وسیله جهت چرخش سوسپانسیون های موجوددرارلن ویالوله آزمایش استفاده می شود.دردوزمان ازاین دستگاه استفاده می شود: الف - جهت انتقال ماده غذائی به تمام نقاط محیط ودرنتیجه رشدبهینه میکروب

ب – جهت هوادهی درزمان کاربا میکروب های هوازی

۸- Loop and Needle :

ازاین دووسیله که یکی بصورت حلقوی ودیگری سوزنی شکل است جهت کشت دادن میکروب استفاده می شود. دراصل بااستفاده ازلوپ جهت کشت برروی محیط جامدوبدست آوردن تک کلنی و ازنیدل جهت کشت درون محیط مایع ویانیمه جامداستفاده می شود.هنگام استفاده ازهردووسیله می بایست ابتداهردورابرروی شعله آتش کاملااستریل نمودوپس ازسردشدن بوسیله آنهانمونه گرفته ودرون محیط جدید کشت داد.جنس هردومی بایست ازپلاتین باشدولی بطورمعمول ازسیم های آهنی باریک جهت ساخت آنهااستفاده می شود.بطوراستانداردطول لوپ ویانیدل می بایست ٦ سانتیمترباشدوپس از ساخت لوپ بایدبتوان بوسیله آن میزان ۰/۰۱ میلی لیتر(قطرلوپ ٥ میلی متر) ویا ۰/۰۰۱ میلی لیتر (٤میلی متر) رابرداشت نمود.

جلسه دوم :

Simple stain :

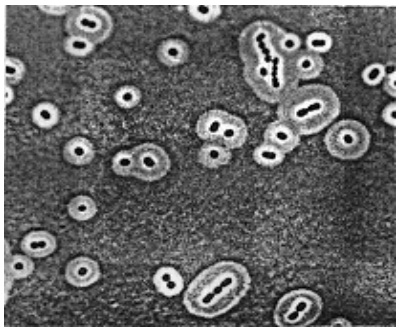
باکتری ها به دلیل بی رنگ بودن در زیرمیکروسکوپ نوری بخوبی قابل مشاهده نیستند . به همین دلیل با استفاده از ترکیبات شیمیائی که در میکروبیولوژی به آنها رنگ گفته می شود سعی می گردد تا آنها را رنگ آمیزی نمود تا بااین عمل اثبات وجود باکتری سریعتر انجام گیرد . دراصل بدلیل رنگ شدن باکتری و قرارگیری آن در یک زمینه شفاف و ایجاد یک اختلاف زمینه با استفاده از یک رنگ و در کوتاهترین زمان ممکن پیکره باکتری نمایان می گردد . باکتریها از نظر شکل شامل : Cocci ، Rod ، Sprillium و Spirochete می باشند.

جهت رنگ آمیزی ساده ابتدا ازنمونه یک گسترش تهیه کرده وسپس بااستفاده ازحرارت نمونه رافیکس می کنیم بعدبرروی آن رنگ متیلن بلومی ریزیم و۳ الی ۵ دقیقه زمان می گیریم.سپس لام راشسته وپس ازخشک کردن آن رادرزیرمیکروسکوپ مشاهده می کنیم .در این رنگ آمیزی چون فقط ازیک رنگ استفاده شده است تمام میکروب هابه یک رنگ مشاهده می شوند.ازاین رنگ آمیزی برای اثبات وجودمیکروب ومشاهده شکل آن استفاده می شود.

رنگ آمیزی کپسول :

کپسول باکتری به دلیل بی باربودن تمایلی برای جذب رنگ ندارد.درنتیجه بایدبرای دیدن آن ازروش Negative stain استفاده نمود.دراین روش باکتری وزمینه لام رنگ می شودولی کپسول رنگ نگرفته وبصورت یک هاله شفاف دراطراف باکتری دیده می شود.

ساده ترین راه برای این نوع مشاهده استفاده همزمان ازIndian ink وکریستال ویولت یامتیلن بلواست.دراین روش ابتدایک قطره ازNormal saline راروی لام گذاشته وبااستفاه ازلوپ مقداری باکتری به آن اضافه می کنیم. سپس یک قطره جوهرسیاه ویک قطره کریستال ویولت یامتیلن بلوبه آن اضافه می کنیم.سپس یک لامل برروی آن قرارداده وآنرادرزیرمیکروسکوپ بررسی می کنیم.دراین رنگ آمیزی زمینه لام به دلیل جوهرسیاه تیره وپیکره باکتری آبی دیده می شود وکپسول باکتری بصورت یک هاله شفاف دراطراف باکتری دیده می شود.



جلسه سوم : رنگ آمیزی گرم

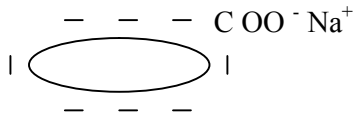
ازترکیبات شیمیائی که به آنها Dye گفته می شودجهت رنگ آمیزی باکتریها استفاده می شود.علت استفاده ازرنگ آمیزی مشاهده بهترباکتری می باشد.ازآنجائی که میکروبها بدون رنگ آمیزی بوسیله میکروسکوپ نوری به خوبی مشاهده نمی گردندبنابراین عبارت بهترباستفاده ازرنگ آمیزی یک اختلاف زمینه بین میکروب رنگ شده وزمینه شفاف بوجودمی آیدوهمین مسئله باعث مشاهده بهترمیکروب می شود.

رنگها به دودسته اسیدی وبازی تقسیم می شوند.ازرنگ های اسیدی می توان به فوشین وائوزین اشاره کردکه تمایل به رنگ کردن قسمتهای بازی سلول مانندسیتوپلاسم رادارند.ازرنگ های بازی می توان به کریستال ویولت , متیلن بلو و سافرانین اشاره کردکه تمایل به رنگ کردن قسمت های اسیدی سلول ازخودنشان می دهند.

سطح باکتری هادارای میزان زیادی گروههای کربوکسیلی (COOH) ناشی ازاسیدآمینه های بکاررفته دردیواره باکتری می باشد.زمانی که این گروههاتجزیه می شوندسطح باکتری میزان زیادی بارمنفی پیدامی کند:

$$COOH \rightarrow COO^- + H^+$$

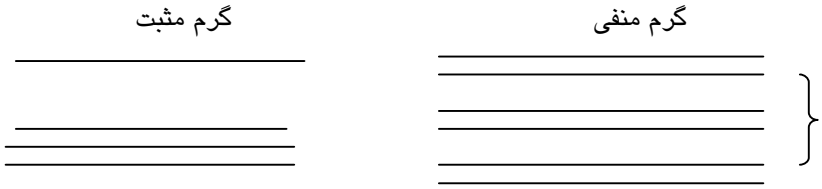
درطبیعت بجای هیدروژن ترکیباتی همچون Na^+ و K^+ قرارمی گیردوهیدروژن بااکسیژن تشکیل آب می دهد.



هنگامیکه ازرنگ های بازی همچون متیلن بلو جهت رنگ آمیزی باکتری استفاده می شوددراصل یک جابجائی یونی رخ می دهدورنگ روی پیکره باکتری مستقرمی شود واملاحی همچون سدیم تولید نمک می نمایند.

$$\text{Bacterial cell surface}^- Na^+ + MB^+Cl^- \rightarrow \text{Bacterial cell surface}^- MB^+ + Na^+ Cl^-$$

قبل ازاینکه مراحل مختلف رنگ آمیزی گرم توضیح داده شودلازم است نکاتی چنددرارتباط باماهیت دیواره باکتری های گرم منفی وگرم مثبت بیان شود.دیواره باکتری گرم مثبت دارای پپتیدوگلیکان ضخیم درحدود۸۰nm است ودرزیرآن یک غشای سیتوپلاسمی قرارگرفته است درصورتیکه دیواره باکتریهای گرم منفی درابتدابایک غشاء دولایه خارجی شروع شده ودرزیرآن فضای پری پلاسمیک قراردارد.وبعدازاین فضاغشاء سیتوپلاسمی قرارگرفته است.حدفاصل غشاء خارجی وداخلی درباکتری گرم منفی یک پپتیدوگلیکان نازک یک یا دولایه ای قرارگرفته است.



رنگ آمیزی گرم درسال ۱۸۸٤ توسط کریستین گرم ابداع گردیدوبه افتخاروی نامش برروی این رنگ آمیزی قرار گرفت . نام برده در یک بیمارستان در برلین کار می کرده است و از این رنگ آمیزی برای اختلاف بین دو گروه

ازمیکروارگانیسم هااستفاده کرده است وتابه امروزنیزاین رنگ آمیزی استفاده می شود.

