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

آزمایشگاه باکتری شناسایی ۱

1

روش های کشت بی هوازی در باکتری ها و مطالعه و جداسازی باکتری های بی هوازی اجباری

تهیه کننده:سهیلا عباسی

به هرارگانیسمی که برای رشد به اکسیژن نیاز نداشته باشد و حتی شاید در حضور اکسیژن بمیرد، ارگانیسم **بی‌هوازی** (Anaerobic organism) گفته می‌شود.

بیهوازی اجباری (Obligate anaerobes) به آن دسته ارگانیسمهایی که در حضور اکسیژن هوا (غلظت ۲۱٪) توانایی زندگی ندارند گفته می‌شود. برخی از این باکتریها در غلظتهای پایین تر اکسیژن (مثلاً ۸٪) می‌توانند زنده بمانند.

از باکتریهای بیهوازی اجباری یا مطلق می‌توان به کلستریدیوم، اکتینومایسیسها، باکتروئیدها و فوزوباکتریومها اشاره کرد.

تنفس بی هوازی

- تنفس بی‌هوازی مشابه تنفس هوازی در سلول است که در آن الکترون‌هایی که از مولکول سوختی استخراج می‌شوند، در طول یک زنجیره انتقال الکترون حرکت می‌کنند و می‌توانند مولکول‌های **ATP** را سنتز کنند. برخی از ارگانیسم‌ها از سولفات به عنوان پذیرنده نهایی الکترون استفاده می‌کنند، در حالی که گروه دیگری از ارگانیسم‌ها از نیترات، سولفور یا یکی از این قبیل مولکول‌ها به عنوان پذیرنده نهایی الکترون در زنجیره انتقال الکترون استفاده می‌کنند.

Anaerobic and Aerobic Respiration

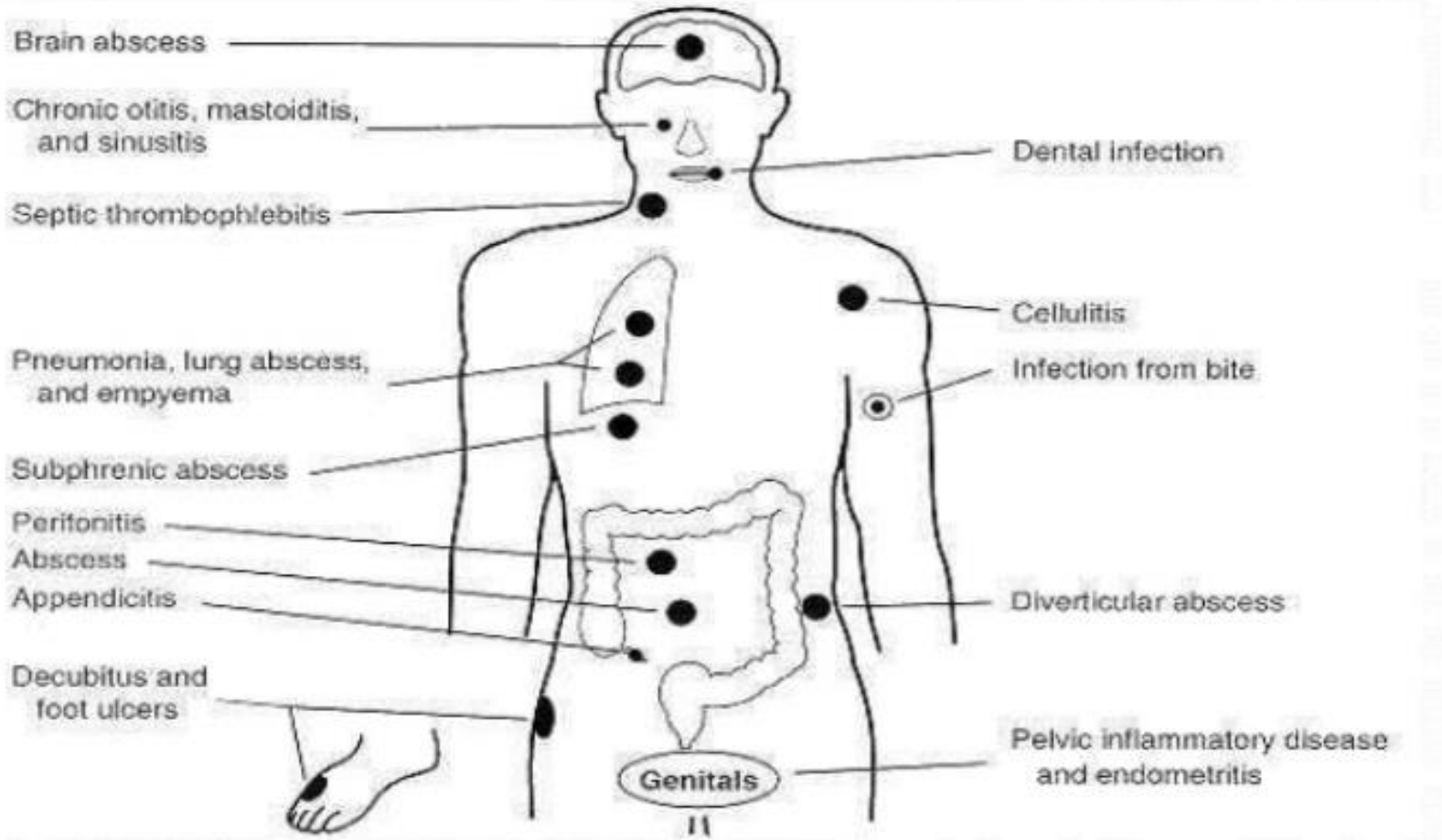
•Reaction name	•Reduct.	•Oxid.	•Reaction Stoichiometry	•kcal/ mol
•Aerobic Respiration	•CHO	•O_2	•$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \Longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$	•686
•Nitrate Reduction	•CHO	•NO_3^-	•$CHO + NO_3^- + H^+ \Longrightarrow CO_2 + N_2 + H_2O$	•649
•Sulfate Reduction	•CHO	•SO_4^{2-}	•$2CHO + SO_4^{2-} + 2H^+ \Rightarrow 2CO_2 + H + 2H_2O$	•190
•Methanogenesis	•CHO or H_2	•CO_2	•$4H_2 + CO_2 \Longrightarrow CH_4 + 2H_2O$	•8.3

Dr.T.V.Rao MD

- **کدام ارگانیسم‌ها از تنفس سلولی بی هوازی استفاده می‌کنند؟**
- برخی از باکتری‌ها و آرکی باکترها که در محیط‌هایی با اکسیژن کم زندگی می‌کنند، برای تجزیه مولکول سوختی سلول بر تنفس بی هوازی متکی هستند. برای مثال، برخی از آرکی باکترها که متانوژن‌ها نام دارند از دی اکسید کربن به عنوان آخرین پذیرنده الکترون استفاده می‌کنند و این آرکی‌ها متان تولید می‌کنند. متانوژن‌ها در خاک‌ها و در **سیستم گوارشی** نشخوارکنندگان که شامل گاوها و گوسفندان هستند، می‌توانند زندگی کنند.

- باکتری‌های احیا کننده سولفات و آرکی باکترهایی که از سولفات به عنوان پذیرنده نهایی الکترون استفاده می‌کنند، سولفید **هیدروژن** را به عنوان محصول جانبی تولید می‌کنند.

