بسم الله الرحمن الرحیم

گزارش کار ازمایشگاه میکروبیولوژی جلسه دوم

موضوع: آماده سازی محیط های کشت

هدف: آماده سازی محیط های کشت استریل جهت تامین نیازمندی های غذایی برای رشد باکتری ها

مواد لازم:

- ظروف های حاوی پودر آماده محیط کشت
- ترازو
- ظروف یا کاغذ برای وزن کردن پودر محیط کشت
- اسپاتول یا کاردک
- دستگاه هم زن مغناطیسی یا گرمکن
- آهن ربا برای دستگاه هم زن مغناطیسی
- pH متر یا کاغذ سنجش pH
- HCl و NaOH یک نرمال
- آب مقطر یا آب بدون یون
- ارلن یا بشر شیشه ای بزرگ
- لوله آزمای شیشه ای ۱۶*۱۵۰ nm
- وسیله ای برای بستن در لوله آزمایش (نظیر در پوش های فشاری، پیچی یا پنبه ای)
- سبد یا جای لوله آزمایش

❖ پلیت یا پتری دیش های پلاستیکی یا شیشه ای

محیط کشت

کشت و تکثیر باکتریها در محیطهای مصنوعی از مهمترین روشهای تشخیصی در باکتر ی شناسی است. برای کشت موفق باید شرایط مناسب برای رشد باکتری فراهم گردد. ازجمله این شرایط مواد غذایی - نمک- PH مناسب- حضور یاعدم حضوراکسیژن-منبع کربن-منبع نیتروژن- حرارت و رطوبت کافی می باشد .

امروزه کشت باکتریها اغلب برروی محیطهای کشت مصنوعی صورت میگیرد. محیطهای کشت علاوه برتامین نیازهای غذایی و بسیاری نیازهای دیگر دارای ترکیباتی هستند که در تشخیص وشناسایی باکتریها نیزموثرند. زمانی که غلظت میکروارگانیسمها کم باشد با انجام کشت میتوان تعداد آنها را افزایش داد.

- **انواع محیط کشت**

محیط های کشتی که در میکروب شناسی به کار برده می شوند انواع مختلف دارند و آنها را می توان از جنبه های گوناگون از جمله حالت و از نظر متمایز سازی تقسیم بندی کرد.

✓ **انواع محیط کشت از نظر حالت**

۱-محیط کشت جامد:(Solid)

این محیط کشت دارای پسوند آگار می باشد چرا که به نسبت ۲ تا ۳ درصد حاوی آگار بوده و همین میزان آگار می تواند باعث جامد شدن یک محیط کشت جامد گردد.آگار تجارتی ماده خشک است شبیه سلولز که اگر در آب سرد ریخته شود باد می کند و اگر بجوشد کاملا حل می شود در عین حال در کمتر از ۴۵ درجه سانتی گراد به حالت جامد درمی آید.آگار به حد کافی مواد غذایی ندارد و باید آن را با مواد غذایی دیگر مخلوط کرده و مورد استفاده قرار داد نوترینت آگار مثالی از یک محیط کشت جامد است.

۲- محیط کشت نیمه جامد:(semisolid)

این نوع محیط کشت به وسیله اضافه کردن ۱ تا ۱/۵ درصد آگار به محیط کشت بدست می آید. مایع کشت دارای پسوند مدیوم (medium) می باشد مثل(SIM (sulfide-Indol-Motility مدیوم که از آن می توان برای بررسی حرکت باکتری ها استفاده کرد.

۳- محیط کشت مایع: (Fluid)

این نوع محیط کشت دارای پسوند براث (Broth) است و حالت جامد یا ژله ای ندارد از این نوع محیط می توان نوترینت براث را نام برد.

- ✓ **انواع محیط کشت از نظر متمایز سازی:**

محیط های کشت مختلف برای تشخیص و جداسازی باکتری ها به کار می روند بر چهار نوع اند:

۱-محیط های کشت عمومی(ساده):

این محیط ها دارای کلیه مواد لازم جهت رشد باکتری ها هستند و به علت نداشتن مواد ضد میکروبی تقریبا تمام باکتری ها می توانند در آن رشد کنند.محیط کشت نوترینت آگار از این نوع محیط کشت است.

۲-محیط های کشت غنی شده:

این محیط ها به واسطه اضافه کردن خون یا سرم به محیط های کشت ساده فراهم می شوند.این محیط ها می توانند رشد یک سری باکتری های پر نیاز را فراهم کنند مثل محیط بلاد آگار یا سرم لفلر که مورد اخیر جهت کشت باسیل دیفتری به کار می رود.

۳-محیط های کشت افتراقی:

این محیط ها به علت داشتن یک سری مواد ویژه و در عین حال ضد میکروبی باعث تمایز برخی از باکتری ها می شوند مانند محیط ائوزین متیلن بلو (E.M.B)و مک کانکی که حاوی لاکتوز و معرف های شیمیایی هستند و به همین علت باعث تمایز باکتری هایی می شوند که لاکتوز را تخمیر می کنند.همچنین محیط هایی مثل سلینت F و تتراتیونات براث وجود دارند که رشد باکتری سالمونلا را در نمونه مدفوع افزایش داده و از رشد دیگر باکتری ها جلوگیری می نمایند.

۴-محیط های کشت اختصاصی (انتخابی):

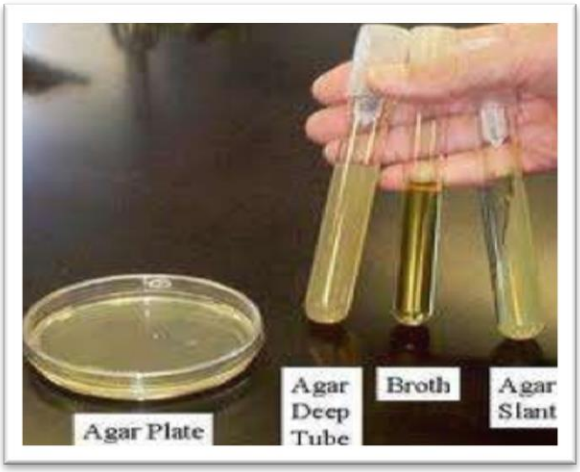
این محیط ها فقط برای رشد باکتری های ویژه ای مناسبند مثلا در محیط کشت مانیتول سالت آگار (Manitol Salt Agar)که دارای قند مانیتول و مقدار زیادی نمک ۷/۵ درصد است فقط باکتری هایی قادر به رشد هستند که اولا مانیتول را تخمیر کنند ثانیا در مقابل غلظت زیاد نمک طعام مقاوم باشند مانند باکتری استافیلوکوک بیماری زا که این توانایی را داراست.

- **اصول تهیه و آماده سازی کامل محیط کشت:**

امروزه اکثر محیط های کشت مورد استفاده در میکروب شناسی به صورت پودرهای آماده وجود دارند که برای تهیه آنها باید طبق دستور مقدار معینی از هر محیط کشت را با مقدار مناسبی آب مقطر مخلوط کرد.برای این منظور:

- ✓ مقداری از پودر محیط کشت را وزن نمایید.
- ✓ پودر محیط کشت وزن شده را به حجم مشخصی از آب مقطر یا آب بدون یون اضافه کنید. گنجایش ارلن یا بشر باید حداقل دو برابر حجم آب مورد استفاده باشد. و مقدار پودر مشخص شده را به تدریج در آن وارد می کنیم و هم می زنیم تا پودر گلوله نشود و به طور یکنواخت حل گردد.

- ✓ بر اساس مشخصات نوشته شده بر روی ظرف پودر محیط کشت، pH محیط کشت را با افزودن قطره هایی از کلریدریک اسید یا سدیم هیدروکسید یک نرمال تنظیم نمایید. برای این کار از دستگاه pH متر استفاده کنید.