دراین رنگ آمیزی ابتدابرروی نمونه فیکس شده رنگ کریستال ویولت اضافه می شود.پس ازگذشت یک دقیقه رنگ راخالی کرده وبجای آن ید یالوگل اضافه می شود.دراثرایجادکمپلکس کریستال ویولت وید رنگ برروی باکتری مستحکم می شود.علت نشستن کریستال ویولت باآب این است که آب ازایجادکمپلکس رنگ ویدجلوگیری می کند.دراین مرحله درباکتریهای گرم مثبت رنگ برروی پپتیدوگلیکان ودرباکتریهای گرم منفی برروی غشاء خارجی قرارگرفته است.درادامه ازترکیب استن – الکل استفاده می شود.استن – الکل خاصیت حل کردن چربی رادارد.بنابراین غشاء خارجی باکتریهای گرم منفی حل شده ورنگ ازروی این باکتریهاپاک می شودودرنتیجه پپتیدوگلیکان این باکتریهانمایان می شود.لازم به ذکراست که پپتیدوگلیکان باکتری های گرم مثبت درمدت زمان مشخص رنگ آمیزی به دلیل ضخیم بودن رنگ راحفظ می کند.

سپس ازرنگ سافرانین استفاده می شود.دیواره باکتریهای گرم مثبت ازقبل رنگ شده است ولی پپتیدوگلیکان باکتری گرم منفی فاقدرنگ می باشدکه بوسیله سافرانین رنگ می شود.درنتیجه درپایان رنگ آمیزی باکتریهای گرم مثبت رنگ بنفش وباکتریهای گرم منفی رنگ قرمزبه خودمی گیرند.هنگام رنگ امیزی نکاتی چندرابایدرعایت کرد:

۱- هنگام فیکس کردن نمونه ازحرارت بیش ازحدخودداری شودچون این عمل می تواندبه پیکره باکتری صدمه واردکندودررنگ آمیزی اخلال ایجادشود.

۲- هنگام استفاده ازاستن – الکل درصورتیکه این ترکیب بیش ازحدبرروی نمونه بمانداحتمال اینکه باکتریهای گرم مثبت به صورت گرم منفی دیده شوندزیاداست.چراکه رفته رفته باکتری گرم مثبت رنگ خودراازدست می دهد.

۳- همواره ازرنگ تازه استفاده شود زیرادراثرماندن رنگ احتمال اکسیدشدن رنگ وجوددارد.

٤- پپتیدوگلیکان باکتریهای گرم مثبت دراثرپیرشدن باکتری نازک می شود واحتمال اینکه باکتری بصورت گرم منفی رنگ بگیرندزیاداست.برای رفع این مشکل می بایست ازکشتهای جوان ٢٤ ساعته استفاده شود.

روش کار:

۱- تهیه گسترش ازنمونه وفیکس کردن آن بوسیله حرارت		۵- استن – الکل	۱۵ الی ۲۰ ثانیه
۲- کریستال ویولت	یک دقیقه	٦- شستشوباآب	
۳- ید	یک دقیقه	۷- سافرانین	۳۰ ثانیه
٤- شستشو باآب		۸- شستشوباآب , خشک کردن ومشاهده بابزرگنمائی ۱۰۰	

جلسه چهارم : رنگ آمیزی اسپور

اسپور شکل مقاوم باکتری است و در مقایسه با شکل فعال باکتری ، اسپورها حرارت بیشتری را تحمل می کنند. همچنین اشکال اسپوردار نسبت به ارگانیسم های فاقد اسپور در برابر مواد ضد عفونی کننده مقاومت بیشتری دارند . اسپورها فعال نیستند بنابراین آب درون اسپور ها کم است و به همین جهت اسپور نسبت به سلول باکتری شفاف تر دیده می شوند . هر باکتری فقط یک اسپور تولید می کند درنتیجه اسپور راهی برای بقای نسل است نه تکثیر درضمن سرعت رویش اسپور نسبت به سرعت اسپورزایی بیشتر است.

اسپورزائی به دلیل کمبودمنابعی همچون کربن یا نیتروژن آغازمی گردد وبعنوان یک تمایزدائم به محسوب می گردد.

۱- گسترشی ازباکتری موردنظرراتهیه نموده وآنراباحرارت فیکس می نمائیم.

۲- سطح نمونه رابامحلول سبزمالاشیت می پوشانیم.

۳- ازسطح زیرین لام توسط چراغ الکلی به محلول رنگ حرارت می دهیم تابخارمتصاعدشود.زمانی که بخار متصاعد شدحرارت راقطع می نمائیم وپس ازسردشدن رنگ ، مجدداً حرارت راتکرارمی کنیم .نبایدرنگ روی سطح لام بجوشدونیزنبایدرنگ خشک شود.این عمل رابه مدت ۵-۳ دقیقه ادامه می دهیم.سپس رنگ روی لام رادور می ریزیم.

۴- اجازه می دهیم تالام خنک شود.درصورت اضافه نمودن آب جهت شستشوبلافاصله لام می شکند.

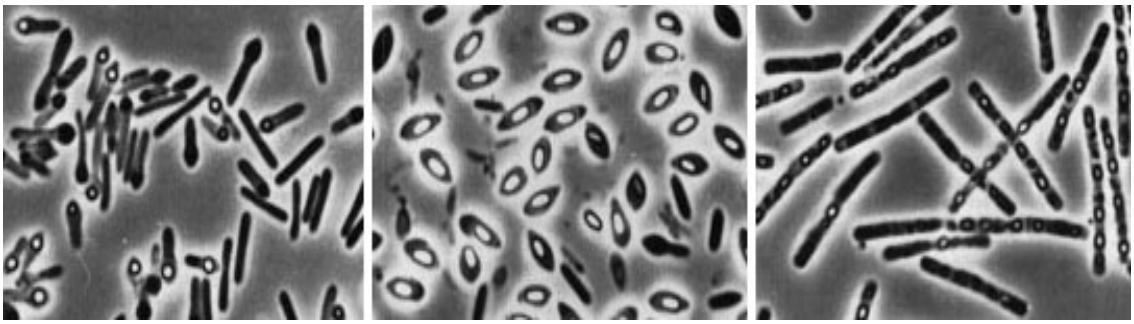
۵- به مدت ۳۰ ثانیه باآب لام رامی شوئیم.

۶- ازمحلول ۵/. درصدسافرانین به مدت یک دقیقه استفاده می نمائیم وسطح لام رامی پوشانیم.

۷- لام راباآب می شوئیم.

۸- لام راباکاغذخشک کن بادقت خشک نموده وزیرمیکروسکوپ باعدسی ۱۰۰ بررسی می نمائیم.

دراین روش رنگ آمیزی اسپورهابه رنگ سبزوباکتریهابه رنگ قرمزمشاهده می شود.



جلسه پنجم : محیط های کشت میکروبی

اولین شرط تشخیص یک میکروب , جداسازی آن است وتازمانی که ازیک محیط مناسب استفاده نشوداین امرتحقق پیدانمی کند.پس ازکشت میکروب وتشکیل کلونی می توان بااستفاده ازرنگ آمیزی گرم وتست های تشخیصی به سرعت آن راتعیین هویت نمودونسبت به درمان آن مبادرت کرد.

درآزمایشگاه میکروبیولوژی ازمحیط کشتهای مختلفی برای رسیدن به این موضوع استفاده می شودکه به شرح زیرمی باشند:

1-Liquid media :

این نوع محیط هابه دلیل مایع بودن درلوله ساخته می شوند.میکروب به راحتی دراین محیط هارشدمی کندولی تشکیل کلونی نمی دهدودراصل رشدمیکروب ازروی کدورت محیط شناسائی می شود.جهت تشخیص کدورت کافی است یک محیط استریل رادرکنارمحیط موردآزمایش قراردهیم وآنهاراباهم مقایسه کنیم.ازاین محیط هازمانی استفاده می شودکه میزان میکروب درنمونه اولیه بسیارکم است ودراصل مابااین عمل غنی سازی راانجام می دهیم.ازمعروف ترین این محیط هامی توان به Nutrient broth & Trypticase soy broth اشاره کرد.یکی دیگرازمحاسنات این محیط ها این است که باکتری درصورتی که زخمی شده باشدیادرشرایط بدغذائی وکمبودانرژی قرارگرفته باشدمی تواندبه راحتی خودراترمیم کند.

