



دانشگاه اصفهان

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



آزمایشگاه میکروب ۲

روش های کشت باکتری

هدف از انجام کشت

- در محیط های طبیعی، باکتری ها کنار هم رشد می کنند و جمعیت میکروبی مخلوطی را تشکیل می دهند اما برای شناسایی یک عامل عفونی خاص باید با به کار بردن روش های خاص این جمعیت ها را از هم جدا کنیم و به طور جداگانه پرورش بدهیم و خصوصیات مختلف رشد و ویژگی های بیوشیمیایی آنها را مورد بررسی قرار بدهیم که نهایت به شناسایی صحیح باکتری برسیم.



- یک باکتری در محیط کشت جامد یا مایع به دلایل مختلفی کشت می شود.
- **کشت** می تواند برای مشاهده تغییر باشد که کلنی روی محیط کشت افتراقی ایجاد می کند، یا برای گرفتن کلنی تک باشد، یا تنها برای ازدیاد باکتری، تجدید کشت و نگهداری آن باشد. مشاهده حرکت باکتری، رشد آنتاگونیسم دو یا چند باکتری در کنار هم، مشاهده هاله های عدم رشد اطراف ماده های خاص و بسیاری دلایل دیگر انجام شود. ما در این جا رایج ترین و پرکاربردترین روش های کشت را معرفی می کنیم.



روش کشت باکتری

• کشت در پلیت : به سه روش قابل انجام است.

