دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی،
آزمایشگاه میکروبیولوژی

آزمایشگاه باکتری شناسایی ۱

آشنایی با اشکال مختلف کلنی باکتری ها و بررسی خصوصیات ماکروسکوپی باکتری ها

تهیه کننده:سهیلا عباسی

روش‌های تشخیص میکروارگانیسم‌ها

روش‌های سنتی و معمول تشخیص عامل باکتریایی عفونت شامل:

- مشاهده میکروسکوپی (مانند رنگ‌آمیزی گرم)
- بررسی فنوتیپی خصوصیات باکتری بر پایه کشت بر روی محیط‌های مصنوعی
- شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد ساختارهای باکتری با کمک روش‌های سرولوژیک
- تعیین حساسیت ضدمیکروبی (آنتی‌بیوگرام) است.

عنوان آزمایش : جداسازی باکتری‌ها از مواد طبیعی (آب ، هوا و خاک)

جداسازی باکتری‌های موجود در خاک

مقدمه:

- در خاک انواع مختلف میکروارگانیسمها، مخصوصا باکتری‌ها به تعداد زیاد یافت می‌شوند، باکتری‌های فراوانی را می‌توان از خاک جدا کرد بسیاری از آن‌ها در کشاورزی و زرراعت مفید می‌باشند و تعدادی نیز سبب بروز بیماری‌های خطرناکی در نزد انسان و دام می‌باشند. با در نظر گرفتن نوع باکتری جستجو شونده، محیط کشت مخصوص، شرایط خاص مانند درجه حرارت مشخص و مدت زمان معینی باید رعایت بشوند تا بتوان با موفقیت باکتری را جدا کرد.

مواد و وسایل لازم جهت انجام آزمایش :

نمونه‌های مختلف خاک	ترازو
محیط کشت بلاد آگار	پی پت استریل
محیط کشت آگار مغذی	میله شیشه‌ای سرکج
محیط کشت آبگوشت غذایی	بشر حاوی الکل
ارلن حاوی ۹۹ میلی لیتر آب مقطر استریل	محلولهای رنگ آمیزی گرم
لوله آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر آب مقطر استریل	محلولهای رنگ آمیزی اسپور

روش انجام آزمایش :

- ابتدا نمونه خاک مورد نظر را از کلیه مواد زائد و فضولات حیوان، لاشه گیاهان و دانه‌های درشت سنگ و سایر مواد پاک کرده و سپس بعد از زدودن این مواد خاک مورد نظر را با یک غربال ریز الک کرده و یک خاک نرم بدست بیاوریم
- به کمک ترازو، مقدار یک گرم از این نمونه خاک را توزین کرده و نمونه وزن شده را به آرامی وارد یک ارلن حاوی ۹۹ میلی لیتر آب مقطر استریل کرده و آنگاه ارلن را به خوبی تکان داده تا نمونه اضافه شده به خوبی با آب مقطر مخلوط و یکنواخت بشود.
- به کمک لوله‌های حاوی ۹ میلی لیتر آب مقطر استریل اقدام به تهیه رقت تا رقت 10^{-6} می کنیم
- و سپس به آرامی به کمک یک پی پت استریل مقدار۰/۱ میلی لیتر از رقت مورد آزمایش را در کنار شعله چراغ گاز به محیط‌های کشت نوترینت آگار و آگار خون دار اضافه کرده و سپس به کمک یک میله شیشه‌ای سرکج استریل نمونه‌های مورد نظر اضافه شده را به طور یکنواخت بر روی محیط‌های کشت یاد شده پخش می‌کنیم.
- ۱۰ تا ۱۵ دقیقه صبر کنید تا نمونه جذب محیط شود و بعد از آن محیط کشت‌ها را به ترتیب زیر برای جداسازی باکتری‌های مورد آزمایش اتوگذاری می‌نمائید.

- ۱-محیط کشت نوترینت آگار به مدت ۳الی۵ روز در دمای آزمایشگاه
- ۲-محیط کشت آگار خون دار به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد.

برای استریل کردن میله شیشه‌ای سرکج(spreader) میله را در ظرفی حاوی اتانول غوطه ور کرده سپس روی شعله قرار دهید تا زمانی که اتانول آتش بگرید. سپس میله را از شعله دور کنید و اجازه دهید تمام اتانول آتش بگیرد و شعله خاموش شود.

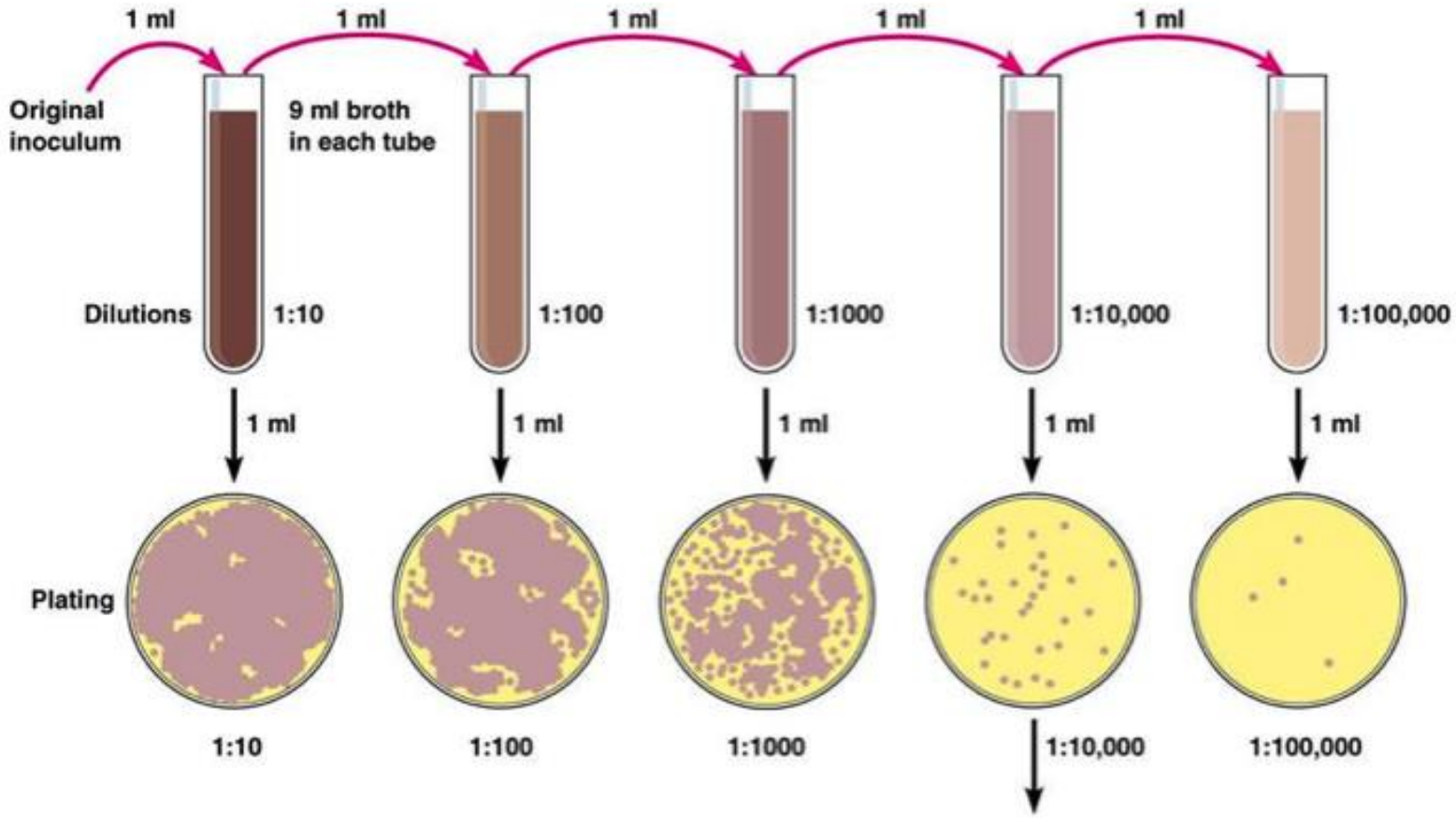
- بعد از طی شدن مدت زمان اتوگذاری و تهیه کشت میکروب‌ها در داخل پتری دیش ابتدا اقدام به شمارش تعداد کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط کشت می‌کنیم. پلیت‌هایی که حاوی ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی باشند قابل شمارش هستند. سپس با توجه به رقت مورد آزمایش و همچنین تعداد کلنی‌های شمارش شده و میزان حجم اضافه شده به محیط کشت تعداد باکتری‌های موجود در یک گرم از نمونه خاک مورد آزمایش را با کمک فرمول زیر بدست می‌آویم :