❖ **آماده سازی لوله های حاوی محیط کشت مایع:(Broth)**

۱- بعد از حل شدن پودر محیط کشت، به مقدار کافی از محیط کشت در لوله آزمایش بریزید. برای توزیع محیط کشت مایع در لوله های آزمایش از یک دستگاه پی پتور و یک پی پت استفاده کنید.

۲- بر روی لوله های آزمایش پر شده درپوش بگذارید.(برای درپوش های پیچی، قدری درپوش را شل ببندید تا بخار آب به داخل لوله وارد و خارج شود).

۳- نام محیط کشت و تاریخ را روی برچسب بنویسید و بر روی لوله آزمایش بچسبانید.

۴- لوله های آزمایش را با اتوکلاو استریل کنید .

۵- پس از کامل شدن دوره استریل جا لوله آزمایش را از اتوکلاو خارج سازید که برای این کار حتما از دستکش محافظ حرارتی استفاده کنید زیرا لوله های آزمایش خیلی داغ هستند.

۶- لوله های آزمایش را در حرارت آزمایشگاه خنک و سپس آن ها را در دمای ۴ درجه سانتیگراد(یخچال) نگه دارید.

❖ **آماده سازی لوله های آزمایش حاوی محیط کشت آگار دار درعمق و سطح شیب دار:(Agar slant)**

۱- محیط کشت آگار دار را در ارلنی با گنجایش دو برابر محیط کشت آماده نمایید. سر ارلن را با پنبه و فویل بپوشانید.

۲- ارلن را با اتوکلاو استریل کنید .

۳- پس از کامل شدن دوره استریل ارلن را از اتوکلاو خارج سازید که برای این کار حتما از دستکش محافظ حرارتی استفاده کنید زیرا ارلن خیلی داغ هستند.

۴- پس از سرد شدن محیط کشت در دمای اتاق (۱۵ دقیقه) مقادیر مناسبی از محیط کشت آگار دار را در داخل لوله های آزمایش توزیع کنید و در لوله های آزمایش را ببندید.

۵- نام محیط کشت و تاریخ را روی برچسب بنویسید و بر روی لوله آزمایش بچسبانید.

۶- جهت آماده سازی لوله ها با آگار شیب دار ، لوله های حاوی آگار مایع را بر روی تکه چوبی با ضخامت ۱/۵ سانتیمتر بخوابانید.

۷- بعد از سفت شدن آگار (حدود ۲۵ دقیقه) لوله های آزمایش را در دمای ۴ درجه سانتیگراد(یخچال) نگه دارید.

❖ **آماده سازی محیط کشت آگار دار در پلیت: (Agar plate)**

۱- بعد از وزن کردن مقدار لازم از پودر محیط کشت، پودر را به ارلنی حاوی حجم مشخصی از آب مقطر اضافه کنید. ارلن باید حجمی معادل حداقل دو برابر حجم آب استفاده شده گنجایش داشته باشد. اگر حجم ارلن بیش از یک لیتر است ، محیط کشتی با حجم نیم لیتر آماده کنید.

۲- محتویات ارلن را بچرخانید تا پودر محیط کشت در آب پخش شود. درب ارلن را با پنبه و فویل بپوشانید.

۳- وقتی که دوره استریل کردن در اتوکلاو خاتمه یافت اجازه دهید تا ارلن حداقل برای ۱۰ دقیقه داخل محفظه اتوکلاو باقی بماند . هنگام خارج کردن ارلن از اتوکلاو حتما از دستکش محافظ حرارتی استفاده نمایید.

۴- ارلن را در محیط آزمایشگاه تا حدی سرد نمایید که انگشتان شما گرما را حس کند اما نسوزد. در حالی که محیط کشت اگار دار سرد می شود پلیت های استریل را روی میز بگذارید.

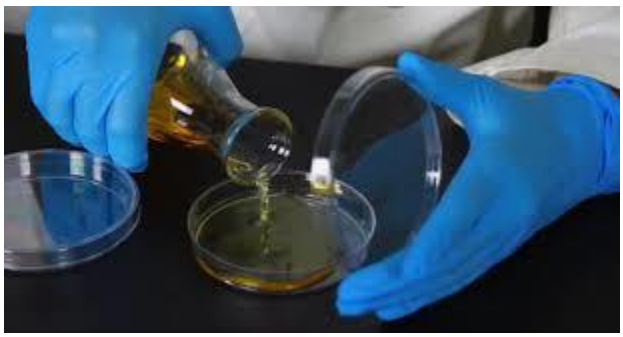
۵- زمانی که محیط کشت آگار دار سرد شده اما هنوز به صورت مایع است . درپوش آلمینیومی و پنبه از سر ارلن بردارید و دهانه ارلن را از میان شعله عبور دهید.(بهتر است جهت جلوگیری از آلودگی کل مراحل تقسیم کردن محیط کشت در زیر هود لامینار انجام شود).

۶- در هر پلیت را بلند کنید و محیط کشت مذاب کافی داخل آن بریزیدبه طوری که بیشتر کف پلیت از محیط کشت پوشیده شود.

۷- برای اطمینان از اینکه محیط کشت کف پلیت را پوشش داده است پلیت را به آرامی در سطح میز بچرخانید.

۸- اگر حباب هایی در آگار ذوب شده ظاهر شد می توانید آن ها را با شعله پاشیدن جزئی با یک چراغ گاز حذف کنید.

۹- پس از اینکه آگار سر شد، اگر نخواستید فورا آن ها را استفاده نمایید، پلیت ها را بصورت وارونه و در یک کیسه پلاستیکی در یخچال نگهداری کنید.



موضوع: انتقال باکتری ها در شرایط آسپتیک

هدف: تلقیح محیط کشت با باکتری مورد نظر بدون حضور میکروب های آلوده کننده . این مساله به عنوان تکنیک اسپتیک نامیده می شود.

مواد و وسایل:

- کشت مایع باکتریایی یا روی سطح آگار
- لوله براث استریل
- لوله آگار شیب دار استریل
- پلیت آگار استریل
- لوپ و سوزن تلقیح

روش کار:

۱- فضای روی میز کار را با محلوا ضد عفونی کننده (الکل ۷۰ درصد) ضدعفونی کرده و اجازه دهید سطح با هوا خشک شود. با دستمال کشسدن آن را خشک نکنید.

۲- لوازم را با رعایت ایمنی و در محل مناسب بر روی میز بچینید. چراغ گاز را با رعایت حداقل احتمال سوختن لباس یا مو در مکان مناسب قرار دهید. کتاب و کاغذ را دور از محل کار نگه دارید.

۳- انتقال باکتری از کشت مایع به لوله محیط کشت مایع:

۳-۱: نام ارگانیسم، تاریخ و نام خودتان را روی لوله محیط کشت مایع استریل بنویسید.

۳-۲: با تکان دادن آهسته لوله باکتریهای لوله کشت مایع را مخلوط کنید .لوله ها را به کمک درپوش آن نگه ندارید زیرا ممکن است درپوش آن رها شود.

۳-۳: لوپ را همانند یک مداد نگه دارید . لوپ را با شعله پاشیدن سر تا سر قسمت سیمی آن تا زمانی که سرخ شود استریل کنید. اجازه دهید لوپ خنک شود اما به هیچ چیز تماس پیدا نکند.

۳-۴: لوله کشت را دست دیگرتان نگه دارید. با انگشت کوچک دستی که لوپ تلقیح را گرفته در لوله را نگه دارید و با چرخاندن قسمت پایین لوله به کمک دست دیگر آن را جدا کنید. در لوله را بر زمین نگذارید.

۳-۵: به سرعت دهانه لوله را سه بار از میان شعله عبور دهید. لوله را با زاویه ۴۵ درجه کنار شعله نگه دارید تا شانس افتادن ذرات گرد و غبار داخل لوله درباز به حداقل برسد.

۳-۶: لوپ خنک شده را به داخل کشت مایع فرو ببرید و مقدار کمی از کشت باکتری را که داخل لوپ جا گرفته، خارج سازید.

