۱۸ــ۲ــ روش‌های رنگ‌آمیزی باکتری‌ها

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

۱ــ ۱۸ــ۲ــ روش رنگ‌آمیزی منفی[۳]: ساده‌ترین راه برای تهیه یک لام میکروبی، تهیه لام مرطوب است مثل آنچه که در مطالعه تک‌یاخته‌ها و الگ‌ها تهیه می‌شود. با این که این روش، روش سریعی‌ست، ممکن است پیدا کردن باکتری‌ها در زیر میکروسکوپ مخصوصاً برای فرد مبتدی مشکل باشد زیرا باکتری‌ها بی‌رنگ و شفاف هستند و تنظیم آن در زیر میکروسکوپ مشکل است. رنگ‌آمیزی منفی و یا رنگ‌آمیزی زمینه روش خوبی برای مشاهده باکتری‌هاست. در این روش، باکتری‌ها را در روی لام با رنگ نیگروزین و یا مرکب چین مخلوط کرده، گسترش می‌دهند. چون این دو رنگ، رنگ‌های واقعی باکتریایی نیستند، به جسم باکتری نفوذ نمی‌کنند، بلکه زمینه را رنگ می‌کنند و باکتری‌ها شفاف می‌مانند و در زمینه سیاه قابل رؤیت می‌گردند. با این که این روش‌ها ساده و محدود هستند، برای بررسی شکل ظاهری و اندازه باکتری‌ها قابل استفاده می‌باشند و چون در آن از حرارت استفاده نمی‌شود، تغییری در شکل سلول حادث نمی‌گردد و بهتر می‌توان اندازه باکتری‌ها را بررسی کرد. هم‌چنین برای مطالعه اسپیروکت‌هایی که با رنگ‌های معمولی به آسانی رنگ نمی‌گیرند، از این روش‌ها بهره می‌گیرند.

مواد و لوازم مورد نیاز:

لام‌های میکروسکوپی، میکروسکوپ

نیگروزین یا مرکب چین

لوپ، ماژیک و چراغ الکلی

محیط کشت حاوی استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس مگاتریوم

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

۱ــ Pleamorphism ۲ــ Palisade ۳ــ Negative staining

معلم شما، روش رنگ‌آمیزی را برایتان مشخص خواهد کرد.

۲ــ۱۸ــ۲ــ رنگ‌آمیزی ساده باکتری‌ها: استفاده از یک رنگ برای رنگ‌آمیزی باکتری‌ها را «رنگ‌آمیزی ساده» می‌گویند. بعضی از رنگ‌های معمول مثل متیلن بلو، فوشین بازی و کریستال ویوله برای این منظور به‌کار می‌روند. زیرا همه این‌ها دارای یون‌های ناقل (یونوفرها) هستند که بار مثبت دارند (کاتیون). چنین رنگ‌هایی را «رنگ‌های بازی» می‌گویند. متیلن بلو (متیلن$^{+}$ کلرور$^{-}$) از این گروه است. رنگ‌هایی که دارای کروموفرهای آنیونی هستند رنگ‌های اسیدی نامیده می‌شوند. مثل ائوزین (سدیم$^{+}$ ائوزینات$^{-}$).

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

برای تمرین روش رنگ‌آمیزی ساده، یک روش کورینه باکتریوم دیفتریه غیربیماری‌زا استفاده می‌شود. فرم بیماری‌زای آن بیماری دیفتری ایجاد می‌کند. یکی از مراحل تشخیص آن، رنگ‌آمیزی ساده است تا خصوصیات ظاهری آن که شامل پلئومرفیسم، دانه‌های متاکروماتیک و ترتیب قرارگیری به‌صورت نردبانی‌ست مشخص شود.

پلئومورفیسم، عبارت است از اشکال نامنظم : یعنی مشاهده اشکال مختلف. مثلاً کورینه باکتریوم دیفتریه که استوانه‌ای شکل است، ممکن است به شکل چماقی، شکل اسپرم، و یا شکل سوزنی دیده شود.

دانه‌های متاکروماتیک : در رنگ‌آمیزی کورینه باکتریوم‌ها یا متیلن بلو، در داخل سلول‌ها گرانول‌های قرمز ارغوانی دیده می‌شوند که به دانه‌های کروماتیک معروف‌اند. این دانه‌ها، مملو از ولوتین هستند. ولوتین یک پلی‌فسفات است. ترتیب قرارگیری به شکل موازی[۱] سلول‌های استوانه‌ای در اکثر کورینه باکتری‌ها به شکل موازی قرار می‌گیرند.