2- Semiliquid media :

این نوع محیط هادارای ۰/۱ الی ۰/۲ درصد Agar می باشند.آگارماده ژلاتینی می باشدکه ازجلبک های دریائی بدست می آید.غیرازمواردداستثنائی توسط باکتریهامصرف نمی شودوتادمای ٤٥ درجه ذوب نمی گردد.درصورتی که میزان این ماده درمحیط به ۱/۵ درصدبرسدمحیط کاملا سفت می گرددوباکتری برروی آن تشکیل کلونی می دهد.

درمحیط های نیمه مایع به دلیل همین میزان کم آگاراکسیژن تااعماق محیط نمی تواندنفوذکند.درنتیجه می توان دراین نوع محیط ها اجتماعی ازباکتریهای هوازی وبی هوازی رامشاهده کردبطوری که باکتریهای هوازی دربالای لوله وباکتریهای بی هوازی درپائین لوله دیده می شوند.ازمعروف ترین این محیط ها می توان به محیط Thioglycolate اشاره کرد.

3- Solid media :

ازمحیط جامدبرای گرفتن تک کلونی استفاده می شودبه همین منظورتمام مایحتاج میکروارگانیسم (خصوصامنابع کربن ونیتروژن)رادردرون ماده ای پلی ساکاریدی به نام آگارکه ازنوعی جلبک قرمزدریائی(Marin rhodophycelan Algea و Gelediumand Gracilaria spp) تهیه می شوداین ترکیب که درسیتوپلاسم ودیواره سلولی جلبک موجوداست از۷۰٪ آگاروز و ۳۰٪ آگارو پکتین تشکیل شده است.این ترکیب

ژله ای در ۱۰۰ درجه بصورت مایع ودرکمتراز۴۵ درجه بـه صـورت جامـدمی باشـدوبرای اینکـه محـیط بصـورت کاملاً جامددربیایدمعمولاً میزان ۱/۵ الی ۲درصدآن رابه ۱۰۰ سی سـی آب مقطراضـافه مـی کننـد.درصـورتی کـه خواسـته باشـیم میـزان کمتـری اکسـیژن بـه محـیط کشـت واردشـود، یانگهـداری بـاکتری هاویاحرکـت بـاکتری رابهترمشاهده کنیم ازمحیط های نیمه جامدکه معمولاً کمتراز۱٪آگاردرخوددارنداستفاده می شود.لازم به ذکراست که گاه ترکیبات اضافه شده به آگارقدرت تحمل دمای اتوکلاوراندارندبنابراین آنهارابه طرق مختلف اسـتریل کـرده وپس ازسردشدن آگار(دمای ۴۵ درجه) آنرابه آگاراضافه می کنند.(مانندکشت خون)درضـمن ایـن ترکیـب درpH زیر۵ هیدرولیزشده وجامد نمی شود.

بـاکتری بـرروی ایـن محـیط کـاملا بسـته وسـفت رشـدمی کندومواد‌غـذائی موردنیازخودرابراسـاس پدیـده انتشاروباتولیدآنزیم ومحلول کردن آنها فراهم می کند.

4- Semisolid media :

این نوع محیط ها دارای ۰/۵ الـی ۰/۷۵ درصـدآگارمی باشـندواین میـزان آگاربـه محـیط شـرایط کـاملاژلاتینی را می دهد.نسبت به محیط قبل نفوذپذیری محیط بازهم کمترمی شود ولـی بـه راحتـی مـی تـوان عـلاوه برکـدورت , تحرک باکتری رانیزمشاهده نمود.ازاین نوع محیط می توان به SIM (سولفور،ایندول ، موتیلیتی)اشاره کرد.

طبقه بندی محیط ها :

1- General media :

به دلیل غنی بودن این نوع محیط هاهمه باکتریهابه راحتی برروی آن رشدمی کنند.ازمعروف ترین آنها می توان به Blood agar اشاره کردکه به خاطر داشتن خون کاملا غنی می باشد.برخی ازباکتریها که دراصطلاح Fastidious یامشکل پسندمی باشندبه این محیط هاعلاقه دارند.

2-Selective media :

به این نوع محیط هاترکیبات خاصی اضافه می شودتاباکتری موردنظربه راحتی جـداگردد.ولـی شـخص آزمـایش کننده بایدازقبل بداندکه باکتری موردنظرش نسبت به چه ماده یامواد‌ی حساسیت داردویامقاوم است .ازجملـه ایـن ترکیبات می توان به صفرا , آنتی بیوتیک ورنگ هااشاره کرد.ماننـد محـیط هـای S.S وSeleniate F کـه بـه دلیـل داشتن صفرا وآنتی بیوتیک ازرشدبسیاری ازباکتریها به استثنای سالمونلا وشیگلا جلوگیری می نمایند.

3- Differential media :

این نوع محیط هابه دلیل داشتن معرف های مختلفـی کـه مـی تواننـددرpH هـای مختلـف تغییررنـگ ازخودنشـان بدهنددرآزمایشگاه میکروب شناسی ازجایگاه ویژه ای برخـوردارمی باشـند.ازجملـه ایـن معـرف هـامی تـوان بـه Phenol red , Methyl red , Nutral red , Bromothymol blue , Bromocrosol purple اشـاره

کرد.دراصل هنگام استفاده قندتوسط باکتری اسیدتولیدمی شودوهریک ازاین معرفهادرpH های تولیدشده می توانندرنگ مختلفی راازخودنشان دهند. مثلا فنل رد درpH اسیدی زرد ودرpH قلیائی قرمز می باشد.

برای ساخت محیط کشت به چندچیزنیازاست : آب مقطراستریل , پودرمحیط کشت , ترازو , ظرف تهیه محیط کشت , شعله گاز , اتوکلاو و پلیت

ابتداروی ظرف محیط کشت رامی خوانیم مثلا نوشته شده است برای تهیه این محیط باید۱۵ گرم محیط رادر۱۰۰۰ سی سی آب مقط حل نمود.اگرما۲۰۰ سی سی محیط نیازداشته باشیم به فرم زیرعمل می نمائیم:

$$\frac{15gr}{1000cc} \div 10 = \frac{1.5gr}{100cc} \quad \Rightarrow \quad \frac{1.5gr}{100cc} \times 2 = \frac{3gr}{200cc}$$

پس ازحل کردن نمونه درآب مقطروجوشاندن آن بوسیله حرارت آن رادرون اتوکلاوقرارمی دهیم .(دمای ۱۲۱ درجه , فشار ۱۵ پوند , ۱۵ دقیقه زمان).پس پایان زمان موردنظرشیرتخلیه اتوکلاوراکم کم بازمی کنیم

(یادآوری می شودکه درشرایط اعمال شده اتوکلاوماده درونی آن جوش نمی خوردولی اگرفشاررابه یکباره تخلیه کنیم محیط به جوشش درآمده وازظرف به بیرون ریخته می شود)سپس محیط راخارج کرده دردمای اطاق قرارمی دهیم واجازه می دهیم تادمای ظرف به حدود ٤٥ درجه برسدسپس آنرادرون پلیت های استریل می ریزیم وپس ازسفت وخنک شدن محیط آنهارابه یخچال انتقال می دهیم.درضمن اگرقرارباشدمحیط درلوله تهیه گرددبایدپس ازجوشاندن محیط قبل ازاتوکلاوآن رابه درون لوله های موردنظرانتقال دادوسپس به اتوکلاومنتقل نمود.

درآخربرای اطمینان ازاینکه محیط های تهیه شده کاملا استریل می باشندبطورتصادفی یکی ازآن راانتخاب کرده وآن رابه مدت ٢٤ ساعت دردمای ٣٧ درجه قرار می دهیم درصورت عدم رشدمیکروب می توان به صحت کارخودپی برد.

جلسه ششم :کشت وخالص سازی میکروب

منظورازکلمه Streaking کشت میکروب برروی محیط جامداست که ماحصل آن ایجادColony مـی باشـد.کلـونی دراصل حاصل تقسیم یک سلول مادربه دوسلول دختری درعرض ۲۰ الـی ۳۰ دقیقـه مـی باشـدکه ایـن تقسـیمات درعرض ۲٤ ساعت به عددبیلیون میرسد (۲^n).به عبارت بهتربه توده ای کـه پـس از۲٤ سـاعت ازیـک بـاکتری بـه دست می آیدکلونی گفته می شود.پس اگربرروی محیط کشت میکروبـی ۵۰ تـوده دیـده شوددراصـل مادرابتـدا۵۰ عددباکتری داشته ایم که پس از۲٤ ساعت به ۵۰ توده تبدیل شده اند.