عکس ضریب حجم مورد آزمایش X عکس ضریب رقت X تعداد کلنی شمارش شده بر روی محیط = تعداد باکتری-های موجود در یک گرم از نمونه مورد آزمایش(CFU/g)

CFU=colony forming unit

رعایت نکات زیر در هنگام رقت سازی ضروری می باشد :

تمام کار رقت سازی باید کنار شعله و در شرایط استریل باشد.اگر از پیپت استفاده می کنید باید استریل باشد.در هر مرتبه باید قاطعا نمونه مخلوط شود.



Calculation: Number of colonies on plate × reciprocal of dilution of sample = number of bacteria/ml
(For example, if 32 colonies are on a plate of $^{1}/_{10,000}$ dilution, then the count is 32 × 10,000 = 320,000 bacteria/ml in sample.)

Copyright © 2007 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

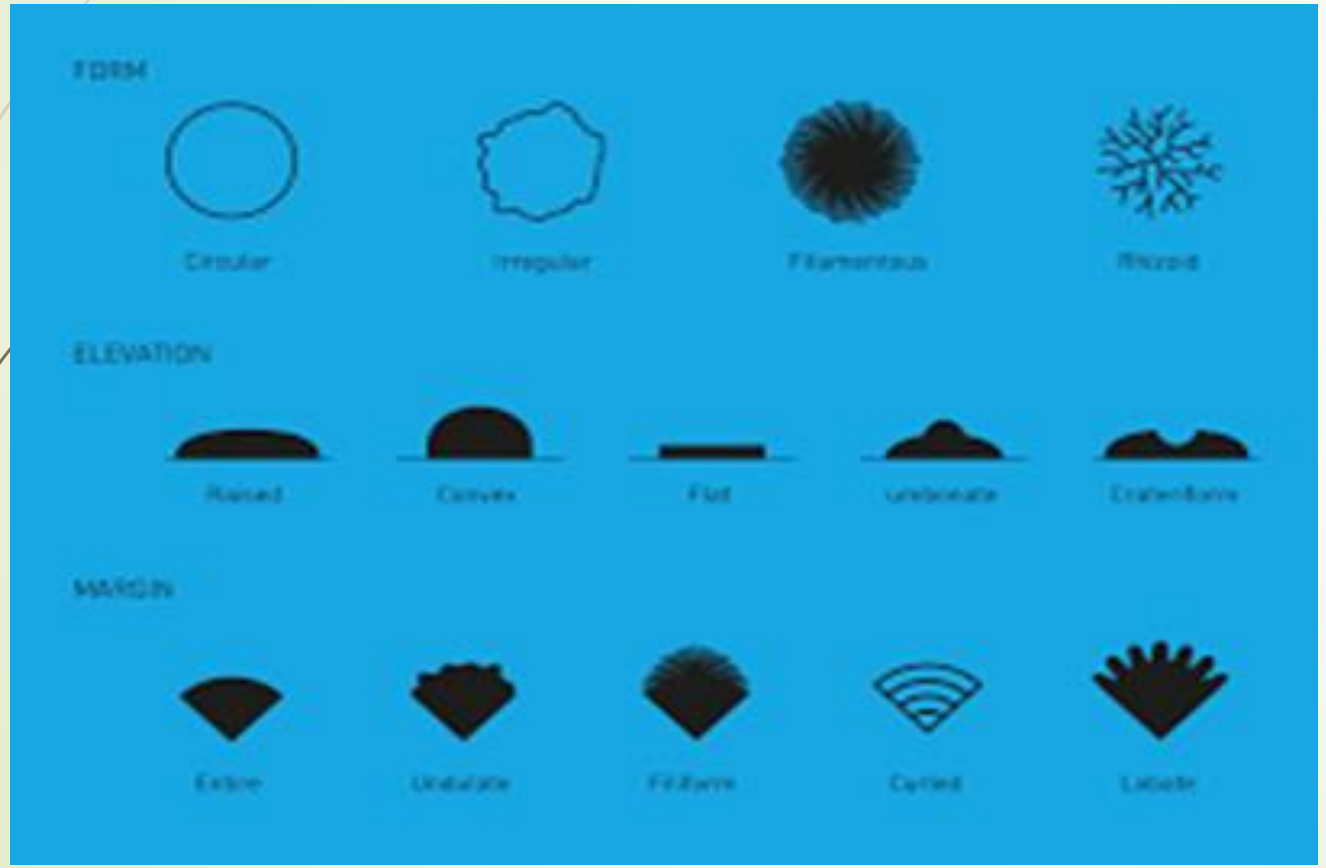
Figure 6.15

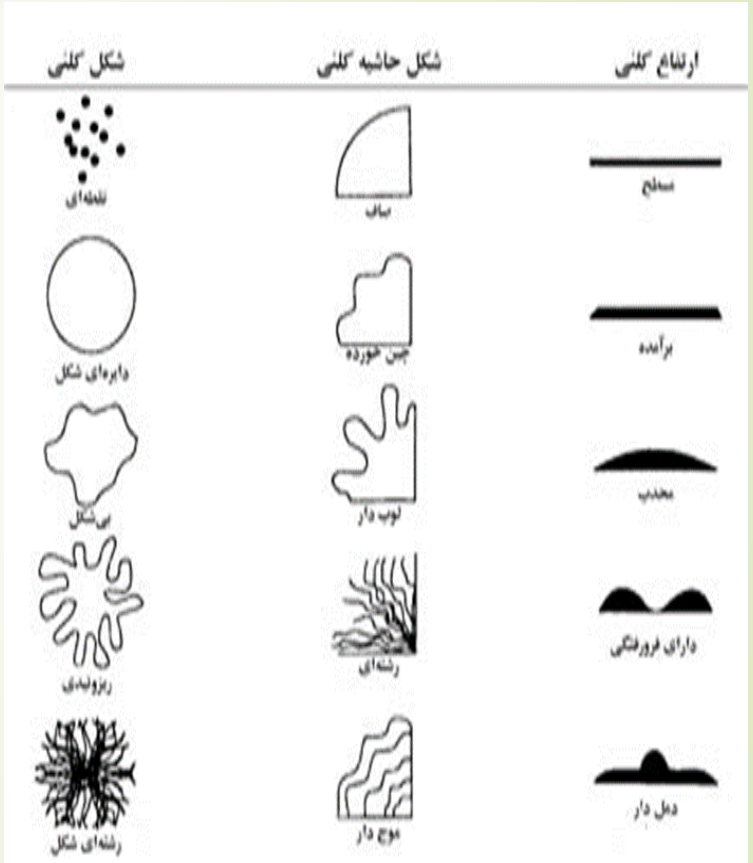
- برای مثال در صورتی که تعدادی کلنی‌های شمارش شده در محیط کشت نوترین آگار ۴۵ عدد و رقت مورد آزمایش $۱۰^{-۲}$ و همچنین مقدار ۰/۱ میلی لیتر از این رقت به محیط کشت اضافه شده باشد تعداد کلی باکتری‌ها در یک گرم از نمونه خاک مورد آزمایش برابر خواهد بود با :

تعداد باکتری‌ها موجود در یک گرم از نمونه خاک=۴۵ X ۱۰۰ X ۱۰=۴۵۰۰

- بعد از بدست آوردن تعداد باکتری‌های موجود در یک گرم از نمونه خاک مورد آزمایش اقدام به بررسی خصوصیات ظاهری کلنی باکتری‌ها بر روی محیط کشت کرده و سپس بعد از مشخص کردن صفات ظاهری یا ماکروسکپی کلنی باکتری‌ها اقدام به جداسازی و خالص سازی آنها می‌کنیم.

