

باکتری‌ها

هدف‌های رفتاری: در پایان این فصل، فراگیر باید بتواند:

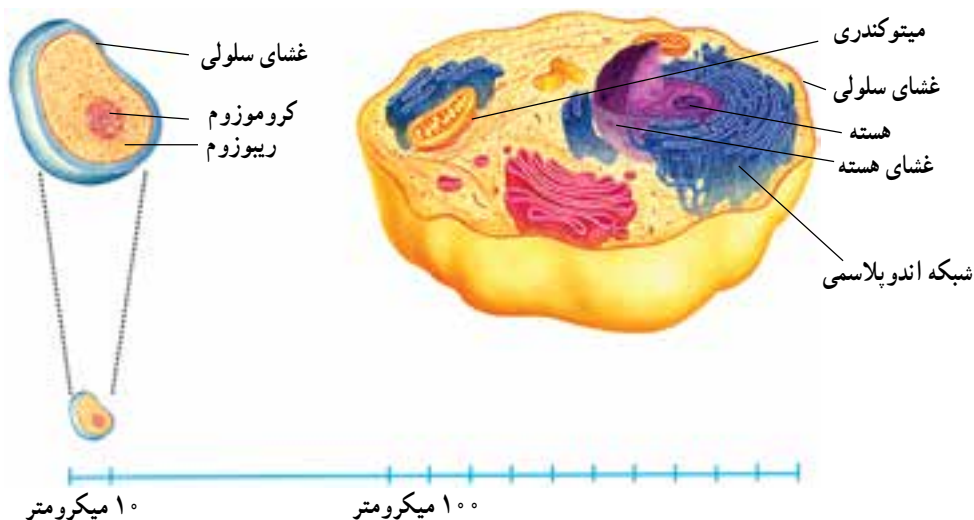
- ۱- سلول‌های یوکاریوت و پروکاریوت را توضیح دهد.
- ۲- ساختمان و ترکیب شیمیایی باکتری‌ها را شرح دهد.
- ۳- طبقه‌بندی باکتری‌ها را توضیح دهد.
- ۴- باکتری‌ها را بر مبنای شکل و اندازه، تفکیک کند.
- ۵- باکتری‌ها را بر مبنای نیاز به اکسیژن و هوا تقسیم‌بندی کند.
- ۶- تغذیه باکتری‌ها را توضیح دهد.
- ۷- نحوه تولیدمثل باکتری‌ها را توضیح دهد.
- ۸- تأثیر عوامل محیطی بر روی رشد و تولیدمثل باکتری‌ها را توضیح دهد.
- ۹- ساختمان و روش تولید اسپور در باکتری‌ها را شرح دهد.
- ۱۰- بیماری‌زایی باکتری‌ها را توضیح دهد.
- ۱۱- بیماری‌های مهم باکتریایی را در دام‌ها بیان کند.
- ۱۲- وسایل آزمایشگاهی را به روش‌های مختلف استریل نماید.
- ۱۳- انواع مختلف محیط‌های کشت را شرح دهد.
- ۱۴- انواع محیط‌های کشت را تهیه نماید.
- ۱۵- باکتری‌ها را به صورت هوازی و بی‌هوازی کشت کند.
- ۱۶- رنگ‌های مورد نیاز برای رنگ‌آمیزی باکتری‌ها را تهیه نماید.
- ۱۷- باکتری‌ها را تثبیت و رنگ‌آمیزی کند.
- ۱۸- باکتری‌ها را شمارش نماید.

۲-۱- اوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها

موجودات زنده به سه سلسله بزرگ (Kingdom) گیاهان، حیوانات و پروتیست‌ها طبقه‌بندی

می‌شوند.

پروتیست‌ها به ویروس‌ها، پروکاریوت‌ها و اوکاریوت‌ها تقسیم شده‌اند:



شکل ۲-۱

پروکاریوت‌ها: («پرو» به معنی ابتدایی و «کاریوت» به معنی هسته)، پروکاریوت‌ها شامل باکتری‌ها، آکتینومیست‌ها و سیانوباکترها (آلگ‌های سبز آبی) است. پروکاریوت‌ها به روش تقسیم دوتایی زیاد می‌شوند. و دارای یک رشته DNA بدون پروتئین‌های بازی هستند.

اوکاریوت‌ها: («او» به معنی واقعی و «کاریوت» به معنی هسته)، اوکاریوت‌ها شامل آلگ‌ها (به جز آلگ‌های سبز آبی)، قارچ‌ها و پروتوزوآها می‌باشند. خصوصیات عمده این گروه دارا بودن کلروفیل و دیواره سلولی حقیقی است. اعضای این گروه معمولاً دارای چندین کروموزوم، عناصر میتوزی، رتیلولوم آندوپلاسمی و میتوکندری می‌باشند. تفاوت‌های اساسی بین پروکاریوت‌ها و اوکاریوت‌ها در جدول ۲-۱ آمده است:

جدول ۱-۲- تفاوت‌های پروکاریوت‌ها و اوکاریوت‌ها

اوکاریوت‌ها	پروکاریوت‌ها	
ده میکرومتر	یک میکرومتر	قطر
دارند	ندارند	غشای هسته
بیش از یک عدد	یک عدد	کروموزوم
رشته‌ای	حلقوی	DNA
دارند	ندارند	میتوزومیوز
دارند	ندارند	اندوواگزوستیوز
دارند	ندارند	تکثیر جنسی
کلروپلاست	غشای سلولی	محل فتوسنتز
۸۰S	۷۰S	ریبوزوم سیتوپلاسمی
دارند	ندارند	تحرك آمیبی
دارند	ندارند	هسته
دارند	ندارند	مژه
دارند	ندارند	لیزوزوم

۲-۲- طبقه‌بندی

بحث در مورد طبقه‌بندی و نام‌گذاری گیاهان و جانوران و میکروارگانیسم‌ها تاکزونومی^۱ نامیده می‌شود که از دو کلمه یونانی تاکزیس^۲ به معنی ترتیب و نظام و نوموس^۳ (ناموس) به معنی قاعده و قانون گرفته شده است. برای طبقه‌بندی باکتری‌ها قلمرو خاصی قایلند که همانا پروکاریوتی یا سلسله پروکاریوتیک‌ها می‌باشد و پس از این مرحله باکتری‌ها را به ترتیب زیر دسته‌بندی می‌کنند.

Kingdom	سلسله
Phylum	شاخه
Class	رده
Order	راسته
Family	فامیل
Genus	جنس
Species	گونه

۳-۲- نام‌گذاری علمی باکتری‌ها

اسامی علمی باکتری‌ها براساس اسم جنس و اسم گونه دسته‌بندی و به صورت لاتین نوشته می‌شوند. اسم جنس همیشه با حروف بزرگ مشخص می‌گردد ولی اسم گونه احتیاجی به حروف بزرگ ندارد مثال: B.anthraxis. نام اول مربوط به جنس باکتری‌ست و اغلب با شکل، نام کاشف و سایر مشخصات که از زبان لاتین گرفته می‌شود مربوط است. نام دوم، نام گونه‌ای‌ست و عنوان صفتی‌ست که تولید بیماری، رنگ و سایر خواص نام اول را توصیف می‌کند. برای مثال در نام باسیلوس آنتراسیس، باسیلوس مشخص‌کننده باکتری‌های میله‌ای گرم مثبت هاگ‌دار و هوازی‌ست و آنتراسیس یعنی زغالی. بدین صورت که این نوع باسیلوس بیماری آنتراکس یا تب زغالی (شاربون) را ایجاد می‌کند.

اسامی جنس را می‌توان به اولین حرف یا چند حرف اول آن خلاصه کرد در صورتی که اسامی گونه را نمی‌توان به صورت مخفف نوشت. ضمناً بسیاری از نام‌های اصلی از نام کاشفان گرفته شده است. برای مثال اشرشیا از نام دانشمند آلمانی اشرشی، شیگلا از نام ایمنی‌شناس ژاپنی شیگلا و سالمونلا از نام میکروب‌شناس امریکایی سالمون گرفته شده است. علاوه بر این، در بسیاری از موارد باکتری را به نام بیماری‌ای که ایجاد می‌نماید نامگذاری می‌کنند: چون با بعضی از باکتری‌ها در آزمایش‌های ثابت روزانه برخورد می‌کنیم می‌توانیم آن‌ها را با اسامی غیرعلمی نیز بنامیم. مانند: اشرشیا کلی و یا پنوموکوکس (ذات‌الریه).

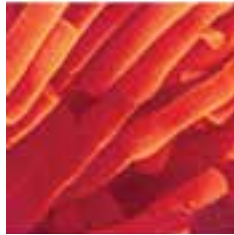
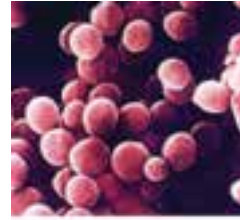
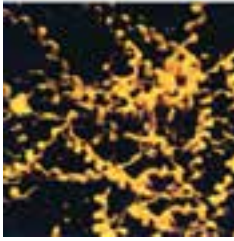
۴-۲- اصول دسته‌بندی باکتری‌ها

معیارهای مختلفی برای دسته‌بندی باکتری‌ها به کار می‌رود که از جمله به عوامل زیر می‌توان اشاره کرد:

شکل، طرز قرار گرفتن، حرکت و خواص مختلف شیمیایی از قبیل ارتباط‌های آنزیمی، مشابهت پادگنی و همسانی ماده ژنتیک. در این کتاب دسته‌بندی باکتری‌ها براساس شکل مورد بررسی قرار می‌گیرد.

۵-۲- اندازه و شکل ظاهری برخی از گروه‌های باکتری‌ها

اکثر دانسته‌های ما درباره اندازه و ساختمان باکتری‌ها از بررسی آن‌ها در محیط کشت به دست آمده است. شکل شناسی باکتری‌ها، بسته به شرایط کشت و سن یاخته‌ها متفاوت است در این شرایط، شکل باکتری‌های جوان را در محیط و درجه حرارتی مناسب در نظر می‌گیرند.



شکل ۲-۲- اشکال باکتری ها

۱-۵-۲ اندازه باکتری ها: اندازه اکثر باکتری ها را برحسب میکرومتر یا میکرون μm می‌سنجند که برابر با 10^{-6} متر یا یک هزارم میلی‌متر است. قطر باکتری‌های کروی، مثل استافیلوکوک‌ها و هم‌چنین استرپتوکوک‌ها، 0.75 تا 1.25 میکرون و قطر متوسط برخی از میکروکوک‌ها یا سارسیناها (کوکسی‌هایی که مکعب‌وار قرار می‌گیرند) $1/5$ تا 2 میکرون است. عرض بعضی از باکتری‌های میله‌ای مانند: باسیل آنتراسیس (شاربن)، $1-1.25$ و طول آن، $3-8$ میکرون است. باسیل کوچکی مثل باسیل انفلوانزا دارای پهنای $2/0-4/0$ و طول $7/0-15/0$ میکرومتر است.

۲-۵-۲ شکل ظاهری برخی از باکتری‌ها: در باکتری‌ها سه شکل کوکسی‌ها یا باکتری‌های کروی، باسیل‌ها یا باکتری‌های میله‌ای و اسپیرال‌ها یا باکتری‌های مارپیچی شناخته شده هستند، باکتری‌های اخیر اجرامی میله‌ای می‌باشند که به حالت مارپیچی درآمده‌اند.

کوکسی‌ها

در کوکسی‌ها، طول و عرض باکتری تقریباً مساوی است. بسیاری از کوکسی‌ها، تقریباً شبیه کره واقعی هستند. در ضمن آن‌ها ممکن است بیضوی، کله‌قندی و ... باشند و شباهتی به دانه‌های لوبیا، کلیه یا مشعل داشته باشند. کوکسی‌ها ممکن است به اشکال مختلف با هم اجتماع کنند:

— استافیلوکوک‌ها^۱

۱- Staphilococci

— استرپتوکوک‌ها^۱

— پنوموکوک‌ها^۲

— نیسریاها

باسیل‌ها: در باسیل‌ها، طول از عرض زیادتر است. تفاوت بین طول و عرض متنوع است. چنان که برخی از باسیل‌ها، ظاهرشان مانند کوکسی ست و برخی دیگر کاملاً رشته‌ای هستند. وضعیت انتهای باسیل‌ها از نظر تشخیص مهم است، انتها ممکن است مقطع و چهارگوش، مدور یا کشیده باشد.