هدف ازکشت باکتری :

۱- بامشاهده کلونی می توانیم نوع گرم مثبت یاگرم منفی بودن راحدس بزنیم چراکه باکتریهـای گـرم مثبـت دارای کلونی کوچک وتقریبا خشک وباکتریهای گرم منفی دارای کلونی های مرطوب وآب دارمی باشند.

۲- بعضاباکتری برروی محیط تغییراتی ازقبل همـولیز , تغییـر pH , ایجـاد بـو , تولیدرنگدانـه وحتـی درمـواردی استثنائی ذوب آگاررااز خودنشان می دهد.

Liquid media:

برای کشت درمحیط مایع که بطورمعمول درلوله ساخته می شودبایدازوسایلی همچـون Needle , Loop, Swab وPipet استفاده کرد.هدف ازاستفاده ازاین محیط هاغنی سازی وافزایش تعدادمیکروب است پس ازایجـاد کـدورت ازاین محیط هانمونه گرفته وبه محیط جامدمنتقل می سازیم.اندک باکتریهائی هسـتندکه بتواننـددرون محـیط مـایع ایجادکلونی نمایند.دراین نوع محیط هاباکتریهای هوازی دربالای لوله وباکتریهای بـی هـوازی درپـائین لولـه رشـد می کنند.

Solid:

برای کشت بروی محیط جامدمی بایست به نکات زیرتوجه نمود:

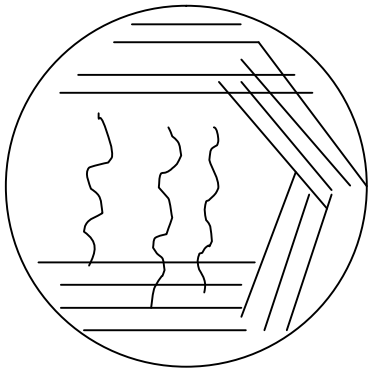
۱- ابتدابا Loop ویاSwab نمونه گرفته وبطورفرضی برروی $\frac{1}{5}$ ویا $\frac{1}{4}$ محیط کشت کاملا آنراکشت می دهیم.

۲- لوپ رابوسیله شعله استریل می کنیم وآنرادرکنارشعله ویابااستفاده ازکنارمحیط کشت خنک می کنیم.

۳- بااستفاده ازپهنای لوپ ازقسمت اول نمونه برداشته وبه قسمت دوم محیط کشت منتقل می سازیم وبدون اینکـه به قسمت اول برگردیم آنرادراین ناحیه پخش می کنیم.

٤- مجددا لوپ رااستریل می کنیم وهمان مراحل قبل رابرای ناحیه سوم وچهارم تکرار می کنیم.

۵- محیط کشت رادرانکوباتور۳۷ درجه قرارمی دهیم.پس از۲٤ ساعت محیط راازلحاظ تشکیل تک کلـونی بررسـی می کنیم.هرچه بهترکارشده باشدکلونی هامجزاتروکلونی هاواضح تردیده می شوند.



درافرادمبتدی دواشکال وجوددارد : ۱- حجم نمونه اولیه آنهازیاداست ۲- ازکل محیط خوداستفاده نمی کنند.

جلسه هفتم : بررسی اثرعوامل ضدمیکروبی

امروزه ازموادمختلفی برای نابودی میکروب هااستفاده می شود.ولی درتمام حالات می بایست به یادداشته باشیم که موادضدمیکروبی درکمترین غلظت بیشترین اثرراداشته باشند.درغیراین صورت ممکن است برروی بافت زنده تاثیرات سوء ازخونشان دهند.این قبیل موادبه دوگروه تقسیم می شوند:

۱- Disinfectant : موادضدمیکروبی که فقط برای سطوح بی جان استفاده می شوند.مانند کلر وفنل

۲- Antiseptic : موادضدمیکروبی که ازبرای ضدعفونی سطوح جانداراستفاده می شود.مانند اتواع پمادها

این نکته رابایدبه خاطرداشت که این مواد باتوجه به نوع تاثیری که می توانندبرروی میکروب داشته باشندازخود دونوع تظاهررانشان می دهند :

۱- Bacteriostatic : این موادبطورقابل برگشت به آنزیم های سلول متصل می شوندودرصورت خروج ازمحیط مجدداباکتری زندگی خودراشروع می کند.

۲- Bacteriocidal : این موادبطورغیرقابل برگشت به آنزیم های سلولی متصل می شوندوبرای باکتری کشنده تلقی می شوند.

برای بررسی تاثیرموادشیمیائی ابتداازدستگاه Phanch استفاده کرده وازکاغذصافی Disk هائی راتهیه می کنیم. سپس این دیسک هارادریک Plate شیشه ای ریخته وآنرااتوکلاومی کنیم تااستریل گردد.

درادامه بوسیله Swab ازمیکروب موردآزمایش نمونه گرفته وبرروی محیطی جدید کشت Lawn تهیه می کنیم . دراین نوع کشت بوسیله سواپ تمام Plate می بایست پوشانده شود.سپس بااستفاده ازیک پنس استریل یکی ازدیسک های استریل شده رابرداشته وبه ماده ضدعفونی کننده موردنظرتماس می دهیم .تاماده جذب کاغذشود. (دقت فرمائیدکه کاغذدرماده موردنظر فرونرودچون درادامه کارباعث ایجاداشکال می شود)بعدبه آرامی کاغذرابرروی Plate کشت شده قرارمی دهیم .این عمل رابرای چندماده ضدعفونی تکرار می کنیم.درادامه آنرادرانکوباتورقرارداده ومدت ۲٤ ساعت زمان می گیریم.دراین مدت ماده ضدمیکروبی که درکاغذصافی وجودداردبه آرامی درمحیط انتشارپیدامی کندودرصورتی که بتواندبرروی میکروب تاثیربگذارددراطراف آن یک Zone عدم رشدمشاهده می شود.درغلظت های مساوی موادهرچه این Zone بزرگترباشدنشانه قدرت زیادآن خواهدبود.قوی ترین ماده ضدمیکروبی فنل است.این ماده توانائی آن راداردکه حتی اسپورباکتریهاراازبین ببرد.به همین علت سایرموادضدمیکروبی رابه فنل قیاس می کنند.

جلسه هشتم :تاثیرآنتی بیوتیک ها

برخـی ازمیکروارگانیسـم هاباتولیـدآنتی بیوتیـک مـی توانندازرشدسـایرمیکروب هـاجلوگیری نماینـد.ازمهمتـرین باکتریهائی که این عمل راانجام می دهندعبارتنداز:Streptomyces , Bacillus , Pseudomonas

اززمان کشف پنی سیلین توسط فلمینگ تاکنون زمان زیـادی مـی گـذرد.درابتداشـایدآنتی بیوتیـک هـای آن زمـان می توانستندباکتریهاراازبین ببرندولی پس ازگذشت اندک زمانی باکتریهابه آن آنتی بیوتیکهامقـاوم شـدندومحققین مجبوربه تولیدنسل های جدیدی ازآنتی بیوتیک شدند.امـروزه آنتـی بیوتیـک هارابـه سـه گـروه تقسـیم مـی کننـد:

۱- آنتی بیوتیک تولیدی به وسیله میکروب , ۲- آنتی بیوتیک نیمه سنتزی , ۳- آنتی بیوتیک سنتزی

باتوجه به گفته بالابایست این نکته رامدنظرقراردادکه برای نابودی میکروب هاازهرآنتی بیوتیکی نمی توان استفاده نمود.بخصوص درزمانی که فردی مریض دچارعفونت شده اسـت چـون اگرمیکـروب مقـاوم باشـدبااین عمـل نـه تنهامیکروب ازبین نمی رودبلکه زمان معالجه فردنیزازدست رفته است.

آنتی بیوتیک به چندشکل ازرشدمیکروب هاجلوگیری می کنند : ۱- جلوگیری ازسنتزدیواره , ۲- ممانعـت ازفعالیـت غشاء , ۳- ممانعت ازپروتئین سازی , ٤- ممانعت ازسنتزماکرومولکول ها , ٥- ممانعت ازهمانندسازی DNA

برای اینکه بتوان برای فردمریض داروئی خوب تجویزنمودبایدازروش Antibiogram استفاده نمـود.درایـن روش ابتـــداازمیکروب بدســـت آمـــده ازفردمـــریض یـــک سوسپانســـیون تهیـــه نمـــوده وآن رابـــاMcfarland ۰.۵ ($BaCl_2 + H_2SO_4$) که یک محیط کدرمی باشدمقایسه می کنیم .درصورتی که کـدورت سوسپانسـیون میکروبـی بالوله نیم مک فارلند باهم برابرباشدمی توان گفت که درهرml سوسپانسیون تهیـه شـده $۱۰^{۸}$ * ۱/۸ میکـروب وجوددارد.این عمل برای این است که درتمام کشـورهااین روش بصـورت اسـتانداردانجام شـود.درصـورت نبـود نیم مک فارلند بایدبتوان نوشته های یک روزنامه راازپشت سوسپانسیون مطالعه نمود.