۱- کشت خطی

۲- کشت سطحی

۳- کشت آمیخته یا پورپلیت

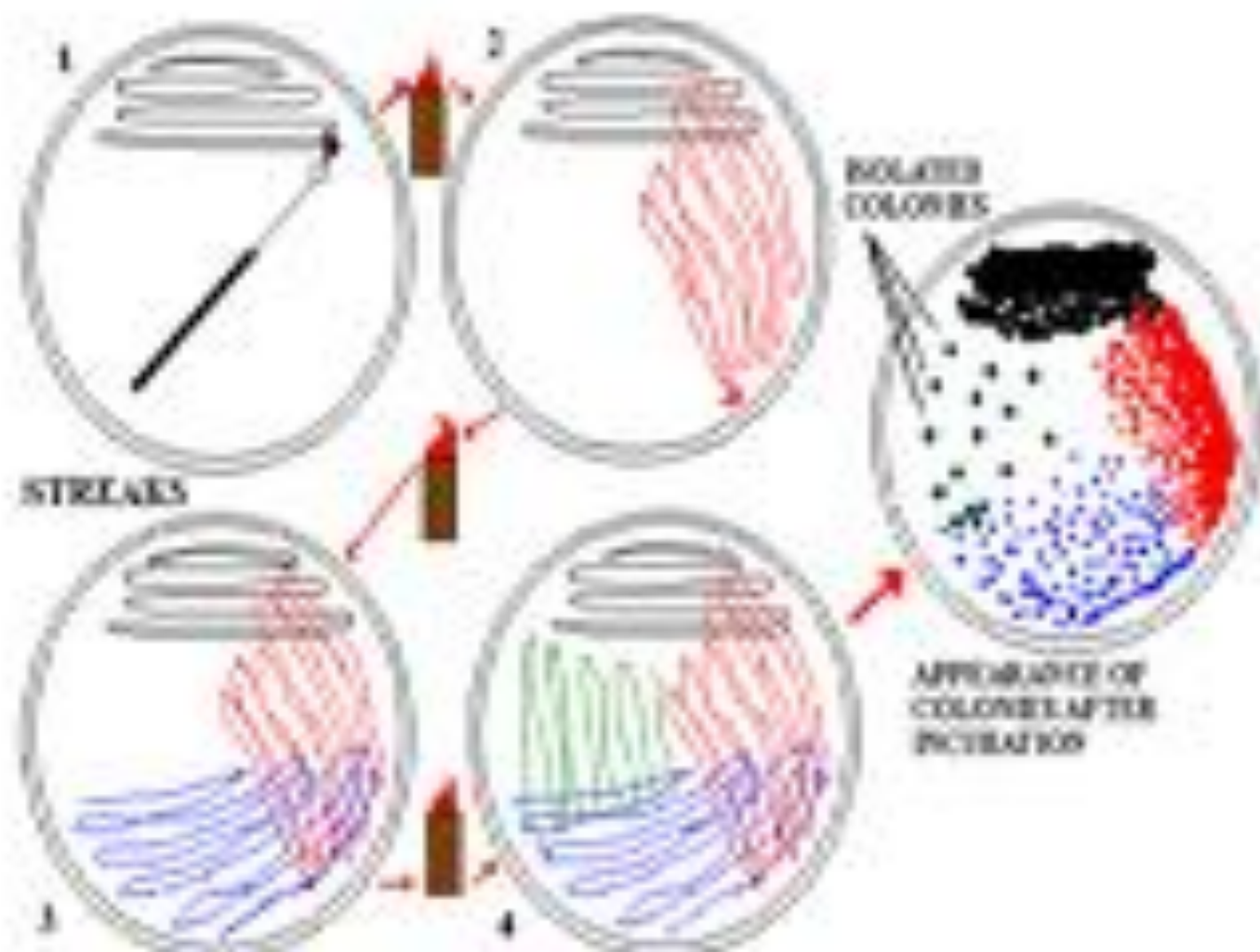


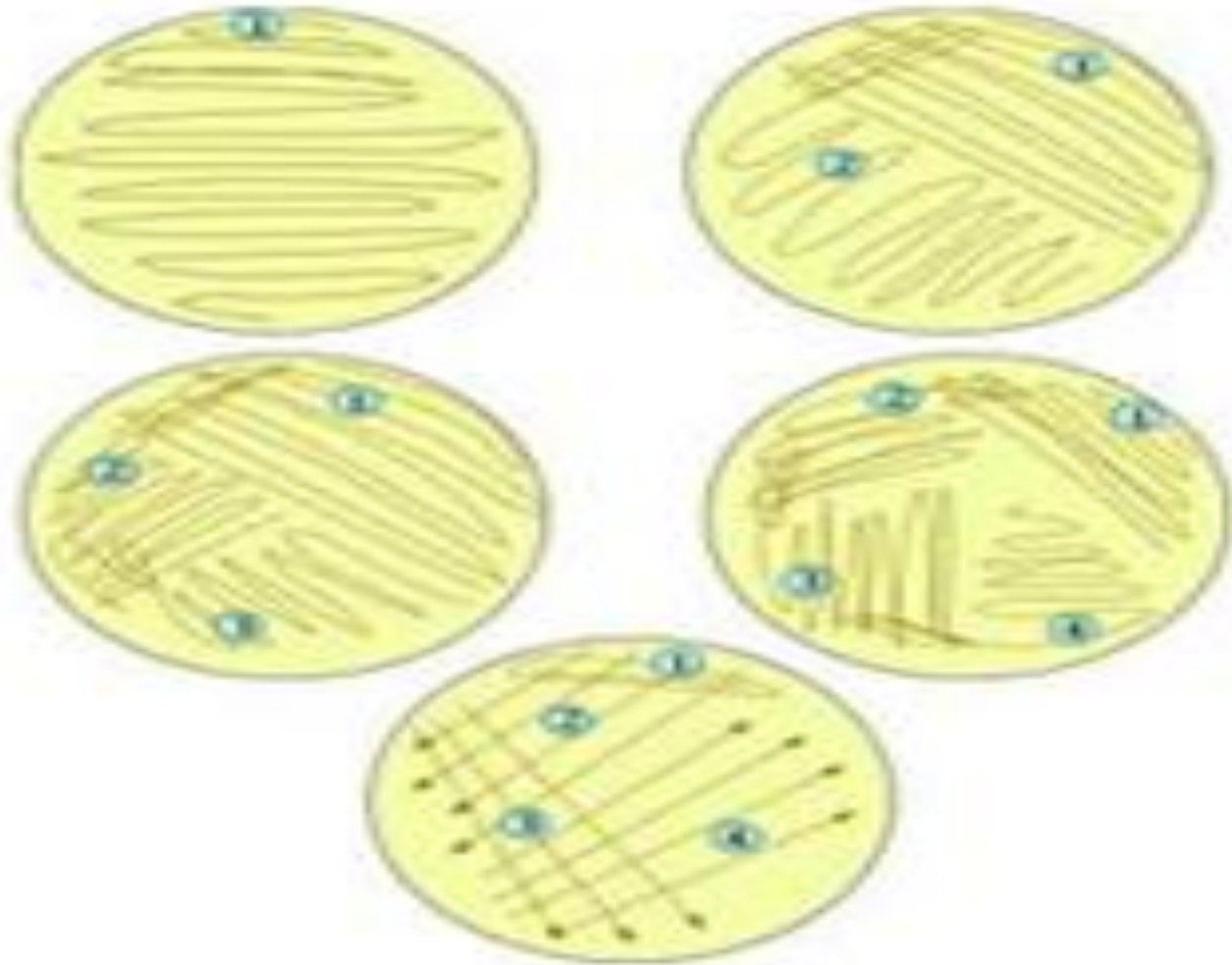
Streak Plate

- روشی اقتصادی و ساده که مراحل کشت باکتری روی یک پلیت انجام گرفته. به این کشت، کشت خطی یا ۴ مرحله ای می گویند. از جمله نواقص این روش اینه که نمی شود تعداد باکتری موجود در نمونه را شمارش کرد و فقط میشه کلونی خالص بدست بیاریم.

- هدف از انجام این تست هم جدا کردن یک سویه خالص باکتری است در این روش با کشیدن خطوطی بر سطح آگار باکتری ها تا حدی از هم جدا شده تا بعد از رشد و تکثیر بصورت کلونی های تکی بر سطح محیط کشت دیده بشوند. حرکت دست هم در محیط کشت بصورت رفت و برگشت لوپ صورت می گیرد. اگر کشت خطی را درست انجام داده باشیم، باکتری ها باید در بخش ۱ (حرکت رفت و برگشت اول) بیشترین تراکم را داشته باشند. در بخش ۲ تعداد کمتری کلنی و تعدادی تک کلنی وجود دارد. تا جایی که آخرین مرحله کمترین مقدار کشت مخلوط و بیشترین تعداد کلنی منفرد (تک کلنی) را داراست







کشت خطی: در این روش از محیط پیش ریخته استفاده می شود. به این ترتیب که ابتدا بوسیله

یک آنس سترون شده مقداری از پرگنه باکتری را برداشته و آنرا روی سطح محیط پیش ریخته بصورت خطهای موازی و در چند جهت می کشید. در کشتهای خطی برای بدست آوردن کلنی 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 بصورت خطهای 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 باکتریها کاسته می شود تا جائیکه در منطقه چهارم شما می توانید پرگنه های تکی داشته باشید که کلنی خالص نامیده می شود.



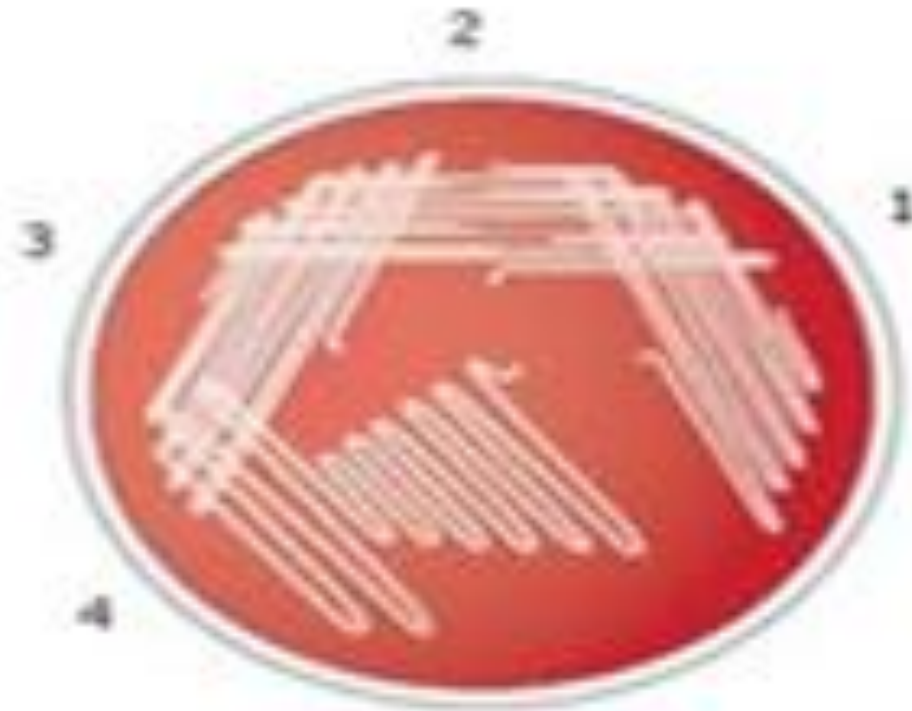
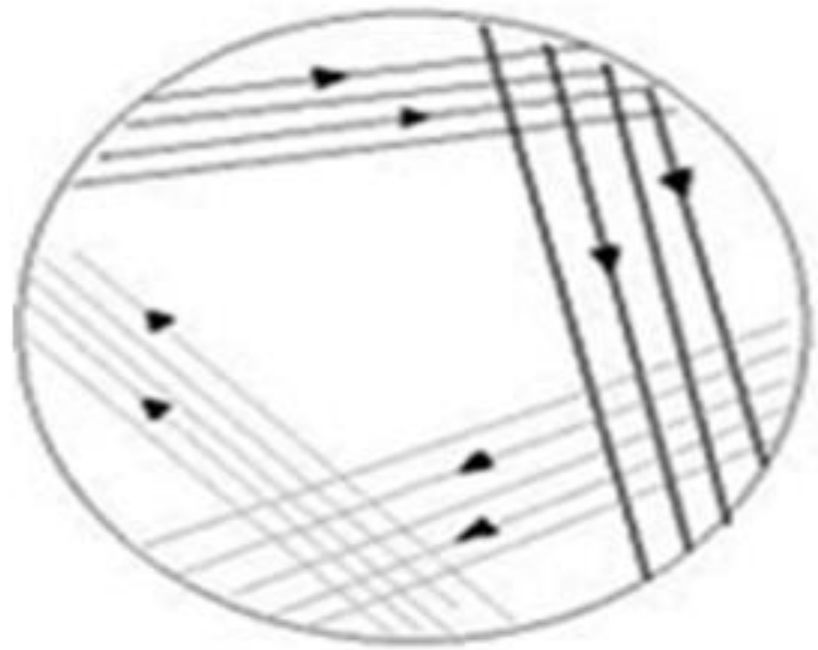
- توجه داشته باشید که کلنی خالص به کلنی گفته می شود که با کلنی دیگر تماس نداشته باشد. در مورد محیطهای کشت باکتریایی که بصورت مایع می باشند برای انجام کشت خطی روی محیط پیش ریخته فقط یکبار لوپ را داخل محیط محتوی باکتری کرده و یک لوپ از آن بردارید سپس آنرا روی محیط پیش ریخته قرار داده و بصورت خطوط موازی آنرا در چند جهت بکشید. و یا مراحل فوق را روی آن انجام دهید.