Sites and Infection produced by Anaerobes



باکتری های بی هوازی مهم از نظر پزشکی:

باکتروئیدس فراژیلیس (عفونت خون)، کلستریدیوم ها و باکتروئیدس (عفونت روده ای)، اکتینومیستها، باکتروئیدس،فوزوباکتریوم و کلستریدیوم ها (عفونت دستگاه ژنیتال)، کلستریدیوم ها، باکتروئیدس و پیتواسترپتوکوکوس(عفونت پوست و بافت نرم).

اکسیژن یکی از فاکتورهای مهم و تاثیر گذار بر رشد میکروارگانیسم ها می باشد. میکروارگانیسم ها از نظر نیاز به اکسیژن بسیار متفاوتند. این تنوع به اختلاف در سیستم های آنزیمی مسیر اکسیداسیون –احیا در گونه های مختلف باکتریایی وابسته است.

Anaerobic Bacteria of Medical Interest

MORPHOLOGY	GRAM STAIN	GENUS
Spore forming	(+)	Clostridium
Non-spore forming bacilli	(+)	Actinomycetes, Bifidobacterium,Eubacte-rium,Propionibacerium, Mobilncus,Lactobacillus
	(-)	Bacteroides,Fusobacterium Prevotella,Porphyromonas
Non-sporefoming cocci	(+)	Peptococcus, Pepto-streptococcus Streptococcus
	(-)	Veilonella

باکتری ها را از نظر نیاز به اکسیژن به پنج گروه اصلی تقسیم می کنند

- **باکتری های هوازی (Aerobes) :** این باکتری ها برای رشد به اکسیژن اتمسفری نیاز دارند و فقط در حضور اکسیژن رشد می کنند و اکسیژن را به عنوان پذیرنده الکترون مورد استفاده قرار می دهند.
- **باکتری های بی هوازی اختیاری :(Facultative anaerobes)** در حضور یا غیاب اکسیژن رشد می کنند در محیط هوازی از اکسیژن استفاده نموده و در شرایط بی هوازی از ترکیباتی مانند نیترات یا سولفات به عنوان گیرنده نهایی الکترون استفاده می کنند. همچنین می توانند از مسیر تخمیری برای تامین انرژی استفاده نمایند.
- **باکتری های بی هوازی تحمل کننده اکسیژن :(Aerotolerant anaerobes)** این باکتری ها از مسیر تخمیری انرژی مورد نیاز خود را تامین می کنند، اما برخلاف باکتری های بی هوازی اجباری، به دلیل داشتن آنزیم های **کاتالاز** و **سوپراکسید دیسموتاز**، حضور اکسیژن باعث مرگ آنها نمی شود و قادرند حضور اکسیژن را تحمل کنند.
- **باکتری های میکروائروفیل :(Microaerophiles)** این گروه از باکتری ها برای رشد به مقادیر بسیار کم اکسیژن نیاز دارند. مقادیر بالای اکسیژن باعث متوقف شدن فعالیت آنزیم های اکسیداتیو و در نتیجه مرگ باکتری خواهد شد.
- **باکتری های بی هوازی اجباری :(Obligate anaerobes)** باکتری های بی هوازی در حضور اکسیژن محصولات متابولیکی سمی مانند یون سوپراکسید**(- O2)** و پراکسید **(H2O2)** تولید می کنند. این محصولات به واسطه آنزیم های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز به آب و اکسیژن تولید می شوند ولی از آنجایی که باکتری های بی هوازی اجباری فاقد آنزیم های فوق می باشند مقادیر بسیار کم اکسیژن باعث مرگ باکتری می شود. بنابراین این دسته از باکتری ها فقط در غیاب اکسیژن قادر به رشد هستند.

- نیازمندی میکروارگانیسم ها به اکسیژن را می توان از طریق کشت مخلوط میکروب در لوله آزمایش تعیین نمود. برای این کار نمونه میکروبی مورد آزمایش را درون محیط کشت جامد ذوب شده ای تلقیح کرده، بلافاصله محیط کشت را سرد می کنند. به این ترتیب میکروب هایی که در تمام محیط کشت منتشر شده اند در محل خود باقی خواهند ماند.
- پس از انکوباسیون، الگوی رشد میکروارگانیسم در محیط کشت، چگونگی نیازمندی آن به اکسیژن را نشان می دهد. باکتری های هوازی در سطح محیط کشت و انواع بی هوازی در عمق لوله رشد می کنند. باکتری های بی هوازی اختیاری به دلیل عدم وابستگی به اکسیژن در سراسر لوله رشد می نمایند و باکتری های میکروائروفیل در منطقه ای کمی پایین تر از سطح محیط کشت رشد خواهند کرد.

اکسیژن

در ۵ گروه اصلی :