مواد و لوازم مورد نیاز برای رنگ‌آمیزی ساده:

محیط کشت حاوی سوش غیربیماری‌زای کورینه باکتریوم دیفتریه

متیلن بلو، ظرف شست‌و شو، کاغذ صافی

نحوه رنگ‌آمیزی: پس از تهیه نمونه میکروبی در روی لام و ثابت‌کردن آن با حرارت، سطح لام را با متیلن بلو بپوشانید و بگذارید یک دقیقه بماند. سپس رنگ لام را شسته، با کاغذ صافی آن را خشک کنید و با قراردادن یک قطره روغن ایمرسیون بر روی لام، آن را زیر میکروسکوپ مطالعه کنید و مشاهدات خود را در گزارش کار آزمایشگاهی خود رسم نمایید.

۱ــ Palisade arrangement

۳ــ ۱۸ــ۲ــ رنگ‌آمیزی کپسول: بعضی از باکتری‌ها، به‌وسیله یک لایه ژلاتین به نام، کپسول احاطه شده‌اند. جنس این کپسول، گلیکوپروتئینی یا پلی‌پپتیدی‌ست و در آب حل می‌شود. رنگ‌آمیزی کپسول باکتری، با روش‌های رنگ‌آمیزی ساده امکان‌پذیر نیست و اگر لام به روش‌های معمول تهیه شود و با حرارت تثبیت گردد، کپسول تخریب خواهد شد و چنانچه برای تثبیت کردن (فیکسه‌کردن) لام از حرارت استفاده نشود، باکتری‌ها به هنگام شست‌و شو از روی لام پاک خواهند شد، بنابراین برای رنگ‌آمیزی کپسول، ترکیبی از روش‌های رنگ‌آمیزی ساده و منفی به‌کار می‌برند. برای این منظور از کلبسیلاپنومونیه[1] که یک باسیل کپسول‌دار است لام تهیه کنید.

مواد و لوازم مورد نیاز:

محیط کشت ۲۴ تا ۴۸ ساعته کلبسیلاپنومونیه

مرکب سیاه، کریستال ویوله

نحوه رنگ‌آمیزی:

۱ــ یک لوپ پر از باکتری را در روی لام در یک قطره مرکب سیاه به هم بزنید.

۲ــ سوسپانسیون مرکب و باکتری را روی لام گسترش داده، در هوای آزاد خشک کنید.

۳ــ لام را به‌آرامی روی شعله بگیرید تا تثبیت شود.

۴ــ روی لام رنگ کریستال ویوله بریزید و بگذارید یک دقیقه بماند.

۵ــ لام را با آب به‌آرامی بشویید تا کریستال ویوله از روی آن شسته شود.

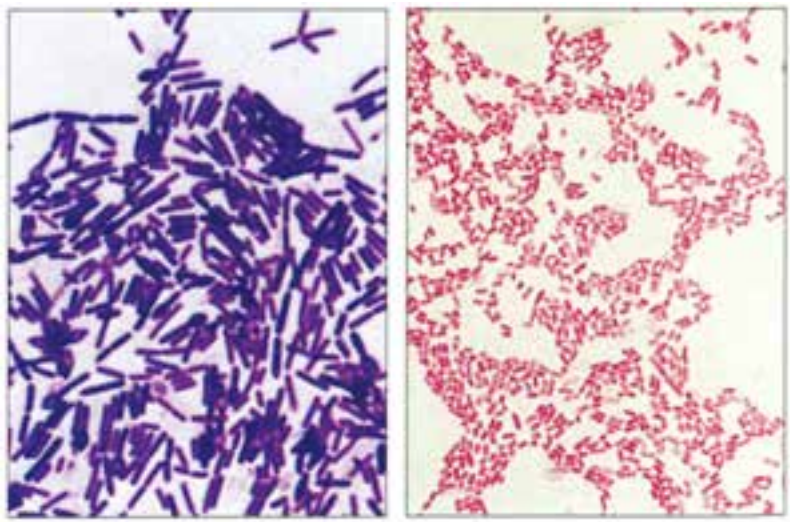
۶ــ با کاغذ صافی لام را خشک کرده، یک قطره روغن ایمرسیون روی آن بگذارید.

۷ــ با عدسی شیء ۱۰۰ میکروسکوپ آن را مطالعه کرده، مشاهدات خود را در گزارش کار خود رسم نمایید.