بنابراین انجام درست کشت خطی منجر به ایجاد کلنی خالص می شود این کلونی تنها از یک باکتری مادری بوجود می آید (تعریف کلنی خالص). باکتریهای منفرد را باکتریهای مادر می نامند که این باکتریها پس از کشت خطی و جدا شدن سلولهای باکتری از یکدیگر بوجود می آیند.



- کشت چهارمرحله‌ای روشی پرکاربرد می‌باشد که برای به دست آوردن تک‌کلنی و مشاهده‌ی تغییرات ناشی از رشد باکتری در محیط کشت (مثل همولیز) روش مناسبی است.
- در این روش مطابق شکل، از یک طرف پلیت شروع کرده و چند بار پلیت را به اندازه‌ی ۶۰ تا ۹۰ درجه می‌چرخانیم. در این روش از سوآپ استفاده نمی‌شود، چون با جذب باکتری به درون پنبه، در مقدار باکتری منتقل‌شونده ایجاد خطا می‌کند.

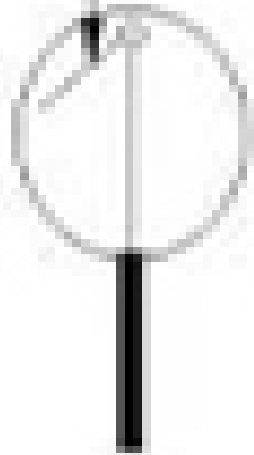




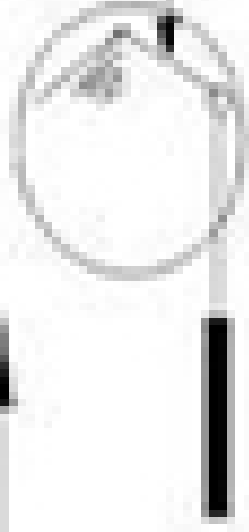
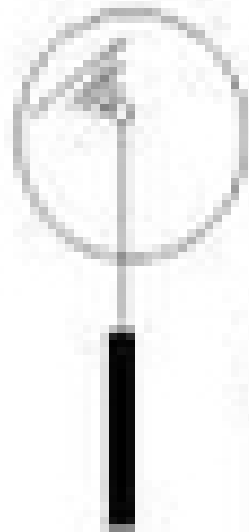
- **لوپ** را می‌سوزانیم و با گوشه‌ای از محیط کشت که با باکتری در تماس نیست سرد می‌کنیم. سپس یک بار از درون خطوط کشت مرحله‌ی قبل شروع می‌کنیم و تنها در آخرین مرحله از کشت لوپ را نمی‌سوزانیم.
- **گرفتن کلنی تک از باکتری از این نظر اهمیت دارد که در صورت وجود سویه‌های دیگر باکتری، می‌توانیم از خلوص کلنی تکی خود مطمئن باشیم.** زیرا هر کلنی منفرد تنها از یک عدد باکتری ایجاد شده است.



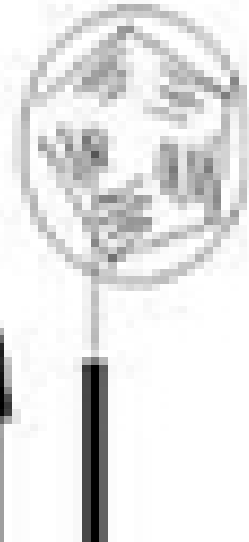
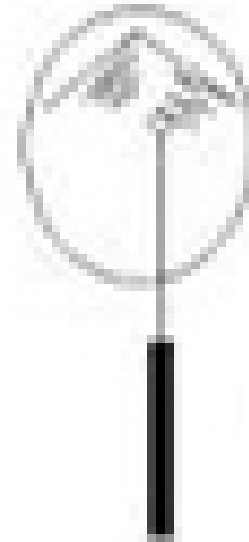
Primary Strain



Secondary Strain



Stemless Loop
By Flooding



Stemless Loop
By Flooding



کشت سطحی

در این نوع کشت هم از محیط پیش ریخته استفاده می شود.
نحوه کشت:

این روش کشت بیشتر برای محیط‌های مایع میکروبی کاربرد دارد و یا اگر محیط مایعی مانند شیر مشکوک به آلودگی میکروبی باشد آن را می توان به این روش کشت میکروبی داده و میکروارگانیسم‌های موجود در آن را مشخص نمود.

برای اینکار ابتدا یک رقت معینی از محیط مایع تهیه نمائید. سپس با استفاده از پیت استریل مقدار مشخصی از آن رقت را برداشته و در سطح محیط جامد پیش ریخته توسط میله پخش کننده یا توک آنس پخش نمائید. و بعد از انکوباسیون می توانید کلنی های رشد یافته در سطح محیط کشت را مشاهده کنید توجه داشته باشید که هنگام انجام کشت سطحی باید سطح محیط خشک باشد.