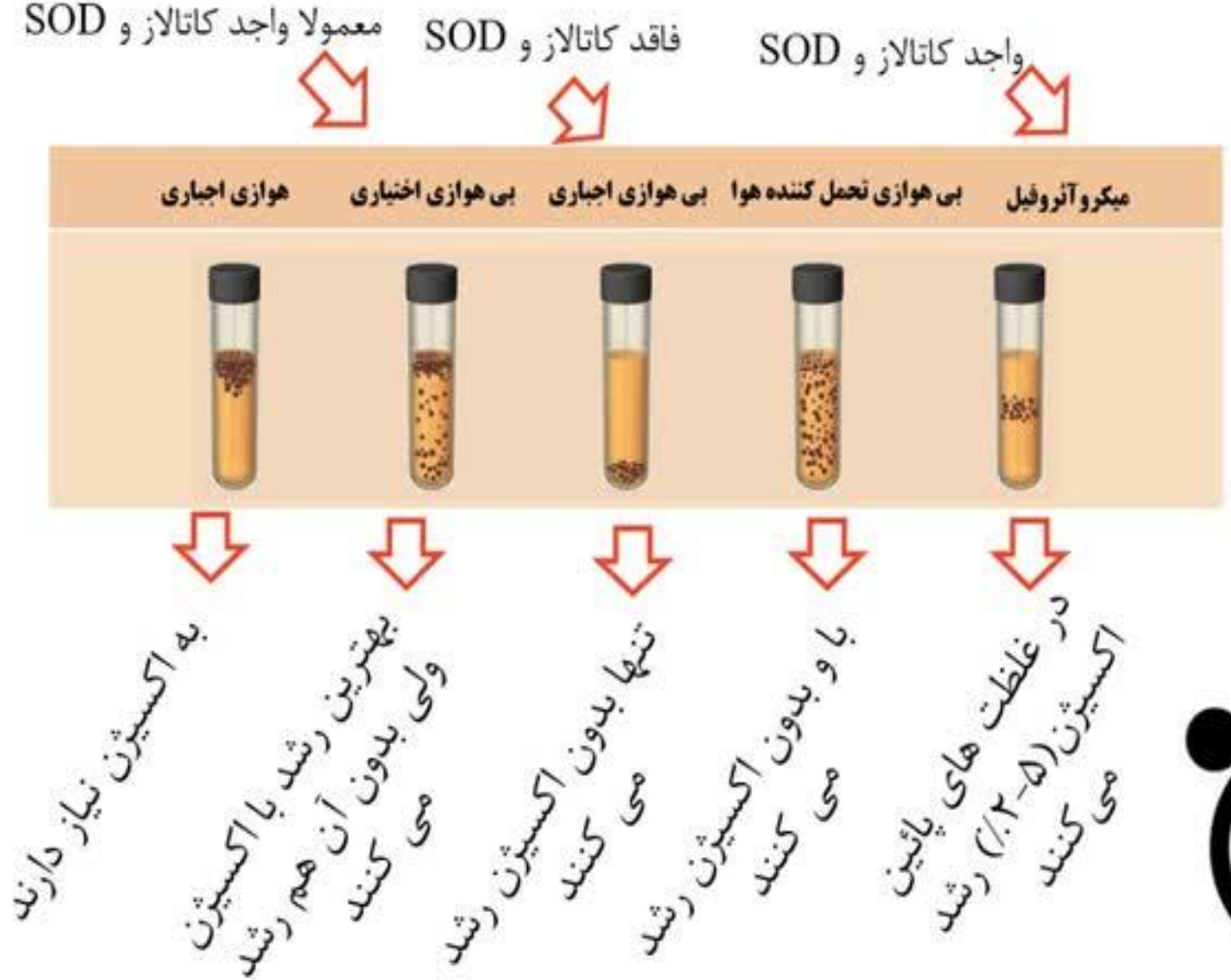
۱. هوازی اجباری

۲. بی هوازی اجباری

۳. بی هوازی اختیاری

۴. بی هوازی تحمل کننده هوا

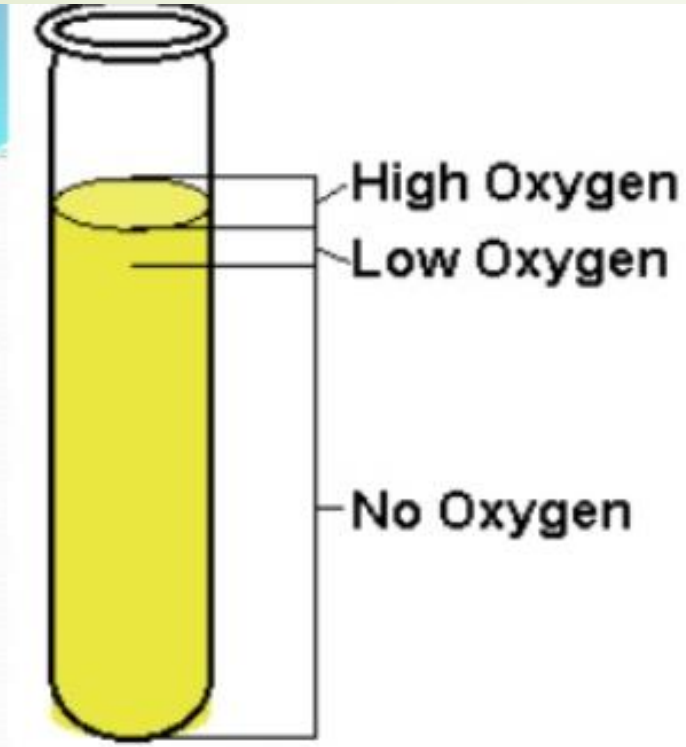
۵. میکروائروفیل



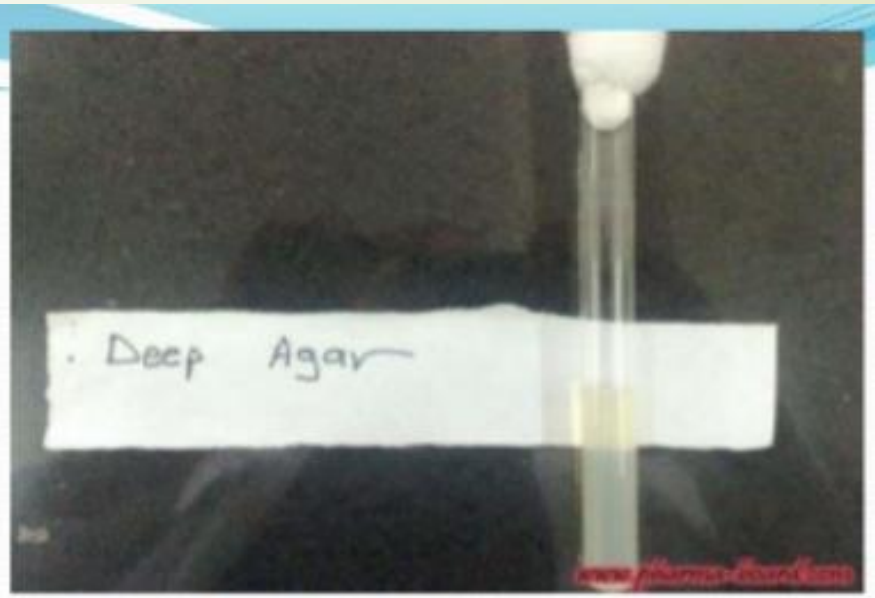
پروتکل/روش انجام آزمایش

تعیین نیازمندی باکتری ها به اکسیژن

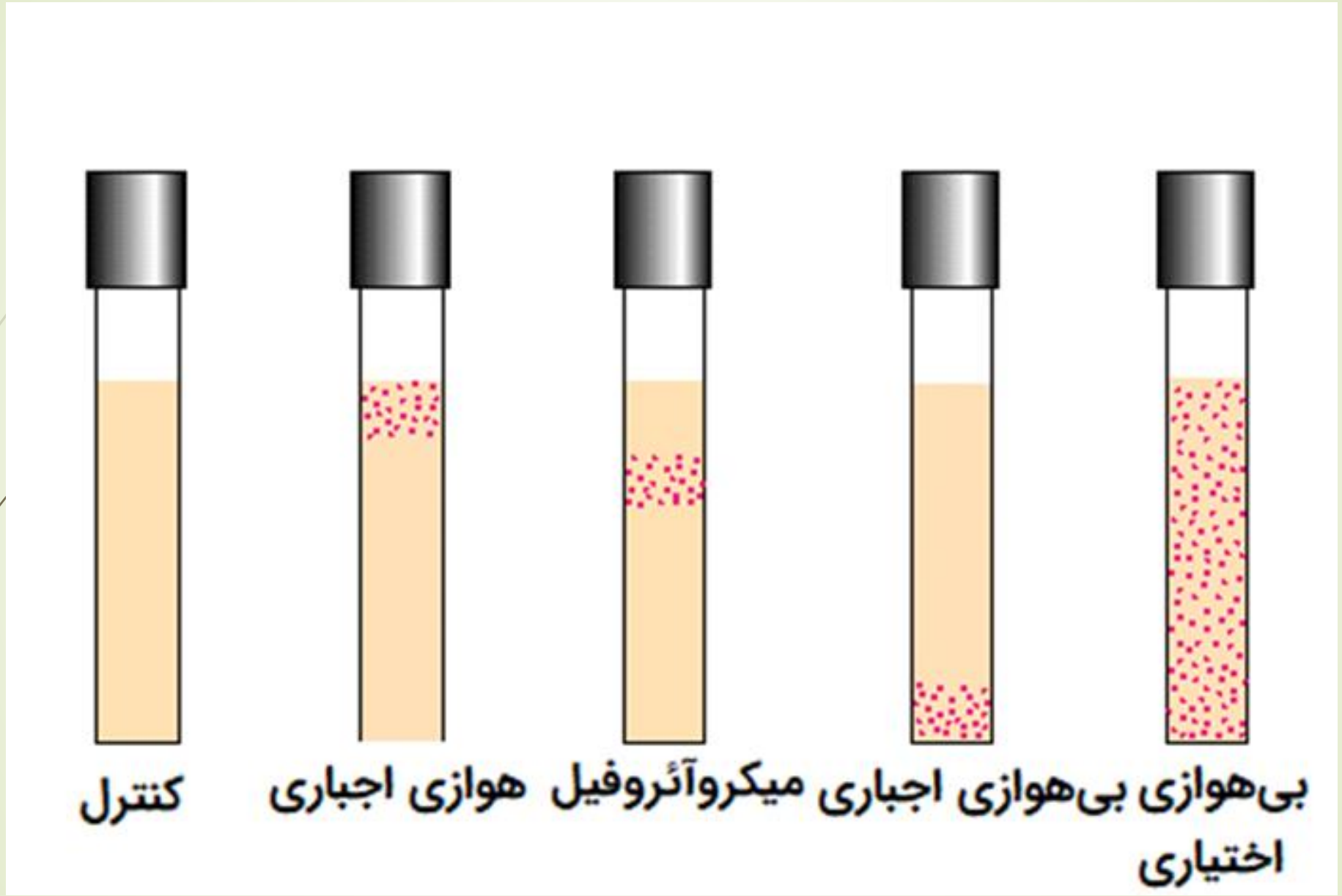
1. محیط کشت مغذی تهیه شده در لوله را در بن ماری جوش قرار دهید تا ذوب شود و اکسیژن محلول در محیط خارج گردد
2. محیط را تا دمای ۴۸ تا ۵۰ درجه سانتیگراد سرد کنید
3. مشخصات باکتری مورد آزمایش را بر روی لوله ثبت کنید
4. در شرایط استریل یک یا دو لوپ باکتری درون لوله تلقیح نمایید
5. لوله را در کف دست گرفته و با چرخاندن آن در بین دو دست، باکتری ها را در محیط پخش کنید
6. محیط را سرد کرده و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه نگهداری کنید
7. نحوه رشد و توزیع باکتری را در سطح و عمق محیط بررسی کنید



