دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، آزمایشگاه میکروبیولوژی

آزمایشگاه میکروب ۲

جلسه ی نهم : روش های نگهداری سویه های میکروبی

نگهداری و استفاده از سویه‌های باکتریایی

- برای نگهداری سویه‌های باکتریایی می‌توان از روشهای طولانی مدت و کوتاه مدت استفاده نمود.

نگهداری طولانی مدت

- نگهداری طولانی مدت باکتریها این امکان را می‌دهد که کلیه سویه‌های میکروبی اعم از هوازی (با رشد سریع و یا سخت رشد) و نیز بیهوازی، ماهها و حتی سالها به صورت زنده نگهداری شوند. بهترین روشهای نگهداری طولانی مدت شامل لیوفیلیزاسیون (Freeze drying) و نگهداری در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد یا پایین تر (در دیپ فریز یا در نیتروژن مایع) می‌باشد.
-

تهیه کننده : سهیلا عباسی

نگهداری در دیپ فریز (۵۰- تا ۷۰- درجه سانتی‌گراد یا پایین تر) و یا نیتروژن مایع:

- باکتری مورد نظر را روی محیط مغذی مانند پلیت TSA (Trypticase Soy Agar) حاوی ۵٪ خون گوسفند و در مورد میکروارگانیسمهای سخت رشد روی محیط آگار شکلاته کشت دهید. پلیتها را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۲±۳۵ درجه سانتی‌گراد و در صورت نیاز تحت شرایط CO_2 برای هر باکتری انکوبه نمائید.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

- بعد از انکوباسیون، خالص بودن و مورفولوژی کلنی‌ها را بررسی نموده و در صورت نیاز، تستهای بیوشیمیایی آنرا انجام دهید. سپس از باکتری رشد یافته، سوسپانسیون غلیظی در ۱۰۰–۵۰ میلی‌لیتر از یک محیط محافظت‌کننده از سرما (Cryoprotective) تهیه نمائید. این محیط برای جلوگیری از تخریب سلولهای باکتری در شرایط انجماد مورد استفاده قرار می‌گیرد.
- محیط محافظت‌کننده از سرما می‌تواند Skim milk، خون گوسفند یا خرگوش دفیبرینه استریل یا Tryptic Soy Broth (TSB) حاوی گلیسرول با غلظت نهایی ۱۵–۱۰٪ باشد.

- سپس از سوسپانسیون باکتریایی فوق به مقدار ml ۱- ۰/۵ در ویالهای شیشه‌ای یا پلاستیکی کوچک استریل توزیع کنید. تعداد ویال ذخیره خود را برای مصرف یکسال آماده نمائید.
- ویالهای حاوی سویه‌ها را می‌توان در برودت ۵۰- تا ۷۰- درجه سانتی‌گراد به مدت یکسال نگهداری نمود. در صورت عدم دسترسی به فریزر ۷۰- درجه می توان سویه‌های با رشد سریع را در فریزر ۲۰- درجه نیز نگهداری نمود. در این شرایط توجه به نکات زیر ضروری است:
- سویه‌های سخت رشد مانند هموفیلوس انفلوانزا و نیسریا گونوره در این دما قابل نگهداری نمی‌باشند و باید در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شوند.

- سویه‌های بارشد سریع در این دما عمر کمی دارند و تعداد زیادتری از آنها از بین می‌روند. بنابراین توصیه می‌شود برای اطمینان از حیات سویه‌ها هر چند ماه، طبق روش زیر کشت داده شوند.
- یک ویال از فریزر بیرون آورده و سریعا زیر آب جاری ولرم محتویات آنرا ذوب نمائید. نمونه را روی محیط آگار خوندار یا شکلاته (در مورد باکتریهای سخت رشد) تلقیح کرده و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۲±۳۵ درجه و در صورت نیاز در شرایط CO_2 انکوبه نمایید. این باکتری می‌تواند برای آزمایشهای کنترل داخلی کیفیت در آزمایشگاه یا برای تهیه working control بکار رود. قبل از هر اقدام باید از خالص بودن نمونه، اطمینان حاصل کرد. ویال مورد استفاده بعد از ذوب شدن باید دور انداخته شده و به هیچ وجه مجددا فریز نگردد.