پس ازاستانداردکردن سوسپانسیون به همان روش موادشیمیائی کشت Lawn تهیه نموده واین بارازدیسـک هـای آنتی بیوتیکی استفاده می کنیم.هنگام قراردادن دیسک هابایددقت نمودکه دیسک رافقط یکباربه محیط تمـاس دهـیم وازتماس های مکررخوداری کنـیم.فاصـله هردیسـک تـادیواره Plate بایـد۱/۵ سانتیمترومرکزهردیسـک بادیسـک دیگر۲/۵ سانتیمترباشد.پس ازگرمخانه گـذاری بایـدباخط کـش قطـرZone عـدم رشـدرااندازه گرفـت وبااسـتفاده ازجداول استانداردحساسیت , عدم حساسیت ویانیمه حساس بودن میکروب نسبت بـه آن آنتـی بیوتیـک راانـدازه گرفت.

هنگام کاربادیسک های آنتی بیوتیکی ممکن است شاهددوپدیده جالب باشیم:

۱- Synergism : دراین حالت ممکن است دودیسک آنتی بیوتیکی مجاورهرکدام برروی میکروب تاثیرداشته باشندولی درفصل مشترک خود(جائی که دراثرپدیده انتشاردوآنتی بیوتیک دریکدیگرفرورفته اند.) Zone بزرگتری راتولیدنمایند.این نشانه عمل متقابل دودارودرازبین بردن یک میکروب است ویااینکه هیچیک به تنهائی آنراازبین نمی برندولی درفصل مشترک آنهاشاهدازبین رفتن میکروب هستیم.

۲- Antagonism : دراین حالت ممکن است دودارو به تنهائی توانائی ازبین بردن میکروب رادارندولی درفصل مشترکشان به دلیل خنثی کردن همدیگرمیکروب به راحتی رشدکرده است.

تذکر: بهترین محیط کشت برای آزمایش آنتی بیوگرام محیط Mueller hinton می باشد.

جلسه نهم : نیازمندی های فیزیکی

جهت رشدبهتر میکروارگانیسم هاعلاوه بر احتیاجات غذایی باید یکسری شرایط فیزیکی و محیطی نیزفراهم باشد.

Temperature:

دما از مهمترین عوامل فیزیکی است کـه در حیـات میکروارگانیسـم نقـش دارد . حـداقل و حـداکثر دمـایی کـه یـک میکروارگانیسم مـی توانـد درآن رشـد کنـد تحـت عنـوان Temperature growth خوانـده مـی شـود . ولـی هـر میکروارگانیسم جهت رشد به یک Optimum دما نیاز دارد . که بنابر تعریف دمـایی اسـت کـه میکروارگانیسـم در آن بیشترین سرعت رشد را دار د . برخی از میکروارگانیسمها فقط در نزدیکـی دمـای Optimum قـادر بـه رشـد هستند که به آنهاStenothermophile گفته می شود . در برخی از میکروارگانیسـم هـا یـک range دمـایی وسـیع وجود دارد که به آنهاEurythermophile گفته می شود .

	Min	Optimun	Max
Psychrophile	۵-	۱۰	۲۰
Psychrotroph	۰	تا	۳۷
Mesophile	۲۵	۳۷	٤۵
Termophile	٤۵	٦۰-۵۰	۹۰-۷۰

pH :

مقدارعددی pH با غلظت یون H^+ نسبت مستقیم دارد $pH = \frac{1}{\log[H^+]}$ بر اساس pH مناسب رشد , باکتریها را به گروههای زیر تقسیم می کنند :

Relative humidity (RH:(

باکتریها مثل سایر موجودات جهت رشد نیاز بـه آب دارنـد . معیـار سـنجش رطوبـت در میکروارگانیسـم هـا (a_w) available water می باشد . a_w فشار بخار محلول به آب خالص است:

$$aw = \frac{Psolution}{Pwater}$$

Osmotic pressure & Ionic strength:

فشاری که در اثر اختلاف غلظت دوطرف یک پـرده نیمـه تـراوا بـه آن واردمـی شـودرا فشـار اسـمزی گوینـد. در باکتریها فشار اسمزی داخل باکتری نسبت به خارج آن چندین برابر افزایش نشان می دهد به این دلیل که بـاکتری برخلاف شیب غلظت وبااستفاده ازانرژی موادرابه داخـل حمـل مـی نمایـد.زمانیکـه بـه Cell membrane فشـار

زیادی وارد شود سلول می میردولیCell wall در باکتری باعث می شود کـه بـاکتری از فشـار اسـمزی محفـوظ بماند..

باکتریهایی که قادرند در فشار اسمزی بالا ادامه حیات دهنـد Osmophile نامیـده مـی شـوند . بـه باکتریهـا کـه غلظت بالای نمک را می توانند تحمل کنند و در آن رشد نمایند Halophile گفته می شود.

Halophile:

تمام باکتریهای Osmophile , Halophile هستند ولـی همـه Osmophile هـا , Halophile نیسـتند. باکتریهـای halophile به دو دسته تقسیم می شوند :

۱- Moderate halophile : عده ای که جهت رشد به حداقل ۳/۵٪ نمک نیاز دارند.

۲- Extreme halophile : عده ای که جهت رشد به حداقل ۱۵٪ الی ۳۰٪ نمک نیازدارند.

علت اصلی اینکه این باکتریهامی توانند نمک را تحمل کنندساختمان غشاء سلولی آنهااست استخراج کرد.

روش کار:

1- pH

دراین آزمایش محیط کشت های مایعی رابه pH های مختلف(۳ , ۵ و۷) می سازیم وباکتری موردآزمایش رابـه تـک تـک ایـن لولـه اضـافه مـی کنـیم بعـداز۲٤ سـاعت گرمخانـه گـذاری وضـعیت تحمـل pH رابـرای بـاکتری موردنظربدست می آوریم.

2-Osmotic pressure

برای این آزمایش هنگام ساخت محیط Nutrient agar آن رادرسه ظرف مسـتقل تهیـه نمـوده وبـه هریـک غلظـت خاصی ازنمک رااضافه می کنیم (۰/۵ و ۵ و۱۰ درصد نمک به ازاء هر۱۰۰ سی سی محیط اضافه می کنیم).سـپس باکتری آزمایشات قبل رابرروی این محیط های سه گانـه کشـت داده وبعـداز۲٤ سـاعت وضـعیت رشددرشـرایط اسمزی مختلف رابررسی می کنیم.

3- Temperature:

دردولوله حاوی محیط مایع ازباکتری آزمایش قبـل کشـت داده ویکـی رادردمـای یخچـال گذاشـته ودیگـری رابـه انکوباتورمنتقل می کنیم .بعدازگذشت ۲٤ ساعت وضعیت رشدمیکروب درهردولوله راباهم مقایسه می کنیم.

جلسه دهم : بررسی فعالیت Exoenzyme های میکروبی

آنزیم های میکروبی به دوگروه تقسیم می شوند:

۱- آنزیم های درون سلولی : این قبیل آنزیم هادردرون سلول دائماً درحال تولیدمی باشند.زیراچرخه های متابولیسمی سلول باکتری به این آنزیم هامرتباً احتیاج دارد.

۲- آنزیم های خارج سلولی : این گروه ازآنزیم هاصرفاً زمانی تولیدمی گردندکه درمحیط باکتری یک ماده غذائی واردشده باشدیابه عبارتی یک محرک ازبیرون باکتری راتحریک به ساخت آنزیم کرده باشدواین آنزیم تازمانی ساخته می شودکه آن محرک درمحیط وجودداشته باشد.درغیراین صورت باکتری نیازی به تولیدآن نخواهدداشت.

باکتری ها درداشتن آنزیم های گروه دوم یا Exoenzyme ها بایکدیگراختلاف دارند وازروی همین اختلاف می توان آنهاراازیکدیگرشناسائی نمود.درزیرتعدادی ازهمین نوع فعالیت های آنزیمی آورده می شود.