در شکل زیر برخی از خصوصیات ظاهری کلنی‌ها آورده شده‌است:





جداسازی باکتری‌های موجود در آب

- آب‌های موجود در سطح کره زمین دارای انواع زیادی از میکربها مانند پسودوموناس، میکروکوکها، فلاووباکتریا، اکروموباکتریا، انواع باکتری‌های هوازی مولد اسپور، انتروباکترها و استرپتومیست‌ها هستند.
- در آب‌های موجود در رودخانه‌ها و لوله‌های داخل شهرها نیز انواع باکتری‌های موثر بر آهن و سولفات نیز موجود می‌باشند.

مواد و وسایل لازم جهت انجام آزمایش :

نمونه‌های مختلف آب	پی پت استریل
محیط کشت آگار خوندار	میله شیشه‌ای سرکج
محیط کشت ائوزین متیل بلو	بشر حاوی الکل
ارلن‌های دهان گشاد استریل	سانتریفیوژ
لوله آزمایش استریل	محلول‌های رنگ آمیزی گرم و اسپور

نحوه انجام آزمایش:

- برای انجام آزمایش جداسازی تعدادی باکتری‌ها از آب ابتدا بعد از نمونه‌گیری از آب مورد آزمایش، به دو روش می‌توان اقدام به جداسازی و شناسایی باکتری‌ها در آب نمود :
- به کمک یک پی پت استریل مقدار ۰/۱ میلی لیتر از آب مورد آزمایش رار بر روی محیط کشت آگار خوندار و ائوزین متیل بلو اضافه کرده و سپس به کمک یک میله شیشه‌ای سرکج نمونه اضافه شده را بر روی محیط‌های فوق پخش نموده و آنگاه محیط‌های کشت فوق را به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد قرار می دهیم.
- بعد از رشد کلنی‌های باکتری‌ها بر روی محیط فوق اقدام به بررسی خصوصیات ظاهری کلنی‌ها کرده و آنگاه بعد از جداسازی و خالص سازی باکتری‌ها اقدام به تهیه لام از کلنی‌های خالص شده نموده و با انجام عمل رنگ‌آمیزی به روش گرم و مشخص کردن مرفولوژی و واکنش گرم باکتری‌ها جدا شده نوع باکتری‌های موجود در نمونه مورد آزمایش را مشخص می‌نمائیم.(جهت رنگ آمیزی گرم هرگز نباید از محیط افتراقی نظیر ائوزین متیلن بلو استفاده شود).

- در روش دیگر حدود ۵ میلی لیتر از آب مورد آزمایش را به کمک یک پی پت استریل وارد لوله آزمایش استریل نموده و سپس آن را به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ نموده و سپس بعد از عمل سانتریفوژ مایع رویی را با ملایمت دور ریخته البته باید دقت کرد که مقدار خیلی کمی از مایع در داخل لوله باقی بماند.
- بعد از یکنواخت کردن رسوب حاصل با مایع باقی مانده و به کمک پی پت استریل مقدار ۰/۱ میلی لیتر از رسوب را به داخل محیط کشت آگار خوندار و همچنین محیط کشت ائوزین متیل بلو اضافه کرده و به کمک میله شیشه‌ای سرکج مایع اضافه شده را به صورت یکنواخت بر روی محیط‌های فوق پخش نموده و آنگاه از محیط‌های فوق مانند حالت قبل، اقدام به جداسازی و شناسایی باکتری‌ها می‌کنیم

جداسازی باکتری‌های موجود در هوا

- هوا واجد انواع متفاوتی از میکروارگانیسم‌ها است. میکروب‌های موجود در هوا از طریق انسان و حیوانات دیگر، خاک و آب وارد هوا می‌شوند.
- این میکروب‌ها از نظر بیولوژیکی فعال نبوده ولی زنده می‌باشند میکروبها موجود در هوا پس از قرار گرفتن در محیط و شرایط مساعد رشد می‌کنند. برخی از میکروب‌های موجود در هوا قادر می‌باشند حتی برای سالها بصورت غیر فعال در هوا باقی مانده و پس از این زمان در صورتی که در شرایط مساعد قرار گیرند رشد کنند.
- نوع و تعداد میکروب‌های موجود در هوا به حمل آن بستگی دارد. در اماکن عمومی معمولا تعداد میکروب‌های هوا بیشتر از سایر نقاط است. جمعیت میکروب‌های موجود در هوا را می‌توان به کمک اشعه، U.V مواد ضد میکروب شیمیائی بخصوصی و یا استفاده از صافی کم کرد

باکتری‌هایی که معمولا در هوا وجود دارند عبارتند از:

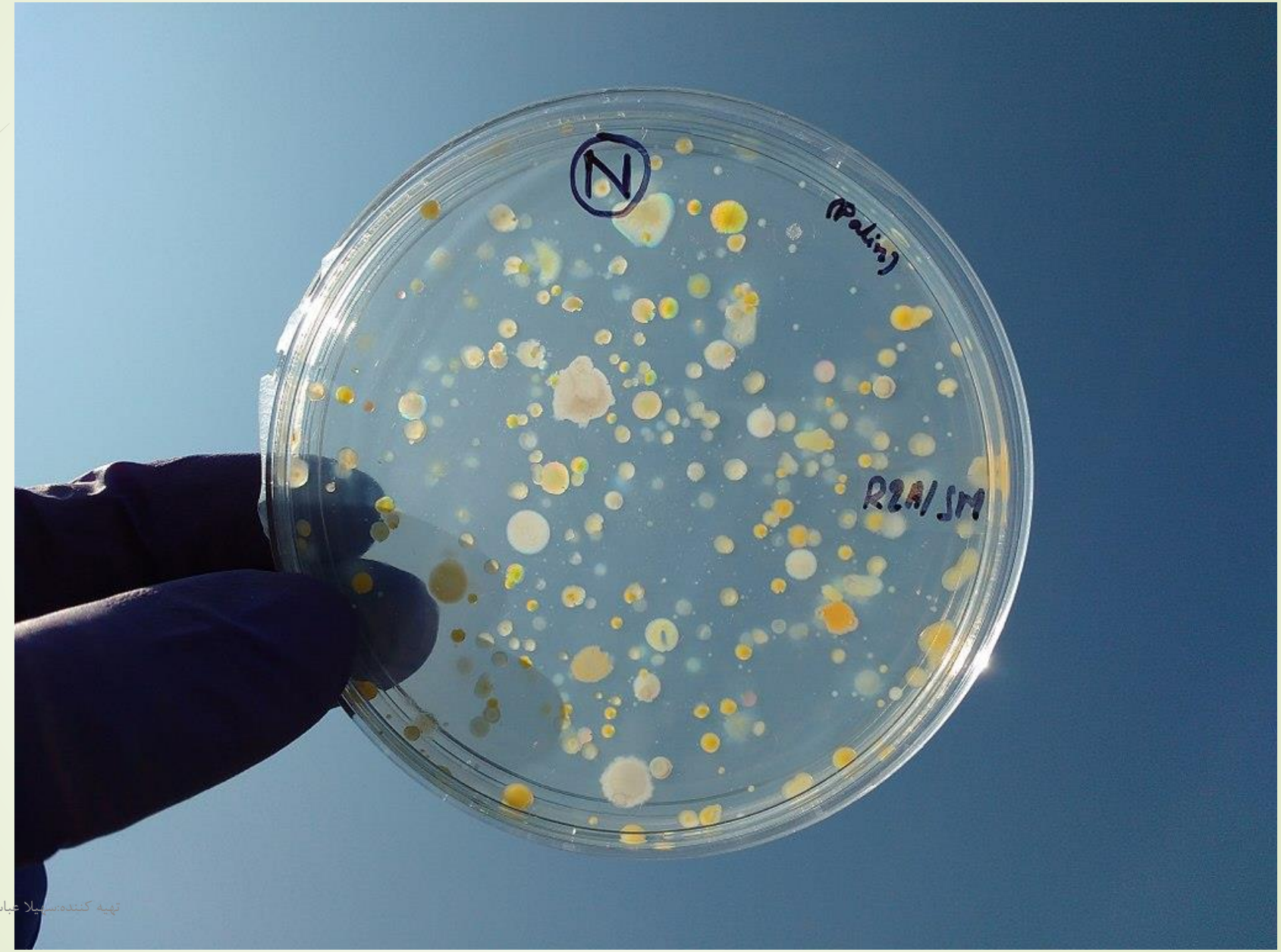
- باسیلوس‌ها، میکروکوکوس‌ها، سارسینا، کورینه باکتریوم، اکروموباکتر، فلاوباکتریوم، استافیلوکوکوس علاوه بر باکتری‌های معمول موجود در هوا، اسپور تعدادی از قارچ‌ها را هم می‌توان از هوا جدا نمود که عبارتند از :
- قارچ آسپرژیلوس، قارچ پنی سیلیوم، قارچ آلترناریا، قارچ پولولاریا، قارچ کلادوسپوریوم و غیره.