برخی از باسیل‌ها گرم مثبت و برخی از آن‌ها گرم منفی‌اند. بعضی هوازی و برخی بی‌هوازی هستند. چگونگی آرایش شکلی و اجتماع احتمالی باسیل‌ها متفاوت است که در این جا به چند نمونه اشاره می‌شود:

— انتروباکتری‌ها^۳: مانند سالمونلا

— باسیلوس‌ها: گرم مثبت، هاگ‌دار، هوازی به صورت مجزا و یا به شکل زنجیری، باسیل‌ها حجیم، یا بلند می‌باشند، انتهای آن‌ها تا حدی قطع شده است (مانند باسیلوس آنتراسیس، باسیلوس سریوس).

— کلستریدیوم‌ها

— کورینه باکتری‌ها

— پاستورلاها

اشکال ویبریونی و اسپیرال

اشکال اسپیرال مربوط به خمیدگی یا پیچیدگی یاخته‌هاست. اگر باکتری یک خم داشته باشد، «ویبریو» نامیده می‌شود. مانند ویبریوکلرا مولد بیماری وبای انسان. اگر باکتری چند خم داشته باشد «اسپریل» نامیده می‌شود مانند اسپریلوم مینوس. این باکتری‌ها تازک‌های قطبی دارند، گرم منفی می‌باشند و پیکر آن‌ها سخت است.

— اسپیروکت‌ها

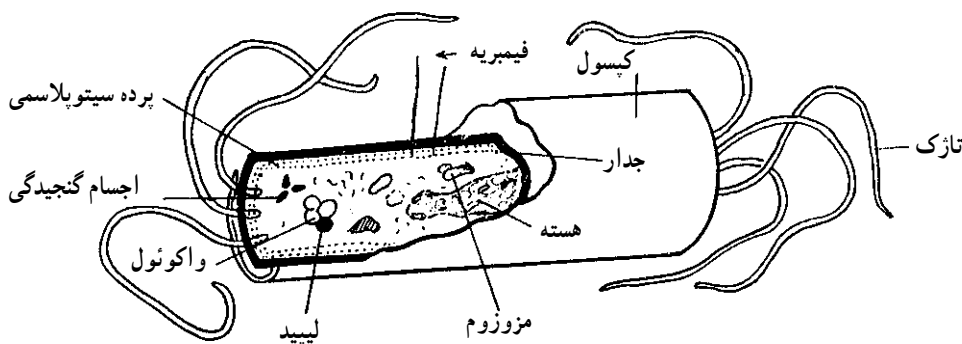
— آکتینومیست‌ها: آکتینومیست‌ها اجرام رشته‌ای، به ضخامت تقریبی سایر باکتری‌ها هستند ولی انشعابات کوتاه و بلند دوشاخه‌ای شکل، شبیه قارچ‌ها دارند. این رشته‌ها گاهی به بندهای باسیلی یا بیضوی قطعه‌بندی می‌شوند.

شکل رشته‌ای باکتری‌ها

برخی از باسیل‌ها، گاهی به شکل بسیار طویل درمی‌آیند که طول آن‌ها حتی تا ۱۰۰ میکرون یا بیشتر می‌رسد. اصولاً در باکتری‌ها ممکن است تغییرات شکلی زیادی بروز کند و از جمله، انواع رشته‌ای ظاهر شود. این امر ممکن است در بسیاری از باکتری‌ها اتفاق افتد مثلاً در اشرشیاکلی این وضعیت مشاهده شده است. بسیاری از این اشکال، نتیجه شرایط غیرعادی کشت، عوامل زیان‌آور یا موتاسیون است، این پدیده ممکن است گاهی به قدری نادر باشد که نتوان تصور کرد که احتمالاً این امر می‌تواند موجب آسان‌شدن زندگی باکتری گردد.

۲-۶- ساختمان باکتری‌ها

۲-۶-۱ طرح کلی سلول باکتری‌ها: باکتری‌ها را به صورت سلول‌های مجزا در حد کامل یاخته‌ای یا در حد اجزای یاخته‌ای، مورد بررسی قرار می‌دهند و برای این کار از میکروسکوپ‌های نوری و یا الکترونی استفاده می‌کنند. در مورد میکروسکوپ نوری، یکی از روش‌ها، بررسی باکتری‌ها به حالت زنده و رنگ نکرده است. در این جا چگونگی کار باید طوری باشد که از خطر آلودگی با اجرام بیماری‌زا جلوگیری شود. در اکثر موارد قبلاً باکتری‌ها را روی لام ثابت کرده، آن‌ها را



شکل ۲-۳- ساختمان باکتری

می‌کشند. در مورد میکروسکوپ الکترونی نیز در موارد لزوم با تهیه برش‌های ظریف و رنگ آمیزی‌های مخصوص، به بررسی ساختمان ظریف باکتری‌ها می‌پردازند.

در یاخته باکتری‌ها قسمت داخلی آن (یعنی پروتوپلاسم) به دو قسمت سیتوپلاسم و مواد هسته‌ای تقسیم می‌شود.

۲-۶-۲ سیتوپلاسم باکتری‌ها: در باکتری‌ها برخلاف سلول‌های موجودات عالی،

هسته به وسیله پرده مخصوصی از سیتوپلاسم جدا نمی‌شود و هم‌چنین، رتیکولوم آندوپلاسمی و ساختمان میتوکندری وجود ندارد. در باکتری‌ها اعضای وابسته به پرده یا مزوزوم‌ها یافت می‌شوند که در اجرام گرم مثبت پیشرفته‌تر هستند. پرده سیتوپلاسمی در خارج از پروتوپلاست واقع شده و پس از آن، جدار باکتری قرار گرفته است. در باکتری‌های گرم منفی در جدار باکتری، پس از قشر پپتید و گلیکان پرده بیرونی وجود دارد که متشکل از لیپولی ساکارید، لیپید و پروتئین است. جدار یاخته‌ای موجب برقراری شکل مخصوص و هم‌چنین مقاومت باکتری‌ها در برابر فشار اسمزی می‌شود. در خارج از جدار، در برخی از باکتری‌ها کپسول و هم‌چنین در پاره‌ای از آن‌ها تاژک قرار دارد که اندام حرکتی است. در باکتری‌های گرم منفی و برخی از باکتری‌های گرم مثبت، رشته‌های ظریفی به نام «خار» یا «فیمبریا» موجود است که تنها با میکروسکوپ الکترونی دیده می‌شود. برخی از باکتری‌ها، در مراحل از زندگی، هاگ‌های داخلی تولید می‌کنند که در برابر شرایط نامساعد زیستی مقاومت فوق‌العاده‌ای دارند.

۳-۶-۲- هسته باکتری‌ها: با این‌که خواص ارثی باکتری‌ها، وجود ساختمان‌های مشابه هسته موجودات عالی در این اجرام را ضروری می‌کند ولی تا زمانی که محققان به روش‌های معمولی رنگ‌آمیزی تکیه می‌کردند قادر به نشان‌دادن هسته باکتری‌ها نبودند. پس از مدتی، پیکارسکی وجود هسته در باکتری‌ها را مشخصاً نشان داد. این‌جا بود که معلوم شد در باکتری‌ها اعضای وجود دارد که واجد DNA هستند و نوکلئوس (هسته) یا «جسمک هسته‌ای» یا «جسمک کروماتین» نامیده می‌شوند که همانا مربوط به کروموزوم باکتری‌ست. شکل و وضعیت هسته، در مراحل مختلف رشد باکتری و هم‌چنین بر اثر بروز تغییرات محیطی، تغییر و تنوع می‌یابد که بیشتر مربوط به نبود دیواره هسته‌ای است. این امر سبب می‌شود ماده هسته‌ای (DNA) کم و بیش با سیتوپلاسم مخلوط شود. بررسی‌هایی که به وسیله میکروسکوپ الکترونی و با ایجاد برش‌های ظریف و رنگ‌آمیزی آن‌ها، انجام گرفته، نشان می‌دهد که هسته به شکل ماده نواری شکلی است که در طول محور باکتری گسترده می‌شود و از یک مولکول واحد غول‌آسای اسید دزاکسی ریبونوکلیک چرخشی تشکیل شده است. این مولکول DNA، به صورت کلاف درهم پیچیده متراکمی است که پیچ و تاب‌های آن به وسیله یک مرکز RNA پایدار می‌ماند. در بررسی‌هایی که با میکروسکوپ الکترونی انجام شده، مشخص گردیده است که با پرده سیتوپلاسمی از طریق مزوزوم - که خود ساختمانی وابسته به پرده است - صورت می‌گیرد. البته گاهی کروموزوم مستقیماً به پرده سیتوپلاسمی متصل است.

۷-۲- تغذیه باکتری‌ها

اساس تغذیه باکتری‌ها: ارگانسیم‌ها، برای رشد باید تمام مواد مورد نیاز ساختمان سلولی و مواد ضروری برای تولید مثل و هم‌چنین انرژی خود را از محیط اطراف دریافت کنند. این‌گونه مواد را «مواد غذایی» می‌نامند که در خارج از بدن به وسیله محیط کشت تأمین می‌شوند. محیط کشت، علاوه بر مواد عام مورد نیاز موجودات، باید مقدار کافی از مواد مورد نیاز میکروارگانسیم‌ها را نیز دربر داشته باشد که آن‌ها را «مواد غذایی» ضروری می‌نامند.

باید گفت میکروارگانسیم‌ها از نظر خواص فیزیولوژی مخصوص به خود و نیز مواد اختصاصی غذایی، بسیار از هم متفاوتند. ترکیب شیمیایی یاخته‌ها که تا حدود زیادی در موجودات زنده ثابت است نیاز اصلی رشد را مشخص می‌کند. آب ۸۰ تا ۹۰ درصد وزن کل یاخته‌ها را تشکیل می‌دهد و از نظر مقدار، مهم‌ترین ماده غذایی است. مواد معدنی مورد نیاز یاخته‌ها علاوه بر هیدروژن و اکسیژن که از نظر متابولیک مشتق از آب‌اند به ترتیب فراوانی عبارت‌اند از کربن، نیتروژن، فسفر، گوگرد. شش ماده فوق ۹۵ درصد وزن خشک هر یاخته را تشکیل می‌دهند، پنج درصد بقیه، متشکل از بسیاری عناصر دیگر است. بررسی‌های مختلف نشان می‌دهند که پتاسیم، منیزیم، کلسیم، آهن، منگنز، کبالت، مس، مولیبدن و روی، تقریباً مورد نیاز تمام میکروارگانسیم‌ها هستند.

تمام یون‌های فلزی مورد نیاز را می‌توان به شکل نمک‌های کاتیونی غیرآلی به‌عنوان غذا در اختیار میکروارگانسیم‌ها قرار داد. پتاسیم، منیزیم، کلسیم و آهن به مقدار نسبتاً زیادی مورد نیازند و آن‌ها را همواره به صورت نمک باید به محیط‌های کشت اضافه کرد. مقدار مورد نیاز منگنز، کبالت، مس، مولیبدن و روی بسیار کم و نشان‌دادن نقش آن‌ها مشکل است، چون به عنوان عوامل ثانوی، همواره اثراتی از این مواد در سایر ترکیبات محیط موجود است و همین مقدار کم، برای رشد کافی است. این‌گونه مواد را «مواد غذایی جزئی» می‌نامند. فسفر را که عامل غیرفلزی است می‌توان به شکل غیرآلی یعنی املاح فسفات به‌عنوان غذا مورد مصرف قرار داد. باید گفت که نیاز به سدیم برای بسیاری از اجرام ریزینی مشهود نیست ولی این ماده، به مقدار نسبتاً زیادی برای برخی از باکتری‌های دریایی، باکتری‌های آبی و سبز و باکتری‌های فتوسنتزی لازم است.

۸-۲- تولید مثل باکتری‌ها

زمانی که باکتری‌ها در شرایط مساعد قرار گیرند به سرعت شروع به تقسیم می‌نمایند و بر تعداد آن‌ها افزوده می‌شود. منظور از رشد در باکتری‌ها، اضافه شدن تعداد آن‌ها در محیط کشت (محیط کشت مصنوعی یا بدن موجودات زنده دیگر) می‌باشد. اگر باکتری در شرایط نامساعد قرار گیرد

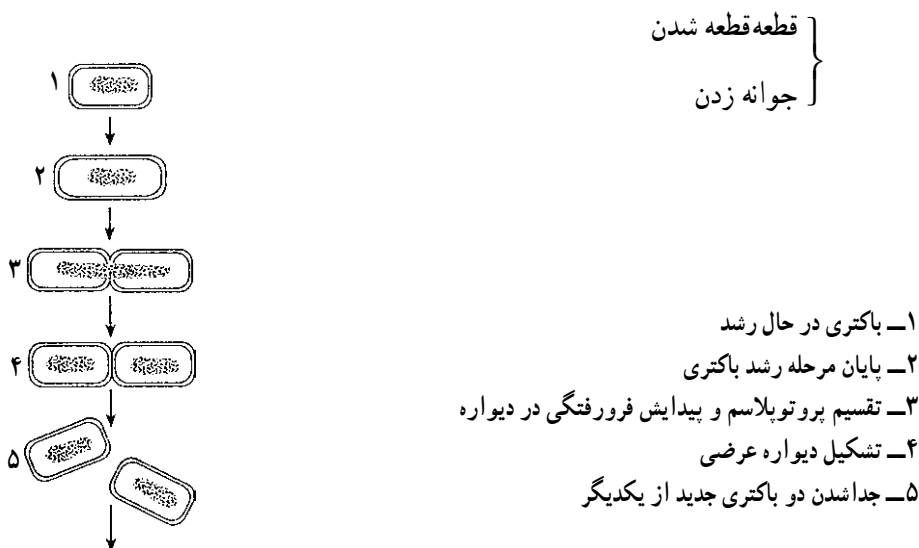
تولید مثل ممکن است با روش‌های دیگر انجام گیرد.

