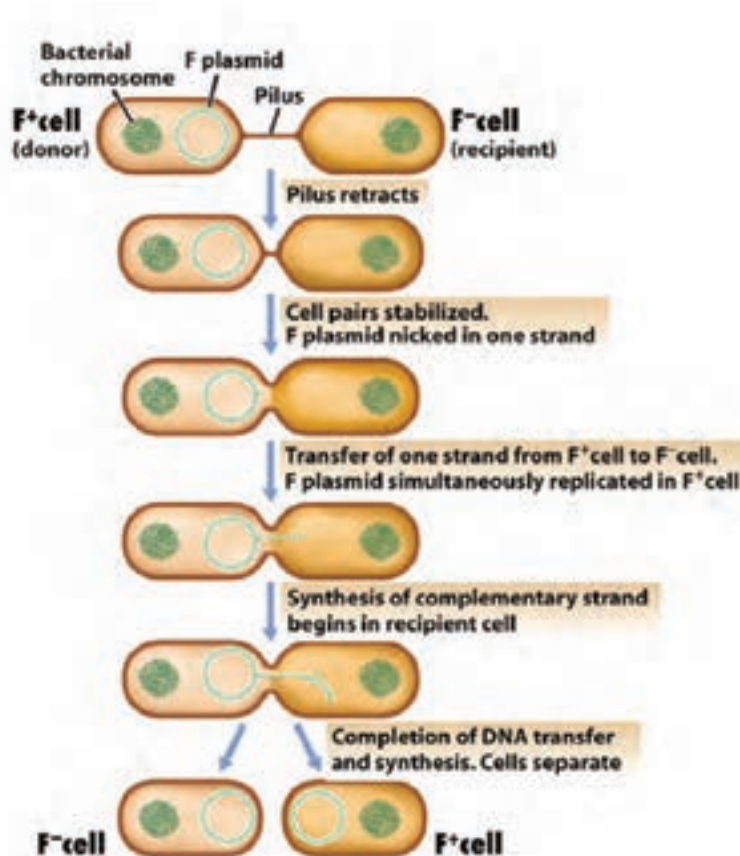


تولید مثل در باکتری‌ها

تولید مثل به دو صورت غیرجنسی شامل جوانه زدن، قطعه قطعه شدن و تقسیم دوتایی و جنسی (آمیختگی)^۱ صورت می‌گیرد. آمیختگی یا الحاق نوع ویژه‌ای از دریافت ماده ژنتیکی است. مواد ژنتیکی به چند طریق شامل الحاق، دگرگونی یا انتقال بی واسطه^۲، و انتقال با واسطه^۳ بین باکتری‌ها منتشر می‌شوند. در همه مکانیسم‌های انتقال، یک یاخته دهنده^۴ وجود دارد که بخشی از ماده وراثتی (DNA) خود را به یاخته گیرنده^۵ می‌دهد. معمولاً پس از انتقال این بخش از DNA یاخته دهنده جزوی از یاخته گیرنده می‌شود و بقیه آن به وسیله آنزیم‌های درون یاخته‌ای تجزیه می‌گردند. انتقال مواد ژنتیکی در باکتری‌ها پدیده متداولی نیست و تنها ممکن است در میان یک درصد کل جمعیت باکتری رخ دهد.

پدیده الحاق: این پدیده پیچیده‌ترین و در عین حال مهم‌ترین روش انتقال ژن در باکتری‌ها محسوب می‌شود و مطالعه آن عمدتاً با استفاده از باکتری اشرشیاکلی صورت می‌گیرد (شکل ۲۵-۲). این عمل با واسطه پلاسمید، که قطعه DNA کوچک و حلقوی است و مستقل از کروموزوم یاخته‌ای تکثیر می‌یابد، انجام می‌شود. ژن‌های موجود در پلاسمید غالباً برای رشد یاخته حیاتی و اساسی نیستند. در واقع این پلاسمید حاوی ژن‌های سنتز کننده مژک‌های جنسی است که مسئول تماس و اتصال یاخته‌های دهنده و گیرنده و انتقال پلاسمید هستند.



شکل ۲۵-۲. مراحل پدیده الحاق در باکتری اشرشیاکلی

در این روش اطلاعات ژنتیکی از طریق تماس مستقیم از یاخته‌ای به یاخته دیگر انتقال می‌یابد یاخته دهنده یا نر دارای توانایی ایجاد مژک جنسی یا F را یاخته F مثبت، و یاخته گیرنده یا ماده فاقد آن را یاخته F منفی می‌نامند. مژک F به صورت یک عضو لوله مانند برای انتقال یک طرفه DNA از یاخته دهنده به گیرنده عمل می‌کند و با انقباض خود موجب نزدیک شدن دو یاخته به هم می‌شود. در این روش DNA پلاسمیدی به تنهایی یا به همراه DNA کروموزومی منتقل می‌شود. در برخی از یاخته‌های F مثبت، عامل F، ضمن شکسته شدن، به کروموزوم یاخته‌ای وارد می‌شود. در این حالت یاخته را HFr^۶ می‌گویند. به هنگام الحاق یاخته HFr به یاخته F منفی، کروموزوم یاخته HFr حاوی عامل F خرد می‌شود، همانندسازی می‌کند و تکثیر می‌یابد. در نتیجه نسخه جدیدی از این کروموزوم یا بخشی از آن به یاخته گیرنده منتقل می‌شود. در اثر این عمل، یاخته گیرنده F منفی می‌تواند صاحب ژن‌های جدیدی شود.

۱- Conjugation

۲- Transformation

۳- Transduction

۴- Donor

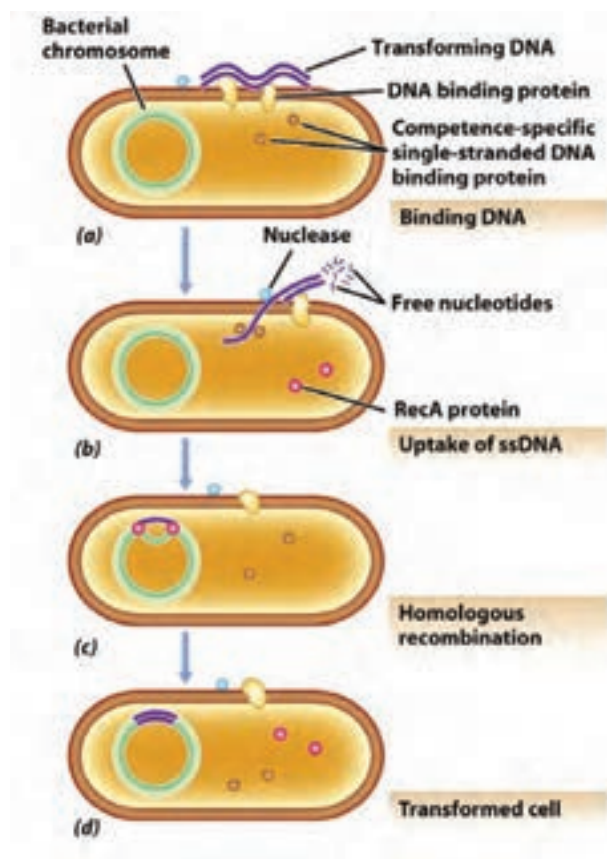
۵- Recipient

۶- High frequency

ژن‌ها طی فرآیند انتقال بی واسطه، به صورت DNA برهنه به باکتری دیگر منتقل می‌شوند (شکل ۲۶-۲). این پدیده نخستین بار در سال ۱۹۲۸ توسط فردریک گریفیث و هنگام مطالعه بر روی باکتری/ستریوکوکوس نومونیا بدون درک دقیق مکانیسم آن نشان داده شد. این باکتری دارای دو نوع کپسول دار و بدون کپسول است که تنها نوع کپسول دار آن بیماری‌زاست. این دانشمند درصدد ایمن سازی موش علیه این بیماری با استفاده از تزریق محلول حاوی پنوموکوک بیماری‌زای کشته شده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد بود. او در حین انجام آزمایش‌های خود متوجه شد که موش تزریق شده با این نوع باکتری کشته شده، به بیماری مبتلا نمی‌شود ولی هنگامی که این باکتری‌های کشته شده با نوع غیر بیماری‌زای زنده، مخلوط و سپس تزریق شوند، موش‌ها به بیماری مبتلا می‌شوند. در این حالت، در خون موش‌هایی که در اثر بیماری مرده‌اند می‌توان باکتری‌های کپسول‌دار را یافت. وی از این آزمایش نتیجه گرفت که مواد وراثتی از باکتری‌های بیماری‌زا وارد یاخته‌های زنده شده و آن‌ها را از نظر ژنتیکی به گونه‌ای تغییر داده‌اند که به نوع کپسول‌دار تبدیل شده‌اند.

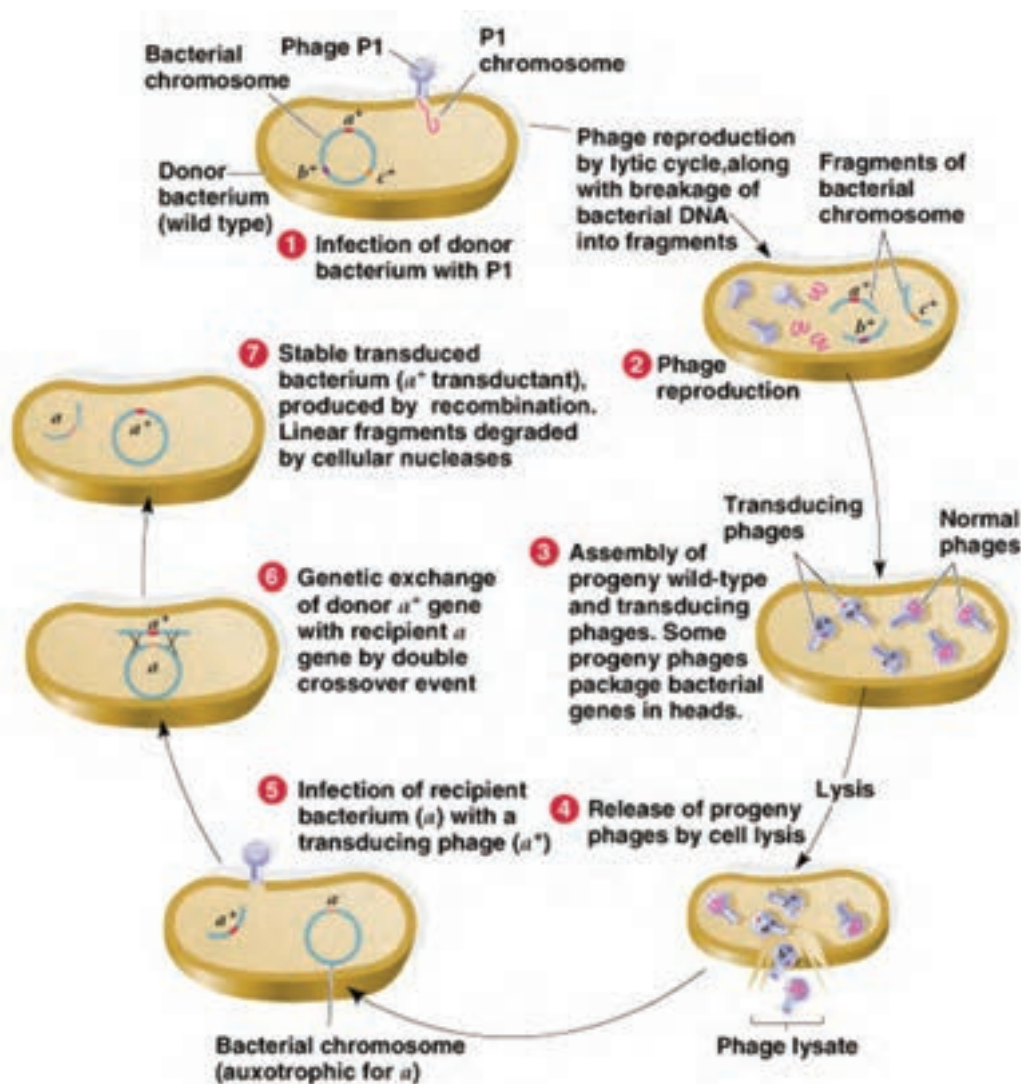
در طبیعت برخی از باکتری‌ها احتمالاً پس از متلاشی شدن، DNA خود را در محیط، آزاد می‌کنند. بخش‌هایی از این DNA می‌تواند به وسیله باکتری‌های دیگر که در شرایط فیزیولوژیکی مستعد^۱ دریافت و پذیرش DNA یاخته دهنده باشند جذب شوند و در آن‌ها صفت یا صفات جدیدی را ایجاد کنند. یاخته دریافت‌کننده این ژن‌ها نوعی یاخته نو ترکیب^۲ است. این نوع دگرگونی یاخته‌ای در طبیعت تنها در میان انواع محدودی از باکتری‌ها دیده می‌شود. انتقال مواد ژنتیکی از طریق الحاق با انتقال از راه دگرگونی دو تفاوت اساسی دارد. یکی آن که الحاق به تماس مستقیم بین یاخته دهنده و گیرنده نیاز دارد. دیگر آن که یاخته‌های جفت شده در الحاق باید از دو نوع قابل جفت شدن باهم با واسطهٔ مژک‌های سطحی باشند، یعنی یاخته‌های دهنده باید دارای پلاسمید و یاخته‌های گیرنده فاقد آن باشند.

سومین مکانیسم انتقال مواد ژنتیکی در بین باکتری‌ها، از طریق فرآیند انتقال با واسطه است. در این فرآیند DNA برهنه از



شکل ۲۶-۲ مراحل پدیده دگرگونی در باکتری اشرشیاکلی

یاخته‌ای به یاخته دیگر منتقل نمی‌شود بلکه به وسیله ویروس‌هایی به نام باکتریوفاژ^۱ یا فاژ از یاخته‌های دهنده به یاخته‌های گیرنده می‌رود (شکل ۲۷-۲). در این فرآیند، ویروس به دیواره یاخته میزبان متصل می‌شود و DNA خود را به درون آن تزریق می‌کند. به هنگام همانندسازی DNA میزبان و DNA ویروس، کروموزوم باکتری شکسته می‌شود و بخشی از آن در داخل غلاف پروتئینی ویروس جای می‌گیرد. در این صورت فاژ حاصله حاوی بخشی از DNA باکتری است. هنگامی که این فاژها باکتری‌های جدید را آلوده می‌کنند بخشی از DNA باکتری قبلی را به باکتری‌های جدید منتقل می‌سازند. در این انتقال هر بخشی از DNA باکتری اول و یا هر ژنی از باکتری دهنده می‌تواند به باکتری دوم یا باکتری گیرنده منتقل شود، لذا این نوع انتقال را عمومی^۲ می‌گویند. در انتقال اختصاصی^۳ DNA ناحیه خاصی از کروموزوم میزبان به‌طور مستقیم وارد ژنوم ویروس می‌شود و جای‌گزین بخشی از ژنوم ویروس می‌گردد.



