



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، آزمایشگاه میکروبیولوژی



آزمایشگاه میکروبیولوژی پایه

بررسی میکروارگانیسم های حاضر در همه جا

➤ میکروبها همه جا هستند ، آنها در آبی که می نوشیم، در هوایی که تنفس می کنیم و در خاکی که روی آن راه می رویم، وجود دارند. آنها درون و روی بدن ما زندگی می کنند. میکروبها روی تمام اشکال حیات و در اکثر محیط ها جایی برای خود اشغال کرده اند. در اکثر موارد بی ضرر بوده و گاهی کارهای مفیدی برای ما انجام می دهند.

کشت باکتری

هنگامی که باکتری ها در شرایطی مناسب، قرار گیرند که قادر به تکثیر و رشد باشند، اصطلاحاً گفته می شود باکتری کشت داده شده است. کشت می تواند برای مشاهده ی تغییری باشد که کلنی روی محیط کشت افتراقی ایجاد می کند، یا

میتواند برای گرفتن کلنی تک باشد، یا تنها برای ازدیاد باکتری، تجدید کشت و نگهداری آن باشد. بعضی کاربردها برای کشت باکتریها عبارتند از:

- ایزوله کردن یا جدا کردن و خالص سازی باکتری. مثلاً با جدا کردن باکتری های مولد بیماری از افراد بیمار و شناسایی عوامل بیماریزا میتوان به ماهیت بیماری پی برد و جهت درمان ان اقدام نمود.
- استفاده از کشت باکتریایی برای درمان بیماری مانند تست آنتی بیوگرام. در این تست با در دست داشتن باکتری خالص شده میتوان تاثیر آنتی بیوتیک ها و داروها را روی باکتری بررسی نمود و بر اساس نتایج حاصله آنتی بیوتیک یا داروی مناسب را برای بیمار تجویز کرد.
- تهیه واکسن. با داشتن کشت های خالص باکتریها، میتوان آنتی ژنهای آن باکتری ها را جدا کرده و از آنها برای تهیه واکسن استفاده نمود.



▶ باکتریها با رشد در روی محیط کشت جامد، ایجاد کلنی هایی می کنند که با چشم غیر مسلح نیز دیده می شوند. هر کلنی عبارت است از جمعیتی از سلولهای باکتریایی که از یک عدد سلول تنها از باکتری در اثر تقسیمات متوالی بوجود آمده است .

▶ با وجود این که اکثر گونه های باکتریایی ، کلنی های مشابهی دارند ولی هر کلنی متفاوت معمولا متعلق به یک گونه مجزای باکتریایی می باشد. در این آزمایش وجود میکروارگانیزم ها در محیطهای مختلف و مشاهده مورفولوژی و مشخصات کلنی باکتریها، بوسیله کشت آنها در محیط جامد انجام می شود