۳-۷: دهانه لوله را از میان شعله عبور دهید. در لوله کشت را گذاشته و آن را در جای لوله آزمایش قرار دهید .مراقب باشید که قطره کشت باکتری روی لوپ را از دست ندهید. همچنین درب لوله را بیش از حد باز نگه ندارید.

۳-۸: لوله حاوی محیط کشت مایع و استریل را بگیرید و همانطوری که برای لوله قبل انجام دادید در لوله را جدا کنید و دهانه لوله بدون در را از میان شعله عبور دهید.

۳-۹: لوپ حاوی باکتری را داخل محیط کشت مایع تازه، وارد کنید و دسته لوپ را میان انگشتان تان بچرخانید تا باکتری ها از آن خارج شوند.

۳-۱۰: دهانه لوله محیط کشت مایع را میان شعله عبور دهید. در لوله آزمایش را بگذاریدو آن را در جای لوله آزمایش قرار دهید.

۳-۱۱: لوپ و سیم آن را شعله بپاشید تا سرخ شود. آن را روی میز بگذارید تا خنک شود.

۳-۱۲: لوله ای که اخیرا تلقیح شد را در گرمخانه(انکوباتور) قرار دهید.

۴- انتقال باکتری از کشت مایع به لوله اگار شیب دار:

۴-۱: نام ارگانیسم، تاریخ و نام خودتان را روی لوله محیط کشت آگار شیب دار بنویسید.

۴-۲: با تکان دادن آهسته لوله، باکتریهای لوله کشت مایع را مخلوط کنید .لوله ها را به کمک درپوش آن نگه ندارید زیرا ممکن است درپوش آن رها شود.

۴-۳: آنس را همانند یک مداد نگه دارید . لوپ را با شعله پاشیدن سر تا سر قسمت سیمی آن تا زمانی که سرخ شود استریل کنید. اجازه دهید لوپ خنک شود اما به هیچ چیز تماس پیدا نکند.

۴-۴: لوله کشت را دست دیگرتان نگه دارید. با انگشت کوچک دستی که آنس تلقیح را گرفته در لوله را نگه دارید و با چرخاندن قسمت پایین لوله به کمک دست دیگر آن را جدا کنید. در لوله را بر زمین نگذارید.

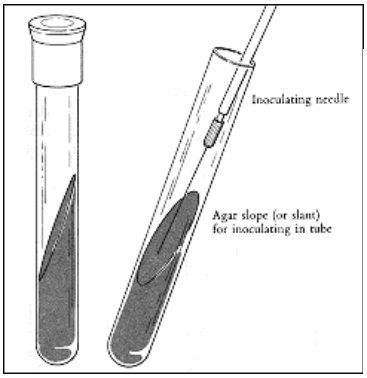
۴-۵: به سرعت دهانه لوله را سه بار از میان شعله عبور دهید. لوله را با زاویه ۴۵ درجه کنار شعله نگه دارید تا شانس افتادن ذرات گرد و غبار داخل لوله درباز به حداقل برسد.

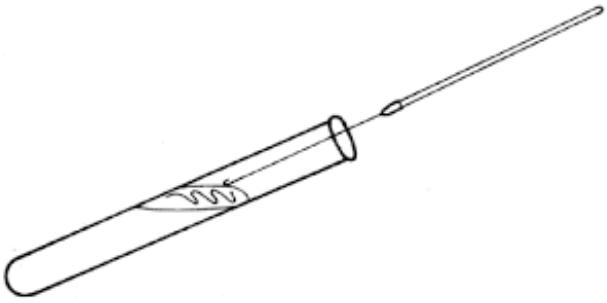
۴-۶: آنس خنک شده را به داخل کشت مایع فرو ببرید و مقدار کمی از کشت باکتری را که داخل لوپ جا گرفته، خارج سازید.

۴-۷: دهانه لوله را از میان شعله عبور دهید. در لوله کشت را گذاشته و آن را در جای لوله آزمایش قرار دهید .مراقب باشید که قطره کشت باکتری روی لوپ را از دست ندهید. . همچنین درب لوله را بیش از حد باز نگه ندارید.

۴-۸: لوله حاوی محیط کشت آگار شیب دار استریل را بردارید و همانطوری که برای لوله قبل انجام دادید در لوله را جدا کنید و دهانه لوله بدون در را از میان شعله عبور دهید.

۴–۹: در کنار شعله نوک آنس را ابتدا به صورت عمودی وارد قسمت عمودی محیط کشت کرده بعد به آرامی آن را از همان مسیر خارج کرده و بدون این که نوک آنس از محیط جدا شود آن را به حالت زیگزاگ روی سطح شیبدار بکشید .

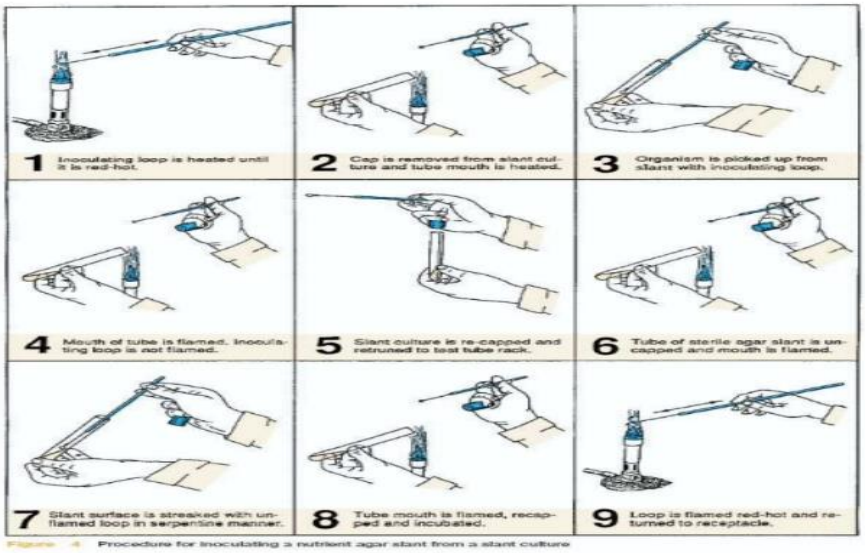




۴–۱۰: دهانه لوله آگار شیب دار را از میان شعله عبور دهید. در لوله آزمایش را بگذاریدو آن را در جای لوله آزمایش قرار دهید.

۴–۱۱: آنس و سیم آن را شعله بپاشید تا سرخ شود. آن را روی میز بگذارید تا خنک شود.

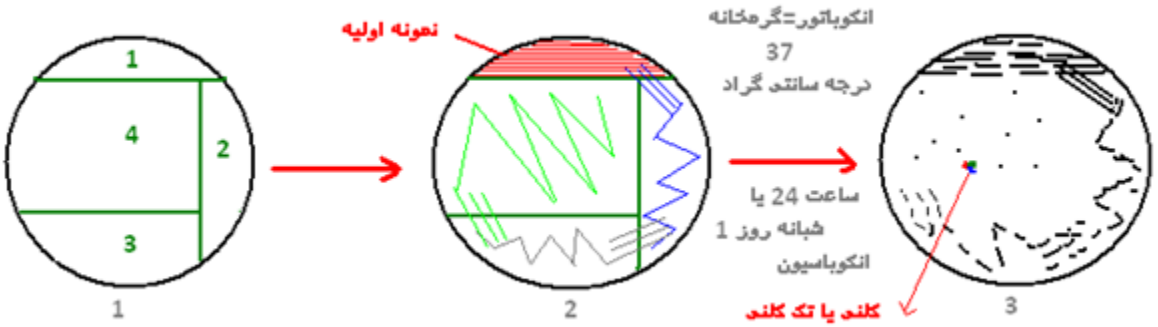
۴–۱۲: لوله ای که اخیرا تلقیح شد را در گرمخانه(انکوباتور) قرار دهید.