O2 content of culture tube



Growth in deep agar


کنترل
هوازی اجباری
میکروآئروفیل
بی‌هوازی اجباری
بی‌هوازی اختیاری

روش های کشت بی هوازی

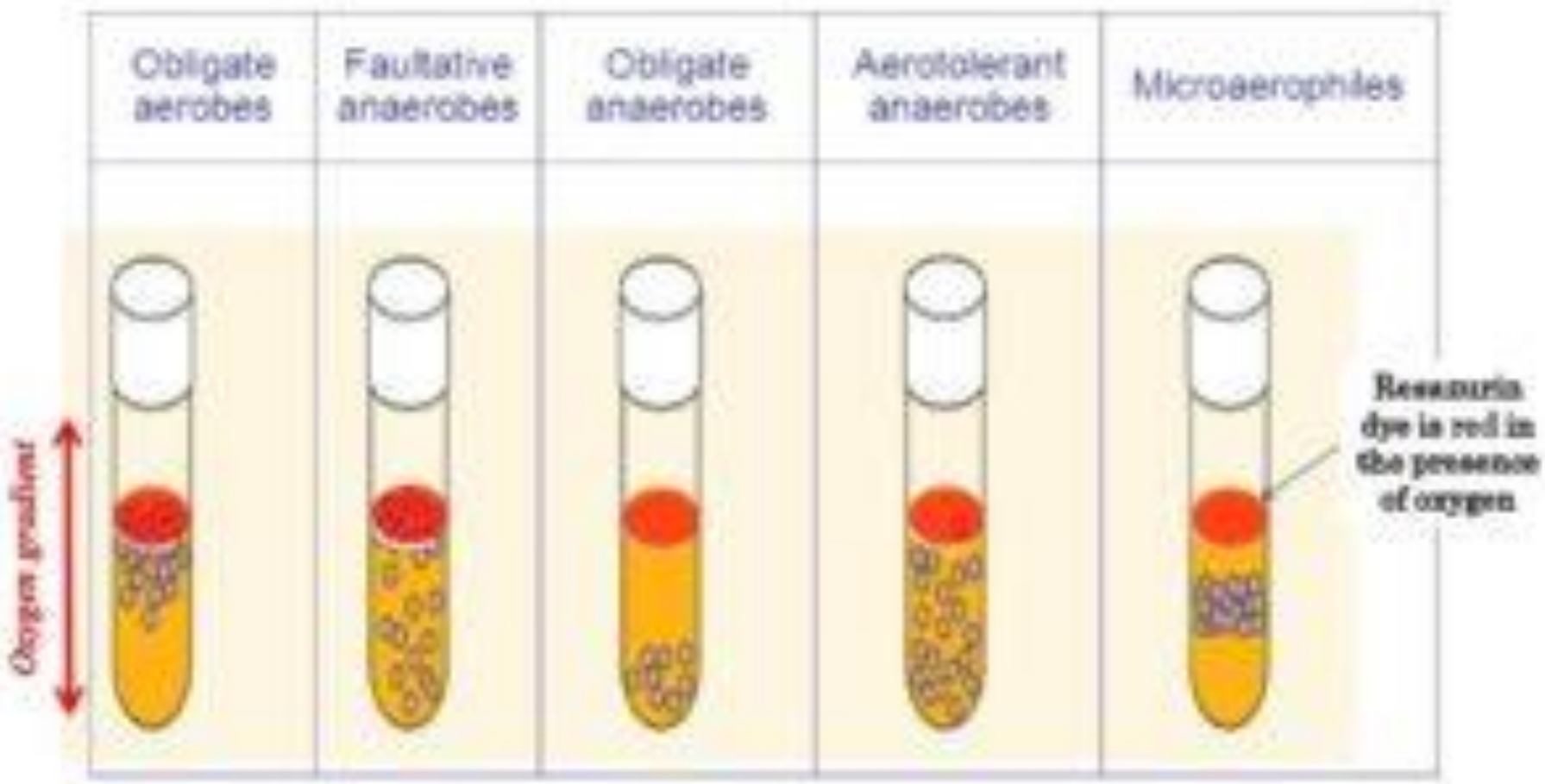
- ۱- جذب اکسیژن محیط کشت به وسیله ی مواد شیمیایی (روش بوخنر)
- ۲- تعویض هوا با یک گاز بی اثر
- ۳- از بین بردن اکسیژن به وسیله احتراق
- ۴- محیط تیوگلیکولات
- ۵- استفاده از روش های بیولوژیکی (کاربرد باکتری های شدیداً هوازی در کنار باکتری های بی هوازی)

کشت در محیط تیوگلیکولات :(Thioglycollate media)

- یک محیط نیمه جامد است که در لوله های درب پیچ دار تهیه می شود. تیوگلیکولات موجود در این محیط، ترکیب احیا کننده قوی است که با اکسیژن محیط ترکیب شده و شرایط بی هوازی ایجاد می کند. رنگ معمولی محیط تیوگلیکولات زرد کم رنگ است، اما زمانی که اکسیژن در آن حل شود به رنگ صورتی یا آبی کم رنگ تغییر خواهد یافت. زیرا در این محیط رنگ هایی مانند **متیلن بلو** یا **رزازورین (Resazurin)** وجود دارد که به عنوان معرف پتانسیل اکسیداسیون احیا عمل می کند. تغییر رنگ در قسمت بالای لوله مشاهده می شود،
- اگر عمقی بیش از ۱/۵ سانتیمتر از بالای لوله تغییر رنگ داده باشد، برای کشت بی هوازی مناسب نیست. در چنین حالتی درب پیچدار محیط کشت را کمی باز کرده و ده دقیقه درون بن ماری جوش قرار می دهند تا اکسیژن حل شده در محیط خارج گردد. به منظور تلقیح نمونه های بی هوازی باید اجازه دهید تا دمای محیط کاهش یابد و ترجیحا نمونه را به عمق لوله تلقیح نمائید.