- چون هنگام ریختن محیط کشت بصورت پیش ریخته ممکن است بخار آب روی درب پلیت و سطح محیط جمع شود برای خشک کردن آن می توان محیطها را در یک گرمخانه با دمای ۵۰-۲۵ درجه قرار داده و خشک نمود. به این ترتیب که درب پلیت را برداشته و قسمت محتوی محیط کشت را وارونه روی لبه درب قرار دهید تا قطرات رطوبت حذف گردد.
- همچنین می توانید پس از ریختن محیط کشت در پلیت در صورت تجمع حباب هوا ، آنها را با شعله دادن سطح محیط حذف نمائید. اینکار باعث سترون شدن سطح محیط کشت هم می شود

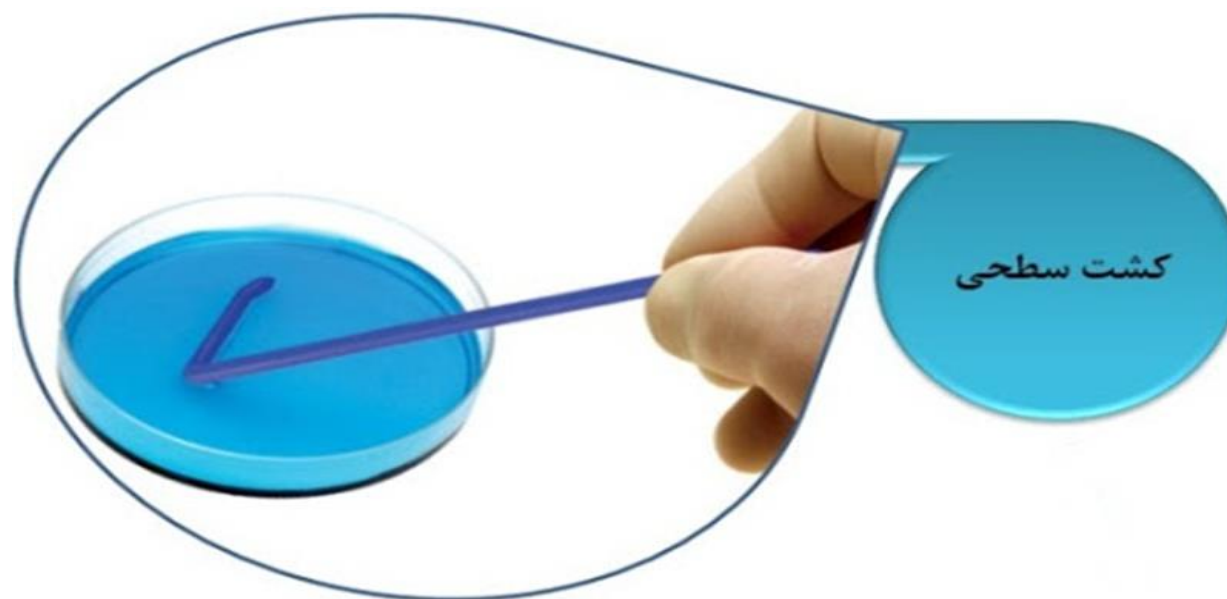


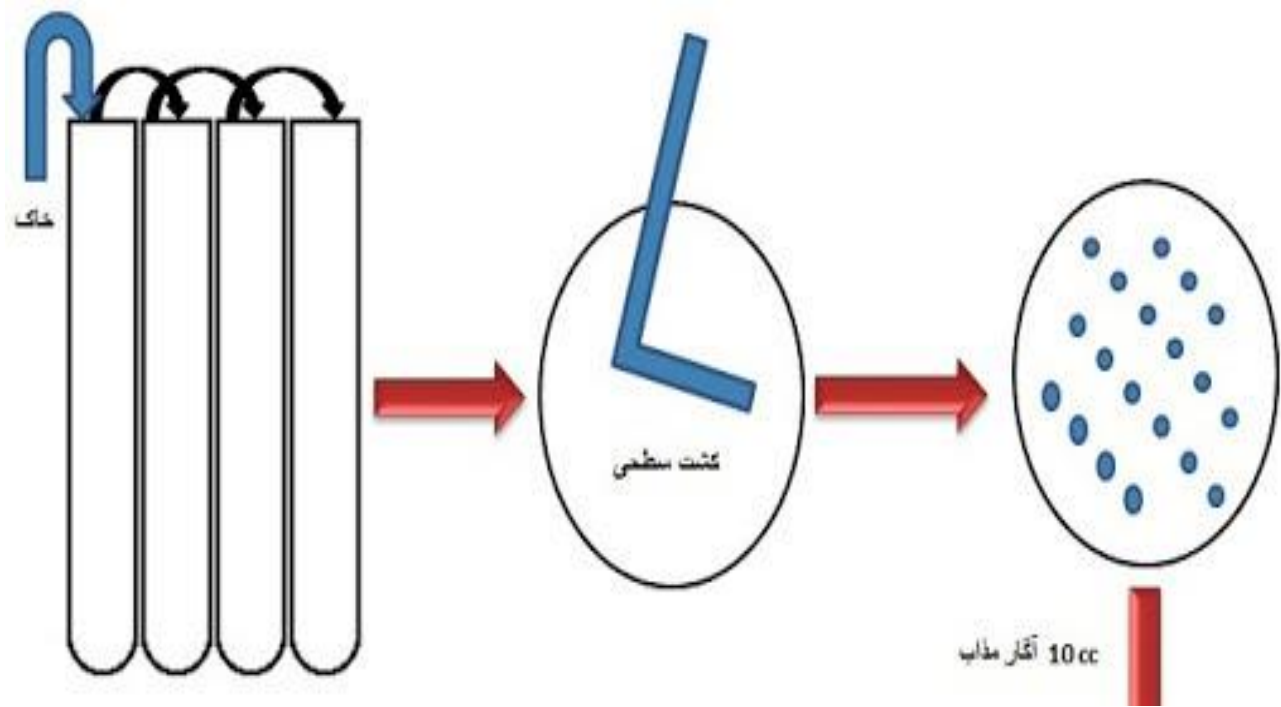
Spread Plate

- این روش هم برای شمارش میکروبی یا جداسازی باکتری ها کاربرد دارد. به این کشت کشت سطحی می گوئیم. در این کشت باید از نمونه های اولیه رقت های متولی درست کنیم و ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت را روی پلیت های مغذی آگار می ریزیم و با کمک میله شیشه ای استریل آن را در تمام سطح پلیت پخش می کنیم. اینطوری ما توانستیم تک کلونی های باکتری را ایجاد کنیم و تعداد کلونی های هر یک از پلیت ها را شمارش کنیم و در نهایت هم تعداد باکتری های موجود در نمونه اولیه رو با در نظر گرفتن ضریب رقت محاسبه کنیم.



- اگر کشت اولیه‌ی باکتری به صورت مایع باشد، می‌توان با سمپلر نمونه‌ی مایع را روی محیط کشت جامد ریخت و بعد با یک پخش‌کننده (**spreader**) استریل، سوسپانسیون را در همه‌جای محیط کشت پخش کرد.