Procedure for inoculating a nutrient agar slant from a slant culture

۵- انتقال باکتری از کشت مایع یا از روی سطح پلیت آگار داری که قبلا بر روی آن کشت صورت گرفته است بر روی سطح پلیت اگار دار استریل: (کشت خطی Streak plate)

نکته: کشت خطی روشی متداول در آزمایشگاه میکروبیولوژی است که برای جداسازی باکتری ها به صورت کشت خالص (Pure culture) استفاده می شود. در این روش باکتری ها به کمک یک لوپ تلقیح رقیق می شوند به طوری که سلول ها بر روس سطح یک پلیت آگار دار پخش می شوند. در روش کشت خطی کلنی ها باید به خوبی از هم جدا شوند به طوری که هر کلنی مجزا را بتوان به راحتی برداشت و برای تعیین مشخصات باکتری ها ، آن ها را مجددا کشت داد.



روش کشت خطی:

در این روش از محیط پیش ریخته استفاده می شود. به این ترتیب که ابتدا به وسیله یک آنس حلقوی سترون شده مقداری از پرگنه باکتری را برداشته و آن را روی سطح محیط پیش ریخته به صورت خط های موازی و در چند جهت می کشید. در کشت های خطی برای بدست آوردن کلونی های تک می توانید پلیت را به ۴ قسمت تقسیم کنید بعد در قسمت اول ابتدا نوک آنس را که محتوی پرگنه باکتری است را به صورت خط های موازی کشیده و بعد خطوط را در منطقه دوم از انتهای خط انتهایی منطقه اول در جهت دیگر ادامه می دهید و در منطقه سوم و چهارم هم به همین صورت عمل می کنید. خصوصیت این روش این است که وقتی خطوط موازی را روی سطح محیط می کشید به ترتیب از تراکم باکتریها کاسته می شود و به انتهای خط که می رسید تراکم باکتری کمتر است و در منطقه دیگر وقتی از انتهای خط منطقه قبلی استفاده می کنید در واقع تراکم بسیار کمتر از تراکم باکتریها در ابتدا می باشد و در نتیجه در مناطق دیگر هم به ترتیب از تعداد باکتری ها کاسته می

شود تا جایی که در منطقه چهارم شما می توانید پرگنه های تکی داشته باشید که کلونی خالص نامیده می شود. بنابراین انجام درست کشت خطی منجر به ایجاد کلنی خالص می شود این کلونی تنها از یک باکتری مادری به وجود می آید (تعریف کلونی خالص). باکتری های منفرد را باکتری های مادر می نامند که این باکتری ها پس از کشت خطی و جدا شدن سلول های باکتری از یکدیگر به وجود می آیند.

توجه داشته باشید که کلونی خالص به کلونی گفته می شود که با کلونی دیگر تماس نداشته باشد.

در مورد محیط های کشت باکتریایی که به صورت مایع می باشند برای انجام کشت خطی روی محیط پیش ریخته فقط یک بار لوپ را داخل محیط محتوی باکتری کرده و یک لوپ از آن بردارید سپس آن را روی محیط پیش ریخته قرار داده و به صورت خطوط موازی آن را در چند جهت بکشید و یا مراحل فوق را روی آن انجام دهید.

۵–۱: نام ارگانیسم، تاریخ و نام خودتان را در پشت پلیت بنویسید.

۵–۲: با تکان دادن آهسته لوله، باکتریهای لوله کشت مایع را مخلوط کنید .لوله ها را به کمک درپوش آن نگه ندارید زیرا ممکن است درپوش آن رها شود.

۵–۳: لوپ را همانند یک مداد نگه دارید . لوپ را با شعله پاشیدن سر تا سر قسمت سیمی آن تا زمانی که سرخ شود استریل کنید. اجازه دهید لوپ خنک شود اما به هیچ چیز تماس پیدا نکند.

۵–۴: لوله کشت را دست دیگرتان نگه دارید. با انگشت کوچک دستی که لوپ تلقیح را گرفته در لوله را نگه دارید و با چرخاندن قسمت پایین لوله به کمک دست دیگر آن را جدا کنید. در لوله را بر زمین نگذارید.

۵–۵: به سرعت دهانه لوله را سه بار از میان شعله عبور دهید. لوله را با زاویه ۴۵ درجه کنار شعله نگه دارید تا شانس افتادن ذرات گرد و غبار داخل لوله درباز به حداقل برسد.

۵–۶: لوپ خنک شده را به داخل کشت مایع فرو ببرید و مقدار کمی از کشت باکتری را که داخل لوپ جا گرفته، خارج سازید.

۵–۷: دهانه لوله را از میان شعله عبور دهید. در لوله کشت را گذاشته و آن را در جای لوله آزمایش قرار دهید .مراقب باشید که قطره کشت باکتری روی لوپ را از دست ندهید. . همچنین درب لوله را بیش از حد باز نگه ندارید.

۵–۸: یک سمت در پلیت را به اندازه کافی بلند کنید تا لوپ را داخل پلیت وارد کرده و توده باکتری را بر روی سطح آگار در گوشه پلیت قرار دهید. دقت داشته باشید که اگر کشت خطی از روی سطح پلیت آگار داری که قبلا بر روی آن کشت صورت گرفته است، انجام گیرد نیز یک سمت در پلیت حاوی کلنی باکتری را به اندازه کافی بلند کنید تا لوپ را داخل پلیت وارد کرده و توده باکتری را بردارید سپس در پلیت را بسته و آن را روی میز گذاشته و پلیت حاوی کشت آگار دار استریل را برداشته و یک سمت در پلیت را به اندازه کافی بلند کنید تا لوپ را داخل پلیت وارد کرده و توده باکتری را بر روی سطح آگار در گوشه پلیت قرار دهید.

۵–۹: پلیت را در دست تان نگه دارید و کشت خطی را انجام دهید.

۵–۱۰: زمانی که روش کشت خطی در پلیت را انجام دادید، لوپ را قبل از آنکه روی میز بگذارید بسوزانید.

۵–۱۱: پلیت را بصورت وارونه (قسمت آگار دار بالا باشد) در گرمخانه با دمای مناسب برای باکتری مورد نظر انکوبه نمایید. و به مدت حداقل ۲۴ ساعت قرار دهید.

۵–۱۲: پس از پایان کار با پلیت کشت خطی، آن را برای استریل سازی در مکان مشخص قرار دهید.

۶– انتقال باکتری از کشت مایع به روش کشت عمقی در لوله:

۶ –۱: در این حالت محیط کشت آگار دار (جامد) را با حفظ شرایط استریل در حالت مذاب داخل لوله های آزمایش استریل ریخته و به حالت عمودی آن را در یک جای ساکن قرار دهید تا سرد شود.

۶–۲: با آنس نوک تیز استریل شده در کنار شعله از پرگنه باکتری مقداری را برداشته و آن را به صورت عمودی در مرکز این محیط تا انتها فرو برده و بدون هیچ گونه تغییر حالتی آن را از همان مسیر خارج کنید .

۶–۳: لوله را در انکوباتور قرار دهید .

- ✓ این روش کشت دارای خصوصیاتی می باشد و آن این است که هنگامی که نوک آنس را در محیط فرو می برید در ابتدای ورود آنس به محیط تراکم باکتری زیاد است و به ترتیب که به عمق محیط فرو می رود از تعداد باکتری ها کاسته می شود تا به انتهای لوله که می رسد تراکم باکتری به حداقل می رسد و از طرفی در انتهای محیط کشت لوله ای اکسیژن کمتر از قسمت سطحی آن است و باکتری ها به ترتیبی که با تراکم وارد محیط شده اند براساس نیاز با اکسیژن (هوازی یا بی هوازی بودن) در محیط رشد متفاوتی دارند. یعنی اگر باکتری هوازی باشد رشد آن در قسمت سطحی بیشتر است و اگر بی هوازی باشد رشد آن در قسمت عمقی بیشتر می شود.