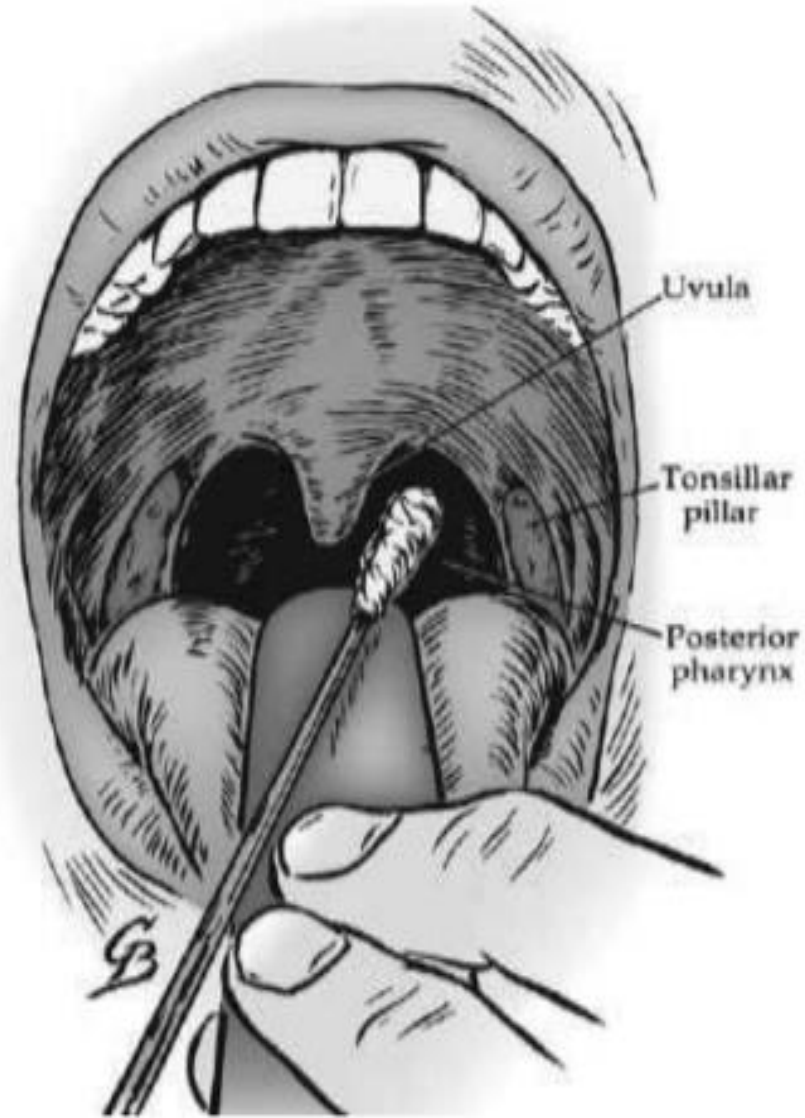
روش کشت میکروارگانیزم های هوا

➤ کشت از هوا به دو صورت انجام می شود، و برای سنجش کیفیت میکروبی هوا در اتاق های عمل انجام می شود. یک روش این است که درب ۱۵ پلیت را باز گذاشته و در مجاورت هوا قرار دهیم و سپس درب آن ها را ببندیم.

➤ روش دیگر این است که از پمپ تخلیه هوای دارای کاغذ صافی استفاده کنیم و سپس آن کاغذ را روی محیط کشت قرار می دهیم.

➤ برای کشت از سطوح از سوآب استریل استفاده می کنیم. اگر محیط مورد نمونه برداری خشک باشد باید ابتدا سوآب را با سرم فیزیولوژی مرطوب کنیم و بعد نمونه برداری کنیم.

➤ اگر باکتری ها از بدن انسان نمونه برداری شده برای رشد نیاز به یکسری از فاکتور های خونی دارند پس آن ها را باید بر روی بلاد آگار (Blood agar) کشت داد، و سایر موارد را روی نوترینت آگار (Nutrient agar) که تمامی موارد مورد نیاز برای رشد باکتری ها را شامل می باشد کشت می دهیم.



شکل ۱-۳: نمونه برداری از حلق توسط

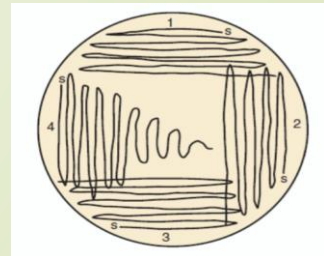
سواپ استریل

روش کار

8

تمامی مراحل به جز نمونه گیری باید در محدوده ی استریل اطراف شعله صورت گیرد.

- ۱- درب لوله های حاوی سوآب را در کنار شعله بردارید ۲- یک سوآب را به گونه ای بردارید که سایر سوآب ها به دست شما نخورد و آلوده نشود ۳- انتهای لوله سوآب ها را با شعله استریل کنید و درب آن را ببندید و در جای خود قرار دهید ۴- سر ارلن سرم فیزیولوژی را باز کنید و با شعله استریل کنید ۵- سوآب را درون سرم زده و بردارید ۶- سر ارلن را با شعله استریل کنید و ببندید ۷- نمونه گیری را از محل مورد نظر انجام دهید ۸- درب پلیت را در کنار شعله باز کنید و با سوآب به یک چهارم از پلیت بکشید ۹- سوآب را روی شعله گرفته تا بسوزد و سپس در ظرف سابلون بیاندازید ۱۰- لوپ را با شعله استریل کنید ۱۱- لوپ را به صورت شکل روبه رو از ناحیه باکتریایی به سمت قسمت آگار بکشید ۱۲- لوپ را مجدداً با شعله استریل کنید ۱۳- لوپ را به صورت شکل روبه رو از ناحیه باکتریایی به سمت قسمت آگار بکشید ۱۴- لوپ را مجدداً با شعله استریل کنید ۱۵- لوپ را به صورت شکل روبه رو از ناحیه باکتریایی به سمت قسمت آگار بکشید ۱۶- لوپ را با شعله استریل کنید و در جای خود قرار دهید ۱۷- پلیت را نام گذاری کنید و در انکوباتور قرار دهید