۴ــ ۱۸ــ۲ــ رنگ‌آمیزی گرم[2]: در سال ۱۸۸۴، کریستین گرم این روش رنگ‌آمیزی را ابداع کرد. با این روش رنگ‌آمیزی، باکتری‌ها به دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی تقسیم می‌شوند. این روش، بر پایه توانایی باکتری‌ها در نگهداری رنگ ارغوانی کریستال ویوله در طی رنگ‌زدایی با الکل، استوار است. باکتری‌های گرم منفی به‌وسیله الکل رنگ ارغوانی کریستال ویوله را از دست می‌دهند. باکتری‌های گرم مثبت این رنگ را از دست نمی‌دهند و ارغوانی می‌مانند. بعد از رنگ‌زدایی، سافرانین که یک رنگ قرمز زمینه است استفاده می‌شود تا باکتری‌های گرم منفی به رنگ صورتی درآیند. در رنگ‌آمیزی گرم، در مرحله اول کریستال ویوله باکتری‌های گرم مثبت و منفی را پس از ۲۰ ثانیه به رنگ ارغوانی درمی‌آورد، سپس رنگدانه ید (لوگل) به مدت یک دقیقه در روی

۱ــ Klebsiella pneumoniae ۲ــ Gram Staining

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



گرم منفی　　گرم مثبت

شکل ۱۳ــ۲

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

مواد و لوازم مورد نیاز:

لام تهیه شده از میکروب و تثبیت شده با حرارت

محلول‌های رنگ‌آمیزی

ظرف شست‌وشو، کاغذ صافی

نحوه رنگ‌آمیزی:

۱ــ روی لام تثبیت‌شده، رنگ کریستال ویوله بریزید و بگذارید ۲۰ ثانیه بماند.

۲ــ به‌آرامی لام را با آب شسته آب روی آن را خالی کنید.

۳ــ محلول ید را روی لام بریزید و بگذارید یک دقیقه بماند.

۴ــ لام را با آب شسته، الکل ۹۵٪ بریزید و بگذارید ۱۰ تا ۲۰ ثانیه بماند. این مرحله، مرحله حساسی‌ست.

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

۵ــ لام را با آب شسته، سافرانین بریزید و ۲۰ ثانیه صبر کنید.

۶ــ آن را با آب بشویید، سپس با کاغذ صافی خشک کنید.

۷ــ روی لام رنگ‌شده یک قطره روغن ایمرسیون گذاشته، در زیر میکروسکوپ مطالعه کنید.

مواد و لوازم مورد نیاز:

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

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

۱ــ Staphylococci aureus ۲ــ Pseudomonas aeroginose ۳ــ Moraxella Catarrhalis

۴ــ Bacillus megaterium ۵ــ Mycobacterium smegmatis

کار آزمایشگاهی یادداشت نمایید.

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

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

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

۵ــ ۱۸ــ۲ــ رنگ‌آمیزی اسپور: گونه‌های باکتریایی متعلق به جنس باسیلوس و کلستریدیوم، ساختمان‌های مقاوم در برابر حرارت، تولید می‌کنند که «اندوسپور» نامیده می‌شوند. این ساختمان‌های خاص، علاوه‌بر حرارت، در برابر بیشتر مواد شیمیایی که باکتری‌های بدون اسپور را به‌راحتی از بین می‌برند مقاوم هستند. این مقاومت به حرارت و مواد شیمیایی، در وهله اول، به ضخیم‌بودن پوست اسپور مربوط است. در رنگ‌آمیزی گرم، اسپورها رنگ نمی‌گیرند. تنها هنگامی که حرارت مناسبی به جسم باکتری داده شود، رنگ خواهد توانست به اسپور نفوذ کند و پس از نفوذ، با معرف‌های رنگ‌زدا و یا آب از بین نمی‌رود.

روش‌های زیادی برای نفوذ رنگ تحت حرارت به کار می‌رود. ولی باکتری‌شناسان دو روش شفر ــ فولتون[1] و دورنر[2] را بیشتر از هر روشی، به‌کار می‌برند.

۱۹ــ۲ــ طرز ساخت معرف‌های مختلف رنگ برای رنگ‌آمیزی

محلول کریستال ویوله:

محلول الف : ۲ میلی‌گرم کریستال ویوله (دارای ۸۵٪ رنگ) را در ۲۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ حل کنید.

محلول ب : ۰/۸ میلی‌گرم اگزالات آمونیوم را در ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید. محلول A و B را با هم مخلوط کنید.

ید گرم (لوگل): ۲ میلی‌گرم یدور پتاسیم را در ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده، ۱ میلی‌گرم کریستال ید به آن اضافه کنید.