موضوع: "آشنایی با محیط کشت TSI "

- طبقه تئوری آزمایش:

محیط تریپل شوگر آیرون (TSI) :

این محیط بطور گسترده در تشخیص باکتریهای روده‌ای (اعضای خانواده انتروباکتریاسه) کاربرد دارد. که بصورت شیب دار در لوله آزمایش ساخته می شود و سطح بیشتری برای رشد باکتریها فراهم می‌آورد . کشت در محیط جامد بصورت عمقی ـ سطحی می‌گیرد.

محیط TSI حاوی معرف فنل ـ رد ، سولفات فرو ، تیو سولفات سدیم (برای تشخیص تولید گاز سولفید هیدروژن) و سه قند گلوگز ، لاکتوز و سوکروز است که غلظت گلوکز درمحیط ۰/۱ غلظت دو قند دیگر می

باشد. دامنه PH محیط از ۶/۸ تا ۸/۴ متغیر می باشد . این محیط قبل از کشت به دلیل داشتن معرف فنل ـ رد قرمز رنگ است.

با استفاده از TSI می توان سه خصوصیت را در یک باکتری مشخص نمود.

الف : توانایی تولید گاز CO_2 , H_2 از متابولیسم قندها.

در این حالت محیط کشت از کف لوله فاصله می گیرد.

ب : توانایی تولید مقادیر زیادی گاز سولفید هیدروژن که از طریق سیاه شدن محیط مشخص می شود.

ج : توانایی تخمیر گلوکز ، لاکتوز و سوکروز.

باسیلهای گرم ـ منفی را بر اساس واکنش ایجاد شده بر روی این محیط می‌توان به پنج گروه تقسیم کرد:

- ✓ در گروه I تخمیر گلوکز ، لاکتوز ، سوکروز ، منتهی به اسیدی شدن (زرد شدن) تمامی محیط و تولید گاز می‌گردد.

گروه I سطح زرد / عمق زرد ، گاز مثبت ، H_2Sمنفی. مثل:E.coli , Klebsiella, Entrobacter

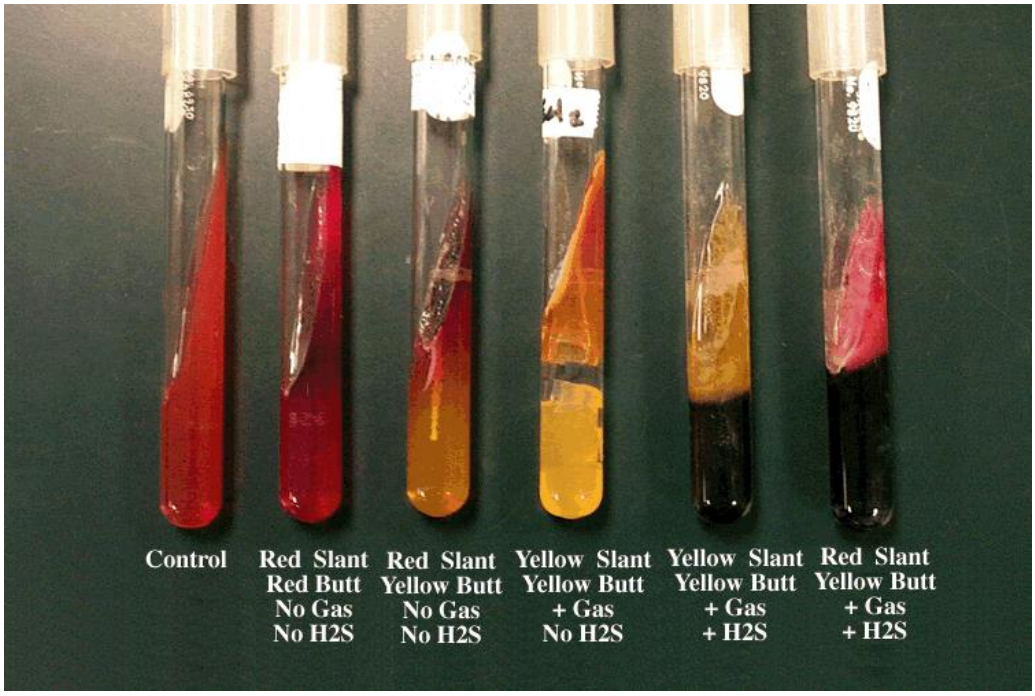
- ✓ واکنش های ایجاد شده توسط باکتریهای گروه III,II همانند گروه I است و تفاوت آنها فقط در تولید یا عدم تولید گاز است.

گروهII سطح قرمز / عمق زرد ، گاز مثبت ، H_2Sمثبت .(چون H_2S مثبت است عمق سیاه می شود.) مثل: Salmonella , Proteus

گروهIII سطح قرمز / عمق زرد ، گاز منفی ، H_2Sمنفی.مثل: Shigella , Seratia

- ✓ هنگامیکه عمق و سطح این محیط توسط باکتریهای گروه III, IV کشت داده می شود ، باکتری کشت داده شده ابتدا بطور هوازی و سپس بطریقه بی هوازی شروع به مصرف گلوکز می‌نماید . زمانی که هر دو طریقه در حال انجام است . (ساعات اولیه انکوباسیون) PH تمامی نقاط محیط کشت اسیدی و در نتیجه محیط زرد رنگ است اما از آنجایی که تخمیر هوازی در مقایسه با تخمیر بی هوازی با سرعت بیشتری به وقوع می‌پیوندد، گلوکز موجود در سطح به پایان رسیده و باکتریها شروع به تجزیه پپتون موجود در محیط می‌نمایند .از تجزیه پپتون در شرایط هوازی ، بی هوازی آمونیاک NH3) (تولید می‌شود . محصولات این عمل خاصیت قلیایی داشته و در نتیجه رنگ سطح محیط مجدداً قرمز می شود . درهمین حال عمق محیط بدلیل سیرآرامتر تخمیر بی هوازی گلوکز، همچنان اسیدی و زرد رنگ باقی می‌ماند.
- ✓ گروه IV یا باسیلهای گرم ـ منفی غیر تخمیر کننده مانند گونه های سودوموناس، پپتونهای موجود در محیط را تجزیه کرده ودر سطح و عمق محیط را بدون تولید گاز، قرمز رنگ می‌نمایند.

گروه IV سطح قرمز / عمق قرمز ، گاز منفی ، H2S منفی. مانند گونه های سودوموناس



موضوع: "آشنایی با محیط کشت (Sulfide Indol Motility)SIM "

این محیط ژله ای و نیمه جامد است.این محیط slant نیست.

۳ تست را می توانیم با این محیط چک کنیم.

a) SH2 + است یا –

b) ایندول + است یا –

c) Motility حرکت باکتری + است یا – .

a. باکتری قادر به تولید SH2 است یا خیر. در این محیط اسید آمینه سیستئین وجود دارد چنانچه باکتری دارای آنزیم سیستئیناز باشد اسید آمینه سیستئین را مصرف و تولید گوگرد مینماید ،گوگرد با H2o موجود در محیط ترکیب شده و تولید SH2 می نماید.اگر + باشد رسوبی سیاه رنگ را پدید می آورد . (مثل تست TSI)

b. ایندول Indol : در این محیط اسید آمینه تریپتوفان وجود دارد چنانچه باکتری آنزیم تریپتوفاناز داشت باشد،تریپتوفان موجود در محیط را به گاز بی رنگ اندول تبدیل مینماید چنانچه به محیط معرف های کواکس(الکل اتیلیک) یا ارلیش (الکل متیلیک) را اضافه نمائیم با گاز اندول موجود در محیط واکنش داده و تولید حلقه ارغوانی رنگ می نماید.