- کشتهای working control: عبارتست ازکشت مجدد از کشت ذخیره فریز شده که برای کنترل کیفیت محیط کشت و ... استفاده می‌شود.
- از کشت ذخیره تا ۳ پاساژ پشت سر هم می‌توان انجام داد. پس از آن، نمونه باید دور انداخته شده و از یک کشت ذخیره فریز شده دیگر برای تهیه کشتهای working control استفاده شود. پاساژهای مکرر (بیش از ۳ پاساژ)، احتمال تغییر فنوتیپی سویه‌ها را افزایش می‌دهد.

- برای تهیه working control، از کشت ذخیره فریز شده، روی پلیت یا آگار شیب دار تلقیح و آنرا به مدت یک شبانه‌روز تا زمانی که رشد مناسبی بدست آید، انکوبه نمائید. در مورد ارگانیسمهای با رشد سریع این پلیت یا آگار شیبدار را می‌توان در ۸-۲ درجه سانتیگراد یا در دمای اتاق تا مدت ۴ هفته نگهداری نمود. بعد از هر پاساژ، خالص بودن و مورفولوژی کلنی‌ها را بررسی نمائید.

استفاده از روغن معدنی در دمای اتاق

۱- محیط کشت Brain Heart Infusion Agar (BHIA) را با شیب کم در لوله تهیه نمایید. برای باکتریهای مشکل‌پسند مانند گونوکوک، منگوکوک، استرپتوکوک پنومونیه و هموفیلوس آنفلوانزا، لازم است محیط شکلات آگار را با افزودن ۵٪ خون گوسفند به محیط فوق پس از خروج از اتوکلاو و رسیدن به دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و قرار دادن در بن‌ماری ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه تهیه نمود.

- ۲- روغن معدنی (یا پارافین مایع) را در حرارت خشک (۱۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یکساعت) استریل نمائید.
- ۳- میکروب مورد نظر را روی محیط کشت دهید.
- ۴- بعد از بدست آوردن کشت کافی، روغن استریل را به مقدار CC ۱ روی سطح محیط بریزید.
- ۵- در صورت نیاز به کشت مجدد، نمونه از سطح آگار (زیر روغن) برداشته می‌شود.
- ۶- بعد از ۱۲-۶ ماه تجدید کشت نمایید.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

کشت عمقی و نگهداری در دمای اتاق

- این روش فقط برای باکتریهایی که مشکل‌پسند نیستند مانند استافیلوکوک وخانواده انتروباکتریاسه بکار می‌رود.
- ۱- یک محیط کشت آگار بدون کربوهیدرات مانند TSA را با عمق زیاد در لوله تهیه نمایید.
- ۲- باکتری را بصورت کشت عمقی در این محیط تلقیح نمایید.
- ۳- این محیط را ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۵ درجه انکوبه نمائید.
- ۴- در لوله را با درپیچ یا چوب پنبه ببندید.
- ۵- لوله در پیچ‌دار را در پارافین مایع فرو ببرید به گونه‌ای که کاملا در لوله را بپوشاند.
- ۶- کشتها را در حرارت اتاق نگهداری نمائید.
- ۷- هرساله سوش موردنظر را تجدید نمائید.

کشت عمقی در محیط سیستین تریپتیکیس آگار (CTA) برای نیسریا و استرپتوکوک

.