برای انجام کشت در محیط مایع کافی است مقداری از نمونه باکتری را به محیط کشت اضافه نماید. باکتری در محیط مایع پس از مدت زمان لازم، بسته به نوع میکروب، به صورت کدورت یکنواخت، غیریکنواخت و یا بصورت پرده ظریفی در سطح محیط کشت ظاهر میشود. در صورتیکه باکتری در محیط جامد کشت داده شود پس از مدت لازم (حدود شانزده الی هجده ساعت)، بجز بعضی از مایکوباکترها (سه تا شش هفته)، به صورت توده هایی در سطح محیط ظاهر میشود که کلنی نامیده می شوند.

پس از کشت دادن باید پلیت ها را به پشت درون انکوباتور گذاشته تا بخار های آب در صورت میعان کلنی ها را خراب نکند. همچنین مشخصات مربوط به کشت را در پشت پلیت بنویسید تا در صورت تعویض درب های پلیت دچار مشکل نشوید.

کلنی ها بر روی محیط کشت ، از نظر

➤ شکل ظاهری کلنی

➤ حاشیه (margin)

➤ شکل بر آمدگی و ارتفاع (elevation)

➤ رنگ

➤ بو

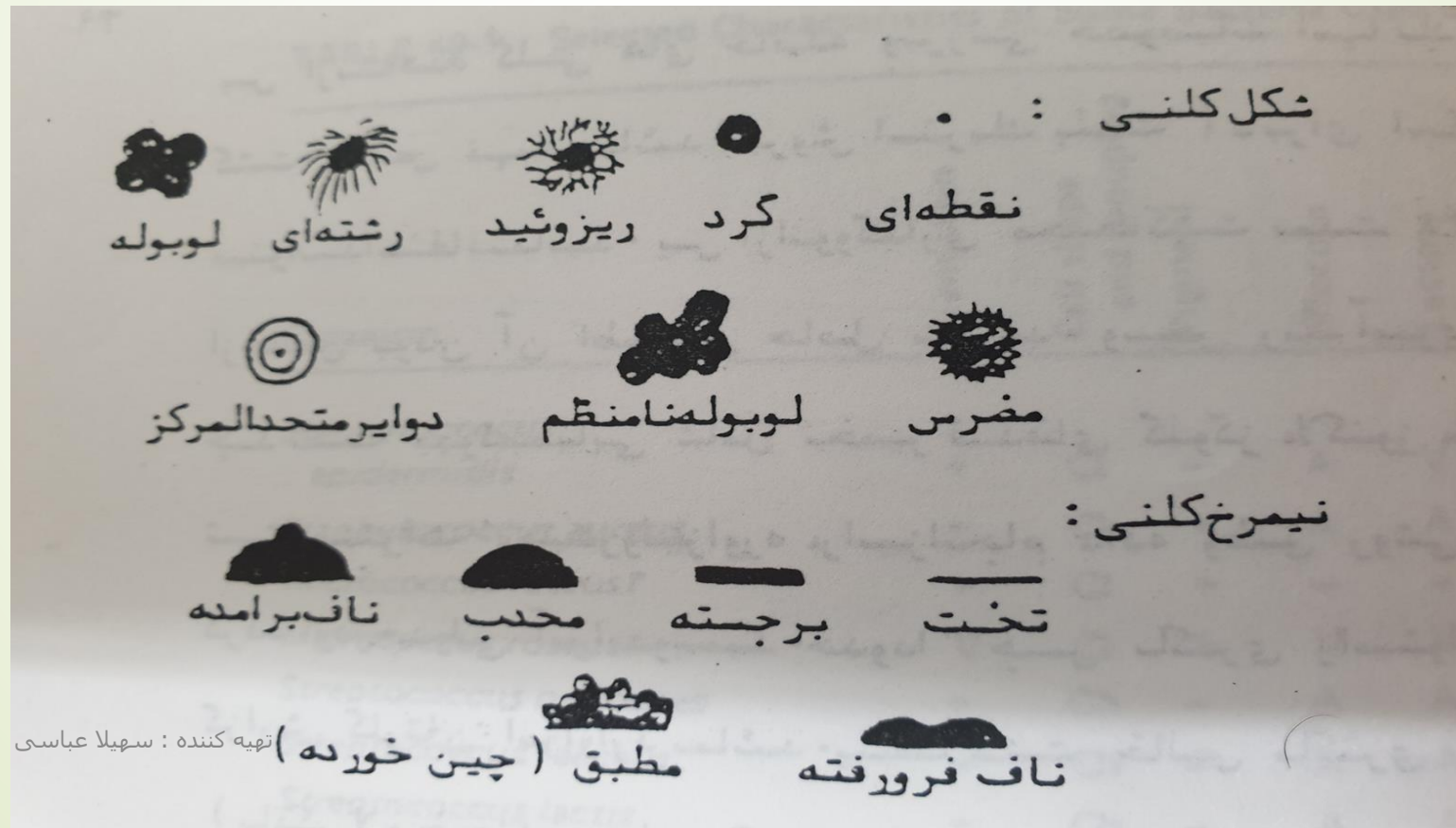
➤ حالت و بافت (surface texture)