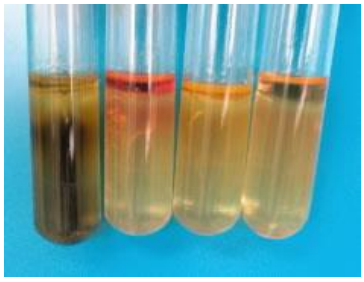
باید توجه شود محیط کشت ازمایش ایندول باید فاقد قند گلوکز باشد زیرا این قند مانع تولید ایندول است.

c. Motility تست حرکت:

محیط کشت نیمه جامد و لوله ای است . (نیاز به کشت در عمق)

از سواپ سوزنی استفاده می کنیم. لوپ را بعد از نمونه برداری وارد محیط کشت می کنیم و دقیقاً از همان مسیر برمی گردانیم.

اگر باکتری دارای حرکت باشد اطراف خطی که با لوپ ایجاد کرده بودیم یک هاله ای از باکتری را می بینیم ولی اگر باکتری حرکت منفی باشد تنها در مسیر عبور لوپ سوزنی (مسیر خط گذاری) ما رشد باکتری را به صورت خطی در نور مشاهده می کنیم.



موضوع: "آشنایی با محیط کشت Baird Parker Agar Base "

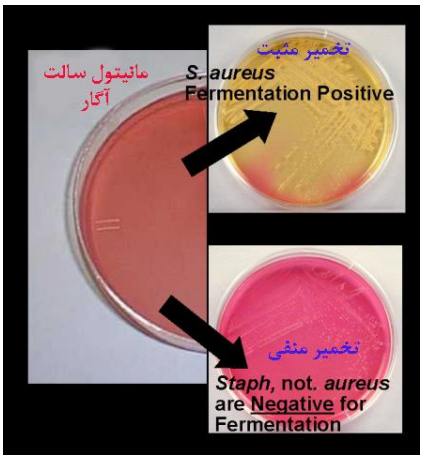
- ✓ بعد از ساخته شدن و استریل نمودن محیط برد پارکر آگار و بعد از رسیدن به دمای حدود ۴۵ درجه سانتیگراد ، به ازاء ۴۷۵ میلی لیتر محیط برد پارکر ۲۵ میلی لیتر اگ یولک تلوریت دار به ان اضافه می گردد. باید دقت شود که در زمان پخش کردن محیط در پلیت هر بار محیط درون ارلن به کمک دست همگن شود.

این محیط کشت انتخابی جامد برای قابل رویت شدن *Stapbylococci* از انواع مختلف نمونه ها براساس استانداردهای ISO است که حاوی تلوریت پتاسیم و تلوریت لیتیم می باشد. تلوریت محیط از رشد کلی فرم ها ممانعت می نماید. استافیلوکوک اورئوس می تواند تلوریت را به تلورید تبدیل نموده و باعث ایجاد کلنی های سیاه بر روی محیط گردد. زرده ی اضافه شده به محیط نیز باعث ایجاد دو واکنش در محیط می گردد. یکی تولید لسیتینازمنجر به ناحیه کدر و دیگری تولید لیپاز که منجر به ناحیه شفاف در اطراف ناحیه کدر می شود. در انتها کلنی های مشکوک به استافیلوکوک اورئوس باید تست کواگولاز انجام گردد.

موضوع: "آشنایی با محیط کشت مانیتول سالت "

هدف آزمایش :افتراق استافیلوکوک اورئوس از سایر میکروکوکاسه ها

اساس آزمایش :غلظت بالای نمک ۷/۵ ٪رشد اکثر سوش های گرم منفی و گرم مثبت بجز استافیلوکوک اورئوس را مهار می کند .استافیلوکوک اورئوس می تواند مانیتول را تخمیر کرده (مانیتول تنها کربوهیدرات موجود در محیط است) و اسید تولید کند. این مسئله منجر به افت pH و تغییر رنگ فنل رد به زرد می شود، در این آزمایش کلنی های استافیلو کوک اورئوس به طور مشخص زرد رنگ شده و توسط هاله زردی احاطه می شوند اما سایر استافیلو کوک ها و میکروکوک ها که قدرت تخمیر مانیتول را ندارند با شکستن پپتون موجود در محیط کلنی های قرمز رنگ با هاله ای ارغوانی – قرمز ایجاد می کنند .



نمونه اولیه : کشت ۲۴ – ۱۸ ساعته از ارگانیسم مورد نظر

(استافیلوکوک اورئوس)

مواد و ابزار مورد نیاز: محیط مانیتول سالت آگار (لوله یا پلیت)

مراحل انجام کار : کلنی های مورد نظر را روی محیط تلقیح کرده

به مدت ۴۸ -۲۴ ساعت در حرارت $35^{o}C$ انکوبه نمایید

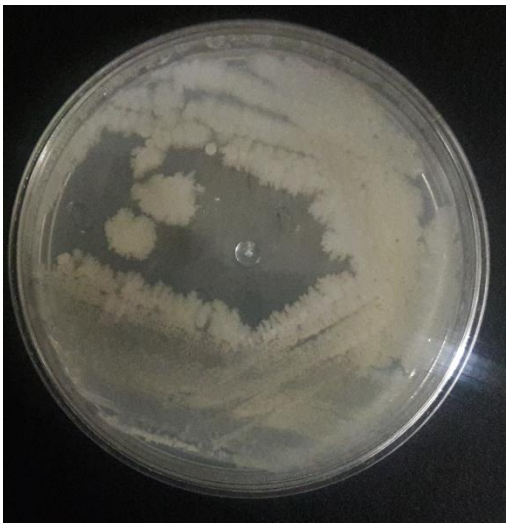
(محیط بدون co2) و سپس نتیجه را بررسی کنید . از آنجا که بعضی از گونه های استافیلوکوک آهسته تر مانیتول را تخمیر می کنند، بنابراین لازم است حتماً تا ۴۸ ساعت پلیت ها نگهداری شود .

نتیجه: کلنی های استافیلوکوک زرد رنگ بوده و توسط هاله زردی احاطه می شود .

تداخلات : انتروکوک می تواند روی این محیط رشد کرده و مانیتول را نیز کمی تخمیر کند. افتراق از استافیلوکوک بر اساس رنگ آ میزی گرم و تست کاتالاز خواهد بود.

موضوع: "آشنایی با محیط کشت نوترینت آگار "

نوعی محیط کشت پایه میکروب شناسی است که برای رشد باکتری‌هایی که مشکل پسند نیستند، بکار می‌رود. این محیط حتی در دماهای بالا نیز جامد است. باکتری‌ها بر روی سطح محیط رشد می‌کنند و کلنی‌های کوچکی را تشکیل می‌دهند. در محیط براث نوترینت (محیط مایع نوترینت)، باکتری‌ها در داخل مایع رشد کرده و سوپی شکل خواهند شد. آگار نوترینت دارای:

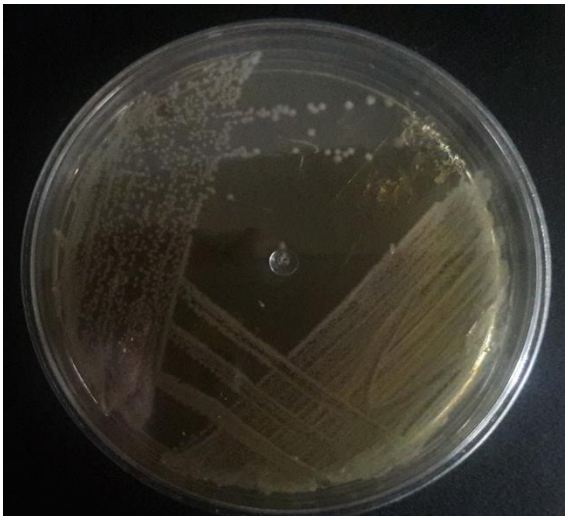


- پپتون به میزان ۵/۰٪
- عصاره گوشت و مخمر به میزان ۳/۰٪
- آگار به میزان ۵/۱٪
- کلرید سدیم به میزان ۵/۰٪
- آب مقطر
- pHخنثی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد باشد

موضوع: "آشنایی با محیط کشت MRS "

Often abbreviated to **MRS**, this type of bacterial growth medium is so-named by its inventors: **de Man**, **Rogosa** and **Sharpe**.