- محیط CTA را در لوله تهیه نمایید .
- باکتری را بطور عمقی در این محیط کشت دهید.
- محیط را به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
- در لوله را با چوب‌پنبه یا در پیچ ببندید.
- لوله در پیچ‌دار را در پارافین مایع فرو ببرید به گونه‌ای که کاملا در لوله را بپوشاند.
- برای نیسریا لوله را در ۳۵ درجه نگهداری و هر دو هفته کشت را تجدید نمائید. برای استرپتوکوک لوله را در حرارت اتاق نگهداری کرده و هر ماه تجدید کشت کنید.
-

تهیه کننده : سهیلا عباسی

محیط کشت Cooked meat برای باکتری های بی هوازی

- ۱- باکتری را در لوله‌های حاوی محیط Cooked meat کشت دهید.
- ۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
- ۳- در لوله را با چوب‌پنبه یا در پیچ ببندید.
- ۴- کشتها را در حرارت اتاق نگهداری نمائید
- ۵- هر دو ماه کشت را تجدید نمائید.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

نگهداری کوتاه مدت

- کشتهای working control که برای کارهای روتین روزانه استفاده می‌شوند، به روشهای زیر تهیه می‌شوند:
  - **باکتریهای با رشد سریع**
- ۱- سوش مورد نظر را در سطح محیط TSA لوله‌ای درپیچ‌دار کشت دهید.
- ۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
- ۳- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری کنید
- ۴- هر ماه کشت را تجدید نمائید.

استرپتوکوکها

- ۱- سوش مورد نظر را در سطح آگار خوندار شیب دار(لوله‌ای درپیچ‌دار) کشت دهید.
- ۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
- ۳- پس از رشد کامل، لوله را در یخچال نگهداری کنید. (جهت استرپتوکوک پنومونیه، محیط را در دمای اتاق نگهداری کنید.)
- ۴- هر ماه کشت را تجدید نمائید

تهیه کننده : سهیلا عباسی

- **منگوکوک و هموفیلوس**

- ۱- سوش مورد نظر را در سطح محیط آگار شکلاته لوله‌ای یا پلیت کشت دهید.
- ۲- محیط را بمدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
- ۳- پس از رشد کامل، لوله را در حرارت اتاق نگهداری کنید
- ۴- هر۲ هفته کشت را تجدید نمائید.

لیوفیلیزه کردن

- لیوفیلیزه کردن یا خشک‌کردن انجمادی، شامل منجمد کردن کشت میکروبی و سپس خشک کردن آن در خلأ است.
- کشت باکتری ها را می توان با خشک کردن، حفظ و نگهداری نمود. ابتدا آن ها را به سرعت منجمد و آنگاه در خلأ خشک می نمایند. این روش لیوفیلیزاسیون نامیده می شود

- در فرآیند لیوفیلیزه کردن، به جای آن که ماده مورد نظر به طور مستقیم در حالت مایع خشک شود، ابتدا ماده مورد نظر منجمد و سپس در فشار پایین خشک می‌شود، زیرا خشک‌کردن مستقیم از حالت مایع، موجب چروکیده شدن و ایجاد تغییرات نامطلوب در ماده خشک شده می‌شود و آب‌گیری مجدد آن را نیز با مشکل مواجه می‌کند.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

لیوفیلیزه کردن

- ساده‌ترین شکل دستگاه لیوفیلیزه کننده، شامل یک محفظه خلأ است که نمونه مورد نظر در آن قرار داده می‌شود. در اثر ایجاد خلأ، آب موجود در نمونه، بخار می‌شود و خروج بخارهای آب از محفظه خلأ، موجب کاهش دمای نمونه و در نتیجه انجماد آن می‌شود.