شکل ۲۷-۲ مراحل پدیده انتقال عمومی در باکتری اشرشیاکلی

بیماری‌های مهم باکتریایی

بیماری مزمن تنفسی طیور

بیماری مزمن تنفسی^۱ طیور یا مایکوپلاسموز^۲ که در بوقلمون‌ها با نام سینوزیت عفونی شناخته شده است توسط گونه‌های باکتری مایکوپلازما ایجاد می‌شود. مایکوپلازماها کوچک‌ترین میکروارگانیسم‌های هسته‌دار دارای DNA، بدون دیواره سلولی و با توانایی رشد روی محیط‌های مصنوعی غنی شده هستند. این باکتری اغلب میزبان‌های محدودی دارد. چندین گونه از مایکوپلازماهای پرندگان شناسایی شده‌اند. اما چهار گونه آن در پرندگان اهلی بیماری ایجاد می‌کنند. عامل بیماری تنفسی در ماکیان مایکوپلازما گالی‌سپتیکم^۳ است که در اثر تماس مستقیم، پرندگان حامل، یا به وسیله تخم منتقل می‌شوند؛ به این ترتیب که عفونت ناحیه فالوس^۴ در جنس نر به آلوده شدن منی و سپس مجرای تخم پرندۀ ماده منجر می‌شود. زیان‌های اقتصادی چون کاهش کیفیت لاشه، کاهش مصرف دان، کاهش کیفیت و میزان تولید تخم مرغ و افزایش هزینه‌های درمانی از عواملی هستند که بیماری فوق را به یکی از پرهزینه‌ترین مشکلات پیش روی صنعت تولید طیور در سراسر دنیا تبدیل کرده‌اند.

نخستین بار تشخیص دقیق این بیماری در بوقلمون‌ها، در سال ۱۹۰۵ میلادی توسط دود^۵ در انگلستان صورت گرفت. وی بیماری فوق را Epizootic Pneumoenteritis نامید. در سال ۱۹۳۵ میلادی، نلسون^۶ اجسام کوکوباسیلی شکل مرتبط با بیماری در جوجه‌ها را شناسایی کرد و موفق شد آن‌ها را در جنین تخم مرغ، کشت بافت و همچنین محیط کشت فاقد سلول، رشد دهد. در سال ۱۹۴۳ میلادی، دلاپلان^۷ و استارت^۸ میکروارگانیسم‌های فوق را از جنین جوجه‌های مبتلا به CRD جدا کردند. در اوایل دهه ۱۹۵۰ میلادی، مارخام^۹ و وانگ^{۱۰} و نیز وان روکل^{۱۱} و السیوک^{۱۲} طی گزارش‌های جداگانه، کشت موفقیت آمیز این میکروارگانیسم از جوجه و بوقلمون را اعلام کردند و آن را جزو گروه (Pleuropneumonia Mycoplasma Spp) قرار دادند.

بیماری مایکوپلاسموز با کاهش رشد و نشانه‌های عمومی بیماری‌های تنفسی مانند صداهای تنفسی و خرخر کردن، سرفه و عطسه، ترشحات چشم و بینی، آماس ملتحمه و تورم شدید کیسه‌های هوایی همراه است (شکل ۲۸-۲). در بوقلمون‌ها تورم سینوس‌های زیر کاسه چشمی دیده می‌شود. در جوجه‌های گوشتی (۸-۳ هفته‌گی) نشانه‌ها آشکارتر از پرندگان بالغ بوده و بیماری شدیدتر است. به‌طور معمول، تظاهرات بالینی این بیماری به آهستگی گسترش می‌یابد و با تغییر هوا شدت آن نیز متغیر است. دوره بیماری طولانی است و ممکن است ماه‌ها ادامه داشته باشد. کاهش رشد و وضعیت فیزیکی ضعیف نشانه وجود یک بیماری مزمن است.



شکل ۲۸-۲ علائم بالینی بیماری مایکوپلاسموز در طیور شامل کاهش رشد، تورم صورت، و عفونت قرنیه و ملتحمه

۱- CRD

۲- Mycoplasmosis

۳- Mycoplasma galisepticum

۴- Phallus

۵- Dodd

۶- Nelson

۷- Delaplane

۸- Stuart

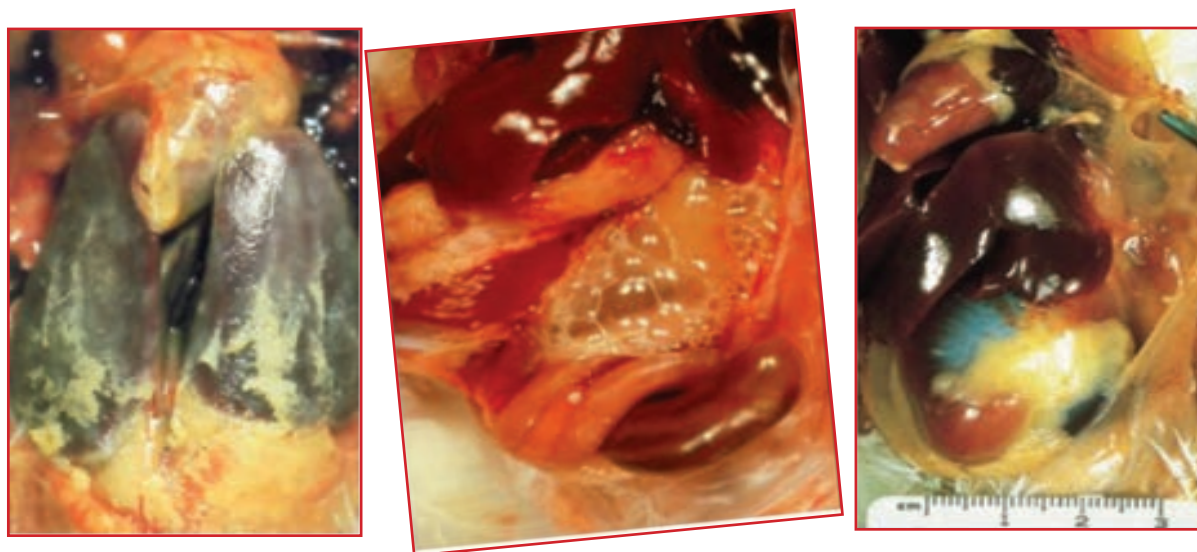
۹- Markham

۱۰- Wong

۱۱- Van Roekel

۱۲- Olesiuk

در واقع، بیماری کیسه هوایی^۱ بیانگر التهاب کیسه های هوایی بر اثر درگیری پرند با مایکوپلازماست. کیسه های هوایی ضخیم و کدر حاوی ترشحات مخاطی یا پنیری بوده و ممکن است در دیواره آن ها فولیکول های لنفوییدی تکثیر یافته باشند (شکل ۲۹-۲).



شکل ۲۹-۲ یافته های کالبدگشایی بیماری مایکوپلازما سموز در طیور

علاوه بر مایکوپلازما گالی سیتیکم، که از نظر اقتصادی مهمترین مایکوپلازماهای پرندگان است، سویه های مایکوپلازما سینوویه^۲، مایکوپلازما مله آگریدیس^۳، و مایکوپلازما آیووا^۴ نیز در واقع عوامل بیمارزای طیور شناخته می شوند. مایکوپلازما سینوویه در ماکیان و بوقلمون، و گونه های دیگر پرندگان در ایجاد بیماری تنفسی و تورم مفاصل دخالت دارد. مایکوپلازما مله آگریدیس فقط بوقلمون ها را مبتلا می کند و مایکوپلازما آیووا موجب کاهش جوجه درآوری و بروز تلفات دیررس جنینی در بوقلمون می شود.

شناسایی عامل بیماری: در انواع مختلفی از محیط های کشت مایع یا آگار که دارای تمامی اجزای مورد نیاز باکتری مانند گلوکز و همچنین عصاره مخمر باشد مانند محیط فری^۵، می توان مایکوپلازماهای پرندگان را تکثیر کرد. در صورتی که به این محیط میزان ۱۰ تا ۱۵ درصد سرم خوک، اسب یا پرندگانی که مدت سی دقیقه در دمای ۵۶ درجه غیر فعال شده است اضافه شود، به محیط بسیار مناسبی برای رشد اکثر مایکوپلازماها تبدیل می شود.

معمولاً کشت های مایع حساس تر از کشت های جامد هستند. نمونه های نای، شکاف شوان^۶، قطعاتی از کیسه هوایی متورم، زرده و بخشی از غشای زرده، سوآب پنبه ای آغشته به ترشحات نای، کیسه هوایی و سایر بافت ها، مایع مفصلی و یا سینوس های متورم برای کشت و جداسازی باکتری مایکوپلازما مناسب هستند. در صورت رشد مایکوپلازما در محیط فری و یا گلوکز تخمیر شده، pH محیط کشت کاهش می یابد. از این خاصیت برای مشاهده رشد باکتری به صورت اختصاصی در محیط با افزودن معرف فنل رد^۷ استفاده می شود. این معرف در محیط اسیدی از قرمز به نارنجی یا زرد تغییر رنگ می دهد. پس از زرد شدن معرف، گرم خانه گذاری محیط های کشت نباید ادامه یابد. زیرا برخی از گونه های مایکوپلازما مانند مایکوپلازما سینوویه نسبت به کاهش pH محیط و اسیدی آن حساس اند. این باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و طی ۳ تا ۵ روز رشد می کند. این درحالی است که در مواردی ممکن است جداسازی این باکتری به زمان بیشتر و پاساژهای متوالی نیازمند باشد.

۱- Air sacculitis

۲- M. synoviae

۳- M. meleagridis

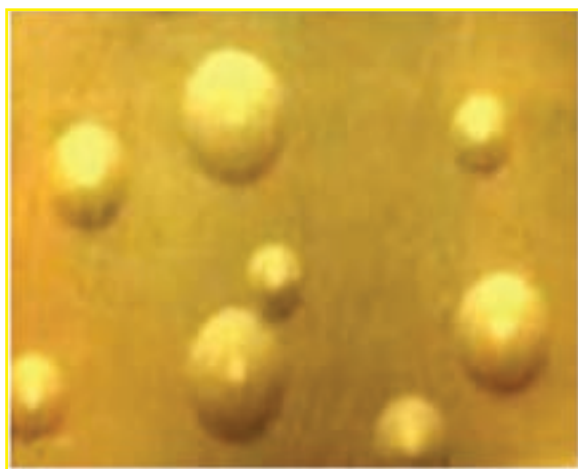
۴- M. iowae

۵- Frey

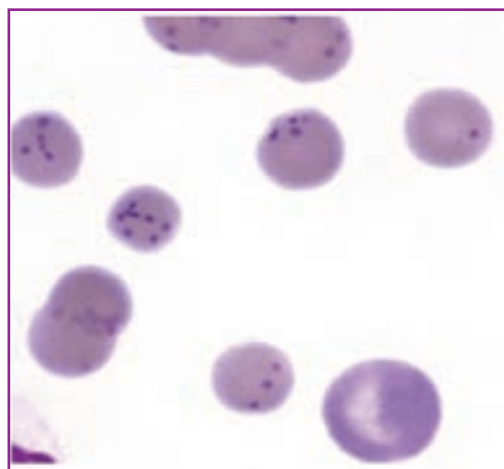
۶- Choanal cleft

۷- Phenol red

گونه‌های مختلف مایکوپلازما پرگنه‌های کوچک و صاف به قطر ۱/۰ تا ۱ میلی متر با مرکز برآمده شبیه تخم مرغ نیمرو شده، ۴ تا ۵ روز پس از کشت ایجاد می‌کنند. این میکروارگانیسم را می‌توان به خوبی با رنگ گیمسا^۱ یا رنگ آمیزی گرم رنگ آمیزی نمود. مایکوپلازما در زیر میکروسکوپ نوری به صورت کروی با اندازه ۵/۰-۲۵/۰ میکرومتر دیده می‌شود (شکل ۳-۲). در بررسی با میکروسکوپ الکترونی به دلیل نبود دیواره سلولی، اشکال قهقهه‌ای، رشته‌ای یا اجسامی قطبی مشاهده خواهند شد. گونه‌های مایکوپلازما با استفاده از روش‌های سرولوژی مانند آگلوتیناسیون سرم بر روی پلیت^۲، بازدارندگی از هم‌آگلوتیناسیون^۳، و الایزا^۴ و نیز روش‌های مولکولی شناسایی می‌شوند. غربال‌گری^۵ گله‌های طیور از نظر آلودگی با مایکوپلازماهای بیماری‌زا، با آزمایش SPA انجام می‌شود. اگرچه این آزمایش سریع و کم هزینه، حساسیت^۶ زیادی دارد اما امتیاز کمتری دارد. در نتیجه واکنش‌های مثبت کاذب^۸ خواهد داشت. گله‌هایی که در آزمایش SPA، واکنش مثبت دارند باید با آزمایش HI و یا کشت تأیید شوند.