مواد و وسایل لازم انجام آزمایش:

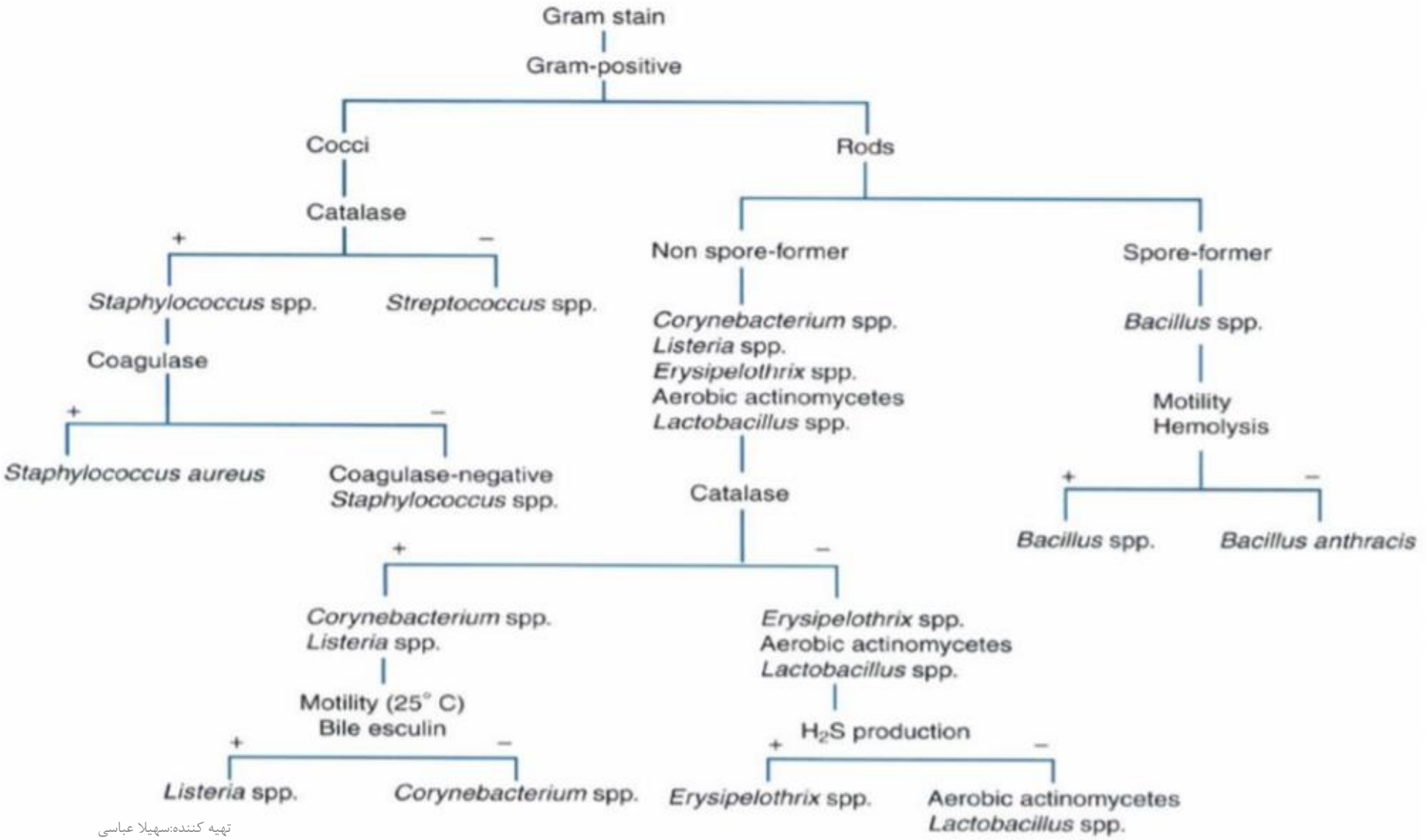
فضا مورد آزمایش	محیط کشت آگار خوندار
محلول‌های رنگ آمیزی گرم	

نحوه انجام آزمایش:

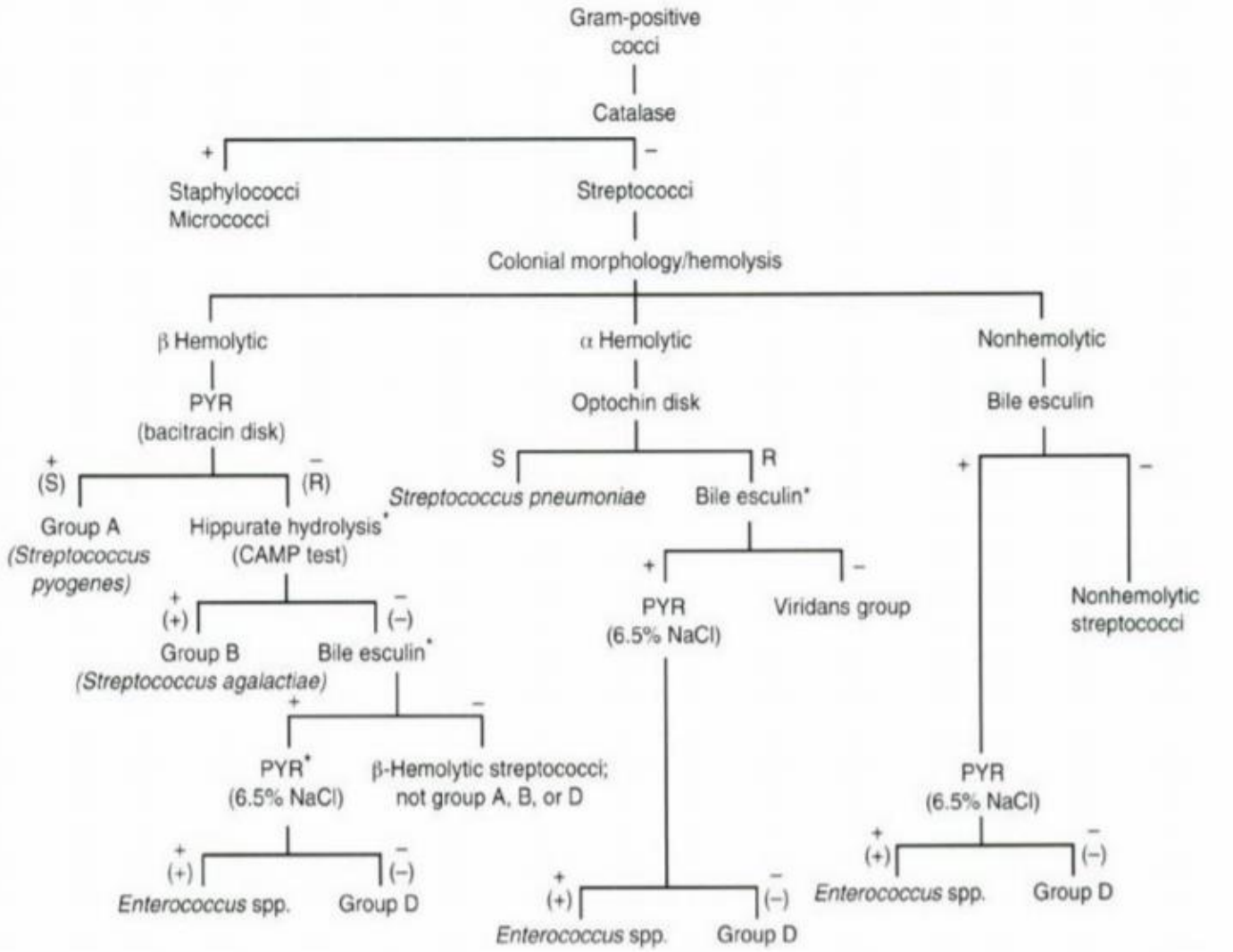
- روشی که در این بحث مورد استفاده می‌گیرد روش تماس مستقیم هوا با محیط کشت است.
- درب پلیت حاوی محیط کشت آگار خوندار را در محل مورد نظر بمدت حدود ۳۰ دقیقه باز نموده و اجازه می‌دهیم که در این مدت هوا محل مورد نظر با سطح محیط تماس پیدا کند برای این منظور می‌توان محیط کشت را در جاهای مختلف مانند فضای داخل آزمایشگاه، فضای دستشویی و غیره قرار دارد. بعد از سپری شدن مدت زمان فوق درب پلیت حاوی محیط کشت را بسته و محیط‌ها را به مدت ۳ الی ۵ روز در دمای آزمایشگاه قرار داده و اجازه می‌دهیم تا کلنی باکتری‌ها بر روی محیط کشت شروع به رشد کند و یا می توان محیط کشت را به مدت ۲۴ ساعت در حرارت۳۷ درجه سانتیگراد اتوگذاری نمود
- بعد از رشد کلنی باکتری با تهیه لام از باکتری و انجام عمل رنگ آمیزی به روش گرم، واکنش گرم و مرفولوژی باکتری جداشده را مشخص نموده و در صورت لزوم با انجام تست‌های بیوشیمیایی جنس و گونه باکتری را دقیقا شناسایی می‌نماییم.