➤ اندازه

مورد ارزیابی قرار می گیرند.

➤ شکل کلی کلنی می تواند به صورت نقطه ای، گرد، ریزوئیدی، نامنظم، رشته ای باشد.

➤ برای بررسی برآمدگی کلنی پلیت را در حالت نیمرخ بررسی می کنند. کلنی می تواند تخت، برجسته، محدب، ناف برآمده، ناف فرورفته با مطبق باشد. حاشیه کلنی می تواند صاف، رشته ای با کرکدار، موجدار و لبدار باشد.



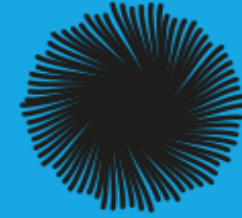
FORM



Circular



Irregular



Filamentous



Rhizoid

ELEVATION



Raised



Convex



Flat



umbonate



Crateriform

MARGIN



Entire



Undulate



Filiform



Curled

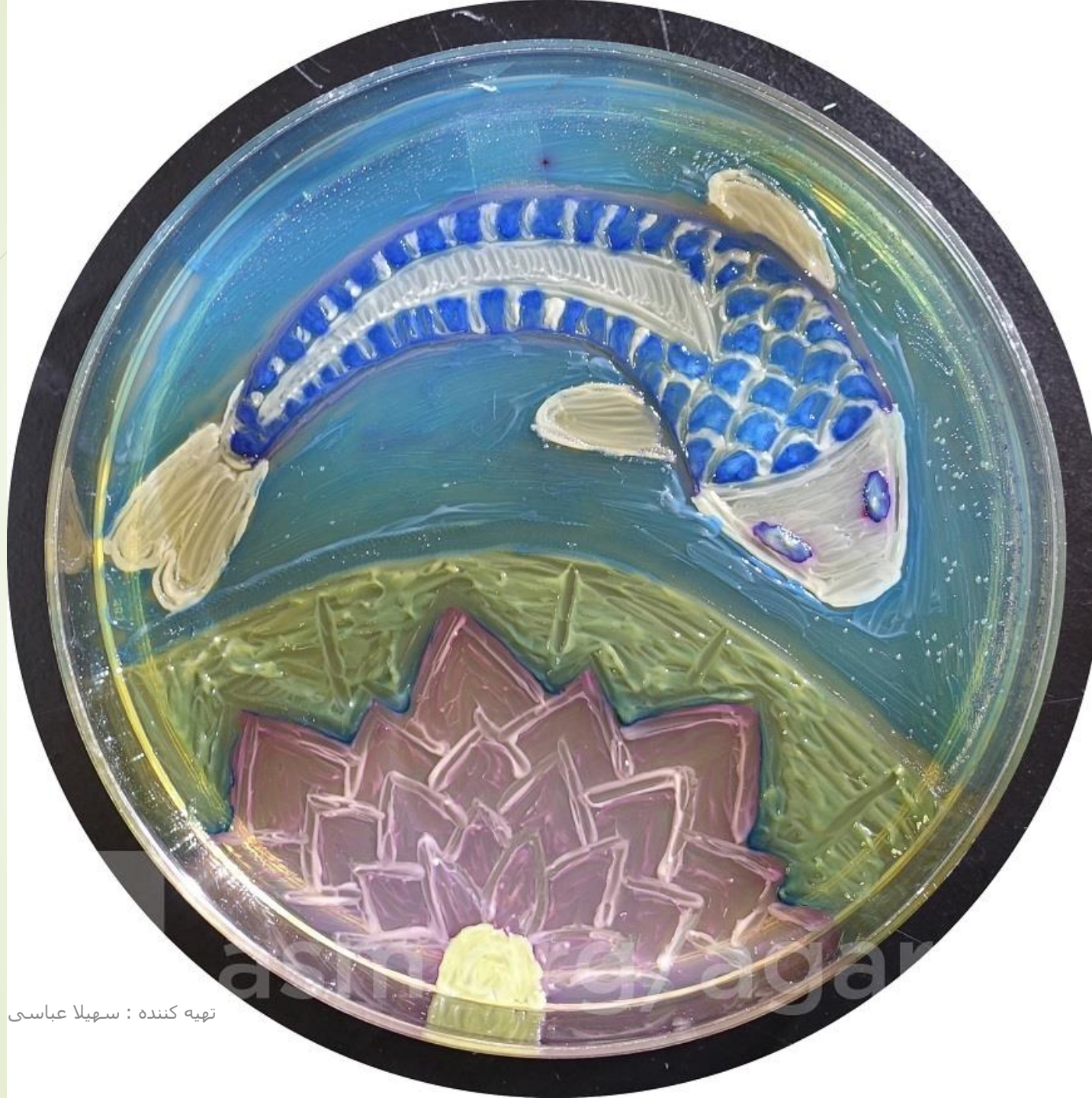


Lobate

➤ **اندازه کلنی:** کلنی ها می توانند

سوزنی (باقطر کمتر از ۰/۵)، کوچک (با قطر ۰/۵ تا ۳ میلی متر)، بزرگ (با قطر بیش از ۶ میلی متر) یا متوسط (با قطر ۳ تا ۶ میلی متر) باشند.