۱-۸-۲- تقسیم و تکثیر باکتری‌ها: باکتری‌ها برحسب گونه و نوع خود به دو طریق جنسی و غیرجنسی تکثیر می‌یابند. معمولاً مهم‌ترین روش تکثیر باکتری‌ها، تکثیر غیرجنسی به صورت تقسیم دوتایی می‌باشد.

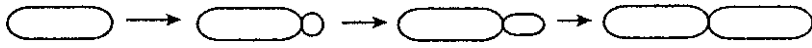
۲-۸-۲- تکثیر غیرجنسی

الف - تقسیم دوتایی: در این نوع تقسیم، یک باکتری پس از زمان معین که برای تمام باکتری‌ها یکسان نیست و بستگی به شرایط محیط و مواد غذایی دارد، تقسیم شده و به دو باکتری تبدیل می‌گردد. در این روش، هنگامی که باکتری در محیط مناسبی قرار گیرد مواد مورد نیاز خود را جذب کرده، به وسیله آنزیم‌های خود، آن‌ها را تغییر می‌دهد و به پروتوپلاسم زنده تبدیل می‌کند. در نتیجه این عمل، بر حجم باکتری افزوده شده، کم‌کم طول باکتری زیاد می‌شود و هم‌زمان با آن، مواد هسته‌ای نیز دو برابر می‌گردد. وقتی که رشد به حد معینی رسید، ابتدا در قسمت وسط فرورفتگی ایجاد شده، رفته رفته دیواره عرضی در قسمت میانی شکل گرفته، یک باکتری به دو باکتری تبدیل می‌شود.

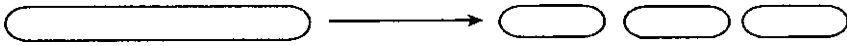
ب - روش‌های دیگر تولید مثل غیرجنسی و تکثیر باکتری‌ها عبارتند از:



شکل ۴-۲- تکثیر غیرجنسی باکتری‌ها به روش تقسیم دوتایی



شکل ۵-۲- تکثیر غیرجنسی به روش جوانه زدن

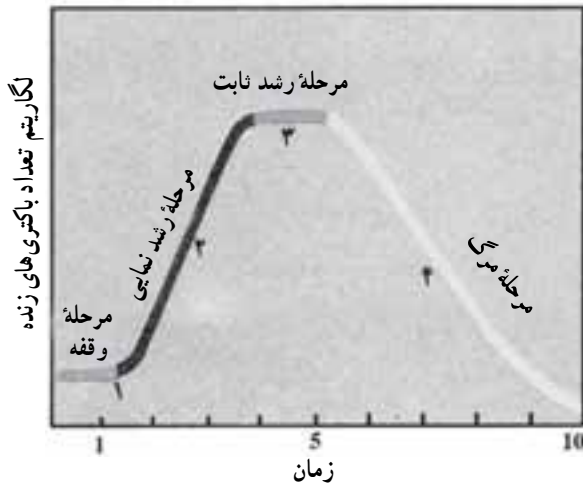


شکل ۶-۲- تکثیر غیرجنسی به روش قطعه قطعه شدن

۳-۸-۲- تکثیر جنسی: به صورت آمیختگی^۱ انجام می گیرد.

۲-۹- منحنی رشد باکتری

چنانچه باکتری در شرایط کشت مناسبی قرار گیرد، پس از زمان معینی به دو و سپس به چهار و بعد به هشت و همین طور شانزده و ... باکتری تقسیم می شود. مدت زمانی که لازم است تا یک باکتری به دو باکتری تقسیم شود «زمان تقسیم»^۲ نامیده می شود. زمان تقسیم در باکتری های مختلف متفاوت است و نیز برای یک نوع باکتری در محیط و شرایط مختلف نیز متفاوت خواهد بود. اگر غذای کافی در اختیار یک باکتری قرار گیرد، در مدت یک هفته حجمی حدود کره زمین تولید خواهد کرد. این نوع افزایش سلولی، افزایش به صورت تصاعد هندسی نامیده می شود. اما در عمل به علت کمبود مواد غذایی و بالا رفتن مواد زاید، پس از مدت معینی رشد باکتری ها کاهش می یابد. منحنی رشد و نمو باکتری ها: در این منحنی چهار قسمت مشخص را می توان در نظر گرفت.



شکل ۷-۲- منحنی عمومی رشد باکتری ها در یک محیط کشت آزمایشگاهی (بسته)

۱- Conjugation

۲- Generation Time

۱-۹-۲- مراحل مختلف منحنی رشد

۱- مرحله وقفه^۱: در این مرحله، باکتری‌ها که تازه در محیط کشت وارد شده‌اند خود را با محیط آشنا می‌کنند و تا مدتی به حالت نهفته یا کمون به سر می‌برند و سرعت رشد آن‌ها صفر می‌باشد. طول این مدت معمولاً ۲ تا ۳ ساعت است.

۲- مرحله رشد لگاریتمی^۲ یا رشد نمایی: در این مرحله، که معمولاً ۵ تا ۸ ساعت طول می‌کشد، تقسیم باکتری‌ها به‌طور منظم و با حداکثر سرعت انجام می‌شود و در آن تمام باکتری‌ها زنده هستند سپس به مرحله رکود نزدیک می‌شوند.

۳- مرحله رشد ثابت^۳: ورود به این مرحله، از عواملی نظیر کمبود مواد غذایی، کمبود فضا و افزایش مواد سمی که محیط را برای ادامه رشد باکتری نامساعد می‌کند ناشی می‌شود. طول این مرحله براساس نوع باکتری متفاوت است و معمولاً حدود ۲۰ ساعت طول می‌کشد. تعداد باکتری‌ها در این مرحله ثابت است و افزایش تعداد باکتری‌ها با تعداد مرگ و میر آن‌ها برابر است.

۴- مرحله مرگ^۴: آخرین مرحله از رشد و نمو باکتری‌ها، مرحله مرگ است و ممکن است چند ساعت تا چند روز به طول بینجامد. در این مرحله، رشد باکتری متوقف و تمام مواد غذایی مصرف شده است و در اثر تجمع مواد سمی به‌صورت لگاریتمی متلاشی می‌شوند و از بین می‌روند.

۱۰-۲- اثر عوامل فیزیکی و شیمیایی محیط در رشد و نمو و متابولیسم باکتری‌ها

اثر عوامل محیط: مواد غذایی، حرارت، رطوبت، pH، اکسیداسیون و احیا.

۱۰-۲-۱- نیازهای غذایی باکتری‌ها: یک محیط کشت باید بتواند نیازهای رشد میکروب‌ها را تأمین کند، بنابراین لازم است از نیازمندی‌های غذایی باکتری‌ها اطلاعات کافی داشته باشیم. هر محیط کشت برای گروه خاصی از میکروب‌ها مناسب است و هفت عامل را باید داشته باشد: آب، کربن، انرژی، نیتروژن، نمک‌ها، عوامل رشد و pH. در زیر، نقش هر یک از عوامل مذکور، بیان می‌شود:

آب: پروتوپلاسم، شامل ۷۰ تا ۸۵ درصد آب است. آب در یک موجود تک‌سلولی، از آب محیط اطراف آن جذب می‌شود و مولکول‌ها آزادانه به داخل و خارج سلول عبور می‌کنند و آب حامل مواد غذایی داخل و خارج سلول می‌باشد و تمام فعالیت‌های آنزیمی کنترل‌کننده فعالیت‌های شیمیایی، با وجود میزان کافی آب مقدور است. کیفیت آب مورد استفاده برای تهیه محیط‌های کشت، مهم است. برای این منظور، از آب سخت که حاوی یون‌های کلسیم و منیزیم بالاست، نباید استفاده شود. فسفات‌های نامحلول کلسیم و منیزیم در حضور پپتون‌ها و عصاره گوشت رسوب می‌کنند، از این رو، بهترین کار، استفاده از آب مقطر است.

کربن: موجودات براساس این که کربن مورد نیاز خود را از چه منبعی تأمین می کنند به دو گروه تقسیم می شوند. آنهایی که می توانند برای سنتز مواد سلولی، کربن مورد نیاز خود را از دی اکسید کربن تأمین کنند اتوتروف^۱ نامیده می شوند و آنهایی که برای تأمین کربن به مواد آلی نیازمند هستند، هتروتروف^۲ گویند. علاوه بر منابع آلی کربن، هتروتروفها به دی اکسید کربن هم نیاز دارند و اگر این گاز کاملاً از محیط زندگی آنها حذف شود مخصوصاً در مراحل اولیه شروع کشت، رشد آنها به خطر می افتد. کربن آلی مورد نیاز موجودات مختلف متنوع اند: به طوری که یک موجود ممکن است تنها به ترکیب ساده ای مثل اسید استیک نیاز داشته باشد و موجود دیگر ترکیبات پیچیده آن را بطلبد.

انرژی: موجوداتی که دارای رنگدانه هستند می توانند از انرژی خورشید استفاده کنند. به این نوع موجودات فتواتوتروف^۳ (اتوتروفهای فتوسنتتیک) می گویند. محیطهای کشت چنین موجوداتی، شامل ترکیباتی است که انرژی مورد نیاز آنها را تأمین می کنند به اتوتروفهایی که نمی توانند از انرژی خورشیدی استفاده کنند، اما قادرند مواد ساده معدنی را برای تأمین انرژی خود اکسید کنند، کمواتوتروف^۴ می گویند. مواد اصلی تولیدکننده انرژی این موجودات، موادی مثل نیتريت، نترات و یا سولفات است. اکثر باکتریها در گروه کموهتروتروفها قرار دارند و نیازمند یک منبع انرژی آلی مثل گلوکز یا اسیدآمینه هستند. میزان انرژی مورد نیاز گونههای مختلف کموسنتتیک در محیط کشت، ۵/۰ درصد است.

تعداد کمی از باکتریها به عنوان فتوهتروتروف (هتروتروفهای فتوسنتتیک) تقسیم می شوند. این میکروبها، دارای رنگدانههای فتوسنتزکننده هستند که آنها را قادر می سازد از انرژی نور خورشید استفاده کنند. منبع کربن آنها باید یک ترکیب آلی مثل الکل باشد.

نیتروژن: گرچه موجودات اتوتروف می توانند از منابع نیتروژن معدنی استفاده کنند، ولی هتروتروفها، نیتروژن خود را از اسیدهای آمینه و ترکیبات بینابینی پروتئینی مثل پپتیدها، پروتئوزها و پپتونها به دست می آورند، عصاره گوشت و پپتون که در نوترینت برات^۵ استفاده می شوند نیتروژن مورد نیاز هتروتروفها را در این محیط تأمین می کنند.

نمکهای معدنی: همه موجودات، به ترکیبات فلزی زیادی مثل سدیم، پتاسیم، کلسیم، منیزیم، منگنز، آهن، روی، مس، فسفر و کبالت نیاز دارند، باکتریها نیز از این قاعده مستثنی نیستند. البته مقدار این نیاز در آنها بسیار اندک است.

عوامل رشد: تعدادی از مواد ضروری که موجود زنده قادر به ساخت آنها از منابع کربن و

۱- Autotrophs

۲- Heterotrophs

۳- Photoautotrophs

۴- Chemoautotrophs

۵- Nutrient Broth

نیترژن نیست، «عوامل رشد»^۱ نامیده می‌شوند. این‌ها ممکن است اسیدهای آمینه یا ویتامین‌ها باشند. برای بسیاری از هتروتروف‌ها عوامل رشد موجود در عصاره گوشت داخل نوترینت براث کافی است. اکثر عوامل بیماری‌زای مشکل‌پسند به محیط‌های کشت غنی شده مثل آگار خون‌دار^۲ نیاز دارند. یون هیدروژن: اگر pH محیط در محدوده خاصی نباشد ممکن است رشد میکروب در آن محیط کاملاً متوقف شود. آنزیم‌های میکروب‌ها نسبت به pH محیط به شدت حساس هستند. زیرا اکثر باکتری‌ها در pH حدود ۷ بهترین رشد را دارند. عوامل بیماری‌زا معمولاً pH قلیایی را ترجیح می‌دهند.