1- Starch hydrolysis :

برخی ازباکتری بوسیله آنزیم آمیلاز توانائی شکستن نشاسته رادارند.البته لازم به ذکراست که باکتری ابتدابه ساکن ازنشاسته استفاده نمی کندبلکه می بایست ابتدادرمحیط ترکیبات ساده دیگری دراختیارش قرار داده شودتاپس ازاتمام آن منبع غذائی باکتری مجبوربه ساخت آنزیم آمیلاز وتجزیه نشاسته گردد . ترکیب این نوع محیط کشت به شرح ذیل است :

1- agar	20 gr	2- Peptone	5 gr	3- Beef extract	3 gr
4- NaCl	5 gr	5- Starch	20 gr	6- D.W	1000 gr

پس ازآماده سازی محیط کشت وخنک نمودن آن ازباکتری مشکوک دروسط پلیت کشت می دهیم وپس از۲۴ ساعت برروی محیط کشت ودرست درمکانی که باکتری رشد کرده است مقداری یُد اضافه می کنیم. یُد بانشاسته محیط ترکیب شده ویک رسوب بنفش رنگ ایجادمی کند.درحالی که بدلیل مصرف نشاسته دراطراف خط کشت هیچگونه رسوب بنفش رنگی مشاهده نمی شود واین نشانه تولیدآنزیم آمیلازازطرف سلول باکتری می باشد.

2- Protein hydrolysis :

همانند حالت فوق دراین تست سعی می شود تاتولیدآنزیم Protease توسط باکتری بررسی گردد.ترکیب این محیط کشت به شرح ذیل است :

1- Nutrient agar , sterile	87.5 ml
2- Skimmed milk , sterile	12.5 ml
3- agar	0.2 gr

این محیط به دلیل وجودشیرسفیدرنگ است.پس ازکشت باکتری درصورت تولیدآنزیم پروتئازدراطراف خط کشت باکتری یک منطقه شفاف قابل مشاهده است که نشانه مصرف پروتئین شیرتوسط باکتری می باشد.

3- Carbohydrate fermentation :

بااستفاده ازاین تست سعی می گرددتاباکتری هارابراساس مصرف انواع قندازیکدیگرتشخیص داد.برای ساخت این نوع محیط ازترکیبات زیر استفاده می شود:

1- Meat extract	5	gr
2- Na_2HPO_4	2	gr
3- Bromothymol blue	12.5	ml (2.5 ml from 0.2% solution to 100 ml)
4- Sugar , 10% solution sterile	50	ml
5- water	950	ml

همانگونه که مشاهده می شودجهت این تست ازمحیط مایع استفاده می شودوازآنجاکه ماحصل استفاده ازقندتولیداسیدمی باشدبه همین جهت ازمعرف برموکرزول پارپل استفاده شده است.این معرف درشرایط اسیدی زرد رنگ ودرشرایط قلیائی بنفش رنگ می باشد.درصورتی که باکتری توانائی استفاده ازقندراداشته باشددراثرتولیداسیدرنگ محیط زردمی شود.ازطرفی برخی ازباکتری های درادامه مصرف قند، گاز نیز تولید می کنند لذا باقراردادن لوله هایِ Durham می توانیم گازتولیدی راجمع آوری ومشاهده نمود.

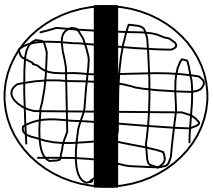
همچنین لازم به ذکراست که قبل ازاضافه نمودن باکتری می بایست یک شب آنرا درمحیطی مانند Nutrient broth کشت دهیم تادرصورتی که باکتری دردرون خودذخیره قندی داردتمام آنرا مصرف نمایدوهنگامی که به محیط تک قندی واردمی شودصرفاً ازقندمحیط استفاده نماید.

جلسه یازدهم : کشت ادرار

به علت اینکه باکتریهای ایجادکننده عفونت ادراری (Urinary tract infection یا UTI) هم ازگروه باکتریهای گرم مثبت وهم ازگروه باکتریهای گرم منفی می باشند ، معمولا هم زمان ازیک محیط Blood agar ویک محیط Mac Conkek یا EMB جهت کشت استفاده می شود.جهت انجام کشت می بایست ازلوپ های استانداردی که توانائی برداشت ۰/۰۱ یا ۰/۰۰۱ میلی لیترراداشته باشداستفاده نمود.لازم به ذکراست که این لوپ های استانداردرامی بایست دریک جایگاه جداگانه قراردادتا ازفرم ایده آل خارج نگردند.

جهت جمع آوری نمونه می بایست ازظروف دهانه گشاد باقاعده حداقل ۴ سانتی مترو دارای برچسب استفاده نمود.درصورتی که ازکودکان نمونه گرفته می شودمی بایست ازکیسه های پلاستیکی کوچک Urin bag که دارای سوراخ می باشند استفاده شود. درضمن حتماً باید فردمریض راراهنمائی نمود.بطوری که ابتدابایدچندقطره اولیه ادرارراخارج نمایدتااگرباکتریهای آلوده کننده محیطی ویانرمال فلوراهای بدن دراین منطقه قراردارندکاملاً شسته شوندوسپس مابقی ادرار رادرظرف آزمایشگاهی تخلیه نماید.(لازم به ذکراست که عفونت مجرای ادراری ازابتدای مسیرادرارشروع وبه مثانه ختم می شود.)

هنگام آزمایش برروی نمونه ابتداآنراتکان داده تاکاملاً مخلوط شود.سپس لوپ استانداردرادرآن فروبرده وپس ازخروج آنراازطرف پهن برروی پلیت قرارداده وباپهنای آن قطرپلیت رارسم می کنیم.درادامه بدون اینکه آنرااستریل نمائیم بطورزیکزاک ازبالابه پائین وسپس ازچپ به راست حرکت می نمائیم.(کشت شطرنجی)



هرچقدرفاصله خطوط کمترباشدکلنی های بیشتری ایزوله می گردند. پلیت هارادردمای ۳۷ درجه به مدت ۱۸ الی ۲٤ ساعت انکوبیت می نمائیم.سپس آنها راخارج کرده وکلنی های روی آنهارامی شماریم.کلنی های شمارش شده رابرحجم برداشته شده تقسیم می کنیم.مثلاً اگربالوپ ۰/۰۱ نمونه گرفته باشیم وتعدادنمونه شمارش شده ۲۰۰ کلنی باشدمی شود۰/۰۱ ÷ ۲۰۰ = ۲۰۰۰۰ یابه عبارتی ۲×۱۰^{٤}

ازنظرکلینیکی زمانی که تعداد باکتری $۱۰^{٥}$باشدعفونت گزارش می گردد ، درصورتی که تعداد $۱۰^{٤}$ باشدمشکوک می گردیم واگر $۱۰^{۳}$ باشدآنراعفونت تلقی نمی کنیم.(یادآوری می گرددکه مثانه می بایست همیشه استریل باشدوتعدادباکتری که پس ازمحاسبه بدست می آیدمشخص کننده همین تعدادباکتری درهرمیلی لیترادرار می باشد) ازنمونه های بدست آمده می توان رنگ آمیزی نمودوبعدازمشخص شدن نوع رنگ آمیزی گرم برای آنهاتست های آزمایشگاهی قراردادونوع میکروب رامشخص نمود.

درادامه باقراردادن تست های آنتی بیوگرام می توان حساسیت آنها رابه آنتی بیوتیکهای مختلف بررسی نمود.

کشت مدفوع

ناخوشی های اسهال یکی ازمعمولی ترین تغییرات سیستم گوارشی انسان است که به طرق مختلف بوجودمی آید:

الف- مصرف دارو :

ترکیبات ضدمیکروبی همچون کلیندامایسین ولینکومایسین سبب اسهال می شوند.این اسهال بسته به فرددرگیر می تواندازحالت خفیف تاخیلی شدیدمتغیرباشدوبعضاً می تواندرمواردی خاص دردرون روده تولیدغشاء کاذب نماید.دراین صورت دارونبایدادامه پیداکند.

ب- مسمومیت غذائی :

دراین نوع درگیری می بایست تاریخچه بیماری بررسی گرددبطوری که اگرفردفقط اسهال داشته باشدولی تب نداشته باشدمی توان احتمال دادکه غذای مصرف شده به سم میکروبی آلوده بوده است ومعمولاً این نوع عارضه بعدازگذشت مدت زمان ۲ الی ٤ ساعت بعدازخوردن غذاشروع می شودوبعدازگذشت چندساعت (بسته به توانائی فرد) خودبه خودخوب می شود.باکتری Staph aureus یکی ازمتداول ترین باکتریهادراین زمینه می باشد.