(ب)



(الف)

الف) اشکال کروی و درون سلولی مایکوپلازما به رنگ بنفش تیره در زیر میکروسکوپ

ب) کلنی مایکوپلازما بر روی محیط کشت جامد

شکل ۳-۲

بیماری سل گاوی

بیماری سل در تمامی کشورهای دنیا گزارش شده است و خصوصاً در گاوهای نژاد شیری اهمیت فراوانی دارد. این بیماری در گاو با ایجاد توپرکل^۹ های پیشرونده در اندام‌های مختلف بدن ناشی از آلودگی با مایکوباکتریوم بوویس^{۱۰} مشخص می‌شود. صرف نظر از مرگ و میر ناشی از بیماری سل، میزان تولید شیر در حیوانات آلوده به مایکوباکتریوم بوویس ۲۵-۱۰ درصد کاهش می‌یابد. بیماری سل گاوی از نظرگاه بهداشت عمومی در جوامع انسانی نیز حائز اهمیت است. سهولت و فراوانی انتشار عامل بیماری به خصوص در محیط‌هایی که بیماری سل گاوی تحت کنترل نیست، می‌تواند این بیماری را به یک بیماری مشترک مهم بین حیوان و انسان تبدیل کند. علاوه بر گاو، انسان، بز و خوک نیز نسبت به آلودگی با این باکتری حساس هستند اما گوسفند و اسب نوعی مقاومت طبیعی را نشان می‌دهند. میکروب سل از راه تنفس، خلط، مدفوع (از طریق جراحات روده‌ای و هم از طریق خلط بلع شده از جراحات ریوی)، شیر، ادرار، ترشحات رحمی و واژن، و همچنین از طریق ترشحات عقده‌های لنفی باز شده به محیط دفع می‌شود. گاوهای با جراحات

۱- Giemsa

۲- Serum agglutination plate (SPA)

۳- Hemagglutination inhibition (HI)

۴- ELISA

۵- Screening

۶- Sensitivity

۷- Specificity

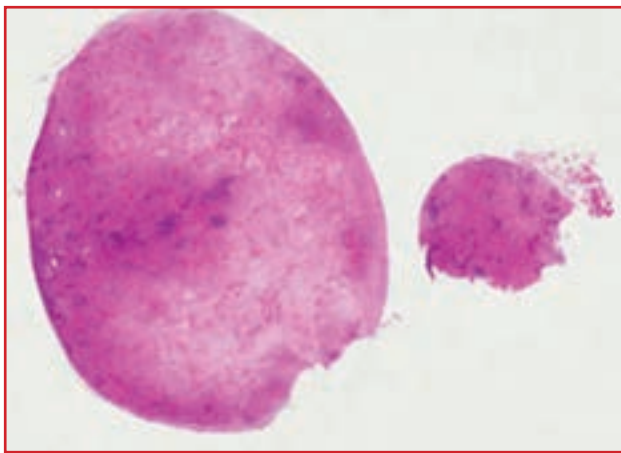
۸- False positive

۹- Tubercle

۱۰- Mycobacterium bovis

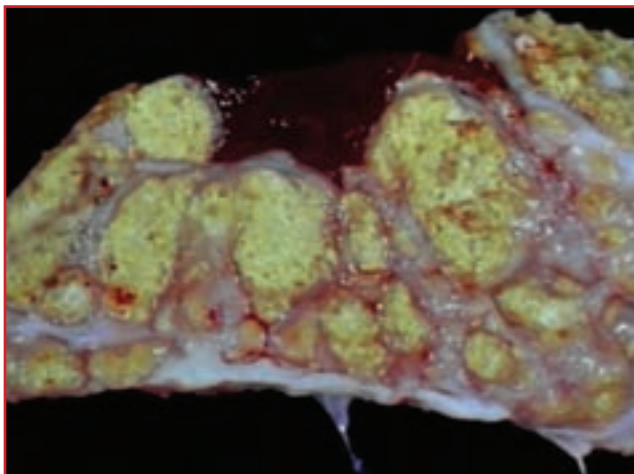
پیشرفته بیماری انتشار دهنده‌های مشخص بیماری‌اند. زیرا باسیل‌ها از طریق این دسته دام‌ها به نوعی با جریان هوای تنفسی، پوست یا لومن روده در ارتباط هستند. ممکن است گاوها در مرحله اول بیماری پیش از آنکه هر گونه جراحی نشان دهند، مایکو باکتریای زنده را از طریق موکوس بینی و نای خود دفع کنند.

راه ورود باکتری، معمولاً از طریق تنفسی یا گوارشی است. راه تنفسی دروازه همیشگی ورود باکتری در گاوهایی است که در جایگاه بسته (گاوداری) نگهداری می‌شوند. این راه حتی در گاوهای موجود در چراگاه‌ها نیز روش انتقال آلودگی است. ایجاد آلودگی از طریق گوارشی در چراگاه‌ها به علت اینکه مدفوع می‌تواند غذا و آب آشامیدنی را آلوده کند، محتمل‌تر است. آب‌های آشامیدنی را که، تحت شرایط طبیعی آب‌های تا ۱۸ روز پس از استفاده آب توسط یک دام مسلول، ممکن است آلوده باقی بمانند. نوشیدن شیر آلوده به وسیله دام‌های جوان یکی از روش‌های معمول انتشار بیماری سل است. آلودگی داخل رحمی (از راه جفت‌گیری) و آلودگی داخل پستانی (با استفاده از سیفون‌های آلوده پستانی یا از طریق فنجانک‌های آلوده ماشین‌های شیردوش) از راه‌های کمتر معمول آلودگی هستند. در دامداری‌هایی که دام‌ها به طور متراکم نگهداری می‌شوند احتمال انتقال آلودگی بیشتر است. در گاوهای گوشتی، به دلیل وضعیت نگهداری آن‌ها، شدت آلودگی کمتر است.



شکل ۲-۳۱ دانه سلی تشکیل شده در مرحله اولیه بیماری

بزها کاملاً نسبت به عامل سل گاوی حساس‌اند و چنانچه در مجاورت گله‌های گاو آلوده قرار گیرند بروز بیماری می‌تواند تا ۷۰ درصد نیز برسد. گوسفند، دامی مقاوم در نظر گرفته می‌شود اما تحقیقات انجام شده در نیوزلند نشان داده است که بیماری سل می‌تواند تا ۵ درصد گله‌های گوسفند را آلوده نماید. همچنین بیماری سل ممکن است در گوزن، آهو، گاو میش، شتر، میمون و سایر حیوانات یک منطقه و همچنین پرندگان بروز نماید. همه حیوانات فوق می‌توانند منشأ آلودگی برای گاو محسوب شوند (شکل‌های ۲-۳۱، ۲-۳۲ و ۲-۳۳).



شکل ۲-۳۳ برونکوپنومونی همراه با پرخونی و چرک پنبیری شکل در اطراف جراحات ریوی



شکل ۲-۳۲ جراحات مزمن ریه محتوی ماده غلیظ پنبیری به رنگ زرد

شناسایی عامل بیماری: عامل سل گاوی مایکوباکتریوم بوویس (راسته اکتینو میستال، خانواده مایکو باکتریاسه و جنس مایکوباکتریا) در برابر حرارت، خشکی و اغلب ضد عفونی کننده ها مقاوم است. تابش مستقیم نور خورشید می تواند باعث تخریب باکتری شود. مایکوباکتریوم بوویس در گرما و رطوبت می تواند به مدت هفته ها زنده باقی بماند. این باکتری همانند همه مایکوباکتریوم ها دیواره سلولی بسیار ضخیمی دارد و در لایه سطحی خود از یک کپسول منتشر، یک دیواره دو لایه ای و غشای پلاسمایی تشکیل شده که احتمالاً بقای میکروب را در محیط های نامساعد (چه در محیط و چه در داخل سلول میزبان) حفظ می کند. دیواره سلولی مایکوباکتریوم ها از نظر ساختمان شیمیایی ترکیبی از پپتیدوگلیکان، آراینوگالاکتان و اسید مایکولیک^۱ و همچنین لیپیدهایی همانند مایکوزیدها، فاکتور طنابی^۲ و سولفالپیدها هستند، که در آسیب زایی باسیل های سل نقش دارند. اجزای دیواره سلولی، خصوصاً اسید مایکولیک، رنگ هایی نظیر کربول فوشین^۳ را حفظ می کنند و به هنگام رنگ زدایی به وسیله اسیدهای رقیق (پدیده اسید فست^۴) موجب مقاومت باکتری می شوند.

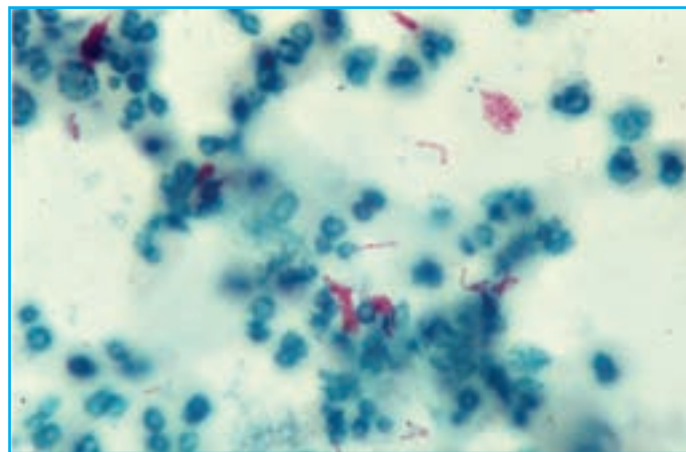
رنگ آمیزی اسید فست یا زیل نلسن^۵

رنگ آمیزی تشخیصی است که میزان و درجه مقاومت سلول های رنگ شده در برابر رنگ بری اسیدها را تعیین می کند. خاصیت مقاومت در برابر اسیدها در بعضی مایکوباکتریوم ها و اکتیو میست ها به مقدار زیاد لیپیدی بستگی دارد که در آن ها موجود است. برای رنگ آمیزی این باکتری ها از حرارت و رنگی که گرایش قوی به سلول باکتری دارد استفاده می شود. در این روش از محلول اسید – الکل، که عامل بی رنگ کننده است، استفاده می شود و بعد هم رنگ آمیزی دوم باکتری ها انجام می گردد. باکتری های اسید فست، کندتر از سایر میکروارگانیسم ها، در برابر اسید – الکل بی رنگ می شوند و بعد از رنگ آمیزی دوم، رنگ اولیه خود را حفظ می کنند.

مواد و رنگ لازم جهت رنگ آمیزی

(۱) رنگ کربول فوشین (۲) اسید – الکل (۳) رنگ بلودو متیلن یا مالاشیت گرین

روش رنگ آمیزی: بعد از تهیه، گسترش و ثابت کردن آن، رنگ فوشین را روی لام می ریزیم و به مدت ۵ دقیقه لام را از پایین به طور متناوب روی شعله حرارت می دهیم، به طوری که رنگ نجوشد و فقط بخار شود. با کم شدن رنگ باید مجدداً رنگ اضافه کرد. پس از سرد شدن لام را شست شو می دهیم. لام را حدود یک دقیقه داخل اسید – الکل فرو می بریم و سپس آن را



شست وشو می دهیم. این عمل را آن قدر تکرار می کنیم تا رنگ لام پوست پیازی شود. رنگ بلودو متیلن را به مدت ۳۰ ثانیه روی لام می ریزیم و شست شو می دهیم، بعد از خشک شدن لام را زیر میکروسکوپ با درشت نمایی $\times 100$ مشاهده می کنیم. باکتری های اسید فست به رنگ صورتی در زمینه آبی و سایر باکتری ها به رنگ آبی دیده می شوند. در صورت استفاده از رنگ مالاشیت گرین، باکتری های اسید فست به رنگ قرمز و سایر باکتری ها به رنگ سبز دیده می شوند (شکل ۳۴-۲).

شکل ۳۴-۲ رنگ آمیزی زیل نلسن. مایکوباکتریوم اسید فست به رنگ قرمز و سایر

باکتری ها به رنگ سبز دیده می شوند

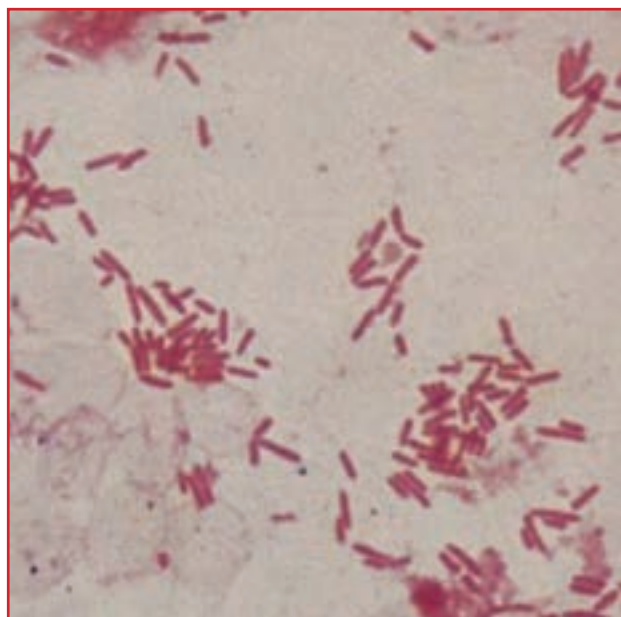
۱- Mycolic acid

۲- Cord factor

۳- Carbol fushin

۴- Acid fast

۵- Ziehl - Neelsen



بیماری پوسیدگی باله ماهی

بیماری دم خوره یا پوسیدگی باله^۱ توسط باکتری های گروه سودوموناس^۲ ایجاد می شود. سلول های این باکتری میله ای شکل، گرم منفی و غیرمتحرک اند و اسپور تولید نمی کنند (شکل ۲-۳۵).

شکل ۲-۳۵ رنگ آمیزی گرم باکتری سودوموناس

آلودگی با سودوموناس باعث ریختن باله ها و فاسد شدن ماهی ها می شود. در این بیماری باله های شنا و دم ماهی دچار تغییرات می شوند و گاهی هم از بین می روند. در مرحله اولیه بیماری پوسیدگی باله ها، خط سفید کم و بیش واضح در طول لبه های خارجی باله شنا ظاهر می شود و به تدریج به سمت قاعده آن پیش می رود. کم کم قسمت هایی از لبه خارجی باله شنا از بین می رود و شعاع های آن لخت می شود (شکل ۲-۳۶). با ظهور زخم، لبه خارجی در اثر تحلیل رفتن نسوج نرم بین باله ها حالت رشته رشته پیدا می کند (شکل ۲-۳۷). در انتها، زخمی روی بدن ماهی باقی می ماند که در مرحله بعد، این محل مورد هجوم اجرام ریزینی دیگر مانند قارچ ها قرار می گیرد (شکل ۲-۳۸) و تا سر حد مرگ ماهی پیش می رود. این حالت در ماهیان آکواریومی و آزاد ماهیان به وفور دیده می شود. تراکم زیاد، دمای بالا، بدی تغذیه (کمبود اسید فولیک^۳ و اینوزیتول^۴) و یا افزایش ویتامین A ممکن است باعث گسترش پوسیدگی باله و دم شود.



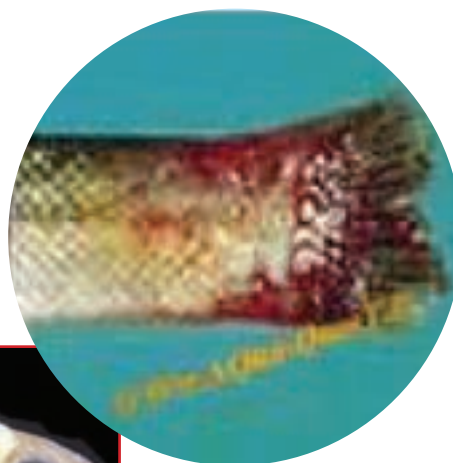
شکل ۲-۳۶ خوردگی لبه خارجی باله دم در بیماری پوسیدگی دم ماهی

۱- Fin rot

۲- Pseudomonas

۳- Folic acid

۴- Inositol



شکل ۳۷-۲ رشته رشته شدن باله دمی در
بیماری پوسیدگی دم ماهی



شکل ۳۸-۲ هجوم قارچ ها در بیماری پوسیدگی باله ماهی

سایر بیماری های باکتریایی ماهیان عبارت اند از :

فرونکلوزیس^۱: یکی از شایع ترین بیماری های میکروبی آزاد ماهیان است و توسط باکتری های گروه آئروموناس^۲ ایجاد می شود (شکل های ۴۰-۲ و ۴۱-۲). منظره میکروسکوپی این باکتری شبیه باکتری سودوموناس است. بیماری فرونکلوزیس با افزایش درجه حرارت، کم شدن میزان اکسیژن محلول در آب، و جمعیت زیاد ماهیان ارتباط دارد. این بیماری ممکن است در هر سنی ماهیان را مبتلا سازد ولی در بین ماهیان انگشت



قدی شایع تر و خطرناک تر است. مهم ترین علامت این بیماری تغییر شکل طحال است که به شکل قرمز در می آید. کبد بی رنگ و خونریزی های وسیع در تمام سروزهای سطحی دیده می شود. ماهی تغذیه نمی کند و خون به داخل روده ها وارد و روی پوست کورک های متعدد دیده می شود (شکل ۳۹-۲). در شکل مزمن، بیماری کورک ها به قسمت های زیرین پوست می روند و به عضلات می رسند (شکل ۴۰-۲).