- سپس فشار بخار آب در زیر فشار نقطه سه‌گانه نگاه داشته می‌شود. در این مرحله، دمای نمونه کاهش می‌یابد تا جایی که دمای آن به زیر نقطه انجماد برسد و تصعید نمونه – تا وقتی که شدت حرارت ورودی به نمونه به وسیله هدایت، تشعشع و جابه جایی برابر افت حرارت از نمونه در نتیجه تصعید مولکول‌های پر انرژی شود – ادامه می‌یابد و پس از آن تصعید متوقف می‌شود

نگهداری باکتری ها با روش خشک کردن در خلأ

- طی این روش ابتدا سوسپانسیون باکتری را در آمپول کوچکی در مخلوطی از الکل (گلیسرول) و یخ خشک (یخ گاز کربنیک)منجمد و تحت خلاء زیاد هوای آن را خالی می کنند.آب یخ تبخیر می شود و در این حالت سر آمپول را جلوی شعله می بندند.اگر منجمد کردن وخشک کردن به سرعت انجام گیرد، حتی گونه های حساس را می توان بدون تغییر مقاومت فیزیولوژیکی ماه ها یا سال ها به حالت زنده نگهداری کرد.
- امروزه از این روش برای نگهداری ویروس ها ، سرم های ضد باکتری، واکسن ها ومواد دیگر استفاده می شود.

دستورالعمل استفاده از ویال لیوفیلیزه نمونه شماره ۱

✓ نگهداری ویال لیوفیلیزه :

ویال های حاوی میکروارگانیسم های لیوفیلیزه را در یخچال $^{\circ}C$ ۸-۲ و دور از رطوبت نگهداری کنید. رطوبت و دمای بالاتر از $^{\circ}C$ ۸ میتواند باعث کاهش یا از بین رفتن قدرت رشد میکروارگانیسم ها شود.

✓ نحوه کشت از ویال لیوفیلیزه :

- بعد از دریافت نمونه ها هر چه سریعتر (حداکثر ۴۸ ساعت) نسبت به کشت آنها روی محیطهای مناسب اقدام نمایید.
- ابتدا پولک فلزی ویال را برداشته، در پوش لاستیکی آن را با الکل ۷۰٪ ضد عفونی کرده و اجازه دهید تا الکل کاملاً خشک شود.
- تحت شرایط استریل ml ۱-۲ از Brain Heart Infusion Broth (BHIB) را که همراه ویال های لیوفیلیزه باکتریایی ارائه شده است به وسیله سرنگ به ویال اضافه نموده، ویال را تکان دهید تا محتویات آن حل شود.

**** هشدار : بعلت اختلاف فشار درون ویال، هنگام تزریق محیط و خارج کردن سرنگ، احتیاط کنید.***

- به وسیله سرنگ چند قطره از سوسپانسیون فوق را روی محیط بلاد آگار حاوی ۳ تا ۵ درصد خون گوسفند(Sheep Blood Agar) و همچنین محیط های مورد نیاز جهت کشت نمونه مدفوع(مانندXLD; HE;MacConkey)تلقیح کرده، با لوپ آن را کشت دهید به گونه ای که کلنی های ایزوله روی محیط رشد کنند.
- پلیت هارا به مدت یک شبانه روز در دمای $^{\circ}C$ ۳۷-۳۵ انکوبه نمایید.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

دستور العمل استفاده از لوله TSA نمونه شماره ۲

✓ نگهداری لوله TSA:

لوله های TSA حاوی کشت میکروارگانیسم خالص را در یخچال $^{\circ}C$ ۸-۲ و دور از رطوبت نگهداری کنید.

✓ نحوه کشت از لوله TSA:

- بعد از دریافت نمونه ها هر چه سریعتر (حداکثر ۴۸ ساعت) نسبت به کشت آنها روی محیطهای مناسب اقدام نمایید.
- تحت شرایط استریل بوسیله لوپ یا سوآب استریل از کلنی های سطح و عمق محیط TSA، برداشته و بر روی محیط بلاد آگار حاوی ۳ تا ۵ درصد خون گوسفند(Sheep Blood Agar) و همچنین محیط های مورد نیاز جهت کشت نمونه مورد نظر کشت دهید به گونه ای که کلنی های ایزوله روی محیط رشد کنند.
- پلیت ها را به مدت یک شبانه روز در دمای $^{\circ}C$ ۳۷-۳۵ انکوبه نمایید.
- توجه ۱: در صورت عدم رشد پلیت ها، یک لوپ یا سوآب پر از کشت TSA برداشته و در یک محیط براث مغذی مانند TSB یا BHIB کشت دهید. براث را به مدت یک شبانه روز در دمای $^{\circ}C$ ۳۷-۳۵ انکوبه نمایید. سپس چند قطره از براث فوق را روی محیط بلاد آگار حاوی ۳ تا ۵ درصد خون گوسفند (Sheep Blood Agar) تلقیح کرده، با لوپ آن را کشت دهید به گونه ای که کلنی های ایزوله روی محیط رشد کنند.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

نحوه نگهداری طولانی مدت باکتری های ارسالی

از آنجا که باکتری های ارسالی به آزمایشگاه شما، سویه هایی با خصوصیات فنوتیپی مشخص می باشند، شما می توانید با نگهداری صحیح از آنها برای برنامه های کنترل کیفیت داخلی بخش میکروب شناسی استفاده نمایید. از کلنی های (۱۸-۲۴ساعته) رشد یافته بر روی محیط بلاد آگار،سوسپانسیون غلیظی در محیط Tryptic Soy Broth (TSB)حاوی ۱۰ تا ۱۵ درصد گلیسرول تهیه نمایید. ویالهای حاوی سوسپانسیون سویه را می توان در برودت $^{\circ}C$ ۵۰- تا ۷۰- به مدت طولانی نگهداری نمود.در صورت عدم دسترسی به فریزر $^{\circ}C$ ۷۰- می توان آنها را در فریزر $^{\circ}C$ ۲۰- حداکثر تا یک سال نیز نگهداری کرد.

هشدار:

- این فرآورده تنها برای استفاده In Vitro می باشد.
- میکروارگانیسم های لیوفیلیزه باید تنها در آزمایشگاه و توسط اشخاص آموزش دیده و مجرب تحت نظارت مسئول فنی استفاده شوند.
- در صورت آلوده شدن سطوح و وسایل به سوسپانسیون میکروبی ، با یک محلول باکتریسیدال مثل ایزوپروپیل الکل ۹۰-۷۰٪ ، فنل۲-۱٪ ، ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی یا هیپوکلریت سدیم (سفید کننده خانگی به نسبت ۱:۱۰ با آب رقیق شود) آنها را ضد عفونی کنید.

ویال های استفاده شده را قبل از دور ریختن به مدت ۳۰ دقیقه در $^{\circ}C$ ۱۲۱ اتوکلاو نمایید.

- **مواد، لوازم و تجهیزات:**
- ✓ محیط محافظت کننده از سرما مانند ۵۰٪ fetal calf serum، یا ۱۰٪ 15% glycerol در Tryptic Soy Broth (TSB)، یا Skim Milk، یا خون دفیبرینه گوسفند
- ✓ محیط کشت آگار خوندار پلیتی
- ✓ محیط کشت شکلات آگار پلیتی
- ✓ محیط کشت آگار خوندار شیبدار لوله ای درپیچ دار
- ✓ محیط کشت شکلات آگار شیبدار لوله ای درپیچ دار
- ✓ محیط کشت Tryptic Soy Broth (TSB)لوله ای درپیچ دار
- ✓ محیط کشتCystine Tryptic Agar (CTA) لوله ای درپیچ دار
- ✓ محیط کشت Brain Heart Infusion Agar (BHIA) شیبدار لوله ای درپیچ دار
- ✓ محیط کشت Cooked Meat لوله ای درپیچ دار
- ✓ روغن معدنی یا پارافین مایع استریل
- ✓ ویال های شیشه ای یا پلاستیکی کوچک درپیچ دار استریل
- ✓ یخچال
- ✓ فریزر^{o}C 70

از حسن توجه شما سپاسگزارم