درصورتی که علائم بعدازگذشت ۱۲ الی ۱۶ ساعت مشخص گرددداحتمال اینکه Clostridium perfringens باشدزیادتراست.اگراسهال همراه باتب باشداحتمال حضور Salmonella و Shigella درروده وجوددارد.درتمام مواردابتدامی بایست تاریخچه قبل ازبیماری ازوی پرسیده شودوسپس ازمدفوع نمونه گرفت وآنرابرروی محیط های مختلف کشت داد.

ج- آمیب های روده ای :

گاه آمیب روده ای مانند انتاموباهیستولیتیکا عامل بروز اسهال می باشدکه معمولاً این نوع اسهال همراه باخونریزی می باشدوبعضاً آن قدرخون زیادمی باشدکه به فرداجابت مزاج دست می دهد.درحالی که روده وی پرازخون است وازمدفوع خبری نیست.

درهرصورت می توان باقراردادن مقداری ازنمونه مدفوع برروی لام (بوسیله اپلیکاتور) وقراردادن یک تادوقطره یُد برروی آن ، نمونه رازیرمیکروسکوپ قراردادوبابزرگنمائی ۴۰ محتویات آنرابررسی نمود.دراین حالت می توان تخم انگل ، گلبولهای قرمزویاسفیدرابررسی نمود.(البته لازم به ذکراست که گاه خونریزی بصورت میکروسکوپی می باشد)

این موضوع بایدهمیشه مدنظرباشدکه برخی ازباکتریهای روده ای مانندشیگلابه سرعت درنمونه ازبین می روندومی بایست بلافاصله برروی ان آزمایش صورت گیرد.زمانی که اسهال خونی زخم ی دهدمی توان از Rectal swab استفاده نمود یابعبارتی سواب رادرداخل مقعدوپشت اسفنگترفرستادوآنرابه آطراف چرخاندتابه دیواره تماس یابدوسپس بااستفاده ازهمان سواب برروی محیط های مختلف کشت داد.

کشت مدفوع بطورقراردادی درشرایط هوازی صورت می گیردچون اکثرباکتریهای این گروه بی هـوازی اختیـاری می باشند(مانندE.coli)

جهت جداسازی نمونه وهمچنین غنی سازی آن ابتداازمدفوع به اندازه ۱ الی ۲ گرم نمونه گرفتـه وآنرادرداخـل ۱۵ میلی لیترمحیط Selenite F کشت می دهیم.ایـن محـیط باعـث تکثیرباکتریهـائی همچـون سـالمونلا وشـیگلا شـده وازرشدسایرباکتریهای موجود درروده جلوگیری می کند.پس ازگذشت ۱۲ الی ۱۴ ساعت ازاین محیط نمونه گرفتـه وبرروی محیط هائی همچون EMB، S.S وMac Conkey کشت می دهیم.سپس بعدازرشـدکردن کلنـی هاازآنهـا نمونه گرفته وبااستفاده ازتست های ازمایشگاهی آنها راتعیین هویت می نمائیم.

جلسه دوازدهم: میکروبیولوژی شیر

شیربه دلیل غنی بودن ازترکیبات قندی وپروتئینی شرایط لازم برای آلودگی رادارد.بنابراین درنگهداری آن بایددقت لازم رامبذول نمودوهمچنین لازم به ذکراست که شیرپاستوریزه صرفاً فاقدباکتریهای بیماریزا می باشدبطوری که اگردرشرایط غیرازیخچال قرارداده شودمیکروب های موجوددرآن رشدکرده وباعث فسادشیرمی شوند.

کیفیت شیر: مقدار یک میلی لیترمتیلین بلورادرلوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی لیترشیرواردمی کنیم وسپس آن رادرون حمام بخار۳۷ درجه قرارمی دهیم.متیلن بلودرشرایط اکسید، آبی ودرشرایط احیاء ، سفیدرنگ است ودرصورت فعالیت باکتریهای شیربه دلیل مصرف اکسیژن متیلن بلواحیاء شده وبی رنگ می گردد.حال هرچه محیط آلوده تر باشدسرعت مصرف اکسژن ودرنتیجه احیائ متیلن بلوبیشتراست. زمانی احیاء شدن متیلن بلوکامل است که $\frac{4}{5}$ لوله بی رنگ شده باشدودرضمن هرازنیم ساعت می بایست وضعیت لوله رابررسی نمود.سپس مطابق استانداردهای بین المللی ، کیفیت شیررابه صورت زیرگزارش می نمائیم:

۱- شیرمرغوب : شیری است که درمدت ۵/۵ ساعت متیلن بلواحیاء نمی شود.دراین حالت ، تعدادباکتریهاکمتراز۰/۵ میلیون درهرمیلی لیتراست.

۲- شیرخوب : شیری است که درکمتراز۵/۵ ساعت وبیشترازدوساعت ، متیلن بلوراحیاء می شود.درهرمیلی لیتراین شیرحدود۰/۵ تا٤ میلیون باکتری وجوددارد.

۳- شیرآلوده : شیری است که درکمتراز ۲۰دقیقه ، متیلن بلوبی رنگ می شود.درهرمیلی لیتراین شیربیش از۲۰ میلیون باکتری وجوددارد.

مشاهده هریک ازمواردزیرنشانه آلودگی شیرمی باشدوباعث می گرددتاشرایط میکروبی شیربطورویژه بررسی شود: ترش شدن شیر(بدلیل اسیدلاکتیک) ، وجودحبابهای گازدرشیر(بدلیل مصرف لاکتوز) ، شیرلخته شده(بدلیل فعالیت آنزیم های پروتئولیتیک) ، حالت رشته ای یاکشدارشدن شیر(بدلیل باکتریهای کپسول دار) ، خامه تکه تکه شده(بدلیل لسیتیناز)

کشت شیر : ازنمونه شیرابتدارقت تهیه نموده وازرقت $۱۰^{-۱}$ به میزان ۰/۰۱ میلی لیتربرروی محیط Nutrient agar کشت Lawn می دهیم.پلیت هارادردمای ۳۲ درجه به مدت۲۴ الی ۴۸ ساعت نگهداری می کنیم.(البته لازم است تاهمین شرایط رابصورت بی هوازی نیزبوجودآورد).پس ازگذشت زمان موردنظرکلنی هاراشمارش می نمائیم.بطوراستانداردتعدادکلنی هامی بایست ازعدد۳۰ کمترباشد.

میکروب های شیر:درآزمایش های میکروبی شیراحتمال وجودباکتریهائی همچون کلیفرم ها ، استرپتوکوک مدفوعی،کپک هاومخمرها، استافیلوکوکوس اورئوس، اسپورکلستریدیوم، سالمونلا وعامل تب مالت وجود دارد.

جلسه سیزدهم :میکروبیولوژی خاک

هدف ازاین آزمایش مشاهده میکروب های موجوددرخاک است.یک گرم ازخاک راوزن نموده ووسپس ازآن رقت 10^{-1}تهیه نموده وباقراردادن یک قطره ازان برروی لام وپس ازخشک شدن آنرابه روش گرم رنگ آمیزی می کنیم وشکل باکتریهای مشاهده شده راترسیم می نمائیم.

برای کشت باکتریهای موجوددرخاک به دلیل حضورانواع باکتریهای بی هوازی وهوازی بایدازروش Pure plate استفاده نمود.دراین روش ابتدامحیط کشت Nutrient agar رابه میزان ۹ میلی لیتردرلوله آزمایش ریخته وبه همین صورت اتوکلاومی نمائیم.پس ازخروج ازاتوکلاوبرای ممانعت ازسفت شدن آنهارادرحمام بخار٤٠ الی ٤٥ درجه قرارمیدهیم.سپس ازرقت های 10^{-4} ، 10^{-5} و10^{-6} یک میلی لیتررابرداشته وکف یک پلیت استریل وخالی قرارمی دهیم ودرادامه یک لوله حاوی Nutrient agar رابرروی آن تخلیه می کنیم وآنرابرروی میزکاربطورت 8 انگلیسی باملایمت تکان می دهیم وبعداجازه می دهیم تامحیط جامدشده وبعدتمام پلیت هارادردمای ۳۰ الی ۳۵ درجه به مدت ۲۴ الی ۴۸ دقیقه می دهیم.دراین شرایط باکتری های بی هوازی درپائین وباکتری های هوازی دربالای محیط رشدمی کنند.