۱-۲-۲- درجه حرارت: باکتری‌ها از نظر دامنه حرارتی به سه دسته تقسیم می‌شوند:
الف - باکتری‌های ترموفیل^۳ یا گرمادوست: باکتری‌هایی هستند که مناسب‌ترین درجه حرارت برای رشد آن‌ها ۴۵ درجه سانتی‌گراد است. این باکتری‌ها در طبیعت در چشمه‌های آب گرم و خاک، دمای بین ۷۵ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد را به راحتی تحمل می‌کنند و در حرارت ۵۵ درجه سانتی‌گراد می‌توانند رشد کنند. باکتری‌های ترموفیل اجباری در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قادر به رشد نیستند ولی باکتری‌های ترموفیل اختیاری می‌توانند هر دو درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵۵ درجه سانتی‌گراد را به خوبی تحمل کنند. اکثر باکتری‌های ترموفیل مولد فساد در مواد غذایی کنسروی متعلق به این گروه از باکتری‌ها هستند.

ب - باکتری‌های مزوفیل^۴ (معتدل): باکتری‌هایی که معمولاً در بدن انسان و حیوانات زندگی می‌کنند و بیشتر مورد مطالعه قرار می‌گیرند، جزو این دسته هستند. باکتری‌های مزوفیل در درجه حرارت ملایم بهتر رشد می‌کنند و معمولاً از این نظر به دو دسته زیر تقسیم می‌شوند:
دسته اول: باکتری‌هایی که درجه حرارت مناسب برای رشد آن‌ها ۲۰ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد است. باکتری‌های این گروه شامل اکثر ساپروفیت‌ها و باکتری‌های انگل گیاهان است.

دسته دوم: باکتری‌هایی که درجه حرارت مناسب برای رشد آن‌ها ۳۵ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد و معمولاً برای حیوانات انگل‌اند یا به طور هم‌سفره^۵ زندگی می‌کنند.

ج - باکتری‌های سایکروفیل^۶ (سرمادوست): دامنه حرارتی رشدشان بین ۰ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. از نظر برخی صاحب‌نظران، متوسط درجه حرارت این باکتری‌ها حدود ۱۵ درجه سانتی‌گراد است. این باکتری‌ها یکی از عوامل فساد مواد غذایی در یخچال هستند، به طور کلی، آنچه مشخص‌کننده یک باکتری سایکروفیل است قدرت رشد و تکثیر آن در صفر درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

۱- Growth Factors

۲- Blood Agar

۳- Thermophiles

۴- Mesophiles

۵- Commensal

۶- Psychrophiles

با توجه به این که باکتری‌ها دارای حرارت دلخواه متفاوت هستند به کمک روش‌های حرارتی مختلف نظیر استریلیزه کردن، پاستوریزه کردن، تندالیزه کردن و ... که در کتاب عملی به طور مفصل توضیح داده شده، می‌توان مواد غذایی را تهیه و نگهداری نمود.

۳-۱-۲-pH: مقاومت یک میکروارگانیسم نسبت به حرارت در pH مناسب به حداکثر می‌رسد (اغلب نزدیک به خنثی) در pH زیاد اسیدی یا قلیایی، مرگ سریع تر اتفاق می‌افتد. هر باکتری در pH معین فعالیت کرده، توکسین و یا پیگمان تولید می‌نماید. اکثر باکتری‌های بیماری‌زا در pH حدود خنثی رشد می‌کنند و تعدادی از آن‌ها ممکن است pH اسیدی یا قلیایی را ترجیح دهند. برای مثال کپک‌ها و مخمرها در pH اسیدی رشد و تکثیر بهتری خواهند داشت. از این رو، میوه‌هایی که pH پایین‌تری دارند بیشتر در معرض فساد ناشی از کپک‌ها و مخمرها هستند. در مواد غذایی، pH می‌تواند نشان‌دهنده درجه سلامت، نوع آلودگی و نوع باکتری موجود در آن باشد.

۴-۱-۲- رطوبت: آب، یکی از مهم‌ترین اجزای ساختمان سلول باکتری‌هاست و تقریباً ۸۰ تا ۹۰ درصد وزن باکتری‌ها را به صورت آزاد یا ترکیب، تشکیل می‌دهد. باکتری‌ها در محیط فاقد آب می‌میرند و یا اسپور تولید می‌کنند.

نقش آب در زندگی باکتری‌ها را می‌توان به صورت زیر خلاصه نمود:

- مواد غذایی به وسیله آب به صورت محلول درآمده، جذب باکتری می‌شوند.
- آب، در دفع و انتقال مواد زاید حاصل از فعالیت‌های حیاتی باکتری از درون آن به خارج مؤثر است.
- آب در سرعت واکنش‌های شیمیایی بسیار مؤثر است و بدون آن واکنش‌های درون باکتری انجام نمی‌پذیرد.
- آب در حفظ شکل باکتری تأثیر زیادی دارد.

عوامل بازدارنده رشد: رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌ها در اثر حضور مواد بازدارنده که به طور طبیعی در محیط کشت وجود دارند و یا این که مصنوعاً به آن اضافه شده‌اند، کند و یا به طور کامل متوقف می‌گردد. مانند آنتی‌بیوتیک‌ها که به طور مصنوعی به مواد غذایی، مانند گوشت و شیر اضافه می‌شود.

۱۱-۲- مراحل مختلف تولید اسپور

برخی از باکتری‌ها می‌توانند اسپور ایجاد کنند. اسپورها در شرایط نامساعد که حیات باکتری‌ها را به خطر می‌اندازد مانند مواد شیمیایی، سرما، گرما، خشکی و ... تشکیل می‌شوند تا بقای باکتری‌ها

را تضمین نمایند. در هر باکتری شکل، اندازه و محل استقرار اسپور آن ثابت بوده و بنابراین به تشخیص گونه‌های مختلف باکتری‌ها کمک می‌کند. شکل اسپورها از گرد تا بیضی متغیر می‌باشد.

۱۱-۲- اهمیت اسپور در زندگی باکتری‌ها: اسپورزایی در بقای باکتری‌ها و دوام آلودگی محیط، اهمیت شایانی دارد. تا زمانی که شرایط محیطی برای رشد باکتری‌های اسپورزا مساعد نباشد، باکتری به حالت استراحت در شکل اسپور باقی می‌ماند و نیازی به غذا ندارد و شرایط نامساعد بر آن بی‌تأثیر است. بدین ترتیب، ممکن است ده‌ها سال و شاید قرن‌ها باقی بماند تا شرایط برای رشد مساعد گردد. اسپورزایی به تولیدمثل باکتری ارتباطی ندارد، چون یک باکتری؛ به یک هاگ تبدیل می‌شود، یعنی تکثیر صورت نگرفته است بلکه زندگی استمرار یافته است. اسپور، در برابر حرارت و عوامل شیمیایی مقاومت زیادی دارد به همین دلیل، استریلیزه کردن محیط و پاک کردن آن از وجود اسپور مشکل است. همه‌ساله در دنیا مخارج سرسام‌آوری در صنایع کنسروسازی برای از بین بردن اسپور باکتری‌ها هزینه می‌شود. از طرفی، بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های مفید در مراحل اولیه اسپورزایی باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی تولید می‌شوند که از این نظر نیز اسپورزایی پدیده بسیار مهمی به‌شمار می‌آید.

شروع اسپورزایی: اسپورزایی معمولاً در انتهای مرحله رشد، در نتیجه نقصان یک ماده غذایی اصلی اتفاق می‌افتد که ممکن است یک منبع کربن یا ازت، یک عامل رشد و یا یک ماده معدنی باشد. اسپورزایی ممکن است پس از انتقال یاخته‌ها از محیط غنی به محیط فقیر از نظر مواد غذایی، ایجاد شود، در ضمن اضافه کردن مواد ممانعت‌کننده اسپورزایی را برمی‌انگیزد. چنانچه سلول‌ها را از محیط غنی به محیط فقیر انتقال دهند، به علت کمبود اسیدهای آمینه اسپورزایی اتفاق می‌افتد. باکتری اسپورزا در طی پدیده اسپورزایی یک تقسیم نامتقارن را تحمل می‌کند که در جریان آن، سرانجام دو یاخته زاده می‌شوند یکی کوچکتر و دیگری بزرگتر.

۱۲-۲- بیماری‌زایی باکتری‌ها

باکتری‌ها از جنبه بیماری‌زایی یعنی توان تولید بیماری در انسان یا حیوانات، انواع مختلفی دارند و از میان انبوه باکتری‌ها تنها تعداد معدودی خواص بیماری‌زایی دارند. باکتری‌ها، در همه موجودات به استثنای حیوانات عاری از جرم (حیواناتی که به‌طور استریل از رحم مادر گرفته می‌شوند و در شرایط استریل زندگی می‌کنند.) همواره وجود دارند. ولی همه آن‌ها زیان‌آور و بیماری‌زا نیستند و حتی برخی نیز ممکن است مفید باشند. توان بیماری‌زایی از یک سو، مربوط به ماهیت، ساختمان و خواص جرم آلوده‌کننده و از سوی دیگر وابسته به خواص موجود آلوده‌شونده (گونه، نژاد، فرد،

دفاع غیر اختصاصی و دفاع ایمنی موجود) است. باکتری‌ها بنا بر دو مکانیسم اساسی حمله‌وری به بافت‌ها یا قسمت‌های سطحی و تولید زهرابه‌ها، موجب بروز بیماری می‌شوند. البته برخی از باکتری‌ها ممکن است بنا بر مکانیسم ازدیاد حساسیت، سبب بروز بیماری گردند.

تهاجم و بیماری‌زایی بسیاری از باکتری‌ها بر این اساس است که پذیرنده‌هایی در باکتری‌ها و هم‌چنین در سطح برخی از یاخته‌های حیوانی و یا احتمالاً گیاهی وجود دارند، که باکتری‌های بیماری‌زا به وسیله آن‌ها به یاخته‌های میزبان می‌چسبند و در آن جا تمرکز یافته، بیماری‌زایی خود را ظاهر می‌کنند و بر باکتری‌هایی که این گونه پذیرنده‌ها را ندارند غالب می‌شوند و آن‌ها را از کارآیی باز می‌دارند.

۱۳-۲- بیماری‌های مهم باکتریایی

۱۳-۲-۱- بیماری سی-آر-دی: عامل این بیماری، نوعی باکتری (از گروه P.P.L.O) به نام «میکوپلازما گالی سپتیکوم» است که معمولاً به تنهایی و بدون کمک دیگر عوامل بیماری‌زا نمی‌تواند علایم مشخص تنفسی به وجود آورد. زمینه‌ساز این بیماری معمولاً ویروس‌ها و عوامل بیماری‌زای دیگر دستگاه تنفسی هستند که در نهایت با حمله میکوپلازماها پیچیده و پیشرفته‌تر می‌شود. مشکل اصلی در این بیماری، بیشتر مرغ‌های پدر و مادری هستند که قبلاً به عامل این بیماری یعنی «میکوپلازما گالی سپتیکوم» آلوده شده‌اند و خود، اکنون به کانون‌های انتقال این بیماری بدل شده‌اند. در نتیجه، بیماری می‌تواند به وسیله مادرهای آلوده از طریق تخم مرغ و جنین به جوجه‌ها انتقال یابد. علاوه بر این، انتقال و شیوع بیماری می‌تواند از راه تماس مستقیم طیور آلوده و بیمار با یکدیگر و هم‌چنین به وسیله گرد و خاک، هوای آلوده سالن، تهویه نادرست و ترشحات مرغ‌های بیمار صورت گیرد. دوره پنهان بیماری تا تجدید حیات دوباره آن متفاوت است و از ۴ روز تا ۳ هفته به طول می‌انجامد.

این بیماری، ممکن است از سن یک هفتگی به بعد و در تمام دوره زندگی مرغ‌ها بروز کند. علایم آن معمولاً منحصر به مجاری تنفسی است. دوره کمون بیماری اغلب ۱۱ تا ۱۸ روز به طول می‌انجامد. در مرغ‌های بالغ، مشخصه بیماری عبارت است از: سرفه، عطسه، خرخر کردن (شبیه کشیدن قلیان) و گاهی آب‌آمدن از بینی و به‌طور کلی، بروز علایم عمومی ناراحتی‌های دستگاه تنفسی. در ضمن چشم‌ها حالت آبکی و باد کرده به خود می‌گیرد.