N
Poling
R2A/ SM

چارت شناسایی باسیل های گرم مثبت

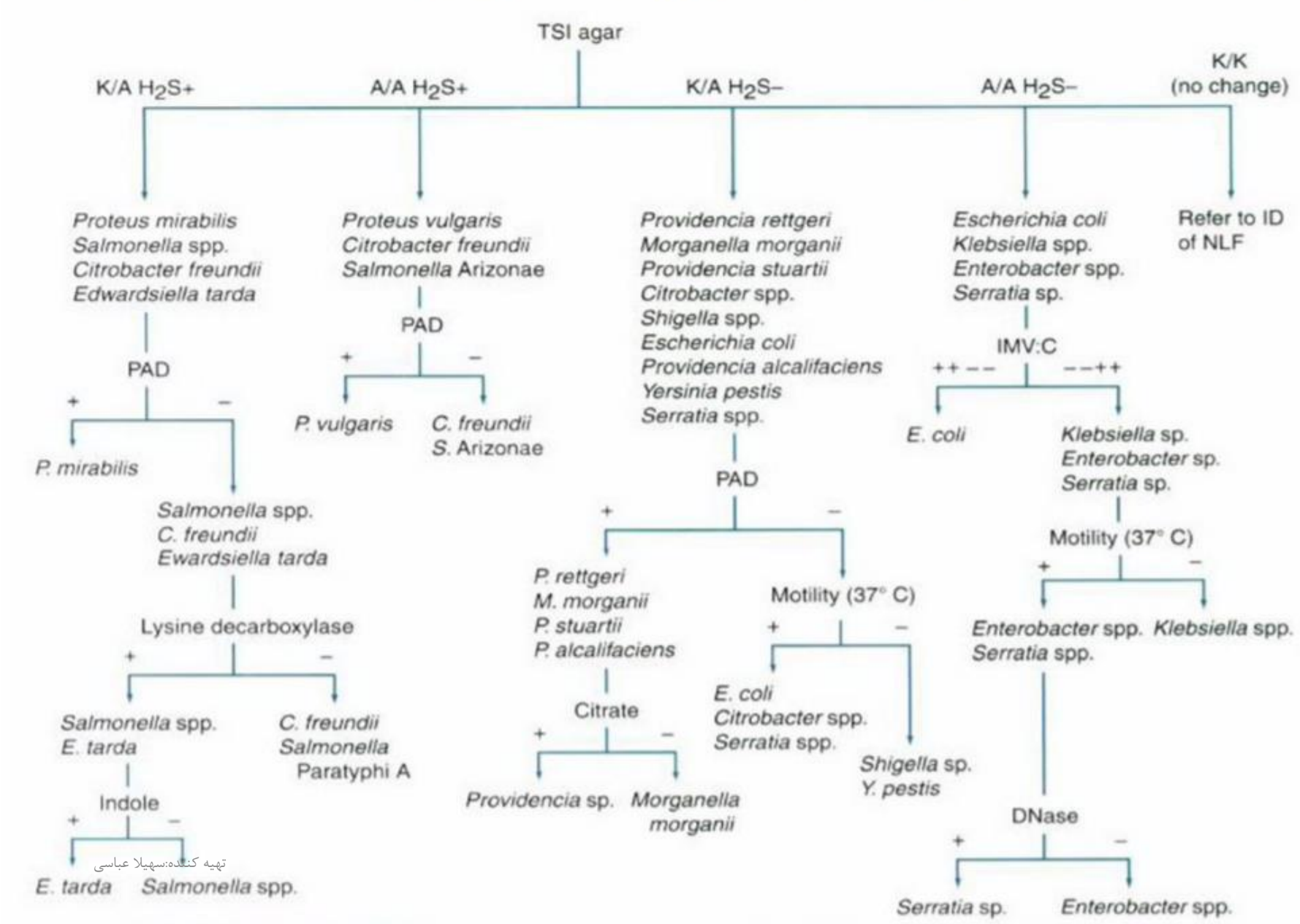


چارت شناسائی کوکسی های گرم مثبت کاتالاز منفی



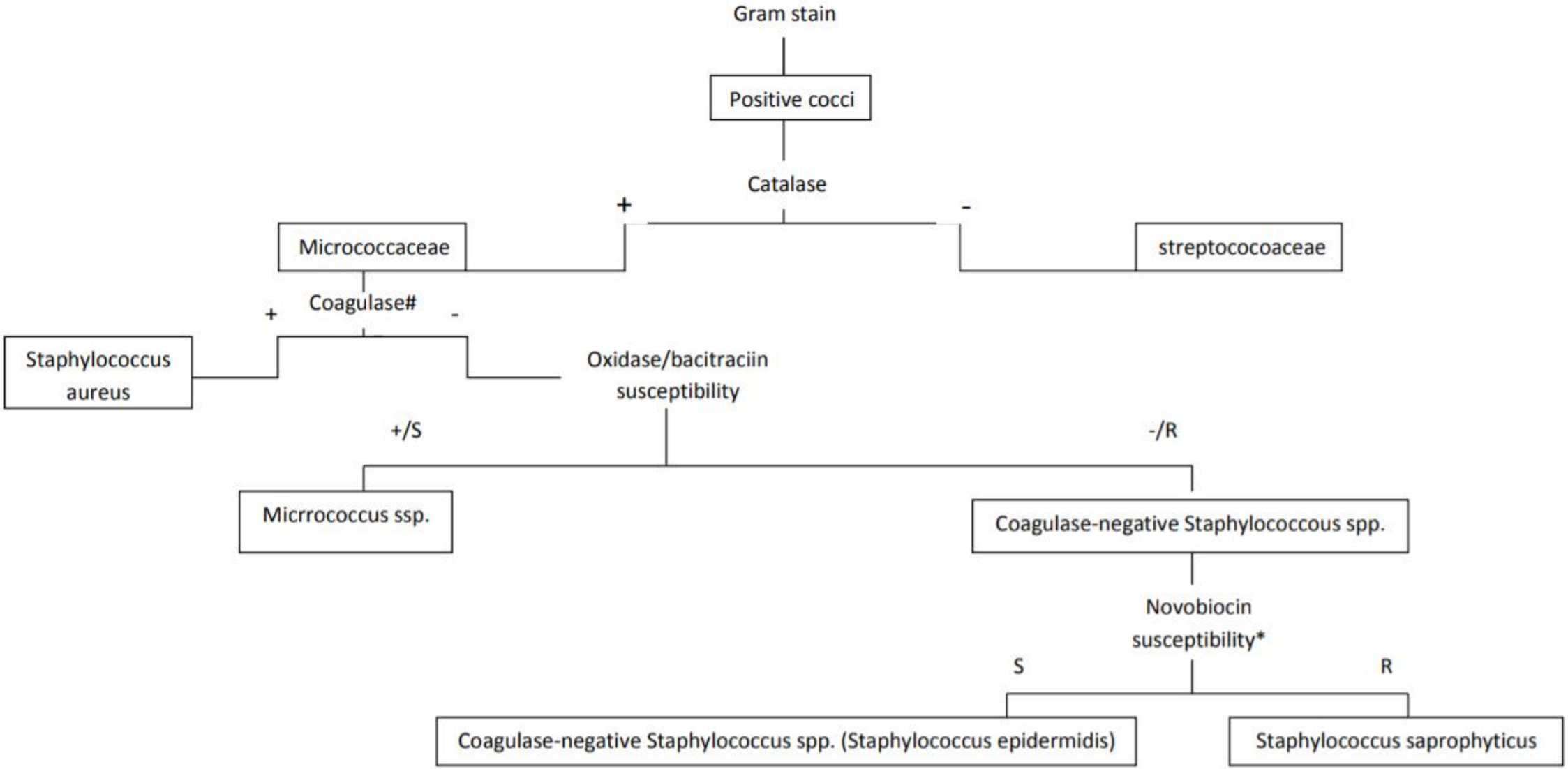
*Optochin disk ≥14mm:S <9mm:R 9-13mm:Do Bile esculin

چارت تشخیص احتمالی انتروباکتریاسه ها در برخورد با آگار



تهیه کننده:سهیلا عباسی

چارت شناسائی گونه های استافیلوکک



#علاوه بر S.aureus، S.lugdunensis، S.intermedius، S.schleferi و S.tryicus نیز کواگولاز مثبت می باشند.

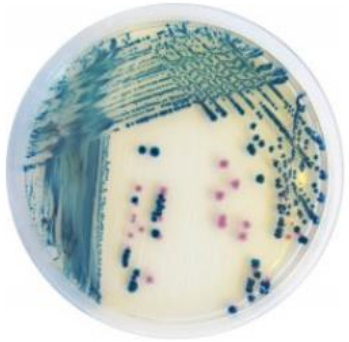
*Novobiocin susceptibility → S:16mm≤

تهیه کننده:سهیلا عباسی

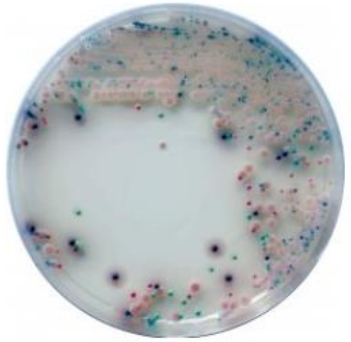
CHROMagar
The Chromogenic Media Pioneer

اهمیت روزافزون کنترل کیفیت محصولات غذایی و بهداشتی از لحاظ آلودگی های باکتریایی و حصول نتایج سریع تر و دقیق تر که امکان عرضه محصول به بازار را بدون فوت وقت فراهم نماید بر دست اندرکاران این بخش پوشیده نیست. از طرف دیگر سرعت اخذ نتایج و کاهش هزینه ها در آزمایشگاه های تشخیص پزشکی جزو اولویت ها میباشد. در روش کشت کروموژنیک با استفاده از محیط های کشت CHROMagar فرانسه، نتایج کشت در مدت فقط 18 - 24 ساعت قابل مشاهده است. در مقایسه، روش کشت سنتی علاوه بر اتلاف وقت پرسنل بخش میکروبیولوژی با توجه به نیاز به انواع مختلف محیط های کشت، ساپلیمنت ها و کیت های سرولوژیکی توجیه اقتصادی قوی ندارد. میکروبیولوژی کروموژنیک CHROMagar با تکیه برتکنولوژی تشخیص بر اساس آنزیم های اختصاصی باکتریهای پاتوژن بنا شده که توانسته سرعت و دقت بالا را همراه با سهولت کاربری و صرفه اقتصادی به ارمغان بیاورد. کمپانی CHROMagar علاوه بر تولید محیط کشت، به عنوان یک موسسه تحقیقاتی میکروبیولوژی فعالیت میکند و هر ساله با تولید گروهی از محیط های کشت جدید امکان جداسازی بخش دیگری از باکتریهای پاتوژن به این روش را فراهم میاورد.

📌کروم آگار برای میکربشناسی پزشکی

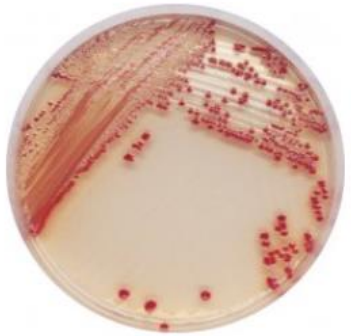


CHROMagar™ Y.enterocolitica

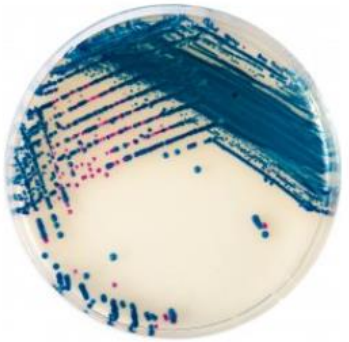


CHROMagar™ Candida

CHROMagar™ Salmonella



CHROMagar™ Acinetobacter



CHROMagar™ StrepB

- اگرچه برخی از این روش‌ها را می‌توان در عرض چند دقیقه انجام داد (رنگ‌آمیزی گرم برای مشاهده میکروسکوپی باکتری‌ها)، اما از دقت و قدرت تشخیصی کافی برای جداسازی میکروارگانیسم عامل برخوردار نیست.
- بنابراین روش‌های سنتی برای تعیین هویت دقیق یک باکتری، قطعی و ارزشمند نمی‌باشند. از طرفی در مورد برخی آزمایش‌ها مانند بررسی خصوصیات فنوتیپی و آنتی‌بیوگرام نیز صرف وقت زیادی لازم است و در مورد برخی از آن‌ها مانند روش‌های سرولوژیک ممکن است واکنش‌های متقاطع سبب عدم تشخیص قطعی عامل عفونت شود.