سافرانین (برای رنگ‌آمیزی گرم) :

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

۱ــ Schaeffer - Fulton ۲ــ Dorner

آب مقطر ۱۰۰ میلی‌لیتر

رنگ فلاژل لیفسون:

محلول الف : ۰/۹ میلی‌گرم استات پاراروزآنیلین و ۰/۳ میلی‌گرم هیدروکلرور پاراروزآنیلین را در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول حل کنید. بگذارید یک شب در دمای اتاق بماند تا کاملاً حل شود.

محلول ب : ۳ میلی‌گرم اسید تانیک را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید.

محلول ت : ۱/۵ میلی گرم کلرور سدیم را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید.

حجم مساوی از محلول‌های الف و ب و ت را با هم مخلوط کرده، بگذارید ۲ ساعت بماند. سپس، آن را در یک شیشه در سمباده‌ای ریخته، حدود ۲ ماه در یخچال نگهداری کنید در صورت ایجاد رسوب آن را دور بریزید. از صاف‌کردن و فریزکردن آن پرهیز کنید.

محلول نیگروزین (محلول دورنر):

نیگروزین حل‌شدنی در آب ۱۰ میلی‌گرم

آب مقطر ۱۰۰ میلی‌لیتر

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

۲۰ــ۲ــ شمارش باکتری‌ها[۱]

در بیشتر مطالعات باکتری‌شناسی، لازم است تعداد میکروب‌های موجود در واحد حجم شمارش شوند. روش‌های زیادی برای شمارش آن‌ها وجود دارد. یکی از روش‌های پرکاربرد، تهیه رقت از میکروب‌ها و مشاهده آن‌ها با میکروسکوپ در روی لام است. آزمایش مستقیم نمونه‌های شیر با این روش، بسیار سریع انجام می‌شود و نتایج آن کاملاً مورد اعتماد است.

روش مشابه دیگر، روش پتروف‌هازر[۲] است که در آن، از یک شمارش‌گر مکانیکی استفاده می‌شود.

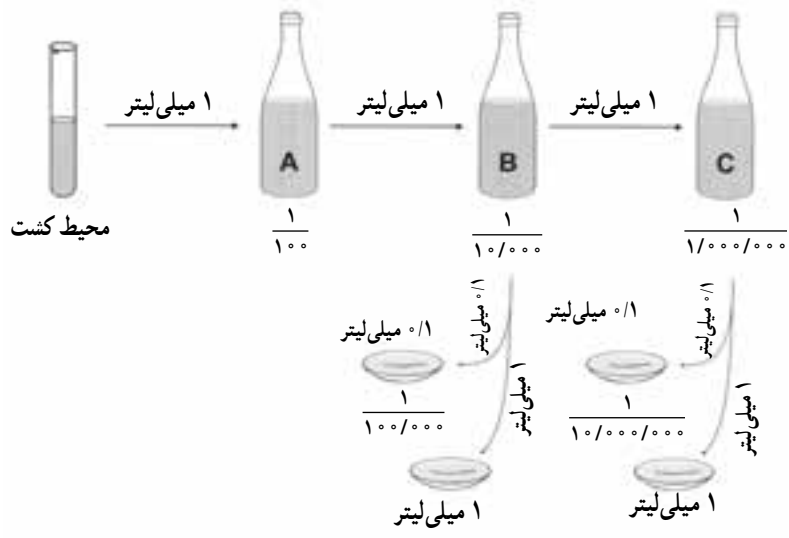
باکتری‌های تولیدکننده گاز را می‌توان به تعدادی از لوله‌های آزمایش حاوی لاکتوزبراث تلقیح نمود و از روی جدول خاص آماری تعداد باکتری‌های موجود در آن را مشخص کرد. این روش، برای شمارش کلی فرم‌ها در نمونه‌های آب انجام می‌شود، ضمن این که بسیار ساده است، اما محدود به آزمایش آب، شیر و مواد غذایی‌ست.

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

۱ــBacterial population counts ۲ــ Petrof Hauser ۳ــ Standard Plate Count (SPC)

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

۱ــ۲۰ــ۲ــ روش پلیت کمی (شمارش با پلیت استاندارد): در تعیین تعداد میکروب‌های موجود در آب، شیر و مواد غذایی، شمارش با پلیت استاندارد در همه جای عالم به‌کار می‌رود. انجام این روش نسبتاً آسان است و نتایج خوبی به‌دست می‌آید. هم‌چنین، از این روش پایه می‌توان برای محاسبه تعداد میکروب‌های محیط کشت، باکتریایی سود جست. روش آزمایش، شامل تهیه رقت از میکروب‌ها در آب مقطر به‌صورت گروهی‌ست که در شکل ۱۴ــ۲ نشان داده شده است.