بهترین راه برای رفع مشکل سی-آر-دی، جلوگیری از ابتلا به بیماری و شیوع آن است. بنابراین، عمل پیشگیری در گله اهمیت خاصی دارد. ولی پیشگیری بیماری و رسیدن به حد مطلوب آن، کار دقیق و مشکلی است. یکی از مهم‌ترین عوامل پیشگیری، رعایت اصول بهداشت و تهویه سالم

است. علاوه بر این، طیور مبتلا باید در حد امکان از گله خارج و در صورت لزوم، معدوم شوند. گله‌های مادر و اجداد، باید به منظور کسب اطمینان از عدم آلودگی و پاک بودن، تحت تست خون قرار گیرند. ۲-۱۳-۲ بیماری سل: سل یکی از بیماری‌های میکروبی واگیر مشترک بین انسان و دام است و بیشتر دام‌های مسن را مبتلا می‌سازد. در مناطقی که دام به صورت متراکم نگهداری می‌شود شدت آلودگی بیشتر از نقاطی است که این کار به صورت باز انجام می‌گیرد.

میکروب بیماری که نوعی باسیل^۱ است نسبت به اسیدها و الکل مقاوم و نسبت به حرارت حساس است به طوری که در آب جوش فوراً از بین می‌رود ولی اگر میکروب به وسیله ترشحات یا خلط پوشیده شده باشد، مقاومت بیشتری دارد و دیرتر از بین می‌رود. از مواد شیمیایی، ید و کلر تأثیر شدید و سریعی بر روی میکروب عامل این بیماری دارند و در مدت کوتاهی آن را از بین می‌برند. کلیه دام‌های اهلی و طیور نسبت به میکروب سل، حساس‌اند اما میزان حساسیت آن‌ها یکنواخت نیست. حساسیت انسان و گاو بیشتر از سایرین است، در گاو، شرایط نگهداری و سن دام نسبت به بیماری تأثیر زیادی دارد.

در بدن حیوان مبتلا، میکروب سل در اندام‌های مختلف جایگزین می‌شود. چنانچه این اندام‌ها ترشحاتی داشته باشند، میکروب همراه ترشحات به خارج راه پیدا می‌کند. ترشحات ریه (خلط) در سل ریوی، ترشحات رحم در سل رحمی و مدفوع در سل روده‌ای و شیر در سل پستان، به مقدار زیادی دارای میکروب سل هستند. در سل پستان، چنانچه شیر گاو آلوده با شیر سایر دام‌ها مخلوط شود، تمام آن را آلوده می‌کند و مصرف آن به صورت خام، خطرناک خواهد بود. در سل روده‌ای، چنانچه پستان به موارد دفعی آلوده باشد و یا مدفوع وارد ظرف شیر گردد شیر آلوده می‌شود. در این نوع سل، میکروب به وسیله مدفوع در تمام گاوداری پخش و در اثر گرد و غبار، وارد هوای تنفسی انسان یا حیوان می‌گردد و باعث انتشار بیماری می‌شود.

بیماری سل در گاو، مزمن است و سال‌ها طول می‌کشد و بیشتر در ریه، غدد لنفاوی، سر و گردن ظاهر می‌شود. در مراحل اولیه بیماری، دام سلامت ظاهر خود را حفظ کرده، کم‌کم در هنگام فعالیت یا استنشاق هوای سرد، سرفه‌های کوتاه و دردناکی بروز می‌کند و دام زودتر از معمول خسته می‌شود و به نفس نفس می‌افتد. در این هنگام، اشتهای دام کم شده، لاغر می‌گردد و نشخوار نامنظم و گاهی نفخ شکم مشاهده می‌شود، سپس درجه حرارت کمی بالا رفته، تنفس کوتاه و سریع می‌شود و سرفه شدت می‌یابد. در هنگام سرفه ترشحات غلیظ و زردرنگی دفع می‌گردد که اغلب به وسیله حیوان مجدداً بلعیده می‌شود و باعث آلودگی غدد لنفاوی دستگاه گوارش و کبد می‌گردد. به تدریج اشتهای

دام کم می‌شود و دام لاغر می‌گردد و در نتیجه از میزان ترشح شیر کاسته می‌شود. بر اثر وارد آمدن فشار روی دنده‌ها، دام به شدت سرفه می‌کند. با مشاهده علائم سرفه، لاغری، بی‌اشتهایی و تورم غدد لنفاوی می‌توان به این بیماری مشکوک شد ولی برای تشخیص قطعی باید از آزمایشگاه و تست‌های حساسیتی استفاده شود.

برای ریشه‌کنی بیماری سل در یک منطقه سالی یک بار عمل تست حساسیتی را روی دام‌ها انجام می‌دهند و در صورت واکنش مثبت، دام‌ها را روانه کشتارگاه می‌کنند. در گاوداری‌های آلوده، گوساله‌های سالم را جدا و به تدریج دام‌های مسن و مشکوک را از بین می‌برند و گوساله‌های به دنیا آمده از مادران مشکوک به بیماری سل را، بلافاصله جدا و با شیر سالم و پاستوریزه تغذیه می‌نمایند. وقتی گوساله‌ها از شیر گرفته شدند تست حساسیتی را روی آن‌ها انجام داده، در صورت منفی بودن وارد گله‌های سالم می‌کنند و در غیر این صورت، به کشتارگاه می‌فرستند. برای پیشگیری از ابتلای دام‌ها به این بیماری، در مناطق خیلی آلوده از واکسن سل که B.C.G (ب. ث. ز) نامیده می‌شود، استفاده می‌گردد.

۳-۱۳-۲- بیماری باکتریال آبشش و پوسیدگی باله: این بیماری عمدتاً مربوط به باکتری‌های رشته‌ای و گرم منفی و تولیدکننده رنگدانه زرد می‌باشد. ماهیان مبتلا بی‌حس و کم‌اشتها شده و تمایل بیشتری به ماندن در سطح آب و دریچه‌های ورودی دارند. تعداد تنفس افزایش یافته و ترشحات چسبناک در صورت افزایش در آبشش‌های ماهیان مشخص می‌باشد.

در مراحل پایانی عفونت‌های ثانویه قارچی نیز مشاهده می‌شود.

انتقال بیماری از طریق آب محیط و سایر ماهیان مبتلا صورت می‌گیرد.

برای پیش‌گیری بایستی کیفیت شرایط محیطی ثابت نگه داشته شود که شامل جلوگیری از تراکم زیاد ماهیان، جلوگیری از کاهش اکسیژن محلول و ذرات معلق در آب و نیز پرهیز از افزایش آمونیاک آب می‌باشد.

۴-۲- ضد عفونی کردن و استریل نمودن

اساس استریل و ضد عفونی کردن به ۱۵۰ سال قبل مربوط می‌شود ولی عمل استریل کردن در قرون گذشته متداول بوده است. الکساندر (Alexander) قبل از نوشیدن آب آن را می‌جوشانده است. مصریان قدیم برای محافظت بدن مردگان خود، آن‌ها را مومیایی می‌کردند. کارهای لیستر (Lister)، پاستور (Pasteur)، و کوخ (Koch) باعث شد که استریل کردن در کارهای پزشکی به‌طور اجباری اجرا شود.

تعریف استریلیزه کردن: به کشتن یا حذف همه میکروب‌های مفید و غیر مفید استریلیزه کردن می‌گویند.

تعریف ضد عفونی کردن (Disinfection): به کشتن میکروب‌ها بجز اسپورها ضد عفونی کردن می‌گویند.

تعریف آنتی‌سپتیک: به ناپود کننده میکروب‌ها در بافت‌های زنده، آنتی‌سپتیک می‌گویند. ماده استاتیک: تنها مانع رشد میکروب می‌شود.

۱-۱۴-۲- میکروب‌کش: میکروب‌ها را نابود می‌کند. (باکتری‌کش^۱، ویروس‌کش^۲، قارچ‌کش^۳، اسپورکش^۴) برای انجام عملیات فوق از دو روش فیزیکی و شیمیایی استفاده می‌شود: روش‌های فیزیکی بیش از روش‌های شیمیایی در استریلیزه کردن کاربرد دارند و عبارتند از: سرم‌دادن، فریز کردن، خشکاندن جسم میکروب برای نگهداری آن.

از گرما به دو صورت در استریلیزه کردن استفاده می‌شود: گرمای خشک و گرمای مرطوب گرمای مرطوب: حرارت دادن در حضور آب که به سه طریق انجام می‌گیرد:

۱- گرمای زیر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد

۲- گرمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد

۳- گرمای بالای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد

دمای زیر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد: بهترین مثال در این مورد پاستوریزه کردن است که در آن از دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه استفاده می‌شود و در روش اصلاح شده آن، دمای ۷۱/۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه به کار می‌رود. بعضی از اسپورها در دمای ۱۰۰ درجه کشته می‌شوند اما این نوع استریل کردن را نمی‌توان به عنوان روش اسپورکش محسوب کرد.

دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد: در این مورد می‌توان تندالیزه کردن را مثال زد که در آن ماده مورد نظر ۳۰ دقیقه در هر روز به طور متوالی حرارت داده می‌شود. اساس عمل این است که بعد از هر حرارت‌دهی، اسپورهای زنده مانده به حالت رویشی افتاده، در مرحله حرارت‌دهی بعدی کشته می‌شوند. نتایجی که با این روش به دست آمده، زیاد رضایت‌بخش نیست، بنابراین، برای استریل کردن مواد حساس مثل محیط‌های کشت دارای کربوهیدرات‌ها، تخم مرغ یا سرم توصیه نمی‌شود.

دمای بالای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد: بخار خشک یک روش عالی برای استریل کردن است زیرا دمای بالایی دارد و قادر به تغییر سختی آب می‌باشد.

بخار با دمای کم همراه با فرم آلدئید: بخار با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد، بسیار مؤثرتر از

آب با همان دماست. افزودن فرم آلدئید به بخار با دمای کم تأثیر اسپورکشی دارد و برای لوازم ناپایدار در برابر حرارت مناسب است.

۲-۱۴-۲- غیرفعال کردن میکروب‌ها با سرما: در دمای پایین رشد باکتری‌ها کند و بالاخره متوقف می‌شود. البته بعضی از باکتری‌های سرمادوست می‌توانند حتی در صفر درجه سانتی‌گراد هم به رشد خود ادامه دهند و این‌ها ممکن است میکروب‌های مهم فاسدکننده مواد غذایی باشند.

تعریف لیوفیلیزه کردن: شامل فریز کردن سریع توأم با خشکاندن است. این روش برای محافظت میکروبی محیط‌های کشت و مواد غذایی خاص به کار می‌رود. فریز کردن و ذوب کردن دوباره می‌تواند باکتری‌ها را غیرفعال نماید و این عمل ممکن است به دلیل وارد آمدن آسیب به غشای خارجی، صورت بگیرد.

۳-۱۴-۲- شوک سرما و شوک اسمزی: روشی است که در آن میکروب‌ها بدون فریز کردن، ناگهان به لرزه می‌افتند. در این روش، باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت نابود می‌شوند اما مخمرها زنده می‌مانند. در روش اصلاح‌شده شوک اسمزی، باکتری‌ها توسط یک محلول هیپرتونیک ساکاروز همراه با EDTA^۱ احاطه می‌شوند و سپس در داخل محلول کلرور منیزیم با دمای صفر درجه قرار می‌گیرد. این عمل، باکتری‌ها را نابود کرده، آنزیم‌های پری‌پلاسم آن‌ها را آزاد می‌کند.

۴-۱۴-۲- تشعشعات یونیزه‌کننده: تشعشعات یونیزه‌کننده شامل اشعه ایکس، تشعشعات بتا و گاما و ... هستند. این‌ها باعث شکسته شدن یک رشته و یا هر دو رشته DNA می‌شوند. برعکس، اشعه ماورای بنفش انرژی کافی برای ایجاد تغییرات شیمیایی را ندارد.

اثر تشعشعات یونیزه‌کننده تابع عوامل زیر است:

۱- نوع میکروب‌ها: اسپورها نسبت به باکتری‌های بدون اسپور، بسیار مقاوم‌ترند.
۲- شرایط قبل از تابش اشعه: میکروب‌هایی که از محیط‌های کشت حاوی سرم جدا می‌شوند مقاومت بیشتری دارند.

۳- اثر اکسیژن: که مربوط است به اثر اکسیژن بر اسپورهای باکتریایی در محیط گازی و بعد از تابش اشعه.