Thioglycolate broth

Growth in thioglycollate broth reveals oxygen preferences



Thyoglycollate binds molecular oxygen, *reducing it* and removing it:

$$R\text{-}SH + O_2 \rightarrow R\text{-}SO_2$$

ب: کشت در محیط تیوگلیکولات

1. مشخصات باکتری مورد آزمایش را بر روی لوله محیط کشت تیوگلیکولات ثبت کنید
2. نمونه باکتری را در شرایط استریل به عمق لوله تلقیح کنید. (این محیط حاوی متیلن بلو یا رزازورین بوده و در حضور اکسیژن به رنگ صورتی یا آبی کم رنگ تغییر رنگ می دهد. در چنین حالتی برای کشت مناسب نیست و باید مجددا در بن ماری حرارت ببینند تا اکسیژن محلول در آن خارج گردد.)
3. لوله های تلقیح شده را به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتگراد نگهداری کنید
4. پس از سپری شدن دوره انکوباسیون لوله ها را از نظر رشد میکروبی بررسی کنید

نکات مهم در حین انجام آزمایش

1. **محیط تیوگلیکولات** حاوی معرف های اکسیداسیون احیاء می باشد که در حضور اکسیژن به رنگ قرمز یا آبی کم رنگ تغییر رنگ می دهد، در صورتیکه عمقی بیشتر از ۱.۵ سانتیمتر از بالای لوله تغییر رنگ داده باشد، برای کشت دادن بی هوازی مناسب نیست و باید مجددا در بن ماری حرارت ببینند تا اکسیژن محلول در محیط کشت خارج گردد.
2. در زمان انکوباسیون لوله های کشت بی هوازی، از محکم بودن درب لوله اطمینان حاصل کنید تا از نفوذ اکسیژن به داخل محیط جلوگیری شود.
3. زمانی که از جار بی هوازی برای انکوباسیون استفاده می شود، درب لوله ها را کمی شل ببندید تا اکسیژن موجود در لوله بوسیله هیدروژن آزاد شده از سیستم گازپک خنثی گردد.

کشت در جار بی هوازی :(Anaerobic jar)

- جار بی هوازی محفظه شیشه ای است که به روش های مختلف اکسیژن آن را تخلیه می کنند و شرایط را برای رشد باکتری های بی هوازی فراهم می سازند. حذف اکسیژن از محیط داخلی جار به دو طریق عمده صورت می گیرد:

- الف- **پمپ تخلیه** : در این روش نوعی از جار بی هوازی به کار می رود که روی درب آن دو عدد شیر وجود دارد. یکی از شیر ها برای تخلیه گازهای درون جار به پمپ تخلیه متصل می شود و شیر دیگر برای اتصال به کپسول گاز ازت و دی اکسید کربن (۹۵ درصد ازت و ۵ درصد دی اکسید کربن) به کار می رود و این دو گاز را جایگزین هوای خارج شده می نماید.

- ب- **سیستم گازپک**: در این روش به پاکت گازپک طبق دستورالعمل مندرج بر روی پاکت حجم مشخصی آب اضافه می شود. در اثر واکنش آب با ترکیبات موجود در پاکت، گاز های CO_2و H_2 آزاد می شود. هیدروژن حاصل در مجاورت کاتالیزور پالادیوم با اکسیژن موجود ترکیب شده و آب تولید می گردد. به این ترتیب اکسیژن موجود در جار حذف شده و شرایط بی هوازی حاکم می شود. برای حصول اطمینان از شرایط بی هوازی سیستم، یک نوار کاغذی آغشته به محلول رنگی متیلن بلو را نیز در جار قرار می دهند. نوار آبی رنگ مذکور در غیاب اکسیژن بی رنگ می شود.

methylene blue
indicator strip
anaerobe
jar
GasPak
GasPak Plus

کشت در جار بی هوازی

1. مشخصات باکتری مورد آزمایش را روی پلیت ثبت کنید
2. باکتری مورد نظر را در شرایط استریل روی پلیت مغذی تلقیح کنید
3. پلیت های تلقیح شده را درون جار بی هوازی قرار دهید
4. نوار آغشته به معرف اکسیداسیون احیاء (متیلن بلو) را درون جار قرار دهید
5. با پیپت ۶ میلی لیتر آب در محل مشخص شده گازپک بریزید
6. فورا آن را بصورت عمودی در جار بگذارید
7. درب جار را بسته و از محکم بودن آن اطمینان حاصل کنید
8. جار را در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه نمایید و بعد از ۲ تا ۳ ساعت جار را چک کنید که معرف اکسیداسیون احیاء بی رنگ نشده باشد، اگر معرف بی رنگ بود گلوله های پالادیوم را جابه جا کنید و دوباره مراحل را اجرا کنید
9. لوله ها و پلیت ها را به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۳۵ درجه سانتیگراد نگهداری کنید

Absorption of O2 by Chemical method

- Pyrogallol
- •Chromium and sulphuric acid
- •Gas-pak
- -available commercially

روش اسید پیروگالیک:

- نمونه میکروبی را به طریق خطی در سطح محیط کشت نوترینت آگار شیبدار در لوله کشت داده و مقداری پنبه درون لوله وارد کرده تا در مجاورت سطح شیبدار قرار گیرد. فضای بالای پنبه را با بلورهای اسید پیروگالیک پر کرده و کمی هیدروکسید سدیم به آن اضافه می کنند. درب لوله را محکم بسته و آن را بصورت وارونه در انکوباتور قرار می دهند. مواد شیمیایی، اکسیژن درون لوله را جذب کرده و فضای بی هوازی ایجاد می کند.

روش استفاده از پارافین:

- در این روش از هر نوع محیط کشتی که حاوی ترکیبات احیاء کننده مانند عصاره قلب و مغز، جگر گوساله، سیستئین یا اسید اسکوربیک باشد می توان استفاده کرد. محیط کشت را حرارت می دهند تا اکسیژن محلول در محیط خارج گردد، سپس آن را به سرعت سرد نموده و نمونه میکروبی را تلقیح می نمایند و حدود ۲ سانتیمتر پارافین ذوب شده روی محیط کشت مایع ریخته و درون انکوباتور قرار می دهند.

By reducing agents

- Thiglyclolate broth
- •Robertson's Cooked Meat (RCM) broth
- contains nutrient broth with pieces of fat-free minced cooked meat of ox heart.

- Robertson Cooked Meat Broth

- جار بی هوازی چیست؟
- Anaerobic jar ظرف پلاستیکی، فلزی یا شیشه ای می باشد که هوای موجود در آن توسط سیستم های مختلف تخلیه شده و CO_2 مورد نیاز نیز تأمین می شود.
سیستم های دیگری وجود دارد که با استفاده از پمپ، هوا را تخلیه و N_2و CO_2 به درون ظرف تزریق می شود و سیستم مارت نامیده می شوند.