اختصاصات: این محیط کشت جامد برای ایزوله کردن *Lactobacilli* براساس ایزو ۹۳۳۲ و ۱۵۲۱۴ می باشد.



موضوع: "آشنایی با محیط کشت آگارخوندار "

محیط کشت آگار خوندار یکی از محیطهای کشت مغذی است که رشد بسیاری ازباکتریها راتامین می کندوهمچنین ایجاد همولیز(فرآیند تجزیه خون) برروی این محیط به راحتی قابل بررسی است. برای تهیه این محیط پس ازتهیه آگار پایه لازم است محیط تادرجه چهل تا پنجاه درجه سانتیگراد خنک شود. دراین مرحله پنج میلی لیتر خون تازه به ازای هرصد میلی لیتر محیط افزوده وپس از مخلوط کردن درپلیت های استریل تقسیم کنید.

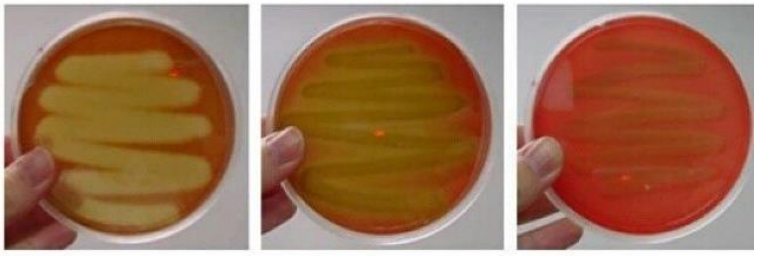
همولیز بتا : ایجاد هاله شفاف توسط باکتری در اثر لیز کامل گلبول های قرمز در محیط کشت مشاهده می شود. اطراف و کنار کلونی ها به صورت شفاف و رنگ پریده دیده می شود.. مثال: همولیز B استافیلوکوک اورئوس.

همولیز آلفا : ایجاد هاله سبز رنگ در اثر تبدیل هموگلوبین باکتری به مت هموگلوبین و عامل اصلی ایجاد همولیز آلفا تولید پراکسیداز در محیط توسط باکتری است.

همولیز گاما: اگر ارگانیسم منجر به ایجاد همولیز نشود به عنوان گاما همولیز شناخته می شود. آگار در اطراف کلنی دست نخورده می ماند. انتروکوکوس فکالیس که به عنوان استرپتوکوک های گروه D شناخته می شوند گاما همولیز را از خود نشان می دهد.

Blood Agar:

Shows three types of hemolysis
α Hemolysis
β Hemolysis
γ Hemolysis



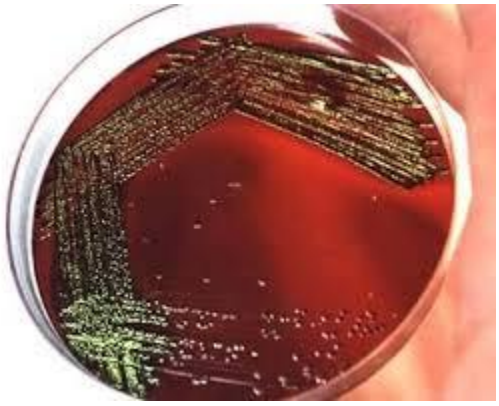
Beta Hemolysis **Alpha Hemolysis** **Gamma Hemolysis**

موضوع: "آشنایی با باکتری E.coli"

Domain:	Bacteria	**طبقه‌بندی علمی**	
Kingdom:	Eubacteria	دامنه:	باکتری
Phylum:	Proteobacteria	شاخه:	پروتئوباکتریا
Class:	Gammaproteobacteria	رده:	گاماپروتئوباکتریا
Order:	Enterobacteriales	راسته:	انتروباکتریال‌ها
Family:	Enterobacteriaceae	تیره:	انتروباکتریاسیا
Genus:	*Escherichia*	سرده:	*اشریشیا*
Species:	***E. coli***	گونه:	***E. coli***
Binomial name			**نام علمی**
Escherichia coli (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919			***Escherichia coli*** (Migula ۱۸۹۵)

E.coli، باسیل گرم منفی، متحرک ،هوازی بی‌هوازی اختیاری و بدون اسپور است. این باکتری در شرایط بی‌هوازی، مخلوطی از اسیدها مانند لاکتات، سوکسینات، اتانول، استات و دی اکسید کربن را تولید می‌کند. رشد بهینه باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد است اما تا دمای ۴۹ درجه را نیز تحمل کرده و به رشد خود ادامه می‌دهد.*E.coli*، هم در شرایط هوازی و هم بی‌هوازی می‌تواند رشد کند. سویه‌ها دارای تاژک هستند و به خاطر همین، متحرک هستند. تاژه‌ها متعدد و از نوع پیرامونی(peritrichous) هستند*E.coli* .

تشخیص آزمایشگاهی: اشریشیا کلی بر روی محیط آگار مک کانکی(MacConkey agar)، کلنی‌های ارغوانی ایجاد می‌کند زیرا باکتری از نوع لاکتوز مثبت است و قند را تخمیر کرده و اسید تولید می‌کند. اسید موجب کاهش pH در محیط آگار مک کانکی شده و در نتیجه رنگ ارغوانی ایجاد می‌شود. همین اتفاق نیز در محیط(Eosin Methylene Blue) EMB رخ داده و کلنی‌های ارغوانی تیره با جلای سبز فلزی ایجاد می‌کند. باکتری در محیط TSI به صورت اسید/اسید و با تولید گاز و H2S منفی است. از نظر تست IMViC به صورت اندول مثبت، MRمثبت، VPمنفی و سیترات منفی است.



موضوع:IMViC TEST

از این تست برای تمایز قائل شدن بین باسیلهای گرم منفی روده به بویژه اشرشیاکلی و گروه انتروباکتر – کلبسیلا استفاده می شود .

این تست شامل چهار تست مختلف است :

۱.Indole Test

۲.Test Methyl red

۳.Voges-Proskauer Test

۴.Citrate utilization Test

✓ Indole Test

ایندول توسط بعضی از میکروارگانیسم های معین در تریپتون براث تولید می شود . تریپتون براث غنی از اسید امینه تریپتوفان است که توسط این باکتریها به عنوان منبع کربن ونیتروژن و انرژی استفاده می شود .

تمام باکتریها و حتی همه باکتریهای روده ای گرم منفی قادر به مصرف تریپتوفان و تولید ایندول با این روش نیستند . بنابراین تولید ایندول می تواند یک روش تشخیص باشد .

روش کار:

محیط کشت : تریپتون براث

پس از کشت زمان داخل انکوباتور :۴۸ ساعت

دمای مورد نیاز : ۳۷ درجه سانتیگراد

معرف :۲ تا ۳ قطره به ازای هر ۵ سی سی محیط کشت

نتیجه : در صورت وجود ایندول رنگ قرمز تولید شده و به صورت یک لایه در سطح لوله نمایان می گردد تولید رنگ ممکن است ۱۵ -۱۰ دقیقه طول بکشد در صورت ایجاد رنگ قرمز نتیجه مثبت است .

- ✓ Methyl red Test

اساس این تست بر پایه تولید اسید از گلوکز توسط باکتریها است .

این محیط ملاک آزمایشی می باشد برای تفکیک مسیرهای تخمیر گلوکز و نهایتا ایجاد ترکیبات اسیدهای آلی بوتاندیول یا بوتیلن گلایکول بوده که از این آزمایش در تفکیک و تشخیص کلی فرم ها از هم مورد استفاده قرار می گیرد. همچنین در تمایز بین استافیلوکوک و میکروکوک و گونه های آن از این محیط استفاده می شود.