شکل ۳۹-۲ کورک پوستی در بیماری فرونکلوزیس آزاد ماهیان

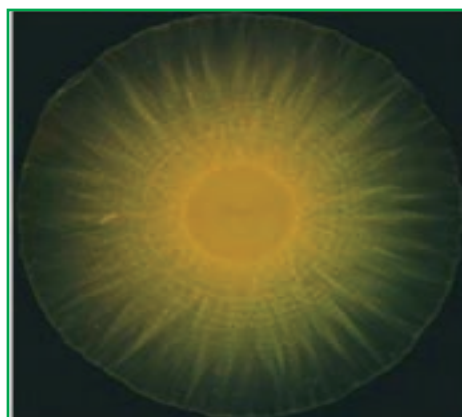
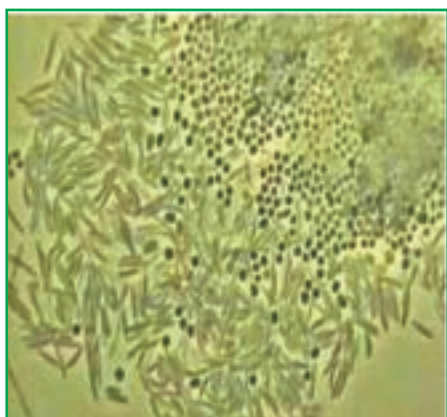
۱- Furunculosis

۲- Aeromonas



شکل ۴۰- آسیب عضلانی در
بیماری فرونکلوژیس آزاد ماهیان

بیماری باکتریال آبشش^۱: بیماری آبشش، که در آن آبشش کاملاً باز و قرمز رنگ و از حالت عادی خارج است و گاهی هم در زیر آن خونریزی رخ می‌دهد، در اثر آلودگی به میکسوباکتر^۲ (شکل ۴۱-۲) ایجاد می‌شود.



شکل ۴۱-۲ پرگنه میکسوباکتر بر روی محیط کشت جامد و منظره میکروسکوپی آن

در ماهی بیمار طریقه شنا کردن تغییر می‌کند و با سرعت به سطح آب می‌آید، سپس بی‌حس می‌شود و آرام می‌گیرد. در مراحل اولیه، ماهی کاملاً بی‌اشتها می‌گردد و آبشش‌ها متورم می‌شوند. صفحات آبششی به تدریج به هم می‌چسبند و رنگ پریده می‌شوند (شکل ۴۲-۲). آبشش‌ها کاملاً باز می‌شوند و تشکیلات کرکی - پنبه ای مانند، روی سربوهای آبششی ظاهر می‌گردد، در نتیجه این تغییرات شدید، تنفس ماهی‌ها مختل می‌گردد و باعث می‌شود به سطح آب بیایند. ادامه روند این بیماری تلفات ماهی‌ها را به همراه خواهد داشت.

۱- Bacterial gill disease (BGD)

۲- Myxobacteria



(ب)



(الف)

الف) تورم و به هم چسبیدن صفحات آبششی
ب) رنگ پریدگی صفحات آبششی در بیماری باکتریال آبشش
شکل ۲-۴۲

علاوه بر بیماری باکتریال آبشش، چندین نوع دیگر بیماری آبشش در ماهیان دیده می‌شود، شامل بیماری آبشش تغذیه‌ای که در اثر کمبود اسید پانتوتنیک ایجاد می‌شود. بیماری آبشش هموراژیک، که با ظهور اتساع‌های شریانی به اندازه دانه‌های شن در مویرگ‌های آبششی مشخص است و عامل آن آلودگی‌های شیمیایی، حشره‌کش‌ها و انگل‌های خونی است. همچنین برانشیو مایکوزیس بیماری آبششی است که در اثر آلودگی آبشش با قارچ ایجاد می‌شود. در تمام این حالات، یکی از بارزترین نشانه‌ها افزایش ترشحات موکوسی در آبشش‌هاست.

بیماری باکتریال کلیه^۱: هنگامی که درجه حرارت افزایش یابد بیماری کلیه بیشتر به صورت یک بیماری مزمن و پنهان بروز می‌کند. در ماهی مبتلا، برآمدگی حباب مانند و یا برجستگی به صورت مناطق بیضی و یا دایره‌ای شکل در طول خط پهلو دیده می‌شود (شکل ۲-۴۳). پوست ماهی تیره می‌گردد و ماهی‌ها در اثر بدی تغذیه نیم کور یا کور می‌شوند. بعضی همه‌گیری‌ها در پاییز و بعضی در بهار رخ می‌دهد. مرگ و میر تدریجی است ولی ناگهان افزایش می‌یابد.

بیماری دهان قرمز^۲: این بیماری در قزل‌آلای رنگین‌کمان مشاهده می‌شود (شکل ۲-۴۴). عامل آن یرسینیا روکری^۳ است. قرمزی دهان و سرپوش آبشش و نیز ساقه دم و پایه باله‌ها، التهاب و تخریب فک‌ها علائم اولیه بیماری هستند (شکل ۲-۴۵). ماهی بی‌حال می‌شود و به رنگ تیره درمی‌آید. در موارد مزمن بیماری، خونریزی چشم و کوری اگرزوفتالمی، حرکت بدون هدف، اتساع شکمی، رنگ پریدگی آبشش‌ها و لاغری دیده می‌شود (شکل ۲-۴۶).



شکل ۲-۴۳ برجستگی بیضی شکل خط پهلو در بیماری باکتریال کلیه

۱- Bacterial kidney disease (BKD)

۲- Red mouth disease (RMD)

۳- Yersinia ruckeri



شکل ۴۵- التهاب و تخریب فک ها در بیماری دهان قرمز



شکل ۴۴- زبان قرمز و متورم ماهی قزل آلا در بیماری دهان قرمز



شکل ۴۶- خونریزی چشم و اتساع شکم در بیماری دهان قرمز مزمن

کشت و تکثیر باکتری در آزمایشگاه^۱

میکروب یک موجود تک سلولی بوده و قادر است کلیه اعمال حیاتی خود را به طور مستقل انجام دهد، بدون آن که نیاز به سلول دیگری داشته باشد. این اصل بیانگر آن است که میکروب ها هم به غذا، آب، مواد آلی و معدنی احتیاج دارند. به محیط مغذی که حاوی کلیه نیازمندی های یک باکتری باشد و رشد آن را تأمین کند محیط کشت^۲ گفته می شود. این محیط حاوی منبع کربن و نیتروژن، عناصر ضروری و ویتامین های مورد نیاز باکتری است. برخی از انواع محیط های کشت، علاوه بر فراهم آوردن شرایط رشد و تکثیر باکتری ها، دارای ترکیباتی هستند که در تشخیص و شناسایی آن ها نیز کاربرد دارند. محیط های کشت به صورت پودر تولید شده و آماده مصرف هستند.

برای به دست آوردن یک کشت موفق باید شرایط مناسب برای رشد باکتری شامل مواد غذایی مورد نیاز، دمای مطلوب رشد، رطوبت کافی، نمک های آلی، pH مناسب و بودن یا نبودن اکسیژن فراهم شود. محیط های کشت به سه دسته تقسیم می شوند: محیط کشت مایع^۳، محیط کشت جامد^۴ و محیط کشت نیمه جامد^۵. محیط های کشت جامد به علت دارا بودن آگار^۶ در ترکیب خود، جامد هستند. آگار (شکل ۴۷-۲) پلی ساکارید خطی است که از بتا - دی گالاکتوز و ۳-۶ ان هیدرو - آلفا - الگالاکتوز^۷ تشکیل شده است.

۱- In vitro

۲- Culture medium

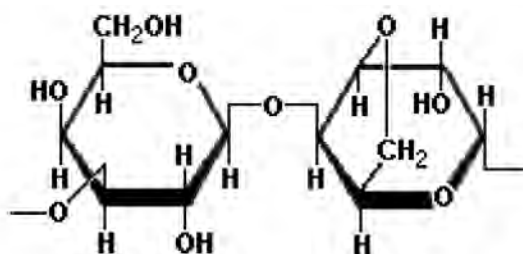
۳- Broth

۴- Solid

۵- Semi solid

۶- Agar

۷- Beta-D-galactose + 3-6 anhydro-alpha-L-galactose



شکل ۴۷-۲ فرمول شیمیایی باز آگار

آگار به وسیله تعدادی از جلبک‌های دریایی ساخته می‌شود و هیچ میکروبی توانایی استفاده از آن را به صورت منبع انرژی ندارد. آگار با سایر ترکیبات موجود در محیط کشت مانند عصاره گوشت، پیتون، قند، معرف‌ها، بازدارنده‌ها و غیره واکنش نمی‌دهد. حتی پس از سترون شدن در اتوکلاو نیز تغییر ساختار یا رنگ نمی‌دهد. آگار بر خلاف ژلاتین، حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد را، که برای رشد تمام باکتری‌های بیماری‌زا مناسب است، تحمل می‌کند. دمای ذوب آن ۹۵ درجه و دمای بسته شدن آن حدود ۴۳ درجه سانتی‌گراد است. مقدار آگار محیط کشت نیمه جامد نسبت به محیط جامد کمتر است و ۱ تا ۵٪ آگار دارد. این نوع محیط‌های کشت، هنگامی که بررسی حرکت باکتری‌ها مورد نظر باشد، مورد استفاده قرار می‌گیرند.

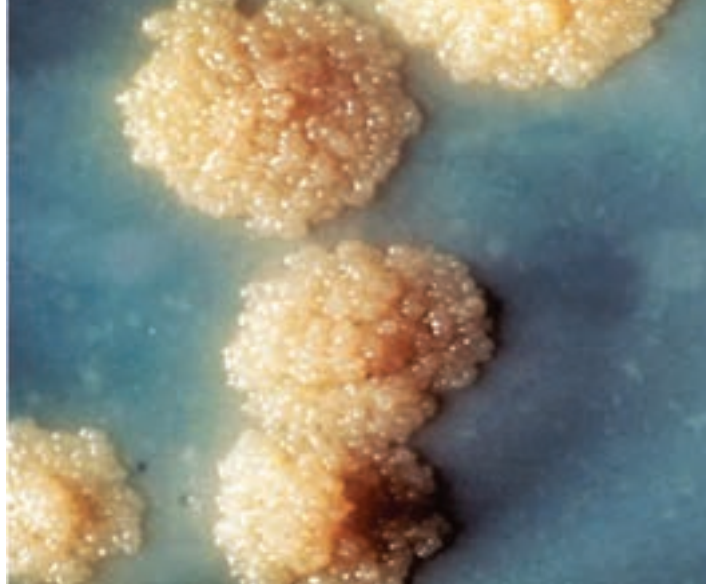


شکل ۴۸-۲ کدورت ایجاد شده در لوله سمت چپ در مقایسه با لوله سمت راست بر اثر رشد باکتری

برای انجام کشت در محیط مایع کافی است مقداری از نمونه به محیط اضافه شود. باکتری در محیط مایع پس از مدت زمان لازم (حدود ۴ ساعت) به صورت کدورت یک‌نواخت، غیریک‌نواخت و یا پرده‌ظرفی در سطح محیط کشت ظاهر می‌شود (شکل ۴۸-۲). در صورتی که باکتری در محیط جامد کشت داده شود، پس از طی مدت لازم، حدود ۱۸ تا ۲۴ ساعت به صورت پرگنه^۱ در سطح محیط ظاهر می‌شود (شکل ۴۹-۲). به جز بعضی از مایکوباکترها، که زمان رشد آن‌ها سه تا شش هفته طول می‌کشد (شکل ۵۰-۲). در واقع مجموعه‌ای از باکتری‌ها که بر روی محیط کشت کنار هم رشد می‌کنند، تشکیل نقاط برجسته‌ای روی محیط کشت می‌دهند که اندازه آن‌ها متفاوت است و به محیط کشت، میزان رشد، و تکثیر باکتری بستگی دارد. این مجموعه را پرگنه می‌نامند.



شکل ۴۹-۲ پرگنه‌های مختلف باکتری‌ها بر روی محیط کشت جامد



شکل ۵۰-۲ پرگنه باکتری مایکوباکتری بر روی محیط کشت جامد

برای شناسایی اولیه میکروارگانیسم‌ها توجه به ویژگی‌های ظاهری پرگنه ضروری است (شکل ۵۱-۲). این خصوصیات عبارت‌اند از:
در محیط‌های جامد (شکل ۵۲-۲):

شکل^۱: گرد^۲، نامنظم^۳، رشته‌ای^۴ یا ریزویدی^۵ است.

اندازه: قطر پرگنه برحسب میلی‌متر چقدر است؟ (کلنی‌هایی را، که قطرشان کمتر از یک میلی‌متر است، نقطه‌ای یا سوزنی می‌نامند).

رنگ: پرگنه چه رنگی دارد و رنگیزه^۶ موجود در آن، محلول در آب است یا خیر؟

سطح: آیا سطح پرگنه نرم^۷ است یا خشن^۸، کدر است یا شفاف و براق؟

برجستگی^۹: ظاهر پرگنه برآمده، تخت و غیره است؟

لبه^{۱۰}: اطراف پرگنه مژرس^{۱۱}، صاف، چین خورده و غیره است؟

قوام: آیا پرگنه به آسانی با آب آمیخته می‌شود؟ در این صورت، آیا محلول یک‌نواختی به دست می‌آید یا این که به صورت دانه دانه است؟

بو: پرگنه بودار و یا بدون بوست؟

در محیط‌های مایع

مقدار رشد: کم، متوسط، زیاد، رشدی وجود ندارد.

پرده^{۱۲} یا غشا

پرده یا پوسته‌ای بر روی سطح محیط مایع وجود ندارد.

پرده بر روی سطح وجود دارد که ممکن است با تکان دادن پاره شود یا نشود.