عملکرد جار **بی هوازی** :

- بعد از قرار دادن پلیتها در داخل آن از گاز پک استفاده می شود . سطح گاز پک را با آب آغشته کرده و آنرا داخل جار قرار دهید و درب جار را کامل ببندید .مواد داخل گاز پک در طی واکنش با آب اکسیژن محیط داخل جار را مصرف میکند .
با حذف اکسیژن محیط شرایط بیهوازی برای رشد باکتری فراهم می شود.
برای نشان دادن صحت کار در جار بی هوازی از نوارهای اندیکاتور استفاده می شود .
- این نوارهای باریک حاوی موادی است که در حالت عادی به رنگ آبی می باشد .
هنگامی که اکسیژن از محیط حذف می شود این مواد هم تغییر رنگ داده و بحالت بی رنگ در می آید .
پس برای نمایان شدن شرایط بیهوازی محیط یک عدد از این نوارها را هم داخل جار می اندازید.

اگر منظور جداسازی باکتری‌های بی‌هوازی باشد باید به نکات زیر توجه نمود.

- **افزودن مواد احیا کننده :**مانند تیوگلیکولات سدیم و سیستئین به محیط کشت.

در این حالت می‌توان محیط کشت مایع را در شرایط هوازی انکوبه نمود، زیرا مواد احیا کننده، اکسیژن سطحی محیط را جذب و آنرا برای باکتری غیر قابل مصرف می‌سازد.

- افزودن اسید پیروگالیک یا کربنات سدیم: این دو ماده نیز میزان اکسیژن محیط را کم و گاز کربنیک آن را افزایش می‌دهند.

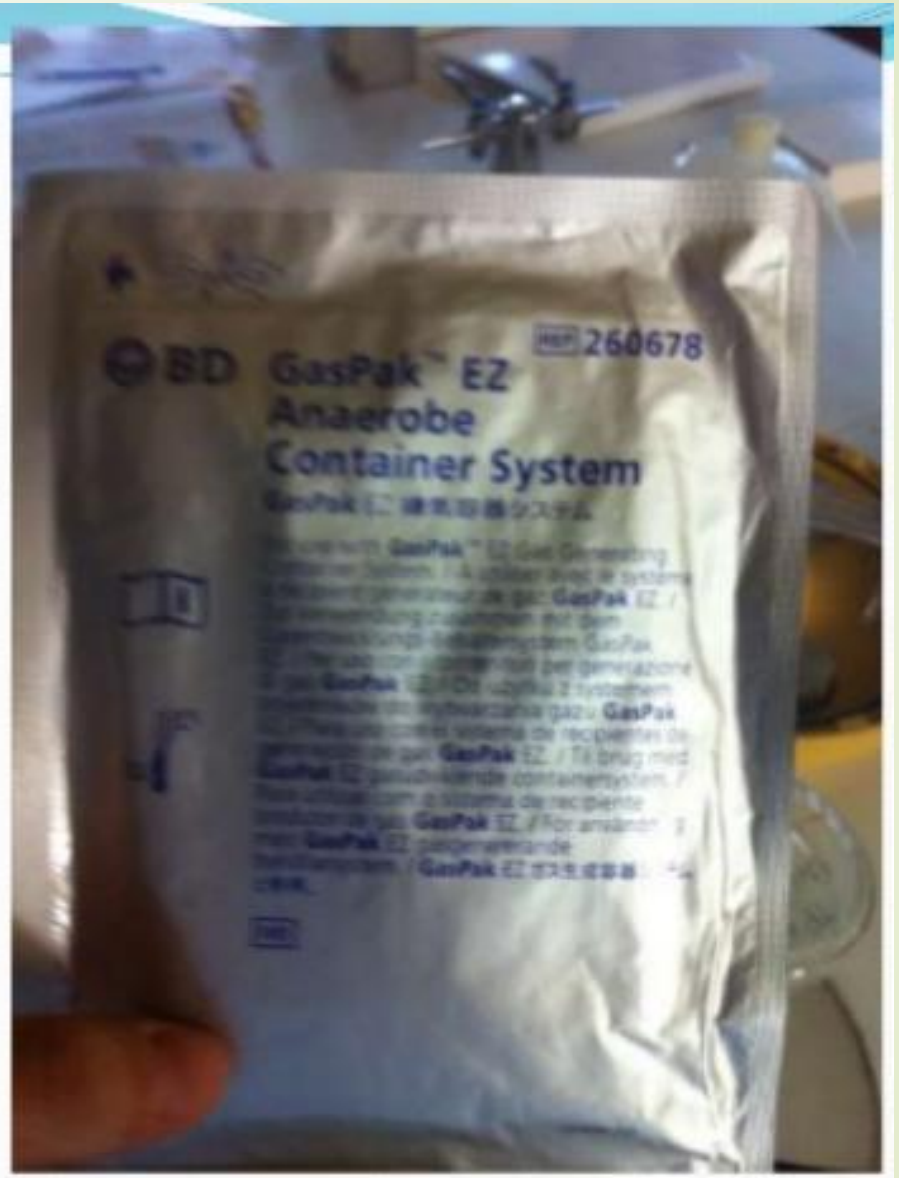
- استفاده از جار بی‌هوازی (Anaerobic jar) :متداولترین روش کشت بی‌هوازی استفاده از (Gaspack jar) است که استوانه‌ای است پلاستیکی از جنس پلی‌کربنات که حاوی سبد توری با دانه‌های پالادیم و پوشش آلومینیومی به عنوان کاتالیزور است. شرایط بی‌هوازی در جار با استفاده از یک ژنراتور مولد هیدروژن و دی‌اکسیدکربن و یا با تکنیک تخلیه و جایگزینی گازهای مورد نظر حاصل می‌شود. این ژنراتور شامل اسید سیتریک، بی‌کربنات سدیم، سدیم بروهایدراید و کلراید کبالت است. پس از اضافه کردن آب با سرنگ یا پی‌پت به گازپک، آنرا در داخل جار قرار می‌دهند و درب آنرا می‌بندند. با انجام واکنش‌های زیر شرایط بی‌هوازی ایجاد می‌شود:

- a) $C_6H_8O_7 + 3NaHCO_3 \rightarrow Na_3(C_6H_5O_7) + 3H_2O + 3CO_2$

b) $NaBH_4 + 2H_2O \rightarrow NaBO_2 + 4H_2$

CO_2ایجاد شده در واکنش اول، رشد بی‌هوازی را تحریک می‌نماید. در حضور کاتالیست، هیدروژن ایجاد شده در واکنش دوم، با اکسیژن موجود در جار تولید آب می‌نماید.