روش کار : پس از انجام کشت و انکوباسیون ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت، مقدار ۰/۶ میلی لیتر معرف رنگی متیل رد اضافه نموده و در صورت ظهور رنگ قرمز آزمایش MRمثبت می باشد. در صورت پیدایش رنگ نارنجی آزمایش MR مثبت ضعیف می باشد و در صورت عدم تغییر و پایداری رنگ زرد آزمایش MR منفی می باشد.

- ❖ اشرشیاکلی بعد از ۴۸ ساعت رشد PH محیط را به۴/۵ یا کمتر رسانده بنابراین رنگ متیل رد به قرمز تبدیل می شود. اشرشیاکلی گلوکز را تخمیر کرده و انواع اسید ها را به عنوان محصول فرعی یا نهایی تولید می می کند.

نتیجه:

ظهور رنگ قرمز: آزمایش مثبت (PH=4/4)

ظهور رنگ نارنجی: آزمایش مثبت ضعیف (PH=5/3)

ظهور رنگ زرد: آزمایش منفی (PH=5/3)

طرز تهیه معرف MR:

۱- متیل رد ۰/۰۴ گرم

۲- اتانول ۴۰ میلی لیتر

۳- آب مقطر ۱۰۰ میلی لیتر

متیل رد را در اتانول حل نموده و به حجم ۱۰۰ میلی لیتر می رسانیم.

✓ Voges-Proskauer Test

اساس این تست بر پایه تولید استیل متیل کربونیل (که یک ماده خنثی است) از گلوکز می باشد .

اشرشیاکلی نمی تواند استیل متیل کربونیل تولید کند در صورتیکه انترو باکتر کلبسیلا می تواند .

روش کار: پس از انجام کشت و انکوباسیون ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت، به لوله کشت داده شده و انکوبه شده حدود۰/۶ میلی لیتر معرف آلفا نفتول (معرفA) و مقدار ۰/۲ میلی لیتر محلول پتاس (معرف B) اضافه کرده و خوب تکان می دهیم. اگر تغییر رنگ صورت نگرفت آن را به مدت سی دقیقه به حال خود گذاشته و در صورتی که ظهور رنگ صورتی تا قرمز پدیدار شود، آزمایش VP مثبت و اگر تغییر رنگی صورت نپذیرد، آزمایش VPمنفی خواهد بود.

نتیجه:

مثبت: ظهور رنگ صورتی تا قرمز

منفی: تغییر رنگی صورت نمی گیرد.

طرز تهیه معرف VP:

معرف A:

۱- آلفانفتول: ۵ گرم

۲- الکل اتلیک مطلق: ۱۰۰ میلی لیتر

محلول نباید تیره تر از رنگ کاه (نی) شود. در صورت لزوم باید مجددا تقطیر گردد.

معرف B:

۱- هیدروکسید پتاسیم: ۴۰ گرم

۲- آب مقطر: ۱۰۰ میلی لیتر

✓ Citrate Utilization Test

اساس این تست بر پایه آن است که بعضی از باکتریها قادرند سیترات سدیم را به عنوان منبع کربن تجزیه نمایند.

روش کار:

محیط کشت : سیمون سیترات

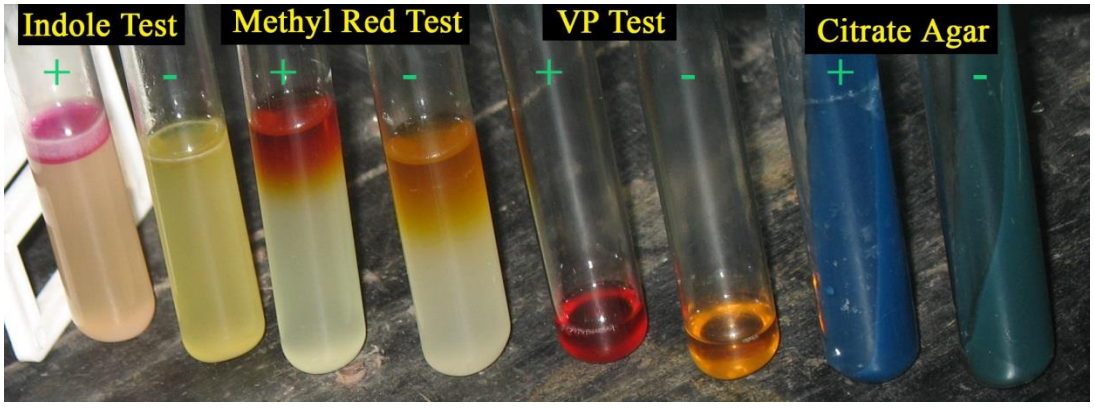
پس از کشت زمان داخل انکوباتور : ۴۸ ساعت

دمای مورد نیاز : ۳۷ درجه سانتیگراد

نتیجه : اگر رنگ از سبز به ابی تغییر کرده باشد ازمایش مثبت و سیترات مصرف شده است .

نتایجIMViC Test برای باکتریهای اشرشیاکلی و گروه انتروباکتر- کلبسیلا :

test	ایندول	متیل رد	وگس پرسکوئر	سیترات
اشرشیاکلی	+	+	-	-
انتروباکتر- کلبسیلا	-	-	+	+



موضوع: محیط کشت سابور دکستروز آگار(Saborad Dextrose agar)

محیط انتخابی برای تکثیر قارچها می باشد که بسیاری از باکتری ها نیز در این محیط رشد می کنند. انتخابی بودن این محیط برای قارچها بر اساس وجود آنتی بیوتیک در آن و همچنین مواد غذایی ناچیز آن است.

موضوع: محیط کشت YGC Agar (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar):

محیطی انتخابی برای جداسازی و شمارش مخمر ها و کپک ها در صنایع لبنی می باشد.

موضوع: آزمایش کاتالاز

آنزیم کاتالاز باعث تجزیه پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می‌گردد. پراکسید هیدروژن یک محصول متابولیک سمی برای باکتریهاست. اگر آب اکسیژینه در محیط تجمع یابد، برای برخی باکتری ها سمی و خطرناک است اما باکتری های هوازی و غیر هوازی اختیاری با تولید آنزیم های کاتالاز(Peroxidase) موجب شکسته شدن H_2O_2 و آزادی مولکول اکسیژن می شوند و از مرگ رهای پیدا می کنند.به عبارت دیگر، تولید کاتالاز توسط برخی از باکتری های درحقیقت نوعی مکانیسم دفاعی برای آنها محسوب می شود. آزمایش کاتالاز را می‌توان بر روی مقدار بسیار کمی از باکتریهای رشد نموده بر روی سطح آگار انجام داد.

اصول آزمایش: آنزیم کاتالاز، پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن می‌شکند. اگر مقدار کمی از ارگانیسم‌های تولید کننده این آنزیم را با آب اکسیژنه مجاور نمائید، بلافاصله حباب‌های اکسیژن آزاد می‌شود.

روش انجام آزمایش:

با استفاده از لوپ ، مقدار کمی از کشت خالص ارگانیسم را به سطح یک لام خشک و تمیز منتقل نمائید.

بلافاصله یک قطره از پراکسید هیدروژن ۳٪ (H_2O_2)(طرز تهیه: ۴۵ میلی لیتر آب مقطر+۵ میلی لیتر پراکسید هیدروژن ۳٪) بر روی کلنی‌های موجود بر روی سطح لام می‌ریزیم.

از نظر آزاد شدن حباب‌های گاز اکسیژن لام را مورد بررسی قرار می‌دهیم. آزاد شدن حباب‌های گاز نشان دهندهٔ وجود آنزیم کاتالاز در میکروارگانیسم است که موجب شکسته شدن پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می‌گردد.مثال: استافیلوکوک و باسیلوس، کاتالاز مثبت هستند و لاکتوباسیلوس کاتالاز منفی است.