کدورت^{۱۳}: کدورت یک‌نواخت و یک‌سان است.

ته نشست یا رسوب^{۱۴}

ته نشست وجود ندارد.

ته نشست وجود دارد. در این صورت یا با تکان دادن متلاشی می‌شود یا نمی‌شود.

۱- Form

۲- Circular

۳- Irregular

۴- Filamentous

۵- Rizoid

۶- Pigment

۷- Smooth

۸- Rough

۹- Elevation

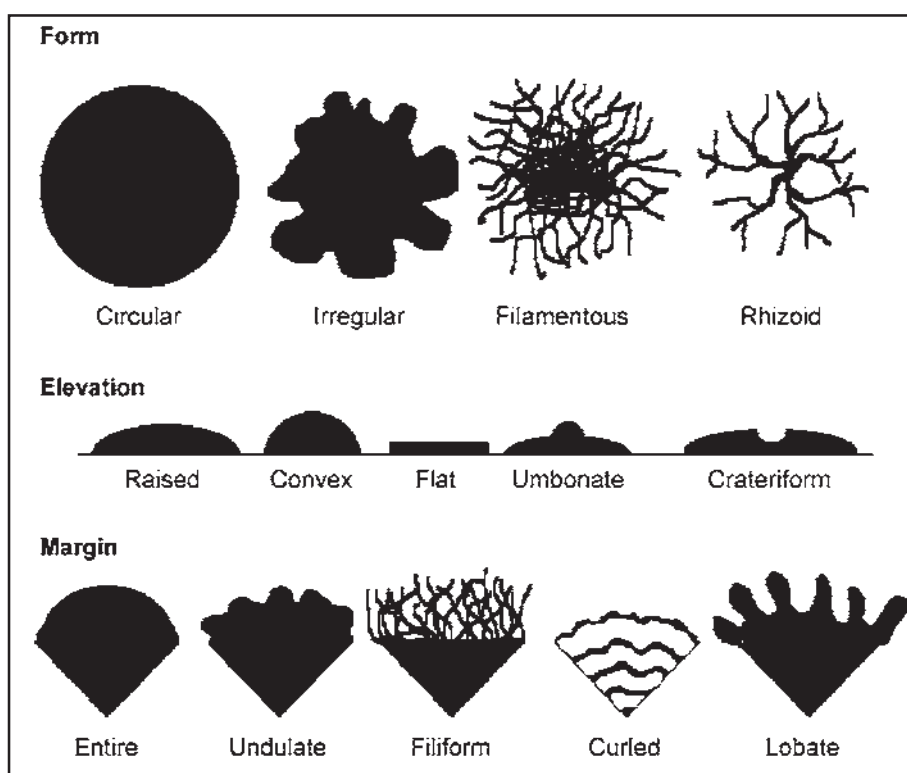
۱۰- Margin

۱۱- Undulate

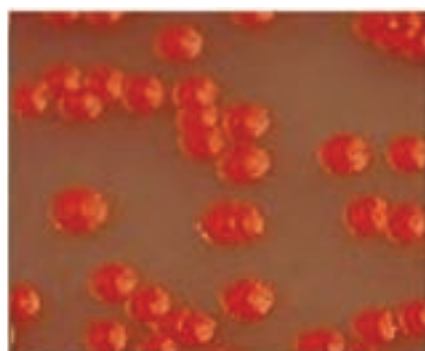
۱۲- Pellicle

۱۳- Turbidity

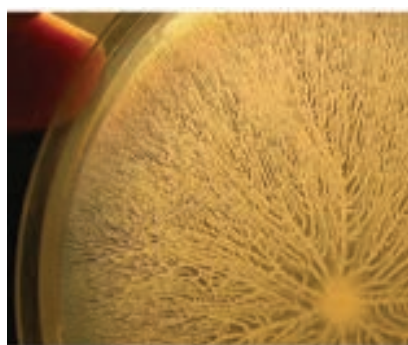
۱۴- Sediment



شکل ۵۱-۲، لیه و برجستگی‌های مختلف در پرگنه انواع باکتری‌ها



(پ)



(ب)



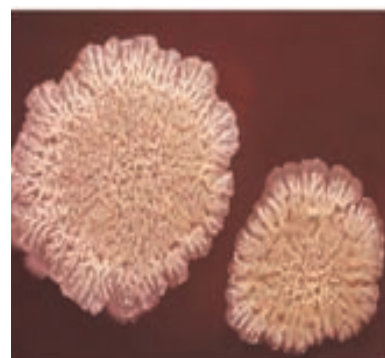
(الف)



(ج)



(ث)



(ت)

الف) پرگنه نامنظم ب) پرگنه ریزوئیدی پ) پرگنه دارای رنگیزه ت) پرگنه با ظاهر چین خورده ث) پرگنه با سطح نرم ج) پرگنه با لبه مضرس

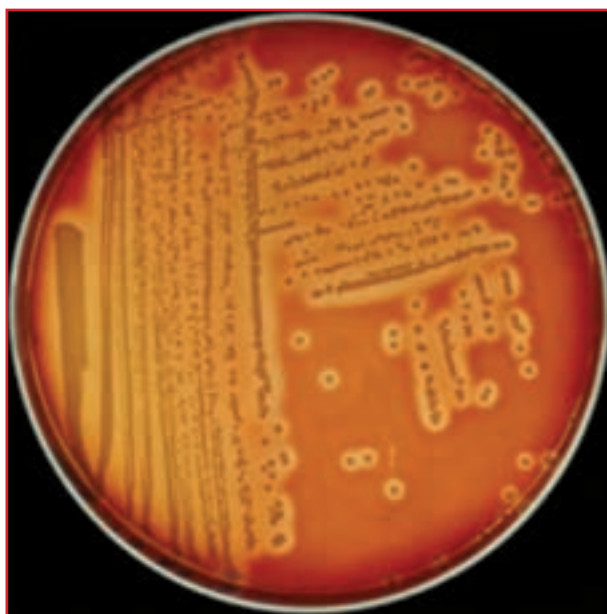
شکل ۵۲-۲ خصوصیات پرگنه باکتری بر روی محیط کشت جامد

باکتری‌ها را می‌توان بر روی محیط‌های مختلف، در پلیت یا در لوله کشت داد. انتخاب نوع ظرف بستگی به نوع کشت دارد. برای کشت‌هایی که محیط آن مایع است از ظروف لوله‌ای استفاده می‌شود و محیط‌های جامد هم در پلیت و هم در لوله کشت داده می‌شوند. بیشتر محیط‌های کشت که در پلیت مصرف می‌شوند، محیط‌های کشت عمومی هستند که برای تهیه مواد غذایی لازم جهت رشد باکتری ساخته شده‌اند. گاه محیط‌های کشت عمومی را با اضافه کردن اجزای مغذی مانند شیر بی‌چربی، خون دفیبرینه گوسفند، زرده تخم مرغ و سرم که موجب افزایش سرعت رشد باکتری‌های دیر رشد می‌شوند، غنی می‌کنند. این مواد مغذی را نمی‌توان با محیط اصلی اتوکلاو همراه کرد، زیرا حرارت ساختمان آن‌ها را تخریب می‌کند. این مواد، ضمن جداگانه سترون شدن، به محیط کشت اضافه می‌شوند.

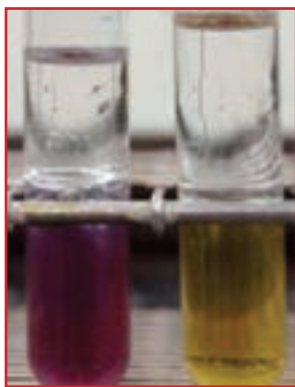
انواع محیط کشت

محیط‌های کشت را از نظر ترکیب شیمیایی، دارا بودن مواد غذایی و یا مواد بازدارنده می‌توان به چند دسته تقسیم کرد :

محیط کشت عمومی: محیط کشت عمومی برای تکثیر و جداسازی باکتری‌ها بکار می‌رود. این محیط‌ها کلیه مواد لازم را برای رشد باکتری دارند و حدود ۸۰٪ از باکتری‌ها می‌توانند در آن رشد کنند. این محیط‌ها فاقد هرگونه مهارکننده و معرف‌اند، بنابراین با رشد باکتری‌های مختلف بر روی آن هیچ‌گونه تغییر رنگی مشاهده نمی‌شود. پلیت کانت آگار^۱، نوترینت آگار^۲، و آگار خون‌دار^۳ مثال‌هایی از این گونه محیط‌های کشت هستند. در محیط آگار خون‌دار، علاوه بر تأمین رشد، باکتری‌های تجزیه‌کننده آهن خون مانند *ستافیلوکوکوس* / *ورئوس*^۴ از باکتری‌های فاقد این توانایی متمایز می‌شوند. باکتری‌های دارای خاصیت همولیز آنزیم همولیزین تولید می‌کنند. این آنزیم در محیط آگار خون دار باعث پاره (لیز) شدن گلبول‌های قرمز می‌گردد و در نتیجه هاله‌ای شفاف اطراف کلنی باکتری مولد آن دیده می‌شود (شکل ۵۳-۲). بسته به نوع باکتری یکی از این سه حالت مشاهده می‌شود: همولیز کامل (β) که باکتری واجد همولیزین است و اطراف پرگنه هاله سبز رنگ ایجاد می‌کند، همولیز ناقص (α) که باکتری واجد همولیزین است ولی نسبت لیز کمتر از ۵۰ درصد است و اطراف پرگنه هاله سبز رنگ ایجاد می‌کند، عدم همولیز (γ) که باکتری فاقد این آنزیم است.



شکل ۵۳-۲ همولیز کامل (نوع بتا) باکتری
ستافیلوکوکوس اورئوس روی محیط آگار
خون‌دار



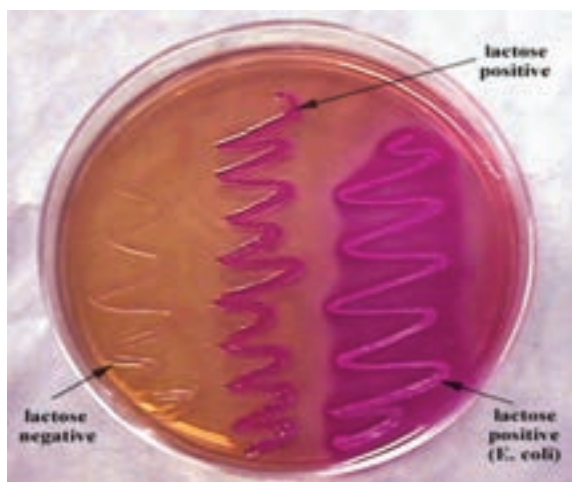
شکل ۵۴-۲ دیکربوکسیله شدن اسید آمینه لیزین توسط باکتری و تغییر رنگ محیط به بنفش در اثر تولید آلکالین آمین و کادوآرین

محیط‌های کشت افتراقی یا جدا کننده^۱: محیط‌های کشت افتراقی

محیط‌هایی هستند که باکتری‌های مختلف در آن صفات خاص خود را نشان می‌دهند و زمانی مورد استفاده قرار می‌گیرند که با باکتری‌هایی با شکل و مشخصات اولیه یک‌سان مواجه هستیم. این محیط‌ها ترکیباتی دارند که موجب می‌شوند برخی از باکتری‌ها در مقایسه با باکتری‌های دیگری که در همان محیط کشت رشد می‌کنند به شکل متفاوتی ظاهر شوند. مانند محیط لیزین دیکربوکسیلاز براث^۲ که به صورت محیط افتراقی در تمایز بین آنتروباکتریاسه‌ها به کار برده می‌شود. این محیط توان این باکتری‌ها را در دیکربوکسیله کردن^۳ اسید آمینه لیزین تعیین می‌کند (شکل ۵۴-۲). همه آنتروباکتریاسه‌ها در نتیجه تخمیر قند گلوکز، اسید تولید می‌کنند و محیط را به رنگ زرد در می‌آورند. چنانچه یک باکتری اسید آمینه مورد نظر را نیز دیکربوکسیله کند آلکالین آمین و کادوآرین^۴ تولید خواهد شد. در نتیجه قلیایی شدن محیط، رنگ بنفش مشاهده خواهد شد.

محیط‌های کشت انتخابی^۵: بعضی از مواد مغذی دارای یک عامل انتخابی هستند که برای جداسازی یا کشت گروه

خاصی از باکتری‌ها کاربرد دارد. عامل انتخابی معمولاً با جلوگیری از رشد ارگانیسم‌های ناخواسته، شرایط رشد سریع و مطلوب باکتری مورد نظر را فراهم می‌کند. وقتی عامل انتخابی به محیط کشت اضافه می‌شود در این صورت محیط کشت را انتخابی می‌گویند، مانند محیط مک کانکی آگار^۶ برای آنتروباکتریاسه‌ها و یا محیط مانیتول سالت آگار^۷ برای استافیلوکوک‌ها. محیط مک کانکی آگار محیط انتخابی - افتراقی است که سبب رشد آنتروباکتریاسه‌ها^۸ و نیز افتراق باکتری‌های گرم منفی لاکتوز مثبت از باکتری‌های لاکتوز منفی می‌شود. عمل انتخابی محیط به رنگ کریستال ویوله^۹ و نمک صفراوی، که مانع رشد باکتری‌های گرم مثبت می‌شوند، بستگی دارد. باکتری‌های گرم منفی که روی این محیط رشد می‌کنند اگر توانایی استفاده از لاکتوز را داشته باشند (مانند اشریشیا کلی) کلنی‌هایی به رنگ قرمز - صورتی خواهند داشت که ناشی از تولید اسید از تخمیر لاکتوز و جذب آن توسط معرف قرمز خنثا^{۱۰} و تغییر رنگ معرف به قرمز است. کلنی باکتری‌هایی که قادر به تخمیر لاکتوز نیستند (مانند سالمونلا^{۱۱}) بی‌رنگ دیده می‌شوند (شکل ۵۵-۲).