- GasPak needing H2O



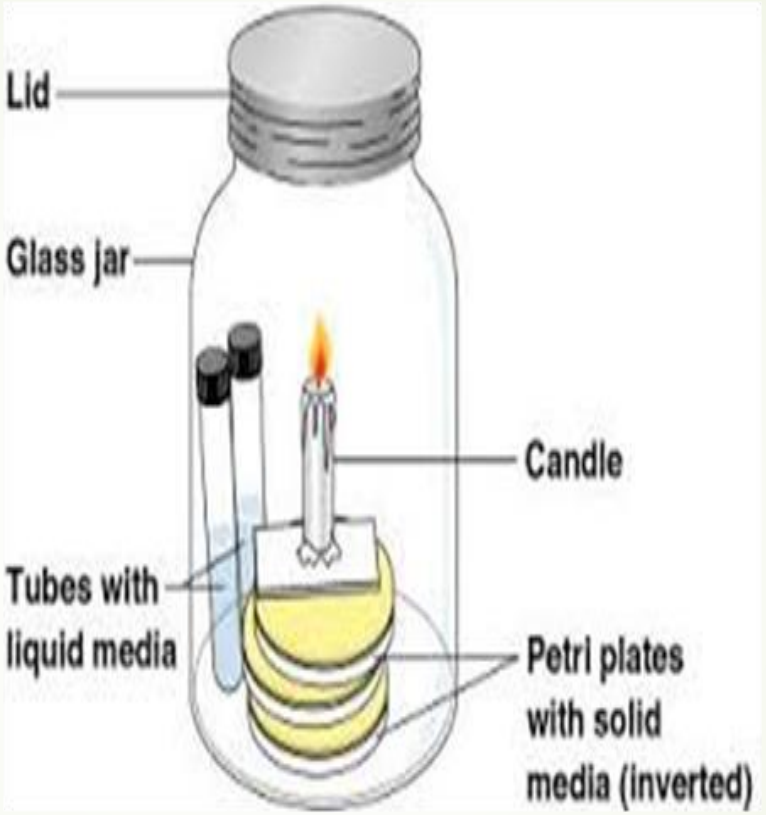
- GasPak Not needing H2O

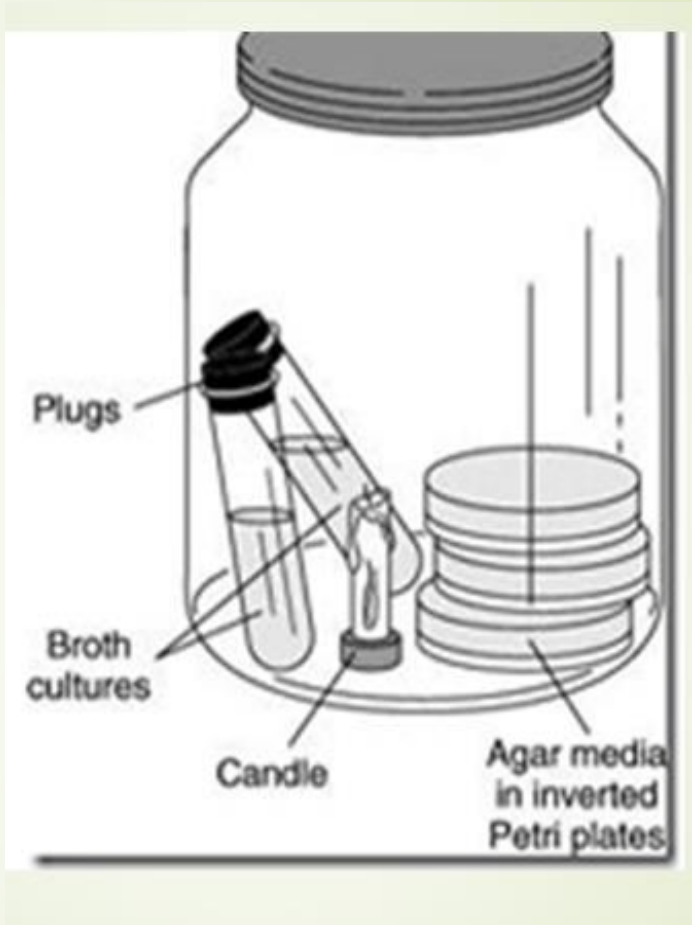
OXOID
ANAEROBIC INDICATOR
CODE NO. BR 55
STORE AT 2 TO 8°C
FOR LABORATORY USE ONLY
Made for Oxoid Ltd.
Basingstoke, Hants., England.

CampyPak Plus
Microaerophilic System Envelope with Palladium Catalyst
BBL GasPak Plus
Anaerobic System Envelope with Palladium Catalyst

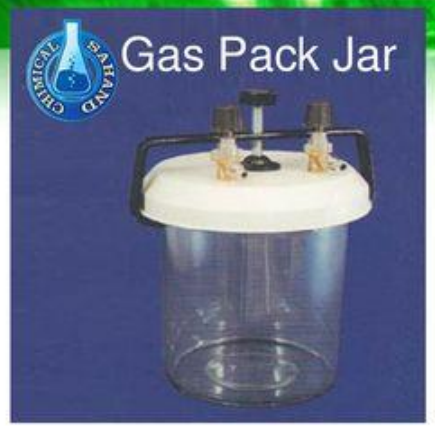
جار CO2یا Candle Jar

- در این نوع جار با روشن کردن یک شمع و بستن درب آن، CO2درون جار را می توان به حدود ٪۷-۳ رساند. این شرایط برای رشد باکتری های میکروآئـروفیـلیک و باکتری هایی که به CO2کمی نیاز دارنـد (مانند استرپتوکوکوس) منـاسب است.