- الف- میکروبیولوژی ملکولی تکنیک های ملکولی یکی از قویترین ابزارها در بررسی میکروارگانیسم ها می باشند که سرعت بالایی در تعیین نوع ومشخصات آن ها دارند. این روش ها تحول بزرگی در آزمایشگاه میکروب شناسی ایجاد کرده اند و باعث تغییردر روش تشخیص میکروارگانیسم ها، مشخصات و میزان آن ها شده است. در برخی ازا ین روش ها این توانایی سبب شده است که مستقیماً از نمونه بالینی طی چند ساعت نتایج لازم را بدست آوریم.
- میکروبیولوژی مولکولی براساس استفاده از اسیدنوکلئیک به ۳ بخش تقسیم می شود.
- ۱ -شناسایی میکروارگانیسم بدون استفاده از تکثیر اسید نوکلئیک می باشد. در این روش از نور یا رنگ حاصل از هیبریداسیون یک پروب اسید نوکلئیک و اسید نوکلئیک استفاده می شود.
- ۲- با استفاده از تکثیر اسید نوکلئیک نوع میکروارگانیسم، مشخصات آن ومیزان آن تعیین می شود.
- ۳ -روش های ملکولی که جهت تعیین ارتباط بین میکروارگانیسم (تایپینگ گونه ها) استفاده می شوند، یکی از ابزارهای مهم برای اپیدمیولوژی سلامت می باشند. پس از انجام این مراحل نتایج به دست آمده آنالیز می شوند که بر اساس روش استفاده شده، آنالیزمتفاوت می باشد.

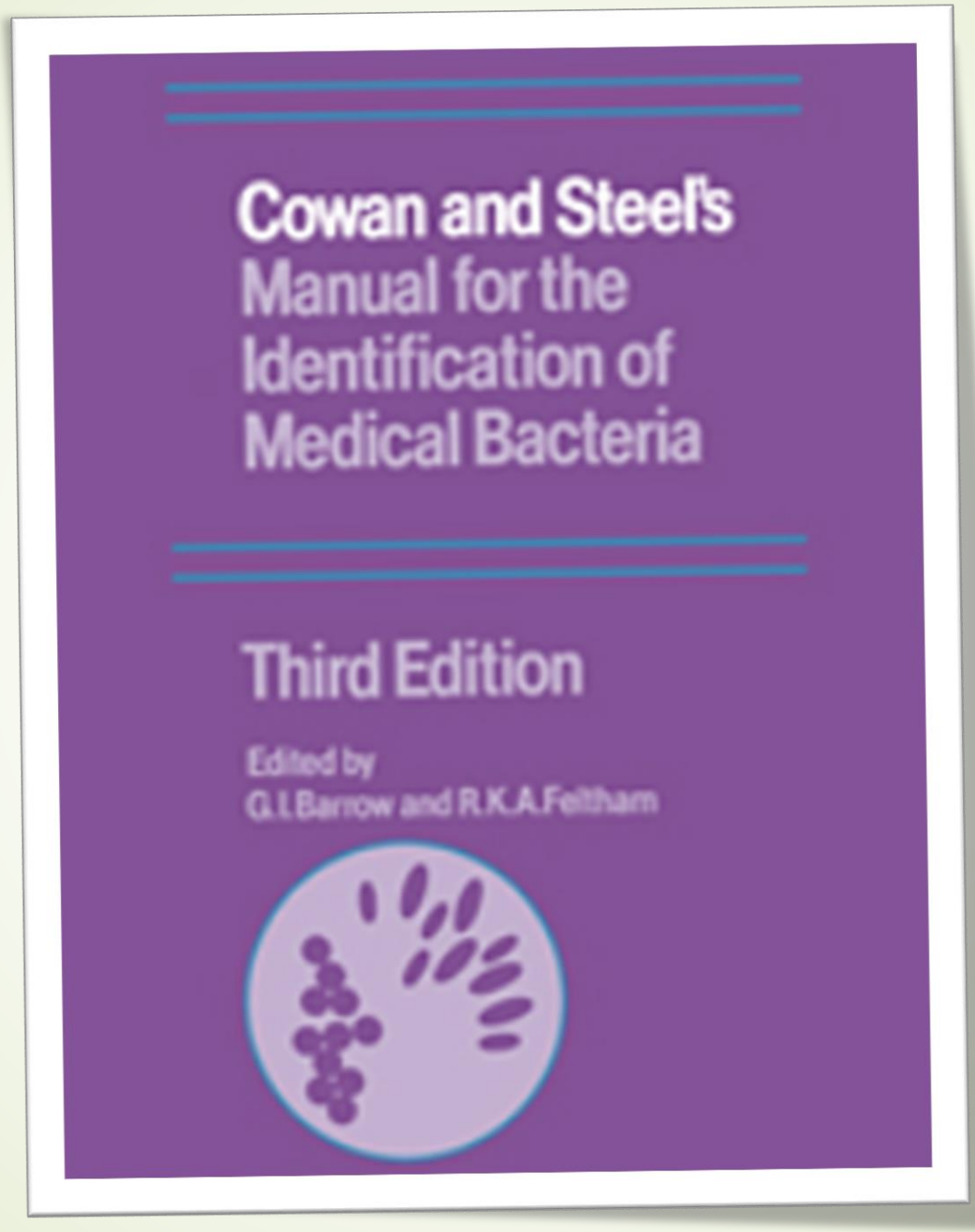
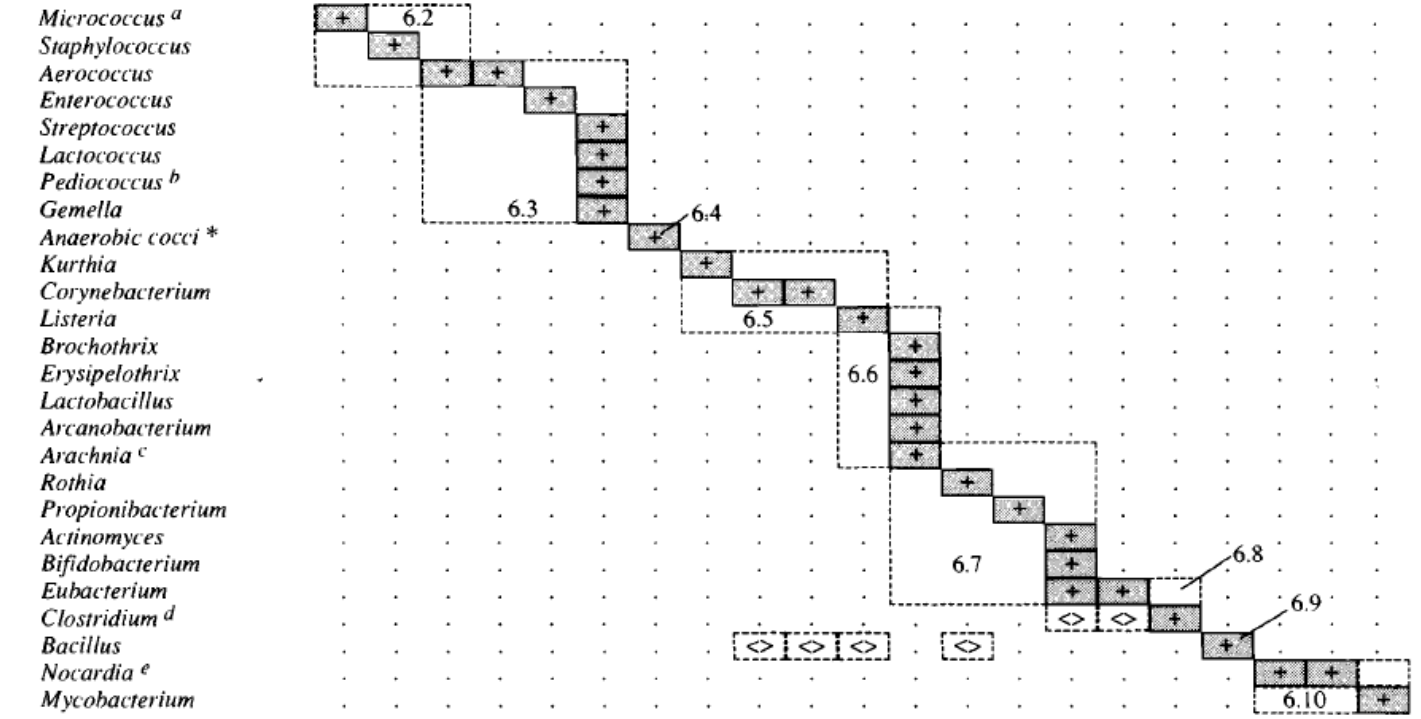