➤ **رنگ کلنی:** رنگ کلنی بر اساس رنگدانه های باکتری و نوع محیط کشت متفاوت است و می تواند شیری ، زرد ، سبز ، نارنجی ، قرمز و ... باشد



تهیه کننده : سهیلا عباسی

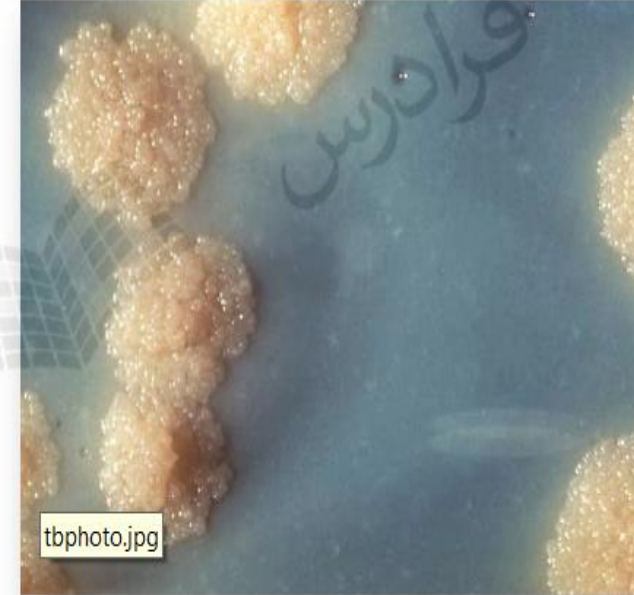
➤ **حالت کلنی:** از نظر کلنی، حالت‌های مختلفی وجود دارد. کلنی نرم (smooth) که در آن کلنی حالت مرطوب دارد، نور را منعکس می‌کند. و صاف و براق است. کلنی خشک (rough) که حالت خشن داشته و نور را منعکس نمی‌کند. مات است و سطح خشن و پر چین دارد. کلنی لزج (mucoïd) که مثل کلنی نرم است ولی حالت لزج و بلغمی شکل دارد.

➤ **بوی کلنی:** برخی از باکتریها دارای بوی مخصوصی هستند و در موارد خاصی کمک به تشخیص باکتری می‌کند ولی کمتر کاربرد دارد.