۴- مرحله اسپورزایی: مقاومت نسبت به اشعه قبل از مقاومت نسبت به دما حاصل می‌شود. تشعشعات یونیزه‌کننده برای استریل کردن لوازم یک بار مصرف پزشکی، کاربرد فراوان دارند.

۵-۱۴-۲- استریل کردن با صافی: قرن‌هاست که از صافی‌ها برای تخلیص آب و فاضلاب

استفاده می‌شود.

^۱ Ethylene Diamin Tetracetic Acid

انواع صافی‌ها

۱- **صافی‌های سرامیکی بدون لعاب:** این‌ها، به لحاظ اندازه سوراخ، در درجات مختلف ساخته شده‌اند و برای تصفیه آب به کار می‌روند. صافی‌های چنبرلند و دالتون (Chanberland and Dalton) نمونه‌هایی از این نوع صافی‌ها هستند. این صافی‌ها را پس از استفاده، می‌توان با مواد شیمیایی تمیز کرد.

۲- **صافی‌های آزبست:** این نوع صافی‌ها، ظرفیت جذب بالایی دارند اما در برابر محلول‌های قلیایی‌کننده، آسیب‌پذیراند و احتمالاً سرطان‌زا نیز هستند.

۳- **صافی‌های شیشه‌ای:** این صافی‌ها دارای ذرات پودر شده شیشه‌ای در اندازه‌های مختلف هستند که بسته به قطر منفذهای مورد نیاز، اندازه ذرات شیشه‌ای فرق می‌کند. این صافی‌ها گران‌قیمت‌اند.

۴- **صافی‌های غشایی:** این‌ها روزانه به مقدار زیاد به کار می‌روند و از استر سلولز ساخته شده‌اند و برای تهیه محلول‌های استریل بسیار مناسب‌اند. اندازه منفذهای آن‌ها بین 0.5μ تا 12μ نانومتر است. قطر منفذی که برای استریل کردن لازم است بین 0.2μ تا 22μ نانومتر می‌باشد. این نوع صافی‌ها در پزشکی و صنعت کاربرد فراوان دارند.

موارد استفاده صافی‌ها

۱- برای استریل کردن محلول‌های تزریقی و چشمی حساس در برابر حرارت

۲- برای آزمایش محصولات دارویی از نظر استریل بودن

۳- برای تصفیه منابع آب

۴- برای ارزیابی میکروبی آب

۵- برای شمارش میکروبی

۶- برای تعیین اندازه ذرات ویروسی

۷- برای استریل کردن هوا

۸- برای استریل کردن سرم‌ها

۶-۱۴-۲- خواص یک ضد عفونی‌کننده مطلوب

۱- طیف گسترده: طیف گسترده ضد میکروبی داشته باشد.

۲- سرعت عمل: باید به سرعت بتواند فرم‌های رویشی و اسپورهای باکتری‌ها، قارچ‌ها، انگل‌ها و ویروس‌ها را نابود کند.

۳- تحت تأثیر عوامل فیزیکی قرار نگیرد: یعنی در حضور مواد آلی مثل خون، خلط و مدفوع فعال باشد و با صابون‌ها، دترجنت‌ها و مواد شیمیایی سازگار باشد.

۴- غیر سمی باشد.

۵- برای سطوح مضر نباشد و باعث تغییر شکل و تخریب لباس ها، لاستیک ها، پلاستیک ها و

مواد دیگر نشود.

۶- به آسانی قابل استفاده باشد.

۷- بی بو باشد.

۸- ارزان قیمت باشد.

جدول ۲-۲- نحوه عمل و خواص عمده ضدعفونی کننده های شیمیایی

ماده ضدعفونی کننده	عمل عمده	مورد استفاده معمول	خواص دیگر	رقت (درصد)
الکل	حلال لیپید دنا توره کننده پروتئین ها	ضد میکروب های پوستی ضد عفونی کننده های سطحی	اثر سریع قابل اشتعال، پوست را خشک می کند.	۷۰
مواد جیوه ای	غیر فعال کننده پروتئین ها	مواد ضد میکروبی پوست ضد عفونی کننده های سطحی	اثر کشندگی ضعیف با مواد آلی غیر فعال می شوند.	۰/۱
نیترات نقره	دنا توره کننده پروتئین	ماده ضد میکروبی برای چشم ها و سوختگی ها	با مواد آلی غیر فعال می شوند بر طیف محدودی از میکروب ها مؤثر است.	۱
ترکیبات فنلی	غشاهای سلولی را تخریب و پروتئین ها را غیر فعال می کنند.	در داخل شوینده های ضد میکروبی پوست	با مواد آلی غیر فعال نمی شوند.	۰/۵-۵
ید	پروتئین ها را غیر فعال می کند.	ضد عفونی می کند - کشنده ضد میکروب های پوست	محلول در الکل - اثر سریع با صابون ها مخلوط می شود.	۲
ترکیبات کلردار	اکسید کننده های آنزیم ها	اصلاح کننده آب - کشنده ضد عفونی کننده	با مواد آلی غیر فعال می شوند.	۵
ترکیبات چهار ظرفیتی آمونوم	عمل کننده سطحی مخرب غشاهای سلولی	ضد میکروب های پوست کشنده - ضد عفونی کننده	با صابون خشی می شوند. بی بو - غیر سوزاننده	کمتر از ۱
گلو تار آلدئید	پروتئین ها را دنا توره می کند. پروتئین ها را غیر فعال می کند.	استریل کننده سرد برای لوازم حساس نسبت به گرما	ناپایدار - سمی دارای فعالیت بالا در قلبایی	۱-۲

۱۵-۲- روش‌های کشت

میکروب‌ها نیز مثل تمام موجودات زنده دیگر، به مواد غذایی اساسی خاص و به عوامل فیزیکی نیاز دارند و این نیازمندی‌ها، از تنوع گسترده‌ای برخوردار است. برای کسب اطلاعات لازم در مورد این نیازمندی‌ها لازم است میکروب‌ها در محیط‌های آزمایشگاهی، کشت داده شوند.

یک محیط کشت میکروبی، غذایی است که برای کشت باکتری‌ها، کپک‌ها و میکروب‌های دیگر به کار می‌رود و ممکن است مایع، جامد و یا نیمه‌جامد باشد.

۱-۱۵-۲- محیط‌های کشت مایع: این محیط‌ها شامل آب گوشت، محیط کشت مایع سبترات، محیط کشت مایع گلوکز، محیط کشت مایع شیر و غیره هستند و برای رشد و تکثیر تعداد زیادی از میکروب‌ها، مطالعه عمل تخمیری آن‌ها و برای آزمایش‌های مختلف دیگر به کار می‌روند.

۲-۱۵-۲- محیط‌های کشت جامد: این محیط‌های کشت، با افزودن مواد سفت‌کننده مثل ژلاتین و یا سلیکاژل به محیط کشت مایع، درست می‌شوند. یک ماده سفت‌کننده خوب، ماده‌ای است که توسط میکروب‌ها مصرف نشود و از رشد میکروب‌ها جلوگیری نکند و در دمای اتاق ذوب نگردد. آگار و سلیکاژل در دمای اتاق ذوب نمی‌شود و به وسیله تعداد بسیار کمی از میکروب‌ها مصرف می‌شود. از طرف دیگر، ژلاتین به وسیله عده معدودی از میکروب‌ها هیدرولیز می‌شود و در دمای اتاق ذوب می‌گردد. نوترینت آگار، بلادآگار (آگار خون‌دار)، و ساپروآگار، مثال‌هایی از این نوع محیط‌های کشت هستند که برای رشد پرگنه‌های باکتری‌ها و کپک‌ها در سطح محیط کشت به کار می‌روند. همان‌طور که خواهیم دید تهیه پرگنه در سطح محیط کشت، برای جداسازی میکروب‌ها از یک محیط کشت مخلوط، کاری اساسی و مهم است.

۳-۱۵-۲- محیط‌های کشت نیمه جامد: محیط‌های کشتی هستند مابین مایع و جامد. گرچه آن‌ها شبیه محیط‌های کشت جامد هستند و مواد سفت‌کننده‌ای مانند آگار و ژلاتین را در برمی‌گیرند ولی به خاطر کم بودن ماده سفت‌کننده در آن‌ها، حالت ژله‌ای دارند. این محیط‌های کشت، برای تشخیص باکتری‌های خاص متحرک به کار می‌روند.

۴-۱۵-۲- محیط‌های کشت اختصاصی: دو نوع محیط کشت اختصاصی که به‌طور گسترده به کار می‌روند عبارت‌اند از محیط‌های انتخابی و محیط‌های افتراقی.

محیط‌های کشت انتخابی: محیط‌هایی هستند که به دلایل زیر، فقط به انواع خاصی از میکروب‌ها اجازه رشد می‌دهند: (۱) به علت نبود مواد غذایی حیاتی این محیط برای اکثر میکروب‌ها (البته نه برای همه آن‌ها) غیر مفید است. (۲) وجود مواد ممانعت‌کننده‌ای که از رشد گونه‌های خاصی از میکروب‌ها جلوگیری می‌کنند. ماده ممانعت‌کننده ممکن است نمک (NaCl)، اسید، یک ماده

شیمیایی سمی (کریستال و یوله)، یک آنتی بیوتیک (استریتومایسین)، و یا مواد دیگر باشد.

محیط‌های افتراقی: این محیط‌ها، شامل موادی هستند که باعث می‌شوند ظاهر بعضی از باکتری‌ها متفاوت از باکتری‌های دیگر باشند. بنابراین امکان افتراق گونه‌های باکتریایی در این محیط‌های کشت، امکان پذیر می‌گردد.

در برخی موارد، محیط کشت طوری ساخته می‌شود که خاصیت هر دو نوع محیط کشت (افتراقی و اختصاصی) را داراست. در این مورد، می‌توان لوین EMB آگار را مثال زد که برای تعیین حضور کلی فرم‌ها در آزمایش آب به کار می‌رود.

محیط‌های کشت بدون آب (به صورت پودر): تا سال ۱۹۳۰، یک تکنسین آزمایشگاه بیشترین وقت خود را صرف تهیه محیط‌های کشت میکروبی از مواد مختلف می‌کرد. اگر یک محیط کشت ۵ یا ۶ ماده اولیه در خود داشت، نه تنها مقادیر مختلف مواد، باید اندازه‌گیری می‌شد، بلکه برای تهیه موادی مثل عصاره گوشت، روش‌های خسته‌کننده پخت باید اعمال می‌گردید، اما امروزه، تهیه محیط‌های کشت بسیار ساده شده است. با توزین مقدار مشخصی از محیط کشت بدون آب، آن را در آب حل کرده، pH آن را تنظیم و در لوله‌های آزمایش تقسیم کرده، استریل می‌نمایند. در اکثر موارد، تنظیم pH لازم نیست.

۱۶-۲- چگونگی تهیه محیط‌های کشت

در این دوره از کار آزمایشگاهی، با همکاران محیط‌های کشتی درست کنید که در کارهای بعدی آزمایشگاه به کار خواهید برد. معلمان نحوه تهیه محیط کشت را به شما نشان خواهد داد. در نقطه چین‌های زیر، تعداد لوله‌های آزمایش محیط‌های کشتی را که تهیه آن‌ها به عهده شما و همکاران گذاشته شده است یادداشت کنید:

- نوترینت براث
- نوترینت آگار
- نوترینت آگار خوابیده
- محیط کشت دیگر

برای تهیه محیط‌های کشت، لوله‌های آزمایش در اندازه‌های مختلف به کار می‌رود، اما معمولاً لوله‌های با قطر ۱۶ میلی‌متری و ۲۰ میلی‌متری و به بلندی ۱۵ سانتی‌متری، بیشترین کاربرد را دارند. ابتدا لوله‌های با اندازه‌های مناسب را انتخاب کنید:

لوله‌های آزمایش بزرگ (با قطر ۲۰ میلی‌متر): این لوله‌ها، برای محیط‌های کشت ذخیره

مثل نوترینت آگار، سایروآگار، EMB آگار و غیره به کار می‌روند. این محیط‌های کشت برای ریختن به داخل پلت‌ها کاربرد دارند.