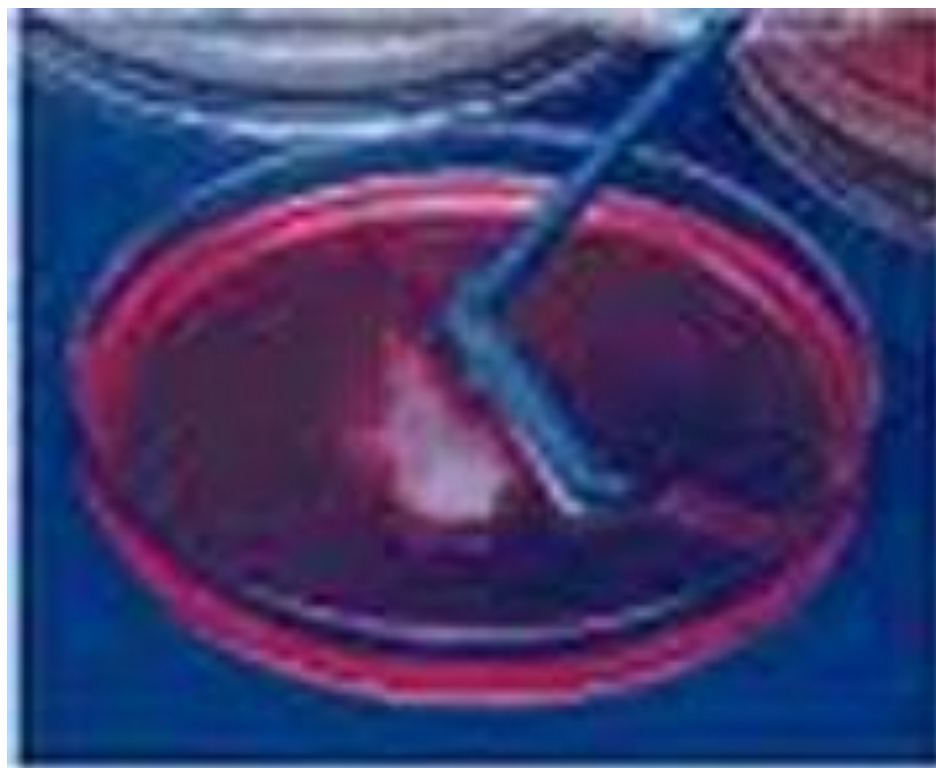




تهیه کننده: سهیلا عباسی



پخش کردن باکتری روی محیط کشت جامد به کمک پخش کننده



تهیه کننده: سهیلا عباسی

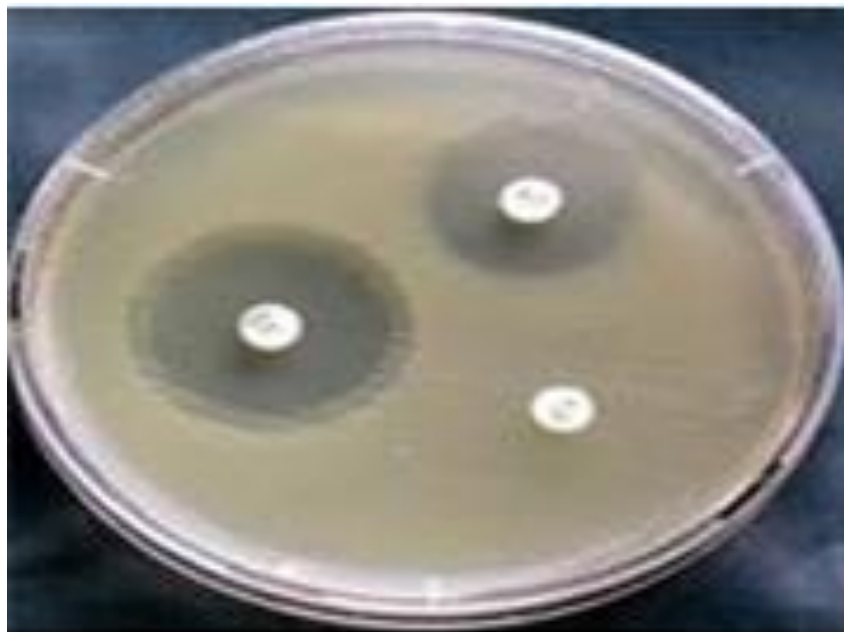


کشت چمنی

- یک کشت یکنواخت در سطح پلیت به ما می‌دهد و بیش‌تر برای آنتی‌بیوگرام و سنجش هاله‌ی عدم رشد اطراف مواد مهارکننده‌ی رشد استفاده می‌شود. در این روش بیش‌تر از سوآپ برای پخش یکنواخت باکتری استفاده می‌شود. استفاده از لوپ نیز در حالت ممکن است. اما یکنواختی کشتی که با سوآپ انجام می‌شود بیش‌تر و بهتر از زمانی است که باکتری‌ها با لوپ پخش شده‌اند.



آنتی‌بیوگرام و هاله‌ی عدم رشد اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیک روی کشت چمنی



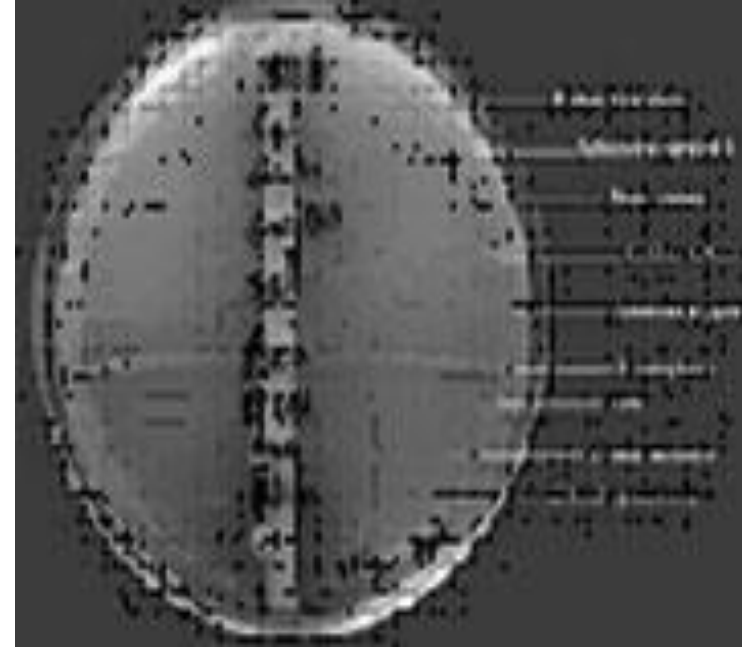
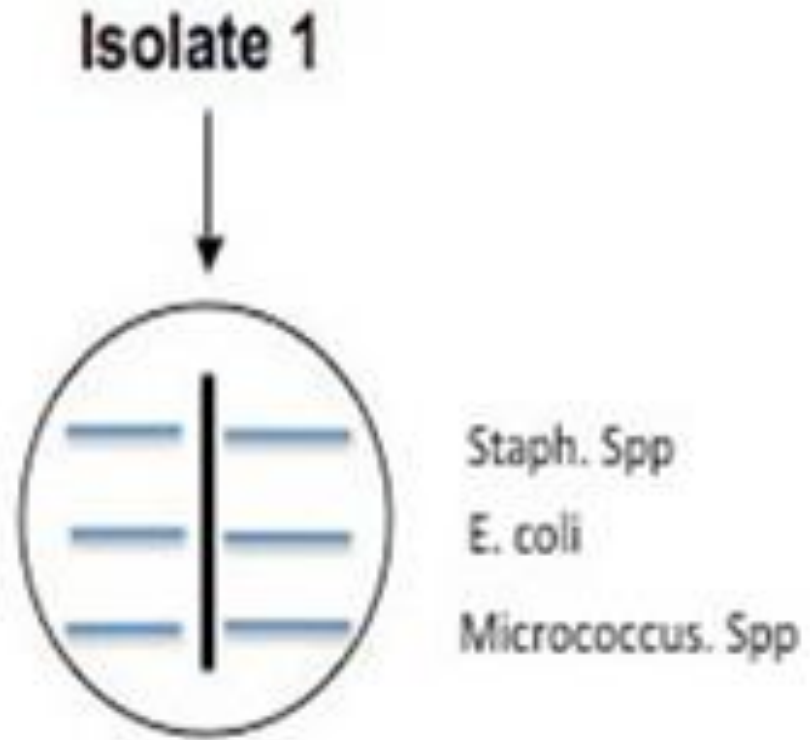
تهیه کننده: سهیلا عباسی