مشخصات کلونی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

17

Description	Result
Colony shape	Irregular form
Colony margin	Undulate margin
Optical property	Opaque
Colony elevation	Pulvinate
Colony color (pigment)	Yellow color
Colony surface	Rough



Mycobacterium tuberculosis

مشخصات کلنی استرپتوکوکوس پنومونیه

18

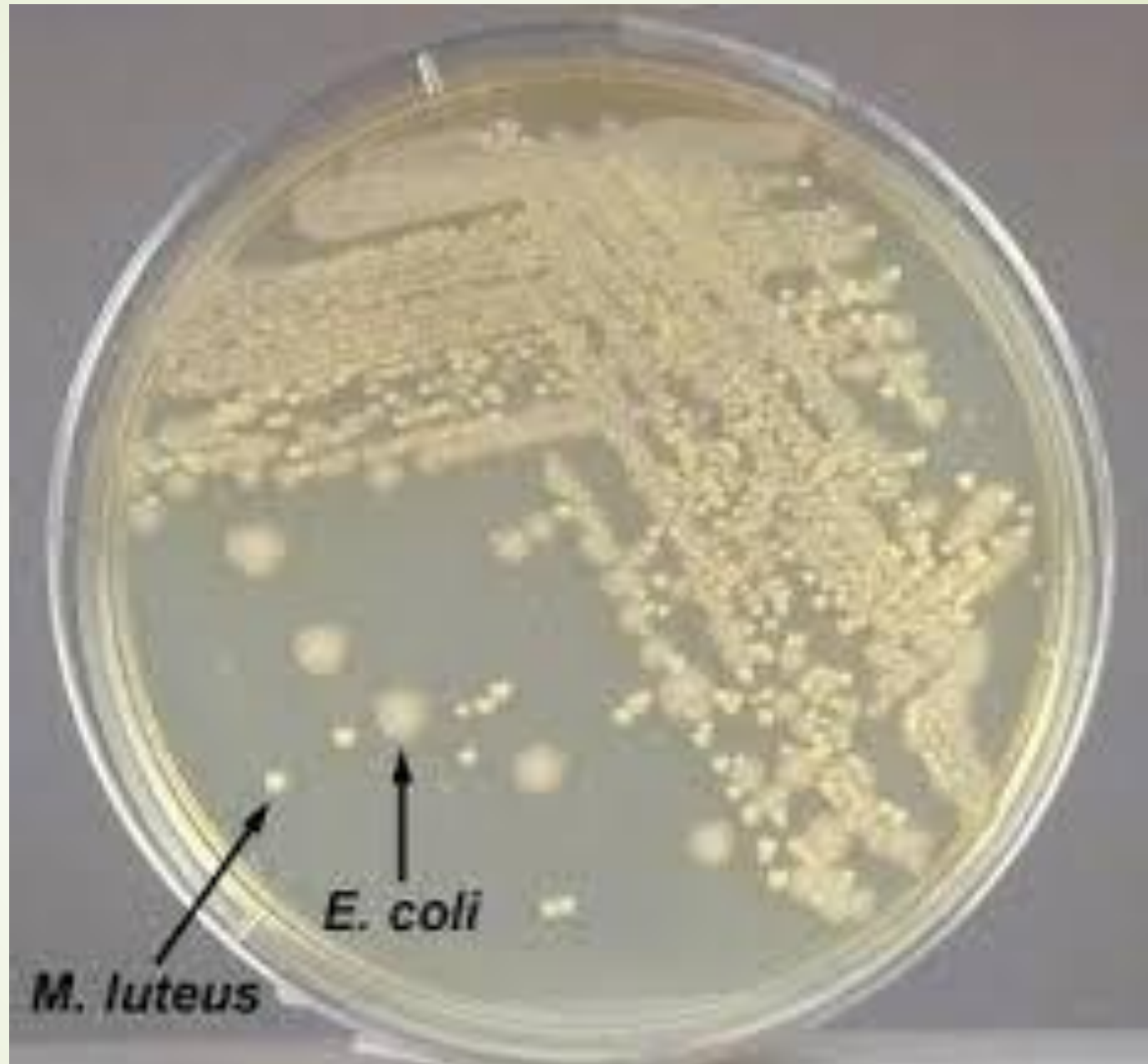
Description	Result
Colony shape	Circular form
Colony margin	Entire margin
Optical property	Opaque
Colony elevation	Raised
Colony color (pigment)	White color
Colony surface	Smooth



Streptococcus pneumoniae



تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی

21



تهیه کننده : سهیلا عباسی

00:45

12 0 11 44 11 44



تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی

25

AGAR ART

AGAR ART



تهیه کننده : سهیلا عباسی



با سیاس فراوان از توجه شما