شکل ۱۴ــ۲ــ روش شمارش کمی با پلیت

برای این آزمایش، تنها سه شیشه نیاز است. اما اگر لازم باشد، باید از شیشه‌های بیشتری استفاده شود. با استفاده از روش رقت، رقت نهایی $\frac{۱}{۱/۰۰۰/۰۰۰}$ در شیشه C حاصل می‌شود. از شیشه B و C به پلیت‌های خالی انتقال داده می‌شود. نوترینت آگار خنک‌شده ۵۰ درجه سانتی‌گراد به پلیت‌ها ریخته می‌شود. پس از این که نوترینت آگار سفت شد، ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری می‌شود و سپس آزمایش می‌شود. پلیتی که ۳۰ تا ۳۰۰ پرگنه داشته باشد، برای شمارش انتخاب می‌گردد. با شمارش آن، محاسبه تعداد میکروب‌ها در هر میلی‌لیتر محیط کشت اولیه، امکان‌پذیر است. باید توجه داشت که لازم است از هر رقت دو پلیت تهیه گردد و در شمارش، از تعداد آن‌ها میانگین گرفته شود.

۲ــ۲۰ــ۲ــ استفاده از پیپت: موفقیت در این آزمایش، به روش پیپت‌کردن صحیح بستگی دارد. در گذشته، محلول میکروبی را با دهان به داخل پیپت می‌کشیدند ولی به لحاظ خطر آشکار آن، امروزه برای این منظور از مکنده‌های دستی استفاده می‌کنند. معلم شما، روش استفاده از آن را به شما یاد خواهد داد.

اگر برای اولین بار است که از پیپت استریل استفاده می‌کنید به نکات زیر توجه کنید :

● وقتی می‌خواهید یک پیپت از جاپیپتی درآورید این کار را طوری انجام دهید که انگشتان شما، انتهای پیپت‌های دیگر را آلوده نکنند. با تکان‌دادن جاپیپتی، یک پیپت از بقیه جدا شده، بیشتر بیرون می‌آید.

● پس از برداشتن پیپت، درپوش جاپیپتی را بگذارید تا بقیه پیپت‌ها استریل بمانند.

● بدنه پیپت را با انگشتتان نگیرید و قبل و بعد از استفاده، آن را روی میز نگذارید و در طی کاربرد آن، استریل نگه دارید و روی میز و یا خودتان را با آن آلوده نکنید.

● برای کشیدن محلول به پیپت، همیشه از یک مکنده مکانیکی استفاده کنید.

● اگر سه عدد پیپت نیاز است، آن‌ها را یکی یکی از جاپیپتی درآورید.

● وقتی کارتان با پیپت تمام شد آن را در داخل ظرف حاوی مایع ضدعفونی‌کننده قرار دهید. در انتهای کار، پیپت‌های قابل شست‌وشو را شسته، استریل کنید و پیپت‌های یک بار مصرف را دور بریزید.

روش تهیه رقت:

مواد و وسایل لازم برای هر چهار دانش‌آموز:

یک عدد شیشه (۴۰ میلی‌لیتری) محیط کشت براث اشرشیاکلی برای هر دانش‌آموز

یک عدد شیشه (۸۰ میلی‌لیتری) نوترینت آگار

چهار عدد پلیت

پیپت‌های ۱/۱ میلی‌لیتری

سه شیشه شست‌وشوشده استریل ۹۹ میلی‌لیتری

ظرف مناسب برای پیپت‌های دورانداختنی

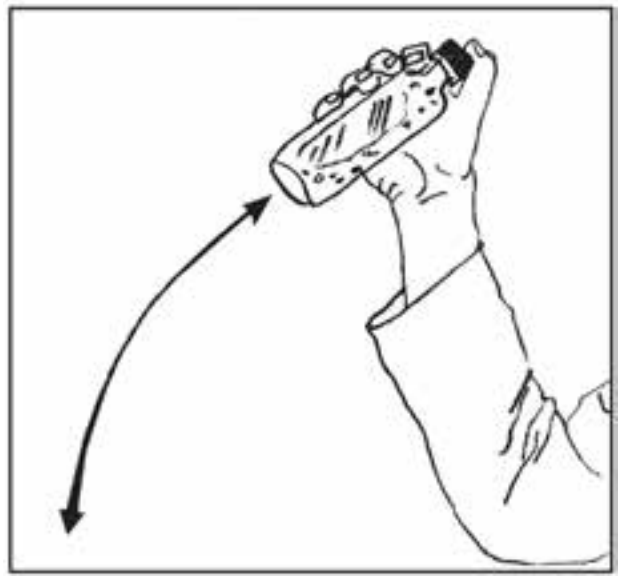
نحوه کار:

۱ــ نوترینت آگار موجود در یک شیشه را ذوب کنید. سه شیشه استریل ۹۹ میلی‌لیتری بردارید و روی آن‌ها را با حروف A، B و C علامت‌گذاری نمایید. هم‌چنین پشت چهار عدد پلیت به ترتیب $\frac{۱}{۱۰/۰۰۰}$، $\frac{۱}{۱۰۰/۰۰۰}$، $\frac{۱}{۱/۰۰۰/۰۰۰}$ و $\frac{۱}{۱۰/۰۰۰/۰۰۰}$ بنویسید. به‌علاوه، میزان حجم

سوسپانسیون باکتری را که پلیت ریخته می‌شود در پشت پلیت یادداشت کنید. (۰/۱ میلی‌لیتر و یا ۱ میلی‌لیتر).

۲ــ محیط کشت اشرشیاکلی را به هم بزنید و با یک پیپت ۱/۱ میلی‌لیتری، یک میلی‌لیتر از آن را به شیشه A منتقل کنید. سپس پیپت استفاده شده را در ظرف حاوی ماده ضدعفونی‌کننده قرار دهید.

۳ــ شیشه A را مطابق شکل ۱۵ــ۲، در عرض ۷ ثانیه ۲۵ بار به هم بزنید. به هم‌زدن شدید نه‌تنها کدورت خوبی تولید می‌کند بلکه باعث بازشدن توده‌های باکتری می‌شود.



شکل ۱۵ــ۲ــ نحوه بهم‌زدن استاندارد محلول با استفاده از آرنج ثابت شده در روی میز

۴ــ با یک پیپت ۱/۱ میلی‌لیتری، یک میلی‌لیتر از محتویات شیشه A را به شیشه B منتقل کنید.

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

۶ــ با یک پیپت استریل دیگر، ۰/۱ میلی‌لیتر از محتویات شیشه B را به پلیت $\frac{۱}{۱۰۰/۰۰۰}$ منتقل کنید و یک میلی‌لیتر به پلیت $\frac{۱}{۱۰/۰۰۰}$ بریزید. با همان پیپت یک میلی‌لیتر نیز به شیشه C بریزید.

۷ــ شیشه C را ۲۵ بار به هم بزنید.

۸ــ با یک پیپت استریل دیگر، از محتویات شیشه C، ۰/۱ میلی‌لیتر برداشته، به پلیت $\frac{۱}{۱۰/۰۰۰/۰۰۰}$ و یک میلی‌لیتر به پلیت $\frac{۱}{۱/۰۰۰/۰۰۰}$ بریزید.

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

۱۰ــ یک چهارم نوترینت آگار (۲۰ میلی‌لیتر) را به هر پلیت بریزید و به‌آرامی محتویات پلیت‌ها را به هم بزنید. این مرحله، مرحله حساسی‌ست زیرا به هم‌زدن کم، مانع از پخش کامل میکروب‌ها می‌شود و به‌هم‌زدن زیاد، موجب می‌گردد محیط کشت از لبه‌های پلیت بیرون بریزد.

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

شمارش و محاسبه

مواد و وسایل لازم:

۴ عدد پلیت، شمارش‌گر پرگنه، شمارش‌گر دستی

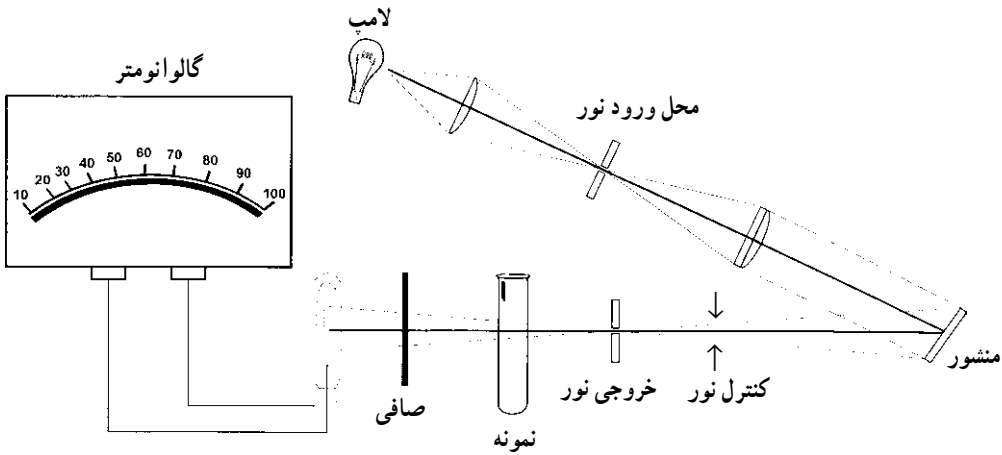
۱ــ پلیت‌ها را به ترتیب رقت روی میز بگذارید و با هم مقایسه کنید. پلیت‌هایی را که تعداد پرگنه‌های آن‌ها بین ۳۰ تا ۳۰۰ عدد است برای شمارش انتخاب کنید. پلیت‌هایی که تعداد پرگنه‌های آن‌ها بیش از ۳۰۰ عدد و یا کمتر از ۳۰ عدد است از نظر آماری مناسب نیستند.

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

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

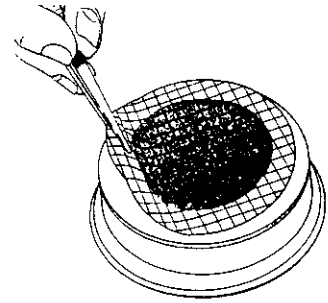
مثال: اگر تعداد پرگنه‌های شمارش‌شده در پلیت حاوی یک میلی‌لیتر از رقت $\frac{۱}{۱/۰۰۰/۰۰۰}$ برابر ۲۲۰ عدد باشد، تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر برابر خواهد بود با $۲/۲\times۱۰^{۸}=۲۲۰\times۱/۰۰۰/۰۰۰$

اگر ۲۲۰ عدد پرگنه در پلیتی که ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت $\frac{۱}{۱/۰۰۰/۰۰۰}$ شمرده شود، نتیجه به‌دست‌آمده از محاسبه بالا، باید در ۱۰ نیز ضرب شود تا تعداد باکتری در ۰/۱ میلی‌لیتر به یک میلی‌لیتر تبدیل شود ($۲/۲\times۱۰^{۹}$). اگر تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر ۲۲۷۰۰۰۰۰۰ عدد باشد آن را ۲۳۰۰۰۰۰۰۰ عدد و یا $۲/۳\times۱۰^{۸}$ عدد ثبت کنید.

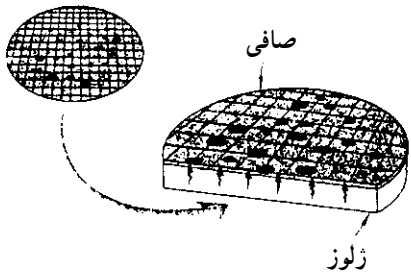


شکل ۱۶ــ۲ــ شماتیک اسپکتروفتومتر

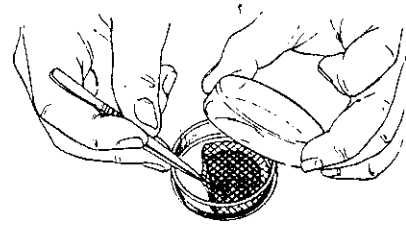
۳ــ۲۰ــ۲ــ شمارش باکتری‌ها به کمک کاغذ صافی: کاغذهای صافی مخصوص میکروب‌شناسی در صنعت ساخته شده‌اند که به دلیل داشتن منافذ بسیار ریز، میکروب‌ها را در خود نگه می‌دارند. از این کاغذ صافی‌ها برای سترون کردن مایعات و محلول‌های مختلف حساس به حرارت استفاده می‌شود. برخی از کارخانه‌های سازنده وسایل آزمایشگاهی نوعی از این کاغذها با قیف‌های مخصوصی که در برابر حرارت مقاوم‌اند و قابل سترون‌شدن هستند برای شمارش و جستجوی باکتری‌ها در آب و فرآورده‌های دارویی ساخته‌اند و حتی بعضی از سازندگان، ظروف پتری مخصوصی را که قطر آن‌ها متناسب با کاغذهای صافی است و محیط‌های کشت آماده در آمپول‌های کوچک برای یک بار کشت و حتی گرم‌خانه‌های کوچک که با برق اتومبیل و یا با باتری کار می‌کنند برای عملیات صحرایی تهیه و عرضه کرده‌اند از این صافی‌ها برای جستجو و شمارش میکروب‌ها در آب آشامیدنی و دیگر آشامیدنی‌هایی که تعداد باکتری‌های آن‌ها کم است و لازم است که حجم زیادی از نمونه برای شمارش و جستجوی باکتری به‌کار رود استفاده می‌شود، به این ترتیب که مقدار کافی مثلاً یک لیتر آب و یا نمونه مایع، از صافی عبور داده می‌شود تا کلیه باکتری‌های موجود در آن حجم در منافذ کاغذ به دام بیفتند. سپس کاغذ صافی روی محیط کشت جامد قرار داده می‌شود، در صورت لزوم ممکن است روی آن نیز با یک لایه نازک از محیط کشت مذاب که حرارت آن کمتر از ۴۵ درجه سانتی‌گراد است پوشانده شود. سپس این ظرف، در گرم‌خانه گذارده شده پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تعداد پرگنه‌های مورد نظر شمارش می‌شود.