نوع دیگر کشت خطی

- به کمک لوپ حلقه‌ای به صورت یک خط ممتد انجام می‌شود و در بسیاری موارد چند نوع باکتری را به صورت عمود بر هم کشت می‌دهند. این روش معمولاً برای مشاهده‌ی اثر آنتاگونیستی دو یا چند میکروب بر هم انجام می‌شود. برای مثال در شکل زیر خط وسط یک باکتری مشکوک به تولیدکننده‌ی آنتی‌بیوتیک است که مواد بیرون سلولی تولید می‌کند. در صورتی که آنتی‌بیوتیک جزو مواد بیرون سلولی این باکتری جدا شده از محیط باشد، کشت خطی باکتری‌های استافیلوکوکوس، اش‌ریشیا کلی و میکروکوکوس اطراف آن، در نزدیکی این باکتری متوقف می‌شود



کشت خطی

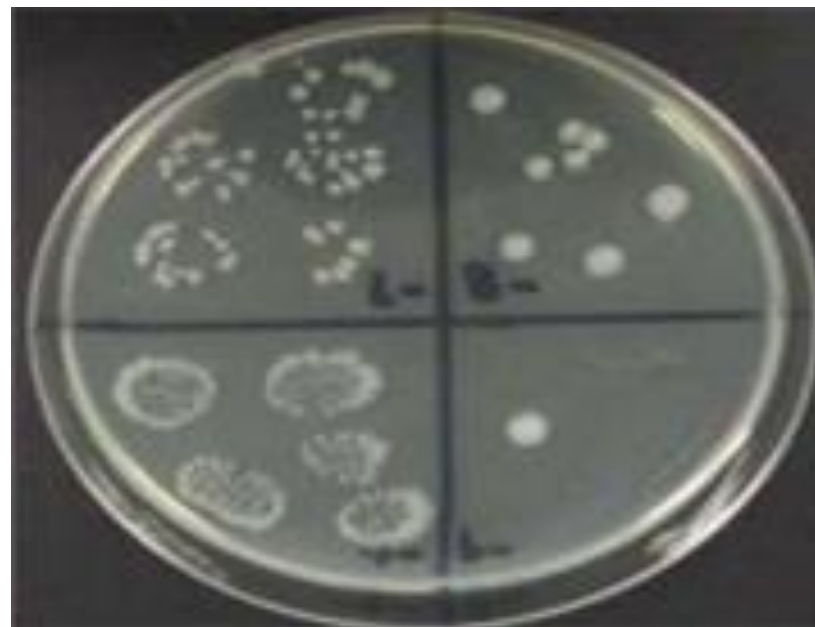
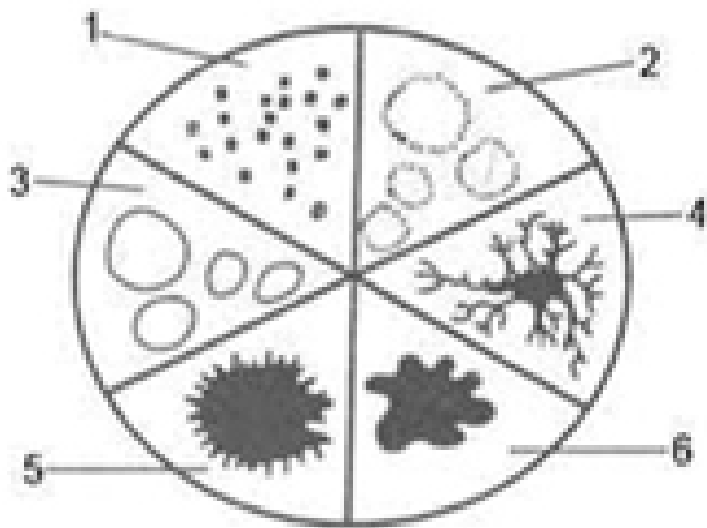