لوله‌های آزمایش کوچک (با قطر ۱۶ میلی‌متر): این لوله‌های آزمایش برای محیط‌های کشت مایع و برای محیط‌های کشتی که در آن‌ها کشت عمقی داده می‌شود و برای محیط‌های کشت خوابیده (Slant)، به کار می‌روند. اگر لوله‌های آزمایش، تمیز و بدون گرد و غبار باشند نیازی به شستن ندارند. با این همه، در صورت نیاز، آن‌ها را در داخل آب گرم و دترجنت غوطه‌ور نموده، با برس شست و شوی لوله آزمایش، داخل آن‌ها را تمیز کنید. سپس دوباره آب‌کشی کنید. بار اول با آب معمولی و بار دوم، با آب مقطر در حالت غوطه‌ور تا بقایای دترجنت از آن‌ها زدوده شود. سپس، لوله‌ها را در جالوله‌ای یا سبد توری به‌طور سر و ته قرار دهید تا خشک شوند و هرگز آن‌ها را با حوله خشک نکنید.

توزین و مخلوط کردن: پودر محیط کشت مورد نظر را دقیقاً توزین کنید. (۸/۰ گرم) مواد و لوازم: ترازو، بشر، هم‌زن شیشه‌ای میله‌ای، محیط‌های کشت پودری، شعله گاز یا

هیتر

۱- آب مورد نیاز را تهیه کنید. حجم مورد نیاز برای هر لوله آزمایش، براساس مقادیر زیر در نظر گرفته شود:

۱- محیط‌های کشت ذخیره	۱۲ میلی‌لیتر
۲- محیط‌های کشت عمقی	۶ میلی‌لیتر
۳- محیط‌های کشت خوابیده	۴ میلی‌لیتر
۴- محیط‌های کشت آب گوشت	۵ میلی‌لیتر
۵- محیط‌های کشت برای تخمیر	۵-۷ میلی‌لیتر

۲- از روی برجسب بسته محیط کشت، مقدار پودر مورد نیاز برای ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب را مشخص کرده و سپس، مقدار مورد نیاز خود را محاسبه کنید، آن‌گاه، آن را وزن کرده داخل آب بشر بریزید. اگر محیط کشت حاوی آگار نباشد، نیازی به حرارت ندارد.

۳- اگر محیط کشت حاوی آگار باشد آن را بر روی شعله گاز یا هیتر حرارت دهید تا به جوش آید، برای این که مطمئن شوید در اثر حرارت آب تبخیر و کم نشده، قبل از حرارت، سطح آب را در بشر علامت‌گذاری کنید. قبل از این که در اثر جوشیدن سرریز شود هیتر را خاموش کنید. توجه: در حین گرم‌دادن با هم‌زن شیشه‌ای، محیط کشت را به هم بزنید تا ته نگیرد.

۴- میزان حجم محیط کشت را در ظرف بررسی کرده، در صورت کاهش، با افزودن آب، آن

را به سطح علامت گذاری شده برسانید. دمای محیط کشت را در حدود 6° درجه نگه دارید تا سفت نشود. چون در دمای حدود 4° درجه سفت می شود.

تنظیم pH: گرچه محیط های کشت پودری شامل مواد بافری هستند pH را در یک محدوده مورد نظر ثابت نگه می دارد ولی ممکن است pH هر سری تولید شده با آنچه در بر چسب نوشته شده است فرق داشته باشد. قبل از اینکه محیط کشت به داخل لوله آزمایش ریخته شود، pH آن اندازه گیری و در صورت لزوم تنظیم می شود.

اگر pH متری در اختیار دارید که قبلاً استاندارد شده است برای تنظیم pH به کار برید و در صورت نیاز به تنظیم pH، از اسید هیدروکلریک (HCl) و هیدروکسید سدیم (NaOH) استفاده کنید. البته از کاغذهای مخصوص برای تنظیم pH نیز می توانید بهره بگیرید و به قرار زیر، pH را تنظیم کنید:

مواد و لوازم مورد نیاز: بشر حاوی محیط کشت

اسید و باز (شیشه های دارای قطره چکان و حاوی اسید و باز یک نرمال و یک دهم نرمال

NaOH, HCl) هم زن شیشه ای میله ای

کاغذ pH متر

دستگاه pH متر

روش کار:

۱- کاغذ pH متر را در داخل محیط کشت فرو ببرید.

۲- اگر pH خیلی بالا باشد با افزودن یک یا دو قطره HCl می توان آن را پایین آورد. برای

مقادیر بیشتر، از HCl یک نرمال استفاده کنید. اگر به تغییر pH اندکی نیاز است، از $1/8$ HCl نرمال استفاده کنید. با یک میله به هم زن شیشه ای، قطرات اضافه شده به محیط را مخلوط کنید.

۳- اگر pH خیلی پایین باشد یک قطره NaOH اضافه کنید تا pH افزایش یابد برای تغییر

اندک pH از NaOH یک دهم نرمال و برای تغییرات وسیع از NaOH یک نرمال بهره بگیرید.

سپس محیط کشت را در لوله های مناسب تقسیم کرده، سر لوله های در پیچ دار را با در

مخصوص ببندید و اگر لوله ها در پیچ دار نباشند با گذاشتن پنبه در آن ها را ببندید و بعد استریل کنید.

استریلیزه کردن محیط های کشت: به محض این که لوله های آزمایش حاوی محیط های

کشت آماده شدند باید استریل شوند. میکروب های موجود در سرپوش لوله های آزمایش و میکروب های

موجود در آب محیط های کشت و پودر آن ها، در مدت بسیار کمی در دمای اتاق شروع به رشد کرده،

محیط کشت را خراب می کنند. قبل از استریلیزه کردن، لوله های آزمایش حاوی محیط کشت باید در

یک سبب سیمی یا جالوله‌ای قرار داده و برچسب زده شوند، این برچسب باید نشان‌دهنده نوع محیط کشت، تاریخ و نام شما باشد، استریلیزه کردن باید با اتوکلاو انجام شود. رعایت موارد زیر در استفاده از اتوکلاو بسیار مهم است.

استریلیزه کردن کامل در دمای 25° درجه فارنهایت ($121/6$ درجه سانتی‌گراد) صورت می‌گیرد. هنگام رسیدن به این دما، داخل اتوکلاو دارای فشار ۱۵ پوند در اینچ ربع (Psi) بخار آب خواهد بود. برای دستیابی به دمای دلخواه، اتوکلاو، باید درجه‌هایی برای خروج هوا داشته باشد.

* **محفظه اتوکلاو را از مواد استریل‌شونده پر نکنید.** باید اطراف سبب حاوی محیط کشت، برای چرخش بخار آب خالی باشد.

* **زمان استریلیزه کردن نسبت به میزان مواد داخل اتوکلاو تنظیم می‌شود.** اگر مواد استریل‌شونده کم باشند تنها 10 تا 15 دقیقه برای این کار کافی است. یک اتوکلاو پر از محیط کشت، ممکن است برای استریلیزه کردن کامل، به 30 دقیقه وقت نیاز داشته باشد.

محیط‌های کشت خوابیده (Slants): برای درست کردن این فرم، باید پس از خارج نمودن لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت از اتوکلاو، آن‌ها را به‌طور افقی بخوابانید. **محیط‌های کشت دیگر:** لوله‌های آزمایش حاوی آب گوشت، آگار عمقی، ژلاتین و غیره را باید پس از اتوکلاو کردن در وضعیت ایستاده قرار دهید تا در دمای اتاق خنک شوند.

نگهداری محیط‌های کشت: اگر محیط‌های کشت بلافاصله به‌کار نمی‌روند. باید در یک مکان خنک نگهداری شوند. این محیط‌ها چنانچه برای مدت طولانی در دمای اتاق بمانند آب خود را از دست داده، خشک می‌شوند. آن‌ها را می‌توان در دمای 4 درجه یخچال، ماه‌ها سالم نگه داشت. **۱-۱۶-۲- طرز تهیه محیط کشت آگار خون‌دار:** محیط کشت آگار خون‌دار، محیط

کشتی است که در آزمایشگاه‌ها کاربرد فراوان دارد زیرا علاوه بر دارا بودن مواد معمول لازم، حاوی خون است بنابراین اکثر باکتری‌ها قادرند در آن رشد کنند. برای تهیه آن، خون گوسفند ضد انعقاددار به میزان 3% تا 5% به محیط کشت پایه (نوترینت آگار، بلادا آگار بیس^۱، تریپتون سوی آگار^۲، پروسلا آگار^۳) اضافه می‌شود. برای افزودن خون به محیط کشت پایه باید پس از اتمام اتوکلاو محیط کشت پایه آن را تا حدود 42 درجه سانتی‌گراد خنک نمایید. سپس خون را به آن اضافه کنید و به هم بزنید، اگر دمای محیط کشت بیشتر باشد خون لیز می‌شود و رنگ محیط کشت کدر و نامناسب می‌گردد. پس از افزودن خون به محیط کشت پایه، بلافاصله باید آن را در پلت‌های استریل تقسیم کنید تا به‌طور یکنواخت سفت شود و سپس آن‌ها را وارونه در یخچال قرار دهید.

۱- Blood agar base

۲- Tryptone soy agar

۳- Brucella agar

۱۷-۲- روش پورپلیت^۱

این روش جداسازی یک گونه از باکتری‌ها از گونه‌های دیگر باکتریایی شامل رقیق کردن یک لوپ پر از میکروب در سه لوله آزمایش حاوی نوترینت آگار ذوب شده می‌باشد. در این حالت، یکی از لوله‌ها دارای تعداد معمولی باکتری‌ست. در این روش، نیاز به مهارت نیست ولی در آن به محیط کشت و لوله‌های آزمایش و پلیت‌های زیاده‌تری نیاز است.

مواد و لوازم مورد نیاز:

محیط کشت حاوی مخلوط میکروبی

سه عدد محیط کشت نوترینت آگار

سه عدد پلیت استریل

یک عدد هیتر، بشر، دماسنج، ماژیک

۱- با ماژیک پشت سه محیط کشت نوترینت آگار را با شماره‌های ۱ و ۲ و ۳ شماره‌گذاری کنید و آن‌ها را در آب بشر قرار داده، آن را روی هیتر بگذارید تا ذوب شود.

۲- با ماژیک پشت سه عدد پلیت را با شماره‌های ۱ و ۲ و ۳ شماره‌گذاری کنید.

۳- محیط‌های کشت لوله‌های آزمایش را سرد کنید تا دمای آن‌ها به ۵۰ درجه سانتی‌گراد برسد.

۴- طبق روشی که در تصویر ۱۶ نشان داده شده است با یک لوپ، از میکروب‌های محیط کشت مخلوط میکروبی برداشته، به لوله آزمایش شماره یک منتقل کنید. در تصویر ۱۷ و ۱۸ به نحوه گرفتن لوله آزمایش و کار با لوپ توجه کنید.

۵- پس از به هم زدن محتویات لوله آزمایش حاوی میکروب، یک لوپ پر از آن را (لوله شماره ۱) به لوله آزمایش شماره دو منتقل کرده، به هم بزنید. احتیاط کنید هنگام به هم زدن محتویات لوله‌ها، محلول تا سر لوله بالا نیاید، سپس لوله آزمایش شماره یک را در داخل آب بشر قرار دهید.

۶- محتویات لوله آزمایش شماره ۲ را کاملاً به هم زده، یک لوپ پر از آن را بردارید و به لوله آزمایش شماره ۳ منتقل کنید. لوله شماره ۲ را در داخل آب بشر قرار دهید.

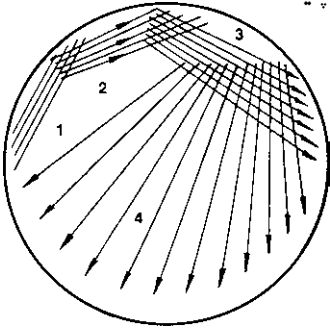
۷- محتویات لوله آزمایش شماره ۳ را به هم زده، سر لوله را روی شعله بگیرید، سپس محتویات آن را به داخل پلیت شماره ۳ بریزید.

۸- سر لوله‌های شماره ۱ و ۲ را نیز روی شعله گرفته، در داخل پلیت‌های مربوط خالی کنید.

۹- پس از این که محیط‌های کشت داخل پلیت‌ها کاملاً سفت شدند، آن‌ها را به مدت ۲۴ تا ۴۸

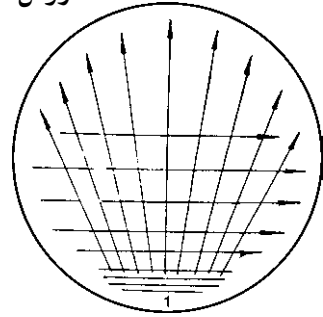
ساعت به‌طور وارونه در گرم‌خانه ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار دهید.