شکل ۵۵-۲ رشد آنتروباکتریاسه‌ها روی محیط مک کانکی آگار و تفریق دو باکتری لاکتوز مثبت و لاکتوز منفی از یکدیگر با ایجاد تغییر رنگ معرف فلر رد

۱- Differential

۲- Lysine decarboxylase broth

۳- Decarboxylation

۴- Cadvarin

۵- Selective

۶- Mac - Conkey agar

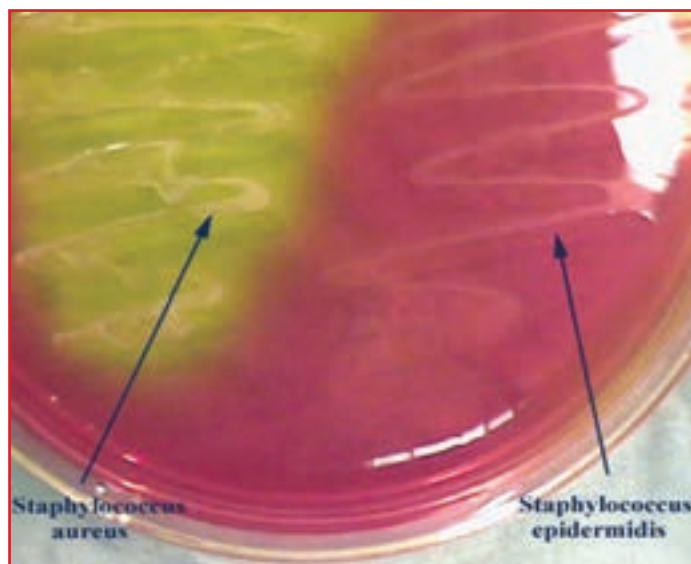
۷- Mannitol salt agar

۸- Entrobacteriaceae

۹- Crystal violet

۱۰- Neutral red

۱۱- Salmonella



محیط مانیتول سالت آگار حاوی ۷/۵٪ کلرید سدیم، قند مانیتول و معرف فنل رد است. غلظت بالای نمک آن عامل انتخابی شدن محیط و رشد نیافتن بسیاری از باکتری‌ها می‌شود. *استافیلوکوک اورئوس*، علاوه بر رشد روی این محیط، می‌تواند با تخمیر مانیتول اسید تولید کند که باعث کاهش pH می‌شود. در pH اسیدی فنل رد از قرمز به زرد تغییر رنگ می‌دهد (شکل ۲-۵۶). سایر استافیلوکوک‌ها قادر به تولید اسید نیستند و بر روی این محیط کلنی‌های قرمز تشکیل می‌دهند.

شکل ۲-۵۶ رشد استافیلوکوک‌ها روی محیط مانیتول سالت آگار و تفریق دو گونه استافیلوکوک از یکدیگر با ایجاد تغییر رنگ معرف فنل رد

محیط‌های کشت غنی شده^۱: این محیط‌ها معمولاً در مواردی به کار می‌روند که تعداد باکتری‌های مورد جست‌وجو در نمونه مورد آزمایش کم باشد یا به دلیل وجود باکتری‌های دیگر جدا کردن آن با اشکال مواجه شود. این محیط‌ها امکان رشد برای باکتری‌ها را از نظر pH و مواد غذایی فراهم می‌سازند. مانند محیط کشت سلنیت F براث^۲ که برای جداسازی گونه‌های سالمونلا به کار می‌رود. این محیط حاوی سلنیت سدیم (یک نمک صفراوی) است و از رشد باکتری‌های گرم مثبت و بسیاری از باکتری‌های گرم منفی جلوگیری می‌کند. میزان تکثیر سالمونلا در این محیط، طی ۲۴-۱۲ ساعت اولیه، از رشد دیگر باکتری‌های روده‌ای سریع‌تر است.

روش تهیه محیط کشت

اولین گام در تهیه محیط کشت برآورد میزان کل محیط کشت مورد نیاز است. این مقدار از تعداد ظروف کشت و حجم مورد نیاز محیط به ازای هر ظرف به دست می‌آید. معمولاً برای هر پلیت با اندازه متوسط، ۲۰ میلی‌لیتر محیط در نظر می‌گیرند. مطابق دستور کارخانه سازنده، می‌توان مقدار لازم از محیط کشت را، که به صورت پودر است توزین و سپس با مقدار توصیه شده آب مقطر داخل ارلن، مخلوط کرد. برای توزین پودر با قرار دادن یک تکه کاغذ تمیز بر روی ترازو و کالیبره^۳ (صفر) کردن آن، به آرامی با یک قاشقک تمیز و خشک، پودر را روی کاغذ می‌ریزند و وزن آن را می‌سنجند (شکل ۲-۵۷ الف). آب مقطر را در یک مزور می‌ریزند و حجم دقیق آن را اندازه‌گیری می‌کنند. برای این که پودر به کف ارلن نچسبد و در هنگام حرارت دادن نسوزد، ابتدا مقداری از آب مقطر را در ارلن می‌ریزند و سپس پودر را به آن می‌افزایند. معمولاً حجم ارلن باید دوبرابر حجم محلول محیط کشت باشد تا در زمان حرارت دادن و به جوش آمدن، سرریز نگردد. هم‌زمان با تکان دادن ارلن، بقیه آب مقطر نیز افزوده می‌شود.

برای انحلال کامل آگار، باید محلول را حرارت داد. به این منظور با قراردادن یک توری شعله پخش‌کن بر روی شعله و یا استفاده از هیتر^۴ (شکل ۲-۵۷ ب) ارلن حاوی محیط کشت به آرامی حرارت داده می‌شود تا زمانی که محیط بجوشد اما کف نکند و سرریز نشود. بهترین روش برای جلوگیری از ته گرفتن محیط کشت، قرار دادن آن در بن‌ماری جوش است. حرارت

۱- Enrichment

۲- Selenite F broth

۳- Calibrate

۴- Hiter



(ب)



(الف)

الف) توزین پودر محیط کشت
ب) حرارت دادن محیط کشت برای حل شدن کامل آگار
شکل ۲-۵۷



شکل ۲-۵۸ محیط کشت سترون شده

دادن باید تا شفاف شدن کامل محلول ادامه یابد. سپس دهانه ارلن را با پنبه بپوشانند و پنبه را با فویل آلومینیومی محکم می کنند. اگر هدف تهیه محیط کشت مایع باشد به حرارت دادن نیازی نیست. در این صورت، محیط در حجم های مورد نظر در لوله های آزمایش سترون تقسیم و درب لوله ها با درپوش یا پنبه مسدود می شود. برای جلوگیری از پریدن پنبه ها سر لوله ها با کاغذ پوشانده می شود. سپس ارلن یا لوله های حاوی محیط کشت را در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد قرار می دهند تا سترون شود (شکل ۲-۵۸).

بعضی از محیط های کشت را، که به دمای بالا حساس اند (مانند محیط S-S آگار^۱)، نمی توان در اتوکلاو قرار داد. روش سترون سازی این قبیل محیط ها توسط کارخانه سازنده بیان شده است.

روش کشت در محیط مایع

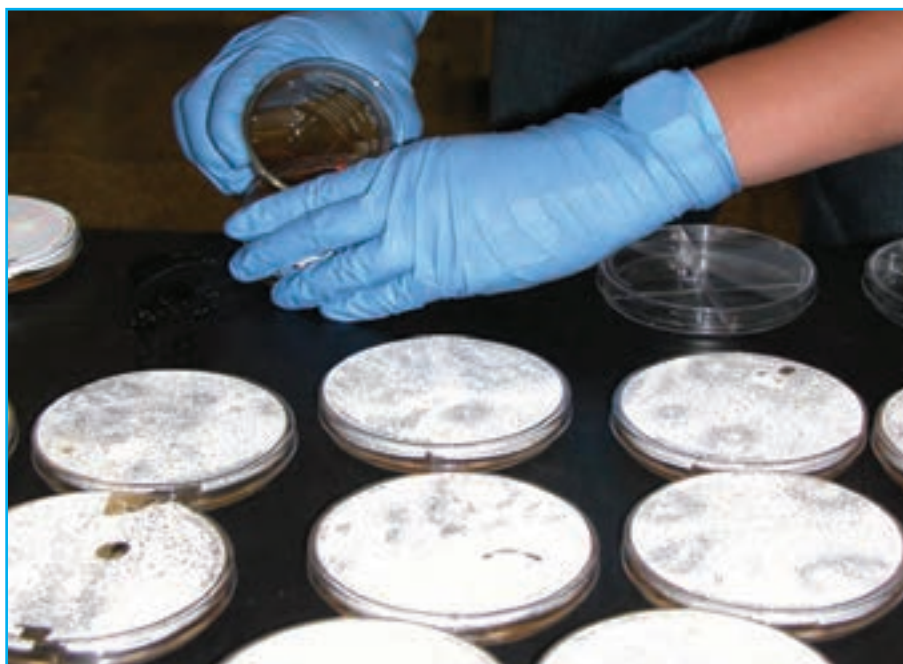
انتقال باکتری از محیطی به محیط دیگر، معمولاً با سوزن کشت با نوک حلقه‌ای (لوپ^۱) یا آنس و یا توسط پی پت صورت می‌گیرد. برای کشت باکتری در محیط مایع :

- ۱- لوپ را در دست راست و طوری روی شعله بگیرید تا سرخ رنگ شود. گرم کردن لوپ باید تدریجی باشد، زیرا دمای زیاد باعث می‌شود باکتری به اطراف و یا به صورت آزمایش کننده پاشیده شود.
- ۲- چند ثانیه صبر کنید تا لوپ سرد شود.
- ۳- محیط حاوی باکتری (لوله یا پلیت) را در دست چپ بگیرید و درپوش لوله آزمایش محتوی باکتری را توسط انگشت کوچک و کف دست بردارید و تا پایان کار آن را در همین حالت داشته باشید (هرگز نباید در پوش را روی میز قرار داد).
- ۴- دهانه لوله آزمایش را مقابل شعله نگاه دارید. برداشت میکروب باید در نزدیکی شعله انجام شود. دهانه لوله را چند بار از روی شعله عبور دهید تا سترون شود، دقت کنید درب لوله را بیش از حد باز نگه ندارید. پس از برداشت، دهانه لوله آزمایش را کمی حرارت دهید و درپوش آن را بگذارید.
- ۵- لوله حاوی محیط کشت را در دست چپ بگیرید و دهانه آن را روی شعله سترون کنید.
- ۶- نوک آنس آلوده به باکتری مورد نظر را داخل محیط فرو ببرید و به آرامی تکان دهید تا باکتری‌ها در محیط پخش شوند، در مواردی که باکتری را از محیط کشت جامد برمی‌دارید، با نوک آنس کمی از برگنه را بردارید و با رعایت مواردی که گفته شد آن را داخل محیط مایع فرو ببرید و به آرامی هم بزنید تا همگن شود.
- ۷- دهانه لوله را مجدداً با شعله سترون کنید و درب آن را بگذارید.
- ۸- پس از پایان کشت، آنس را روی شعله سترون کنید و آن را در جای خود قرار دهید.
- ۹- محیط کشت را در گرم‌خانه قرار دهید.

روش تهیه محیط کشت جامد پیش ریخته

متناسب با باکتری‌ها و آزمایش‌های مورد نظر، می‌توان محیط‌های کشت جامد را در پلیت، لوله یا در ظروف دیگر تهیه کرد. اگر حجم زیادی از محیط کشت جامد پیش ریخته مورد نیاز است باید از چند ارلن کوچک به جای یک ارلن بزرگ استفاده کرد، این عمل باعث سهولت تقسیم محیط کشت در پلیت‌ها می‌شود. برای توزیع در پلیت باید دمای محیط کشت حدود ۴۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد باشد (اگر دما بالاتر باشد بخار زیادی روی درب پلیت جمع می‌شود). بهترین راه برای حفظ این دما، استفاده از بن ماری ۵۰ درجه است. بهتر است توزیع محیط کشت در پلیت‌ها زیر هود بیولوژیک انجام شود.

در صورت استفاده از میز آزمایشگاه، قبل از انجام کار باید میز را با ساولون ضد عفونی کرد (شکل ۵۹-۲). چنانچه تعداد پلیت‌ها کم باشد، یک شعله روی میز کار کافی است و اگر تعداد پلیت‌ها زیاد باشد آن‌ها را بین دو شعله می‌چینند، به طوری که درب آن‌ها رو به بالا باشد. با رعایت شرایط سترون، مقدار ۱۵ تا ۲۰ میلی لیتر از محیط کشت در پلیت‌های سترون ریخته می‌شود. پس از ریختن محیط در پلیت‌ها درب آن‌ها را می‌گذارند و روی میز کار قرار می‌دهند. بعد از بسته شدن آگار می‌توان پلیت‌ها را وارونه کرد تا سرد شوند. پلیت‌های آماده شده را می‌توان درون کیسه پلاستیکی قرار داده و درب کیسه را محکم بست و سپس در یخچال نگهداری کرد.



شکل ۵۹-۲ توزیع محیط کشت در پلیت در روی میز کار آزمایشگاه

کشت بر روی محیط جامد پیش ریخته در پلیت

کشت بر روی محیط جامد پیش ریخته در پلیت به سه صورت انجام می‌شود (شکل ۶۰-۲) :

کشت خطی بر روی سطح محیط جامد : با این روش می‌توان باکتری را به طور خطی توسط آنس بر روی سطح محیط جامد کشت داد. به این ترتیب که ابتدا به وسیله یک آنس سترون شده مقداری از پرگنه باکتری را برمی‌دارند و آن را روی سطح محیط به صورت خط‌های موازی و در چند جهت می‌کشند.



شکل ۶۰-۲ کشت پلیت حاوی محیط جامد در زیر هود بیولوژیک

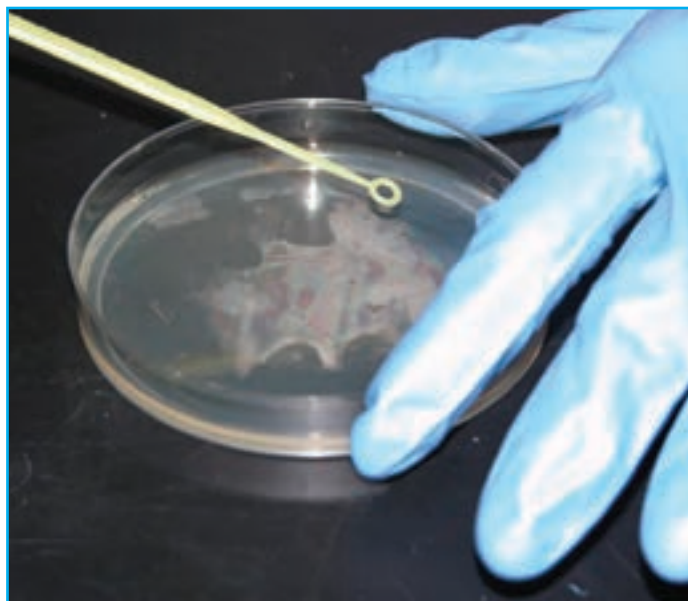
در کشت‌های خطی برای به دست آوردن کلنی‌های تک می‌توان پلیت را به چهار قسمت تقسیم کرد. در قسمت اول ابتدا نوک لوپ را که محتوی پرگنه باکتری است به صورت خط‌های موازی و تقریباً روی هم می‌کشند و بعد خطوط را در قسمت دوم از انتهای خطوط منطقه اول در جهت دیگر ادامه می‌دهند. در منطقه سوم و چهارم هم به همین صورت عمل می‌کنند. خصوصیت این روش این است که وقتی خطوط موازی روی سطح محیط کشیده می‌شوند از تراکم باکتری‌ها کاسته می‌شود و در منطقه دیگر، وقتی از انتهای خط منطقه قبلی استفاده می‌شود در واقع تراکم بسیار کمتری از باکتری‌ها وجود دارد. به این ترتیب در منطقه آخر می‌توان «پرگنه‌های تک» داشت (شکل ۶۱-۲)، که پرگنه خالص نامیده می‌شوند. پس از گرم‌خانه‌گذاری می‌توان پرگنه‌های

رشد یافته بر سطح محیط کشت را مشاهده کرد. برای انجام کشت خطی از مایعات، فقط یک بار آنس را داخل لوله محتوی باکتری می کنند و آن را روی محیط پیش ریخته قرار می دهند. سپس مراحل فوق انجام می شود.