۱ــ برداشتن صافی از روی دستگاه صاف‌کننده



۳ــ انتشار مایع به طرف صافی



۲ــ گذاشتن صافی روی تشتک ژلوزدار

شکل ۱۷ــ۲ــ نمایش شمارش میکروارگانیسم‌ها به کمک صافی

اگر منظور فقط جستجوی یک نوع میکروب، مثلاً سالمونلا در یک آشامیدنی مانند آب یا شربتی دیگر باشد می‌توان حجم مناسبی از نمونه را از کاغذ صافی گذراند، سپس کاغذ صافی را در محیط کشت مایع قرار داد و پس از گرم‌خانه‌گذاری، از آن محیط برای جستجو و تشخیص میکروب مورد نظر استفاده نمود. از این روش در کارخانه‌های داروسازی برای کنترل سترونی محلول‌های دارویی مانند محلول‌های تزریقی استفاده می‌شود. هم‌چنین این روش، در بهداشت محیط و کنترل آب و فاضلاب و بررسی‌های همه‌گیرشناسی، بسیار ارزشمند می‌باشد.

شکل۱۸ــ۲ــ نمونه‌ای از صافی مدرج جهت شمارش میکروارگانیسم‌ها

۴ــ۲۰ــ۲ــ روش شمارش مستقیم: از این روش به دلیل سرعت زیاد، می‌توان در موارد فوری مانند تحویل‌گرفتن شیر و یا موارد فوری دیگر استفاده نمود. البته دقت این روش به مراتب از روش قبلی کمتر است. در روش شمارش مستقیم، می‌توان از لام‌های مخصوص نئوبار[۱] و یا لام توما[۲] که معمولاً برای شمارش گلبول‌های خون به‌کار می‌رود استفاده نمود. بدین ترتیب که نمونه مورد آزمایش به نسبت‌های معینی با آب مقطر و یا سرم فیزیولوژی و یا هر رقیق‌کننده مناسب دیگر، رقیق می‌شود. (برای بهتردیدن میکروارگانیسم‌ها، مواد رنگی مانند آبی متیلن و یا ویوله ژانینی و یا رنگ دیگری به مایع رقیق‌کننده افزوده می‌شود) سپس از محلول تهیه شده، روی لام توما ریخته و یک لامل سنگینی روی آن قرار می‌دهند. پس از چند دقیقه با عدسی ۴۰ میکروسکوپ میکروارگانیسم‌ها در حجم معینی (سانتی‌مترمکعب) شمارش می‌شوند.

خودآزمایی

۱ــ تفاوت‌های استافیلوکوک‌ها و کوکسی‌ها را توضیح دهید.

۲ــ واژه‌های زیر را تعریف کنید.

اسپریل، پروتوپلاست، مرحله رشد لگاریتمی، باکتری‌های مزوفیل، فتواتوتروف.

۳ــ تمام یون‌های فلزی مورد نیاز را می‌توان به شکل ... به‌عنوان غذا در اختیار میکروارگانیسم‌ها قرار داد.

۴ــ تقسیم دوتایی باکتری‌ها را توضیح دهید.

۵ــ مراحل مختلف اسپور در باکتری‌ها را شرح دهید. (به‌طور مختصر)

۶ــ نحوه انتقال بیماری سی ــآرــ دی چگونه است؟

۷ــ علائم بیماری سل در دام‌ها را نام ببرید.

۸ــ تشعشعات یونیزه‌کننده را نام ببرید.

۹ــ محیط‌های کشت نیمه جامد را شرح دهید.

۱ــ Neubar ۲ــ Thoma