روش های مختلف کشت در سطح پلیت



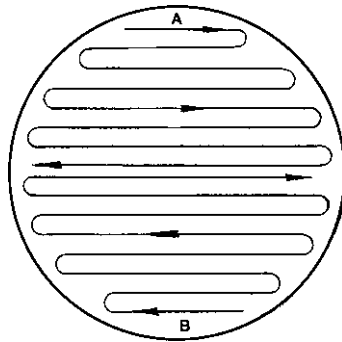
شکل ۹-۲- روش کشت یک چهارم

- ۱- یک لوپ پر از میکروب را در محدوده حاشیه یک کشت دهید. لوپ را داخل محیط کشت نکنید.
- ۲- لوپ را روی شعله بگیرید. ۵ ثانیه سرد کنید و سپس ۵ تا ۶ خط از ناحیه یک به ناحیه دو بکشید.
- ۳- لوپ را دوباره روی شعله بگیرید و ۶ تا ۷ خط به ناحیه سه بکشید.
- ۴- لوپ را دوباره روی شعله گرفته، تعدادی خط از ناحیه سه به ناحیه چهار بکشید.
- ۵- لوپ را روی شعله گرفته، در جای خود بگذارید.



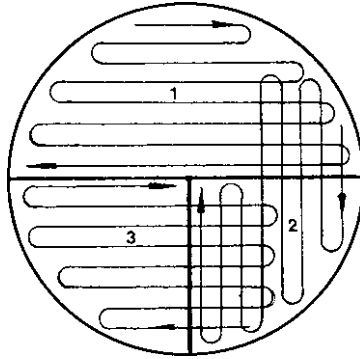
شکل ۸-۲- روش کشت شعاعی

- ۱- یک لوپ پر از میکروب را در ناحیه کوچکی نزدیک حاشیه کشت دهید (ناحیه ۱).
- ۲- لوپ را سوزانده، بگذارید به مدت ۵ ثانیه سرد شود.
- ۳- از ناحیه یک، تعداد ۷ تا ۸ خط مستقیم به طرف دیگر پلیت بکشید.
- ۴- لوپ را دوباره در جهت عرضی از نزدیک ناحیه یک بر روی محیط کشت بکشید.
- ۵- لوپ را سوزانده، در جای خود قرار دهید.



شکل ۱۰-۲- روش کشت ممتد

- ۱- یک لوپ پر از میکروب را از ناحیه A شروع کنید و تا مرکز یکبارگی گسترش دهید.
- ۲- پلیت را ۱۸۰ درجه دوران داده، بدون سوزاندن لوپ از ناحیه B به مرکز کشت دهید.
- ۳- لوپ را سوزانده در جای خود قرار دهید.

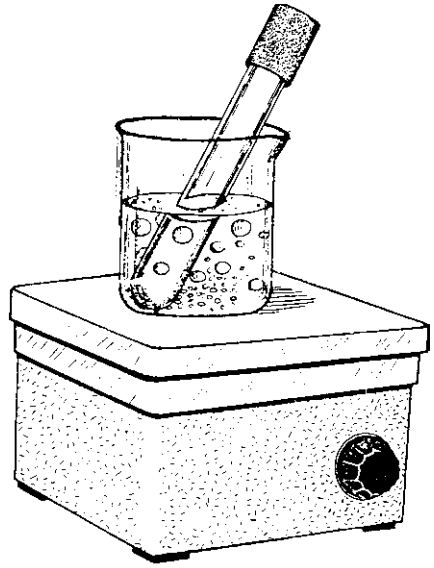


شکل ۱۱-۲- روش کشت T

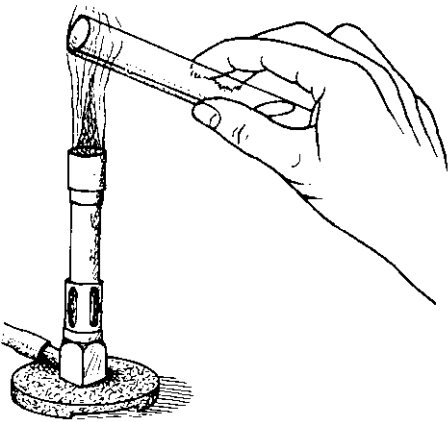
- ۱- با یک ماژیک از پشت پلیت آن را به نصف و یک چهارم علامت گذاری کنید.
- ۲- یک لوپ پر از میکروپ را از حاشیه پلیت به وسط آن کشت دهید.
- ۳- پس از سوزاندن لوپ از ناحیه یک به طور عرضی به ناحیه دو کشت دهید تا این ناحیه پر شود.
- ۴- پس از سوزاندن دوباره لوپ، از ناحیه دو به ناحیه سه کشت دهید.



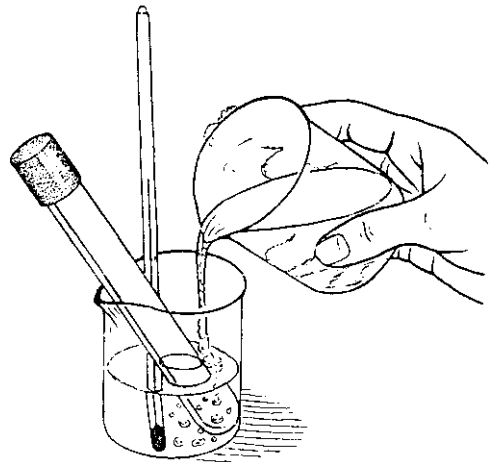
تصویر ۱- کشت میکروبی



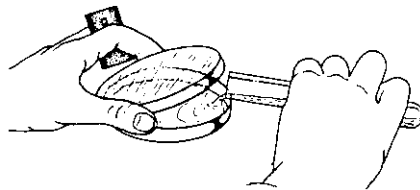
تصویر ۲- به مدت ۵ دقیقه نوترینت آگار را بجوشانید.



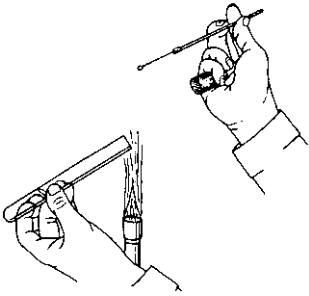
تصویر ۴- سر لوله آزمایش را روی شعله بگیرید.



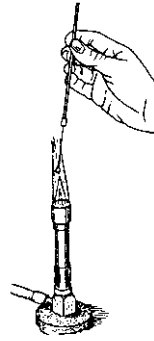
تصویر ۳- با افزودن آب سرد به آب جوش بشر آن را تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد سرد کنید.



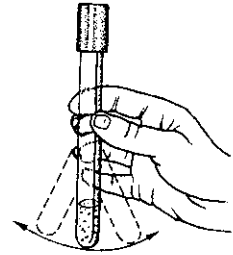
تصویر ۵- محتویات لوله را در داخل پلیت بریزید.



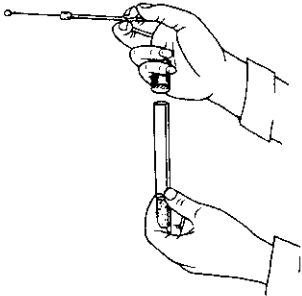
تصویر ۸- درپوش لوله را برداشته، سر لوله را روی شعله بگیرید. درپوش لوله را روی میز نگذارید.



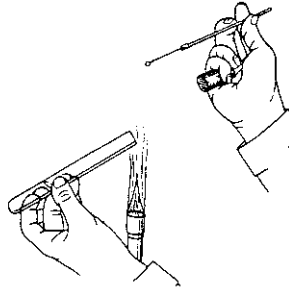
تصویر ۷- لوب را روی شعله بگیرید تا گداخته شود.



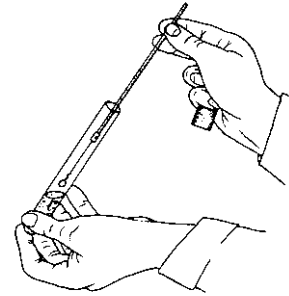
تصویر ۶- با تکان دادن به حالت پاندولی، محیط میکروبی را به هم بزنید. مواظب باشید سر لوله آلوده به میکروب نشود.



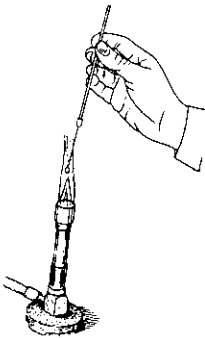
تصویر ۱۱- درپوش لوله را دوباره به سر لوله آزمایش بگذارید.



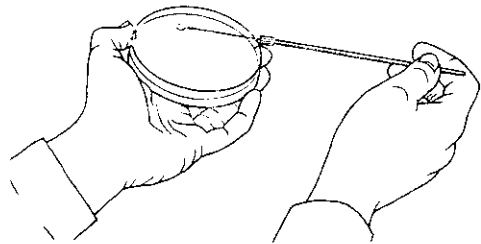
تصویر ۱۰- دهانه لوله حاوی محیط کشت را روی شعله بگیرید.



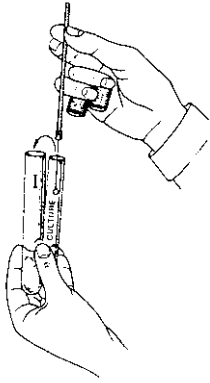
تصویر ۹- پس از سرد شدن لوب یک لوب از محلول میکروبی برداشت کنید. مواظب باشید دهانه لوله آلوده نشود.



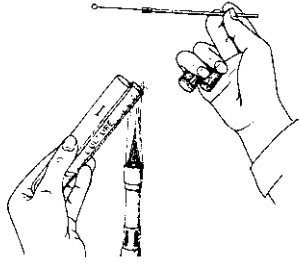
تصویر ۱۳- پس از اتمام کار، لوب را بسوزانید.



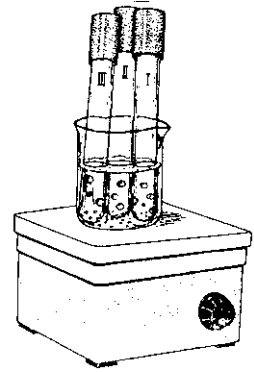
تصویر ۱۲- مطابق شکل پلیت را بگیرید و سطح آن را کشت دهید.



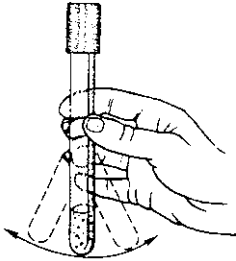
تصویر ۱۶- یک لوپ پر از محیط کشت لوله اول را به لوله دوم منتقل کنید.



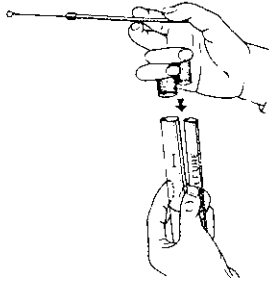
تصویر ۱۵- پس از به هم زدن محیط کشت، لوپ و سر لوله را روی شعله بگیرید.



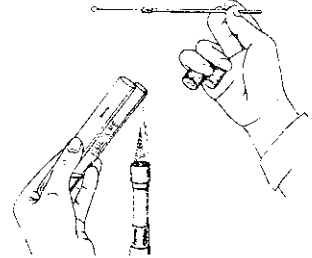
تصویر ۱۴- سه عدد محیط کشت نوترینت آگار ذوب کنید و دمای آن‌ها را به ۵۰ درجه برسانید.



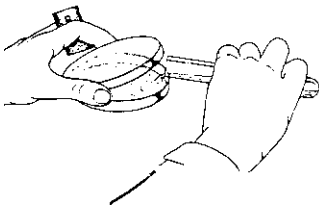
تصویر ۱۹- با به هم زدن لوله، بین دو انگشت، میکروب‌ها را به حالت معلق در آورید.



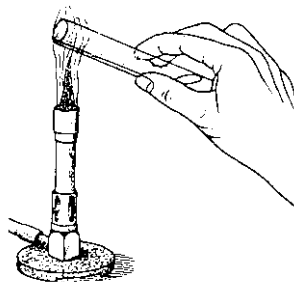
تصویر ۱۸- درپوش‌های لوله‌ها را در جای خود قرار دهید.



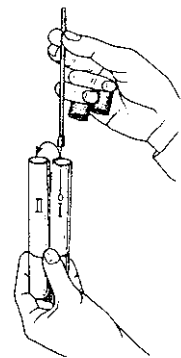
تصویر ۱۷- سر هر دو لوله را روی شعله بگیرید.



تصویر ۲۲- محتویات هر لوله کشت داده شده را به داخل یک پلیت بریزید.



تصویر ۲۱- پس از به هم زدن لوله ۲ و انتقال به یک لوپ از آن به لوله ۳، سر لوله‌ها را روی شعله بگیرید.



تصویر ۲۰- یک لوپ پر از لوله یک به لوله دو منتقل کرده، لوله دو را به داخل آب بشر برگردانید.