Cowan and Steel's
Manual for the
Identification of
Medical Bacteria
Third Edition
Edited by
G.I.Barrow and R.K.A.Feltham

Table 6.1. *First-stage table for Gram-positive bacteria*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Shape	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Acid fast	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	w	+
Spores	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–
Motility	–	–	–	–	D	–	–	d	–	–	+	–	–	–	–	–	D	D	–	–	–
Growth in air	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	d	+	+	+	+
Growth anaerobically†	–	+	w	w	+	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	D	–	–	?
Catalase	+	+	w	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+	+	–	–	–	+	+	+	+
Oxidase	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	?	?	?	?	?	d	–	–	–
Glucose (acid)	D	+	+	+	+	+	+/–	–	–	+	+	+	+	+	+	–	D	D	+	+	+
Carbohydrates [F/O/–]	O/–	F	F	F	F	F	F/–	–	–	F	F/–	F	F	F	F	–	F/–	F/O/–	O	O	O/NT



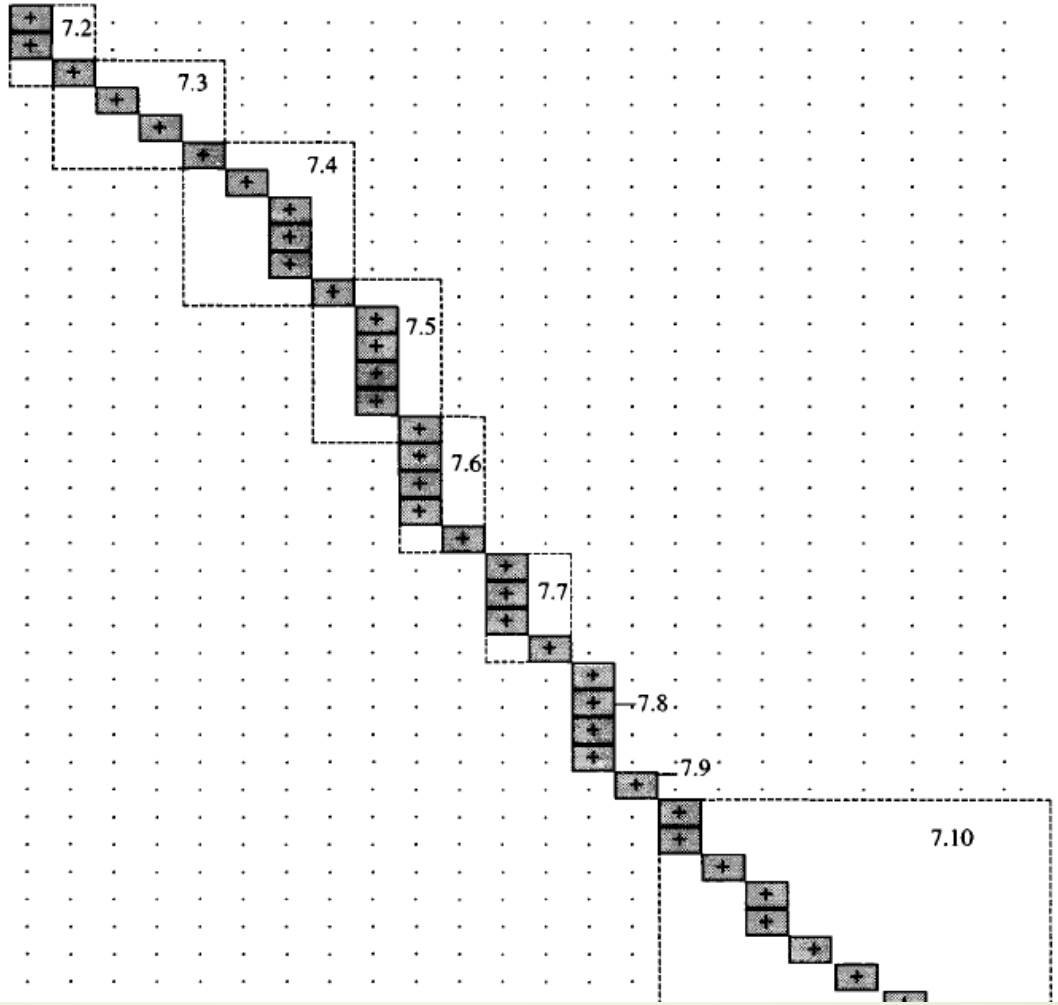
* *Peptococcus* and *Peptostreptococcus*.
a Also *Stomatococcus*.
b Also *Leuconostoc*.
c Also *Actinomyces odontolyticus*.
d Exceptions: *C. histolyticum*; *C. tertium*; *C. carnis*.
e Also *Actinomadura*.

Cultural characters of these organisms can be found in tables with the number indicated.
S Sphere (coccus).
R Rod-shaped (bacillus).

Table 7.1. *First-stage table for Gram-negative bacteria*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Shape	R	S	S	S	S/R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R/S	R	H/C	H/C	H	R	R	NT
Motility	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	+	D	–	–	+	+	+	–	+	NT
Growth in air	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–*	–†	+	–	+	+	+
Growth anaerobically	+	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	–	+
Catalase	d	D	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	D	–	D	+	–	–	+	?
Oxidase	–	?	+	+	–	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	D	+	+/w	+	–	–	D	?
Glucose (acid)	D	–	+	–	+	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	D	–	–	–	+	+	–	?
Carbohydrates [F/O/–]	F/–	–	O	–	O/–	F	–	–	–	O	O/–	F	F	F	F	NT	–	–	–	F	F	–	?

Bacteroides
Fusobacterium [a]
Veillonella [b]
Neisseria
Branhamella
Acinetobacter
Kingella
Moraxella
Brucella
Bordetella pertussis
Bordetella parapertussis
Bordetella bronchiseptica
Alcaligenes
Shewanella
Pseudomonas (alkali-producers)
Achromobacter
Agrobacterium [c]
Janthinobacterium
Pseudomonas (oxidizers) [d]
Flavobacterium [e]
Actinobacillus
Pasteurella
Aeromonas salmonicida
Cardiobacterium
Chromobacterium
Vibrio
Plesiomonas
Aeromonas
Enterobacteria [f]
Haemophilus
Gardnerella
*Eikenella**
Campylobacter
Helicobacter
Arcobacter
Anaerobiospirillum
Streptobacillus [g]



با تشکر از حسن توجه شما

تهیه کننده:سهیلا عباسی