کشت چندبخشی

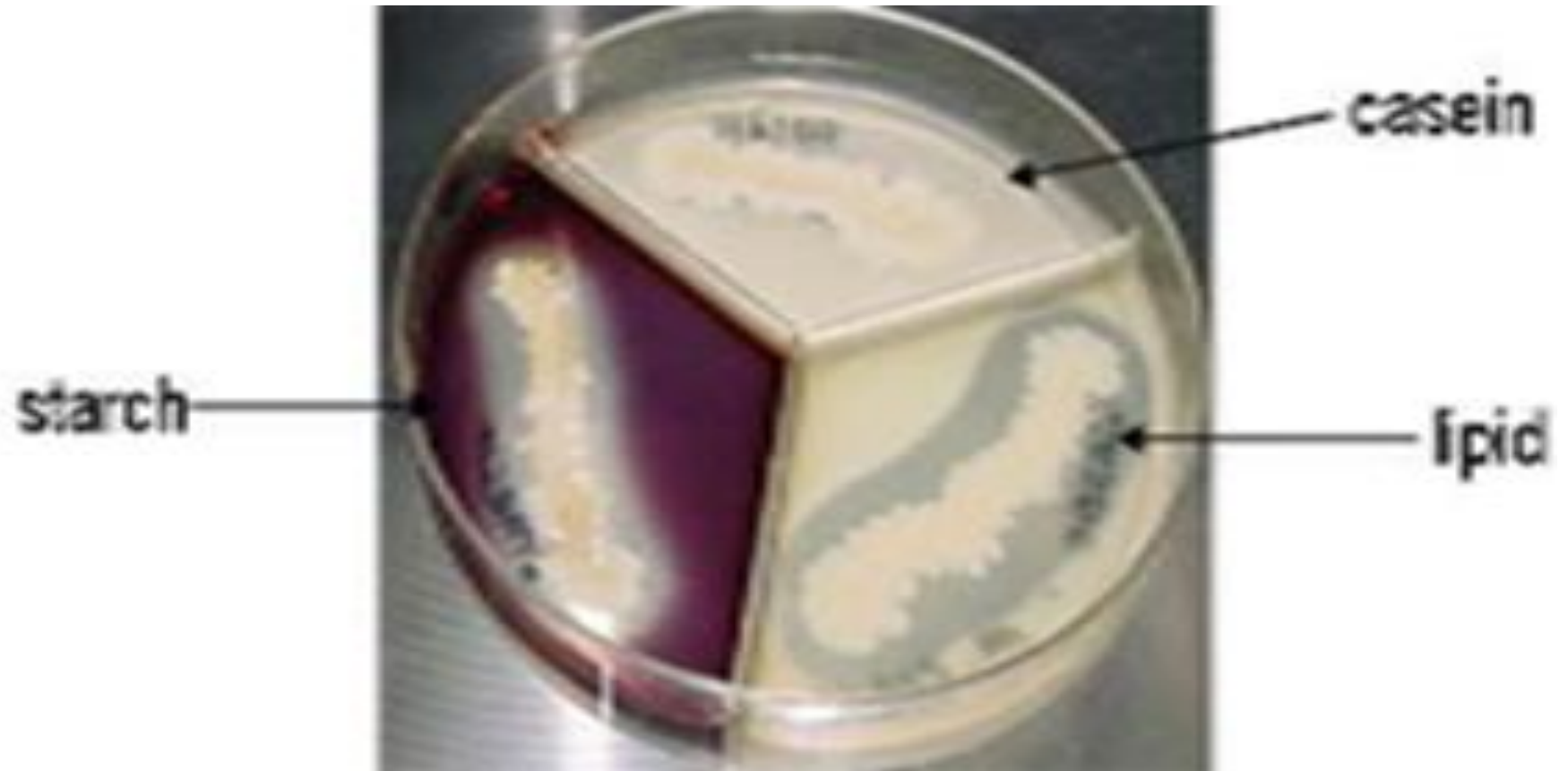
- اغلب برای نگهداری سویه‌های میکروبی متعدد و صرفه‌جویی در مصرف محیط‌کشت به مدت کوتاه در یخچال انجام می‌گیرد.
- در این روش پلیت از قسمت کف با مارکر به چند بخش تقسیم شده و سویه‌های متفاوت بین خطوط کشت داده می‌شود.



کشت چندبخشی



- همچنین پلیتهایی وجود دارد که با دیواره‌هایی از خود پلیت به دو، سه، چهار یا بیش‌تر بخش تقسیم شده است و به صورت آماده در بازار موجود است



کشت عمقی با استفاده از لوپ سوزنی برای مشاهده‌ی حرکت باکتری در محیط کشت نیمه جامد با درصد آگار کم درون لوله‌ی آزمایش انجام می‌شود.



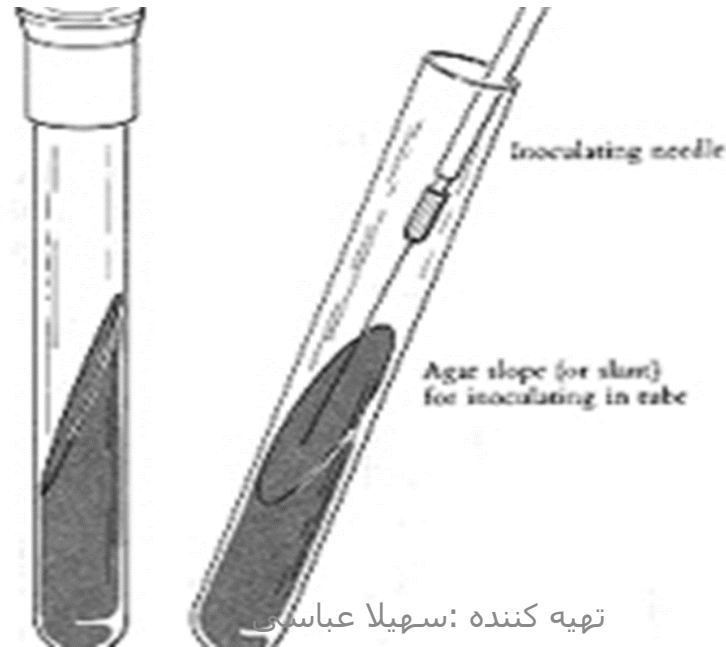


در شکل روبرو دو محیط کشت نوترین آگار درون لوله‌ی آزمایش می‌بینید که باکتری در آنها به صورت عمقی کشت داده شده است. در لوله‌ی سمت چپ باکتری تنها در مسیر کشت رشد کرده است، زیرا توانایی حرکت ندارد. اما در لوله‌ی سمت راست همه‌ی محیط کدر شده است. یعنی باکتری توانایی حرکت داشته و در کل محیط پخش شده است.



کشت شیب‌دار

محیط کشت جامدی است که در لوله‌ی آزمایش مطابق شکل برای ایجاد شرایط کم‌هوا در ته لوله‌ی آزمایش و مشاهده‌ی کارکرد باکتری در شرایط کم‌هوا (میکروآنروفیل) انجام می‌شود. معمولاً محیط کشت‌های جامد مورد استفاده در این حالت دارای معرف‌های شیمیایی هستند که انجام تخمیر و تولید اسید توسط باکتری‌هایی که می‌توانند شرایط کم‌هوا را تحمل کنند، نشان می‌دهد.