درپلیت هاعلاوه بربررسی تعدادباکتریها ، می توان آنتاگونیست های احتمالی رامشاهده نمود.

این آزمایش رامی بایست برای باکتریهای سرمادوست وگرمادوست نیزبررسی نمود.به همین دلیل ابتدارقت های 10^{-3} ، 10^{-4} و10^{-5} راازنمونه خاک تهیه می نمائیم.سپس باقراردادن ۱ الی ۰/۰۱ میلی لیترازنمونه(برحسب قطرپلیت) برروی محیط کشت آنراکشت Lawn می دهیم.(بایدتوجه نمودکه میله های شیشه ای که جهت پخش نمونه استفاده می شوندمی باست توسط الکل ضدعفونی گردند.)

درادامه یک پلیت رادردمای ۱۰ درجه ، دیگری دردمای اتاق وآخرین پلیت رادردمای ٦٠ درجه قرارمی دهیم.دراین آزمایش علاوه براینکه توانسته ایم باکتریهارابرحسب نوع دمای رشدتفکیک نمائیم ، می توانیم شاهدرشدانواع کلنی بابعضاً رنگ های متنوع باشیم.

جلسه چهاردهم : میکروبیولوژی آب

آب مصرفی می بایست عاری ازهرگونه میکروب باشد.درصورتی کـه درآب E.coli دیـده شودنشـانه آلـودگی آب بامدفوع انسان یافاضـلاب اسـت وایـن آب ازدرجـه اعتبارسـاقط اسـت.آب موردآزمـایش بایددرشـرایط اسـتریل ودرظروف استریل برداشته شود.ابتدااجازه می دهـیم تابـه مـدت ۵ دقیقـه آب ازشـیرخارج شـود.سـپس شـیرآب راباشعله چراغ الکلی ضدعفونی خارج می کنیم.درصورتی که آب حاوی کلرباشداین ماده راتوسط تیوسولفاتسدیم خنثی می کنیم.بدین صورت که به یک لیترآب موردآزمایش ۱۰۰ میلی گـرم تیوسـولفات سـدیم اضـافه وباتکـان دادن آنرایکنواخت می کنیم.پس ازنمونه گیری بایدبلافاصله آزمایش راانجـام داددرغیـراین صـورت بایدنمونـه آب رادردمای یخچال قرارداد.

جهت بدست آوردن تعدادباکتری درآب موردآزمایش ازروش Pure plate که قـبلاً توضـیح داده شداسـتفاده مـی شودوسپس پلیت هارادردمـای ۳۷ درجـه قـرارداده ودرادامـه تعدادآنراشـمارش مـی کنـیم.لازم بـه ذکراسـت کـه درصورت مشاهده آلودگی باچشم ابتدامی بایست بامقداری آب استریل نمونه رارقیق نمود.

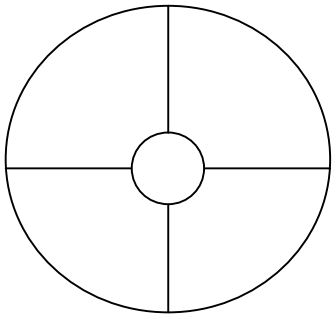
بهتریت راه برای محاسبه حضورباکتریهای مـدفوعی درنمونـه اسـتفاده ازتسـت MPN یابیشـترین تعـداداحتمالی باکتری استفاده می کنیم .جهت انجام آزمایش ۱۰۰ سی سی ازآب موردنظرراتهیه می نمائیم.همچنین جهـت انجـام این آزمایش نیازبه محیط کشت Lactose broth می باشد.۹ لوله ازاین محیط تهیه می نمـائیم بطـوری کـه ۳ لولـه اول ازغلظت دوبرخورداراست.ازنمونه تهیه شـده بـه سـه لولـه اول کـه دارای غلظـت دوبرابراسـت بـه هریـک ۱۰ سی سی ، به سه لوله دوم به هریک یک سی سی وبه سه لوله آخر ۱/. سی سی اضافه می کنیم.لازم بـه ذکراسـت که جهت مشاهده تولیدگازبایدبه تمام لوله هاازقبل لوله دورهام اضافه نمود.لوله هارادردمای ۳۷ درجه به مـدت ۲۴ ساعت قرارمی دهیم.سپس به وضعیت لوله هاوتولیدگازدرآنهادقت می نمائیم.درصورتی که درسه لوله اول دوتـای ان گازتولیدکرده باشد ودرسه لوله دوم یک موردآن ودرسه لوله آخرنیزیـک موردگازایجادشـده باشـد ، عـدد۲۱۱ بدسـت مـی آیدکـه باتوجـه بـه جـدول MPN یـک عددکـه نشـانه تعـدادباکتری هـای مـدفوعی در۱۰۰ سـی سـی می باشدمحاسبه می شود.

تعدادصفرتایک موردE.coli نشانه آب خوب ، ۱ الی ۳ عددنشـانه آب نسـبتاًخوب ، تعـداد۳ الـی ۱۰ عددنشـانه آب آلوده وتعداد۱۰ عددنشانه آب بسیارآلوده است دردوموردآخربایداعلام شودکه آب قابل آشامیدن نیست.

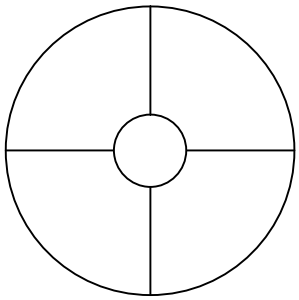
پس ازتستMPN بایدبرای آب تست های تأییدی ، تأکیدی وتکمیلی قرارداده شود.درتست تأییـدی ازمحـیط هـائی که گازتولیدکرده اندبرروی EMB کشت می دهیم.درتست تأکیدی درصورت مشـاهده کلنـی هـائی بـاجلای فلـزی ویاصورتی درمرحله قبل آن رامجدداً به محیط Lactose broth جهت تولیدگازانتقال می دهـیم ودرتسـت تکمیلـی درصورت تشکیل مجددگازازهمان کلنی هاتست های شناسائی جهت باکتری های روده ای قرارداده می شود.

1- Thermal death time (TDT)

دراین آزمایش ابتداسوسپانسیونی ازمیکروب رادرلوله آزمایش تهیه کرده وحمام بخاررابرروی دمای ٦٠ درجه تنظیم می کنیم.سپس از محیط Nutrient agar استفاده کرده وضمن اینکه پشت آنرابه صورت مساوی به چهار قسمت تقسیم می کنیم برروی اولین قسمت عبارت C یاکنترل راحک می کنیم وازسوسپانسیون موردنظربایک لوپ نمونه گرفته ودراین قسمت بصورت خطی کشت می دهیم .سپس لوله رابه حمام بخارانتقال داده و١٠ دقیقه زمان می گیریم وبازضمن اینکه پشت محیط کشت عبارت ١٠ راحک می کنیم ازآن نمونه گرفته وبصورت خطی کشت می دهیم.بازلوله رابه حمام بخاربرده ودوباره ٥ دقیقه زمان می گیریم ولی درپشت محیط عبارت ١٥ راحک می کنیم وپس ازکشت مجدداین اعمال را تکرارمی کنیم.



درادامه محیط کشت رابه انکوباتورانتقال داده ودردمای ٣٧ درجه به مدت ٢٤ ساعت قرارمی دهیم.پس ازاین مدت زمان به خطوط کشت نگاه می کنیم .مشاهده می شودکه درکنترل ودرزمانهای ٥ , ١٠ و١٥ رشدداشته ایم ولی اززمان ٢٠ به بعدرشدی مشاهده نمی شود پس بیان می کنیم که ٢٠ $\supseteq$ TDT به این دلیل که مانمی دانیم که آیامیکروب دقیقا دردقیق ٢٠ ویا ٢١ به بعدکشته شده است واین خودنیازبه تکراردوباره آزمایش واین بارزمان های حدفاصل رانیزبایداندازه گیری نمائیم.

2- Thermal death point (TDP)

این آزمایش عکس آزمایش قبل است بطوری که دراینجازمان ثابت است ودما تغییرمی کند.زمان دراین آزمایش ١٠ دقیقه می باشدودمااز٥٠ درجه شروع شده وبعدبه ٦٠ و ٧٠ درجه ختم می شود.برخلاف آزمایش قبل که بایک لوله می توانستیم تمام آزمایش راانجام دهیم دراین مرحله برای هردمابایدیک لوله مجزارابه مدت ١٠ دقیقه مورداستفاده قراردهیم.