کشت در سطح محیط جامد : روش کشت سطحی بیشتر برای مایعات، مانند شیر یا آب مشکوک به آلودگی، کاربرد دارد. در این روش با استفاده از پی پت سترون، مقدار مشخص از رقت معینی از باکتری را بر روی سطح محیط جامد می ریزند و با کمک آنس یا میله مخصوص آن را کاملاً در سطح محیط پخش می کنند (شکل ۶۲-۲). باید توجه داشت که هنگام انجام این کشت، سطح محیط خشک باشد.



شکل ۶۱-۲ کشت خطی بر روی محیط جامد و ظهور کلنی های تک از باکتری



شکل ۶۲-۲ پخش کردن مایع روی سطح محیط کشت

کشت آمیخته^۱: در این روش میزان یک میلی لیتر از کشت مایع باکتری را در کف پلیت سترون می ریزند و ۲۰-۱۵ میلی لیتر از محیط کشت مورد نظر، که قبلاً سترون شده و حرارت آن به حدود ۴۵ درجه سانتی گراد رسیده است، اضافه می کنند. مایع و محیط کشت با حرکات دورانی (به صورت عدد ۸ انگلیسی) کاملاً با هم مخلوط می شوند. در صورت لزوم باکتری را با لایه نازکی از همان محیط کشت می پوشانند که در این حالت به آن کشت دولایه^۲ گفته می شود.

۱- Pour plate

۲- Bilayer culture

کشت جامد در لوله

کشت عمقی یا عمودی^۱: حدود ۵ تا ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت را در لوله آزمایش می ریزند و به طور عمودی قرار می دهند تا آگار ببنند و محیط کشت سرد شود. سپس توسط سوزن کشت یا آنس نوک تیز سترون شده در کنار شعله، از پرگنه باکتری مقداری را برمی دارند و آن را به صورت عمودی در مرکز این محیط تا انتها فرو می برند. آنس باید بدون هیچ گونه تغییر حالتی از همان مسیر خارج شود. ویژگی این گونه محیط های کشت تقسیم بندی باکتری ها براساس نیازمندی به اکسیژن و چگونگی رشد آن هاست. در انتهای محیط کشت درون لوله، میزان اکسیژن کمتر از قسمت سطحی آن است. چنانچه باکتری هوازی باشد رشد آن در قسمت سطحی بیشتر است و اگر بی هوازی باشد رشد آن در قسمت عمقی بیشتر خواهد بود. نمونه کشت عمودی، محیط کشت SIM^۲ است. با استفاده از این محیط می توان سه خصوصیت مختلف باکتری، یعنی تولید هیدروژن سولفور، تولید اندول و حرکت را به طور هم زمان ارزیابی کرد. سیاه شدن محیط نشانه تولید گاز هیدروژن سولفور توسط باکتری و واکنش آن با سولفات آهن و در نتیجه تشکیل رسوب سیاه رنگ سولفور آهن است. تولید اندول توسط باکتری، با افزودن معرف کواکس^۳



و کلروفرم به محیط و ظهور رنگ ارغوانی در سطح کشت قابل ردیابی است (شکل ۶۳-۲). باکتری های دارای آنزیم تریپتوفاناز^۴ قادرند طی سری واکنش های شیمیایی، تریپتوفان موجود در پپتون محیط را اکسید کنند و اندول استیک تولید نمایند. نیمه جامد بودن محیط اجازه پخش شدن و در نتیجه کدر نمودن محیط را به باکتری های متحرک می دهد. باکتری های فاقد حرکت فقط مسیر خط کشت را کدر می کنند. در صورتی که باکتری کشت شده متحرک باشد و هیدروژن سولفور نیز تولید کند، رنگ سیاه در محل رشد باکتری پخش می شود.

شکل ۶۳-۲ تولید هیدروژن سولفور، تولید اندول و نبودن حرکت در محیط SIM

کشت شیب دار^۵: حدود ۵ میلی لیتر از محیط کشت جامد ذوب شده در لوله آزمایش ریخته می شود و پس از سترون کردن، لوله ها را به صورت کج به گونه ای می خوابانند که سطح محیط کشت شیب دار باشد. باکتری مورد نظر را با سوزن کشت در عمق و سطح محیط یا به وسیله آنس در سطح شیب دار کشت می دهند. با آنس نوک تیز با حفظ شرایط سترون از پرگنه باکتری برمی دارند و در کنار شعله، نوک آنس را ابتدا به صورت عمودی وارد قسمت عمودی محیط کشت می کنند و بعد به آرامی آن را از همان مسیر خارج می سازند. سپس بدون این که نوک آنس از محیط جدا شود آن را به حالت زیگزاک روی سطح شیب دار می کشند. این روش برای تشخیص سویه های باکتری ویژگی فوق العاده ای است. مثلاً ممکن است در کشت یک نوع باکتری، رنگ قسمت عمودی محیط کشت تغییر کند که نشانه بی هوازی یا بی هوازی اختیاری بودن باکتری است. اگر باکتری فقط در قسمت شیب دار رشد نماید و رنگ آن قسمت تغییر می کند، که نشانه هوازی بودن آن است. نمونه آن محیط سه قندی آهن دار^۶ است. این محیط افتراقی برای شناسایی باسیل های گرم منفی براساس توانایی تخمیر قندهای لاکتوز، گلوکز، سوکروز و نیز تولید گاز SH_2 به کار می رود. در نتیجه احیای تیوسولفات سدیم، SH_2 تولید می شود. این گاز با سولفات آمونیوم فریک محیط ترکیب می شود و رسوب سیاهی را ایجاد می کند. تخمیر قندها با تغییر رنگ معرف فتل رد نشان داده می شود (شکل ۶۴-۲).

۱- Stab culture

۲- Sulfide – Indol – Motility

۳- Kovacs

۴- Tryptophanase

۵- Slant (slope) culture

۶- Triple Sugar Iron agar (TSI)



لوله شماره ۱: باکتری تخمیرکننده گلوکز و نیز لاکتوز و سوکروز مقدار زیادی اسید تولید کرده و رنگ محیط را زرد کرده است. تولید گاز همراه با ایجاد ترک و حباب در محیط است.

لوله شماره ۲: مواد قلیایی در اثر دکربوکسیلاسیون اکسیداتیو پپتون تولید شده و مقدار کم اسید تولید شده در سطح را خنثا کرده است. بنابراین بالای لوله، قرمز و ته آن زرد است.

لوله شماره ۳: باکتری کشت داده شده قادر است گاز SH_2 تولید کند.

لوله شماره ۴: تغییر نکردن رنگ محیط نشان دهنده تخمیر نشدن قندهاست که در این صورت احتمالاً باکتری آنروباکتریاسه نیست.

شکل ۶۴-۲ واکنش های بیوشیمیایی در محیط سه قندی آهن دار

تعیین تعداد باکتری ها

برای تعیین تعداد باکتری روش های متعددی وجود دارد، مانند شمارش کلنی و کدورت سنجی. روش کدورت سنجی از ساده ترین روش های تعیین تعداد باکتری ها در محیط مایع حاوی باکتری است. برای سنجش کدورت سوسپانسیون می توان کدورت آن را توسط دستگاه کدورت سنج^۱ اندازه گیری کرد، سپس آن را با جداول مربوطه مقایسه و تعداد باکتری ها را اعلام نمود. می توان کدورت را با استفاده از لوله های کدورت استاندارد (روش مک فارلند^۲) و به طور چشمی مقایسه کرد. برای این منظور، براساس جدول زیر لوله های مک فارلند را با مخلوط کردن مقادیر متفاوت از اسید سولفوریک ۱ درصد و کلرید باریم ۱ درصد تهیه کنید. لوله مورد آزمایش را در کنار هر یک از ده لوله استاندارد قرار دهید و میزان کدورت آن ها را با هم مقایسه کنید.

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
کلرید باریم (ml)	۰/۱	۰/۲	۰/۳	۰/۴	۰/۵	۰/۶	۰/۷	۰/۸	۰/۹	۱
اسید سولفوریک (ml)	۹/۹	۹/۸	۹/۷	۹/۶	۹/۵	۹/۴	۹/۳	۹/۲	۹/۱	۹
تعداد تقریبی باکتری	۳	۶	۹	۱۲	۱۵	۱۸	۲۱	۲۴	۲۷	۳۰

رنگ های مورد استفاده در آزمایشگاه باکتری شناسی

رنگ های حیاتی مورد استفاده در آزمایشگاه باکتری شناسی در سه گروه طبقه بندی می شوند:

الف) رنگ های اسیدی: رنگ های اسیدی آنیونی و دارای کروموزن منفی هستند و با قسمت هایی از سلول که دارای بار مثبت اند، مانند پروتئین ها، ترکیب می شوند. از این رنگ ها می توان به اسید پیریک، قرمز کنگو و فوشین اسیدی اشاره کرد.

۱- Turbidometer

۲- Mac Farland nephelometry standard

ب) رنگ‌های بازی : این رنگ‌ها کاتیونی و دارای کروموژن مثبت‌اند و با قسمت‌هایی از سلول که دارای بار منفی هستند، مانند DNA و RNA، ترکیب می‌شوند. از این رنگ‌ها می‌توان به متیلن بلو، کریستال ویوله، سافرانین و تولوئیدین بلو اشاره کرد.

پ) رنگ‌های خنثا : این رنگ‌ها فاقد بار الکتریکی‌اند و با قسمت‌هایی از سلول که فاقد بار هستند ترکیب می‌شوند، مانند رنگ سودان سیاه که برای رنگ‌آمیزی دانه‌های چربی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

انواع رنگ‌آمیزی در باکتری‌ها

رنگ‌آمیزی ساده : برای مشاهده شکل، آرایش و ریخت‌شناسی سلول باکتری به کار می‌رود. در این نوع رنگ‌آمیزی ترجیحاً از یک رنگ بازی استفاده می‌شود که براساس تبادل بارهای مثبت و منفی و برقراری یک اتصال یونی بین مولکول‌ها عمل می‌کند. چون سطح سلول باکتری به سبب تجزیه گروه‌های کربوکسیل حاصل از تجزیه اسیدهای آمینه و یا به دلیل تجزیه اسیدهای ریبونوکلئیک در سیتوپلاسم، دارای بار منفی است بین بارهای مثبت و منفی جاذبه ایجاد می‌شود و سطح سلول باکتری رنگ می‌گردد.

رنگ‌آمیزی افتراقی : برای مشاهده ساختمان‌های مختلف باکتری، افتراق ترکیب دیواره سلولی، مشاهده کپسول، اسپور و... در آزمایشگاه به کار برده می‌شود.

روش تهیه گستره باکتری روی لام برای انجام رنگ‌آمیزی

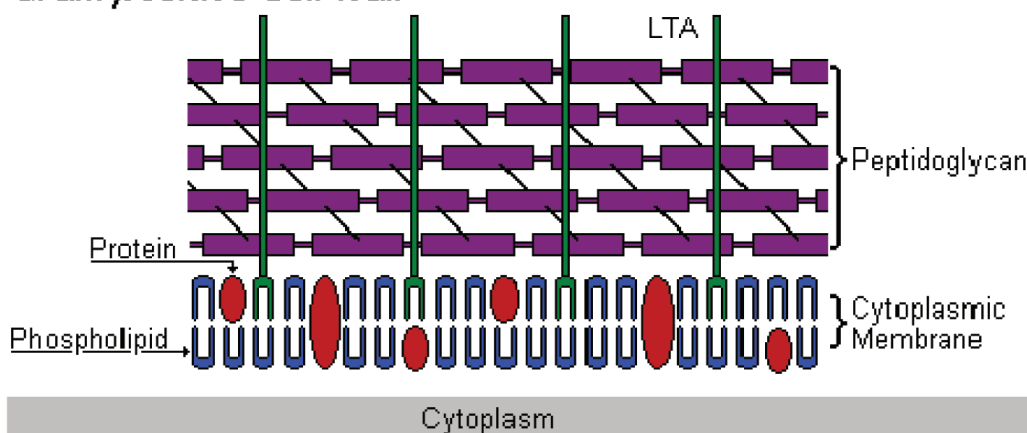
برای رنگ‌آمیزی باکتری‌ها، ابتدا باید یک گستره میکروبی از باکتری مورد آزمایش تهیه کرد. برای این کار :

- ۱- یک لام تمیز بردارید و یک قطره آب مقطر روی آن بریزید.
- ۲- با استفاده از نوک آنس که آن را با شعله سترون کرده‌اید، مقداری از پرگنه باکتری را کنار شعله از روی محیط کشت بردارید و در یک قطره آب روی سطح لام پخش کنید. در صورتی که باکتری درون محیط مایع کشت شده است به قطره آب نیازی نیست. می‌توانید با آنس نوک گرد، حجمی از باکتری رشد کرده در محیط مایع را بردارید و آن را روی سطح لام پخش کنید.
- ۳- صبر کنید تا لام در مجاورت جریان هوا خشک شود.
- ۴- گستره روی لام را با استفاده از حرارت ثابت کنید. یعنی لام را چند بار از روی حرارت شعله عبور دهید تا گستره روی لام ثابت گردد و به هنگام رنگ‌آمیزی از روی لام کنده نشود.