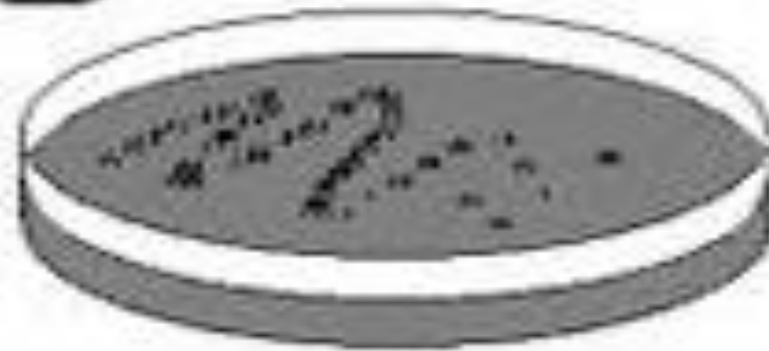
Various Examples of Solid Media
(black = culture)



Slant



Stab or Deep



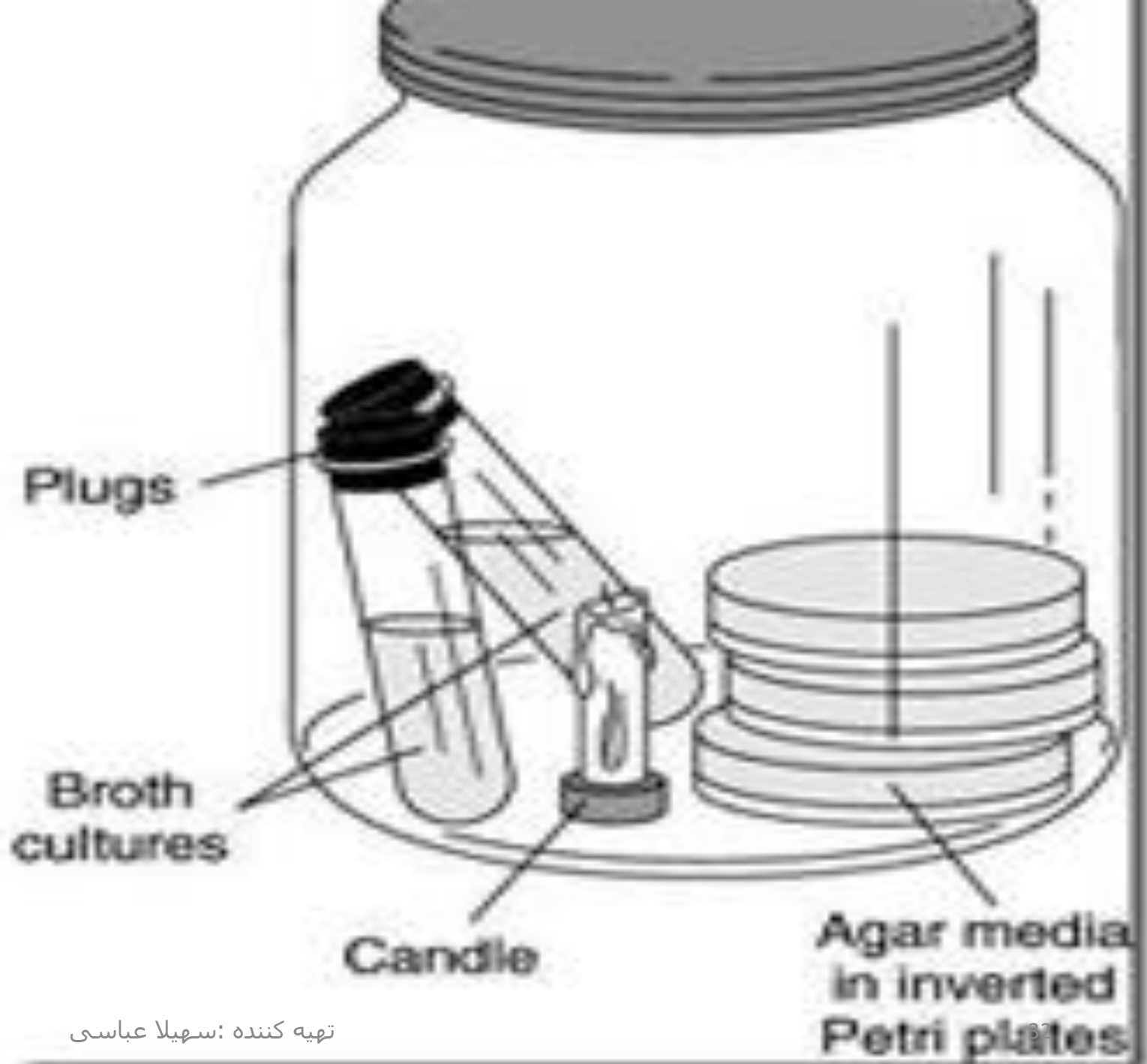
Streaked Petri Dish



کشت بی‌هوازی

- برای باکتری‌های بی‌هوازی انجام می‌شود. در این روش یک ظرف دربسته به نام جار به کار برده می‌شود
- که پلیت‌ها درون آن قرار می‌گیرد. یک شمع درون جار روشن می‌شود تا هوای موجود در آن را مصرف کند. شمع پس از مصرف تمام اکسیژن موجود در جار خاموش می‌شود و شرایط بی‌هوازی (بدون اکسیژن) را برای میکروبی‌های بی‌هوازی فراهم می‌کند





تهیه کننده: سهیلا عباسی

کشت آمیخته یا پورپلنت

- در این روش کشت هم نیاز به تهیه سوسپانسیون از باکتری می باشد . یعنی باید از باکتری مورد نظر در محیط مایع رقت معینی را تهیه نموده بعد به میزان ۱ سی سی از آنرا در کف پلنت استریل ریخته سپس از محیط کشت مورد نظر که قبلا استریل شده و حرارت آن به حدود ۴۵ درجه سانتیگراد رسیده بمیزان ۱۵-۲۰ سی سی به پلنت اضافه نمائید. سپس با حرکات دورانی بصورت عدد ۸ انگلیسی آنرا کاملا مخلوط کنید. اگر نیاز بود مجددا سطح محیط آمیخته با باکتری را با یک لایه نازکی از همان محیط کشت بپوشانید دراین حالت به آن کشت دولایه هم گفته می شود



Pour Plate

این روش یکی از تکنیک های جداسازی باکتری است به شیوه ای که مقدار مشخص باکتری برداشته شده از محیط کشت مایع را چند برابر رقیق می کنیم تا تعداد باکتری های موجود در اون به اندازه ای کم بشوند که روی محیط کشت، کلونی های تک و مجزا دیده بشود.

در این روش قبل از سفت شدن محیط کشت جامد(دمای ۴۸ تا ۵۰ درجه سانتیگراد)، حجم مشخصی از باکتری را به آن اضافه می کنیم و محیط کشت و به درون پلیت استریل می ریزند. بعد از سرد شدن محیط کشت، باکتری ها بطور یکنواخت درون محیط پخش می شوند و بعد ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه کلونی های باکتری در همه جای محیط پخش شدند.



یادتان باشد کاربرد این روش بیشتر برای شمارش باکتری ها هست و در میکروبیولوژی غذایی هم بسیار مورد استفاده قرار می گیرد. اما به هر حال عیب این روش این است که هم وقت گیر و دشوار است و هم وسایل آزمایشگاهی بیشتری نیاز دارد.



- نکته مهم در طی انجام این تکنیک ها این است عملیات کشت را به سرعت انجام بدهیم چون با باز بودن در پلیت برای مدت طولانی امکان آلودگی وجود دارد. به همین خاطر همواره کنار شعله کار کنید.