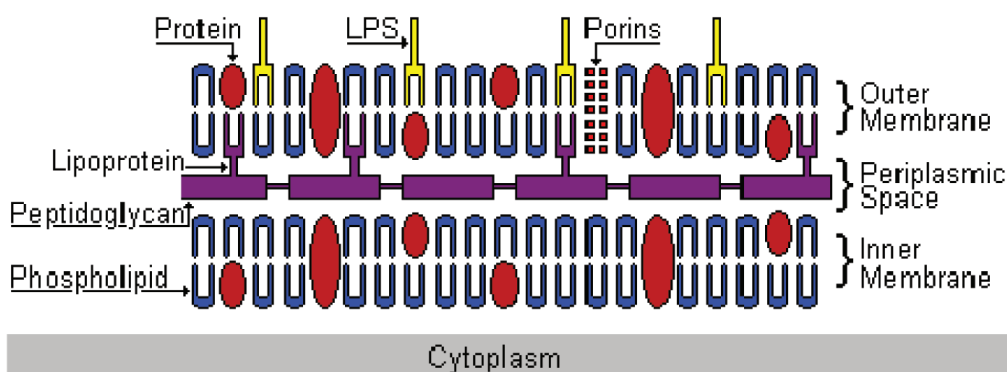
تقسیم‌بندی باکتری‌ها براساس رنگ‌آمیزی دیواره سلولی

باکتری‌ها را می‌توان بر اساس نوع واکنش آن‌ها در روش رنگ‌آمیزی گرم، که مربوط به دیواره سلولی آن‌هاست، به دو گروه بزرگ تقسیم نمود. باکتری‌هایی که در روش رنگ‌آمیزی گرم به رنگ بنفش در می‌آیند گرم مثبت و آن‌هایی که رنگ قرمز به خود می‌گیرند گرم منفی نامیده می‌شوند. این فرآیند به افتخار متخصص بافت‌شناسی کریستین گرم^۱ نام‌گذاری شد. اگرچه هر دو گروه یعنی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارای دیواره سلولی هستند ولی فرق بین این دو گروه مربوط به خواصی است که در ساختمان این دیواره وجود دارد (شکل ۶۵-۲).

Gram-positive Cell Wall



Gram-negative Cell Wall



شکل ۶۵-۲ نمایش تفاوت دیواره سلولی در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

باکتری گرم مثبت واجد دیواره سلولی تک‌لایه و ضخیم با قطری حدود ۲۰ تا ۸۰ نانومتر است. در ساختار دیواره سلولی این باکتری‌ها هتروپلیمر اسید تیکوئیک^۱ وجود دارد که باکتری‌های گرم منفی فاقد آن هستند. دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت از لایه ضخیمی از پلی ساکارید پپتیدوگلیکان^۲ تشکیل شده است که در باکتری‌های گرم منفی ضخامت آن به حداقل می‌رسد. در دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی مقدار چربی بیشتری به کار رفته است. خارج دیواره سلولی باکتری گرم منفی به وسیله غشای خارجی^۳ احاطه می‌شود. بین غشای خارجی و دیواره سلولی فضایی وجود دارد که فضای پری پلاسمیک^۴ نامیده می‌شود. در فضای پری پلاسمیک، سموم و آنزیم‌های باکتری با غلظت زیادی تجمع یافته‌اند. این سموم و آنزیم‌ها روی اجزای سلول باکتری تأثیر ندارند و فقط موادی را هضم می‌کنند که برای باکتری مضر است. اساس ساختمان در پپتیدوگلیکان از واحدهای تکرار شونده پلی ساکاریدهای ان-استیل گلوکزآمین^۵ و ان-استیل مورامیک اسید^۶ ساخته شده است (شکل ۶۶-۲).

در رنگ‌آمیزی به روش گرم، براساس این تفاوت مهم در دیواره سلولی از دو نوع رنگ استفاده می‌شود. زمانی که رنگ اول یا محلول کریستال ویوله بر روی گستره باکتری ریخته می‌شود، رنگ با ریبونوکلیئات موجود در دیواره سلولی ترکیب می‌گردد و کمپلکس کریستال ویوله - ریبونوکلیئات را به وجود می‌آورد. با افزودن محلول ید که ترکیبی فلزی است، ید به کمپلکس رنگ متصل می‌شود و

۱- Teichoic acid

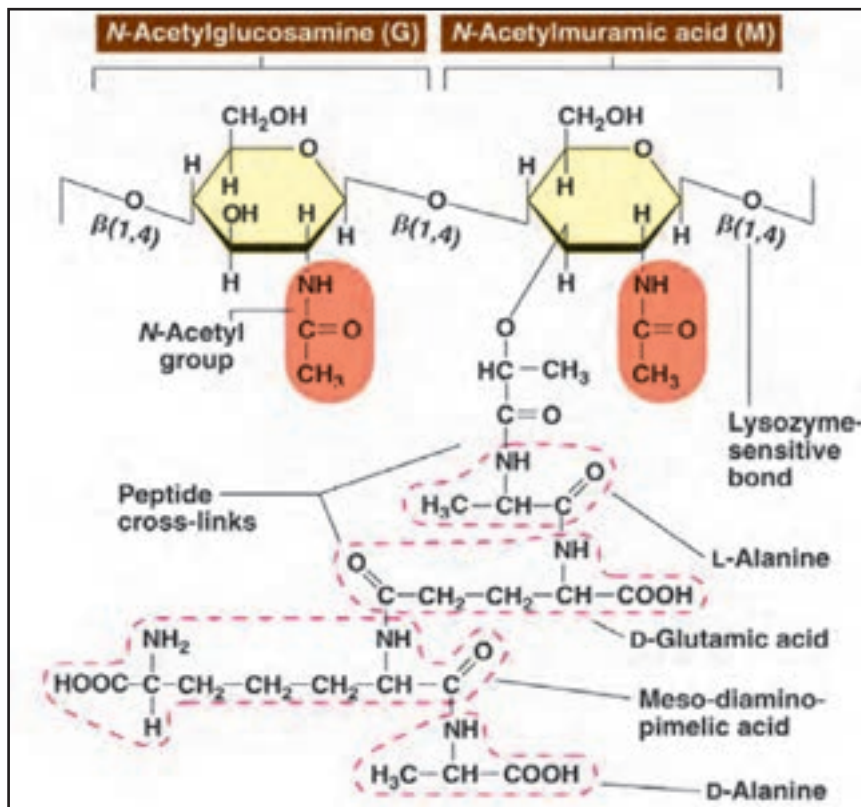
۲- Peptidoglycan

۳- Outer membrane

۴- Periplasmic space

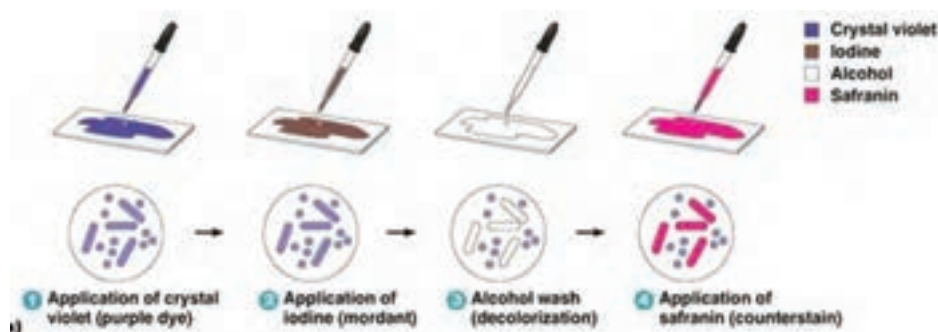
۵- N - Acetylglucosamine

۶- N - Acetylmuramic acid



شکل ۶۶-۲ واحدهای تکرار شونده پلی ساکاریدی پپتیدوگلیکان

ترکیب رنگی نامحلول کریستال ویوله - ید - ریونوکلئات را ایجاد می کند. این پیوند در باکتری های گرم مثبت بسیار پایدار است و در مرحله بعد توسط ماده رنگ بر (الکل - استن) شکسته نمی شود و رنگ بنفش کریستال ویوله را در خود حفظ می کند. در نتیجه زیر میکروسکوپ باکتری های گرم مثبت به رنگ بنفش دیده می شوند. در باکتری های گرم منفی این کمپلکس ایجاد نمی شود. از طرف دیگر در دیواره سلولی باکتری های گرم منفی مقدار چربی بیشتری به کار رفته است. چربی ها در الکل استن محلول اند و در اثر شستشو با حلال رنگ بر، چربی ها از دیواره سلولی خارج می گردد و رنگ کریستال ویوله هم از سطح باکتری خارج می شود. این امر باعث بی رنگ شدن سریع باکتری های گرم منفی می شود. بنابراین بعد از افزوده شدن رنگ دوم (سافرانین یا فوشین)، این رنگ به دیواره سلولی باکتری های گرم منفی جذب می شود (شکل ۶۷-۲). در بررسی میکروسکوپی، باکتری های گرم منفی به رنگ قرمز دیده می شوند.



شکل ۶۷-۲ مراحل شماتیک رنگ آمیزی گرم در باکتری

نکات مهم در مراحل رنگ آمیزی گرم

- ۱- حرارت بیش از اندازه برای ثابت کردن گستره باعث پاره شدن دیواره سلولی باکتری می شود. بنابراین باکتری گرم مثبت رنگ کریستال ویوله را هنگام رنگ بری از دست می دهد و رنگ ثانویه را جذب می کند. در نتیجه باکتری گرم مثبت، به صورت گرم منفی دیده می شود.
- ۲- اگر گستره ضخیم باشد، ممکن است در مرحله رنگ بری به درستی رنگ نشود و این امر سبب بروز خطا در تشخیص گرم منفی یا گرم مثبت بودن باکتری خواهد شد.
- ۳- رنگ بری بیش از اندازه ممکن است باعث پاره شدن دیواره باکتری گرم مثبت شود، در نتیجه باکتری با از دست دادن رنگ کریستال ویوله رنگ ثانویه را جذب می کند و به صورت گرم منفی دیده می شود.
- ۴- هنگام تهیه گستره روی لام، سن کشت باکتری نباید از ۲۴ ساعت بیشتر باشد، زیرا در محیط کشت های کهنه قابلیت نفوذ دیواره سلولی باکتری دستخوش تغییراتی می شود که خاصیت گرم مثبت بودن را از دست می دهد.
- ۵- غلظت درست و تازه بودن رنگ ها در کیفیت رنگ آمیزی مؤثر است.

خصوصیات باکتری های گرم مثبت و گرم منفی

- ۱- باکتری های گرم مثبت نسبت به پنی سیلین و مواد ضد باکتریایی حساس تر از باکتری های گرم منفی هستند.
- ۲- گرم منفی سخت رشدترند و نیازهای غذایی پیچیده تری نسبت به باکتری های گرم مثبت دارند.
- ۳- باکتری های گرم منفی نسبت به مواد اسیدی و قلیایی قوی و آنزیم لیزوزیم حساس ترند. بنابراین پاره شدن دیواره سلولی و متلاشی شدن آن ها آسان تر از باکتری های گرم مثبت انجام می شود.
- ۴- خاصیت گرم مثبت بودن یک باکتری در شرایط دشوار محیطی مانند کمبود مواد غذایی در کشت های کهنه، از بین می رود اما خاصیت گرم منفی بودن تحت هیچ شرایطی از بین نمی رود. به هنگام تشخیص باید به این نکته هم توجه داشت که در لام رنگ آمیزی شده برای باکتری گرم مثبت، ممکن است باکتری های گرم منفی هم دیده شود، اما در لام رنگ شده از کشت خالص یک باکتری گرم منفی هرگز باکتری های گرم مثبت دیده نمی شوند.



۱- تفاوت‌های استافیلوکوک‌ها و کوکسی‌ها را توضیح دهید.

کوکسی‌ها باکتری‌های کروی شکل‌اند و هرگاه این باکتری‌ها در کنار هم قرار گیرند و به شکل خوشه دیده شوند به آن‌ها استافیلوکوک گویند.

۲- واژه‌های زیر را تعریف کنید.

اسپریل: باکتری‌های مارپیچی شکل را اسپریل گویند.

پروتوپلاست: محتویات داخل سلول را پروتوپلاست گویند.

مرحله رشد لگاریتمی: مرحله‌ای از رشد باکتری‌هاست که با سرعت صورت می‌گیرند و در طی آن باکتری‌ها به سرعت افزایش می‌یابند. این مرحله ۵ تا ۸ ساعت به طول می‌انجامد.

باکتری‌های مزوفیل: باکتری‌هایی است که در درجه حرارت معتدل فعالیت نمایند.

فتواتوتروف: موجوداتی است که دارای رنگدانه‌اند و می‌توانند از انرژی خورشید استفاده نمایند.

۳- تمام یون‌های فلزی مورد نیاز را می‌توان به شکل نمک‌های کاتیونی غیرآلی و به صورت غذا در اختیار میکروارگانیسم‌ها قرار داد.

۴- تقسیم دوتایی باکتری‌ها را توضیح دهید.

در شرایط مساعد از نظر مواد غذایی، دما و مواد گازی اندازه باکتری افزایش می‌یابد و سپس به دو سلول مشابه تقسیم می‌شود و تا وقتی که شرایط مساعد باشد، این دو سلول می‌توانند مانند سلول والد رشد کنند و با همان سرعت تقسیم شوند. تکثیر باکتری‌ها معمولاً از راه تقسیم دوتایی صورت می‌گیرد و چگونگی افزایش آن‌ها تابع تصاعد هندسی است.

۵- مراحل مختلف تشکیل اسپور در باکتری را شرح دهید.

بعضی از باکتری‌ها وقتی در وضعیت کم غذایی یا در شرایط نامطلوب قرار می‌گیرند، پوسته‌ای سخت به دور خود ترشح می‌کنند و به حالتی درمی‌آیند که به آن اسپور می‌گویند. اسپورها نسبت به شرایط نامساعد، نظیر دمای بالا، تشعشع و وجود مواد شیمیایی از قبیل ضد عفونی‌کننده‌ها بسیار مقاوم‌اند.

اسپورها در پاسخ به کمبود مواد غذایی طی فرآیند پیچیده اسپورزایی شکل می‌گیرند و پس از تکمیل شدن به یک سلول باکتری تبدیل می‌شوند.



۶- نحوه انتقال بیماری سی-آر-دی چگونه است ؟

بیماری از طریق مادران آلوده و تخم مرغ به جنین و در نتیجه جوجه‌ها انتقال می‌یابد. هم‌چنین بیمار از طریق تماس مستقیم طیور آلوده و همین‌طور گرد و خاک، هوای آلوده، تهویه نادرست و ترشحات مرغان انتقال می‌یابد.

۷- علایم بیماری سل در دام‌ها را نام ببرید.

در دام‌های مبتلا به سل سرفه‌های کوتاه و دردناک، لاغری، کاهش اشتها، نشخوار نامنظم، بالا رفتن درجه حرارت، تورم غدد لنفاوی و گاهی نفخ شکم مشاهده می‌شود.

۸- تشعشعات یونیزه کننده را نام ببرید.

شامل اشعه ایکس، بتا و گاما و غیر آن‌هاست.

۹- محیط‌های کشت نیمه جامد را شرح دهید.

محیط‌های کشتی هستند مابین مایع و جامد. گرچه آن‌ها شبیه محیط‌های کشت جامدند و مواد سفت‌کننده‌ای مانند آگار و ژلاتین را در برمی‌گیرند و به دلیل کم بودن ماده سفت‌کننده در آن‌ها، حالت ژله‌ای دارند. این محیط‌های کشت، برای تشخیص باکتری‌های خاص متحرک به‌کار می‌روند.