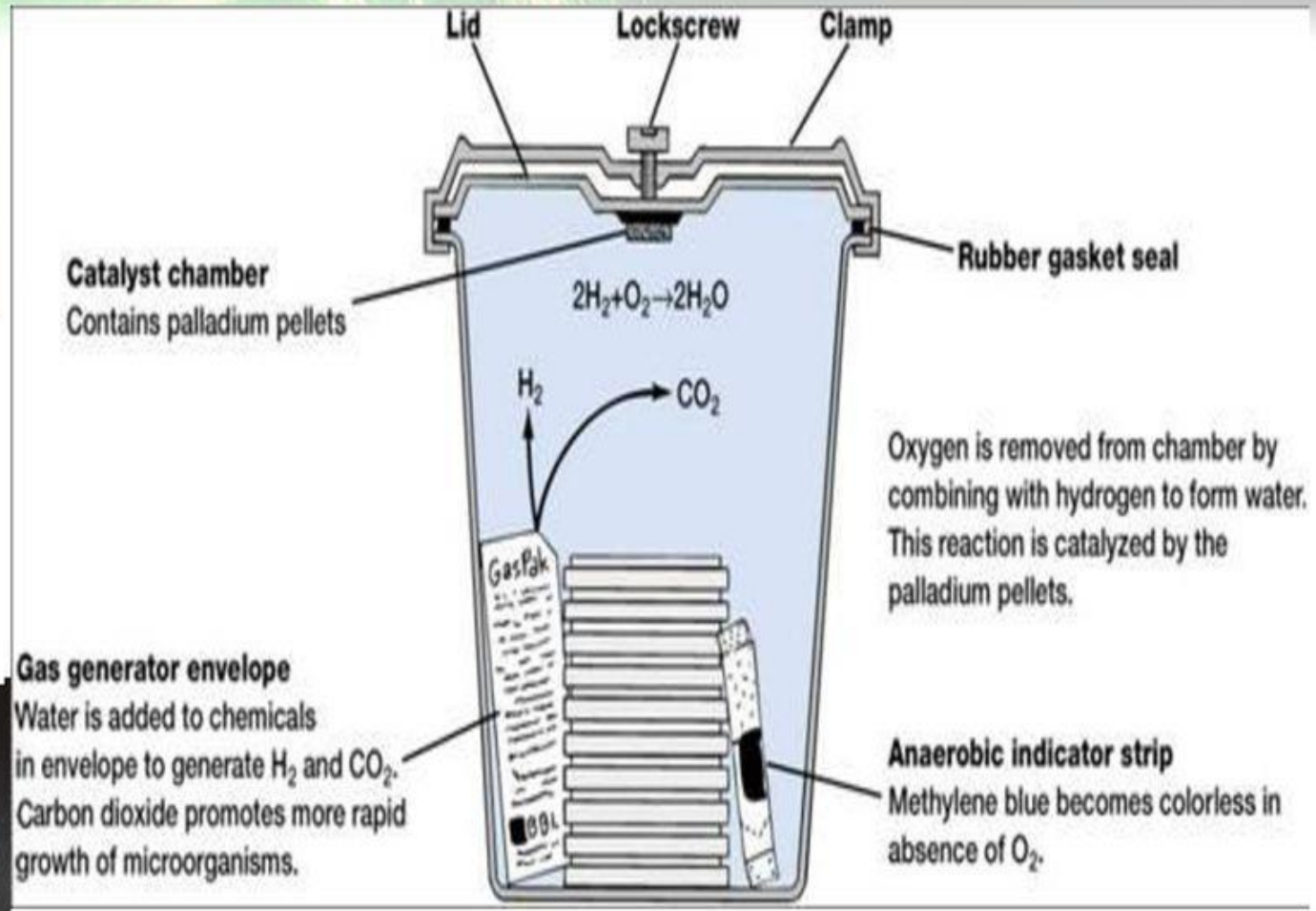

Lid
Glass jar
Candle
Tubes with
liquid media
Petri plates
with solid
media (inverted)


Plugs
Broth
cultures
Candle
Agar media
in inverted
Petri plates

کشت بی هوازی درجار

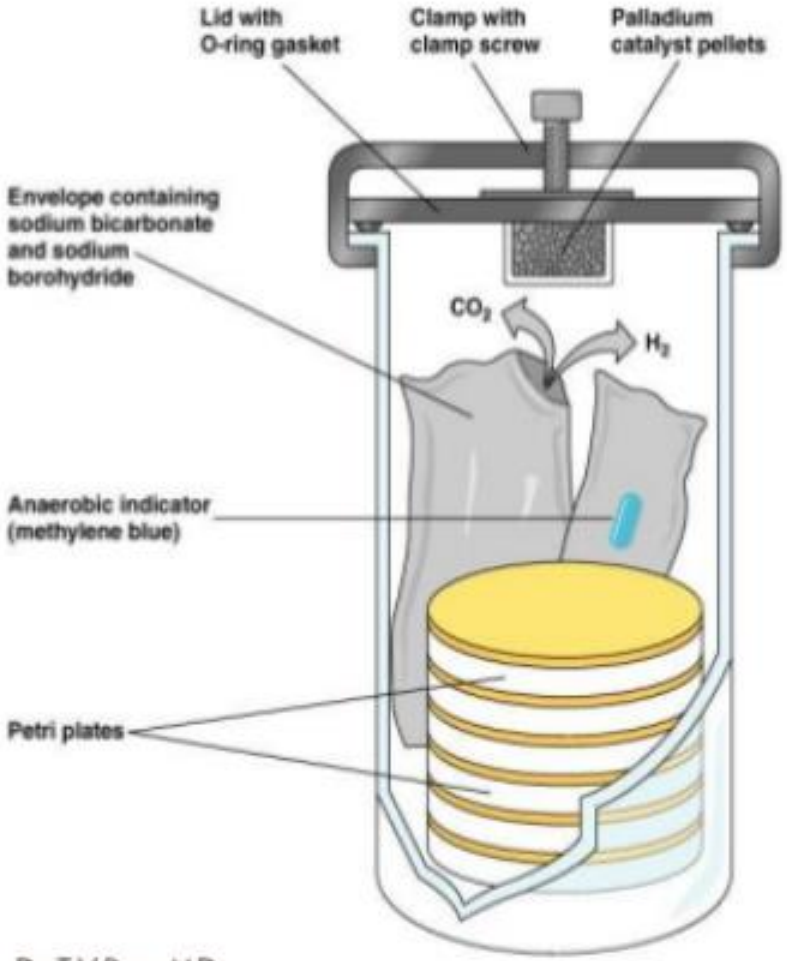


Gas packs



Anaerobic Culture Methods

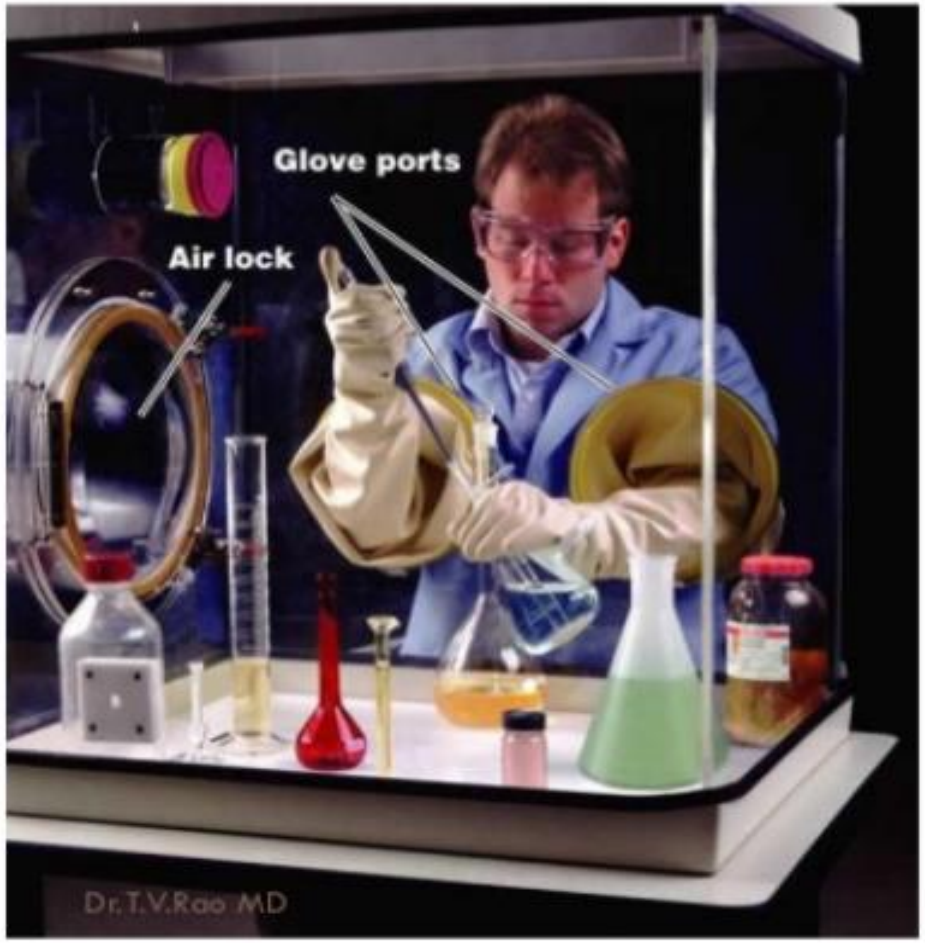
- Production of a vacuum
- •Displacement of Oxygen with other gases
- •Absorption of Oxygen by chemical or biological methods
- •By using reducing agents



4- Mechanical exclusion of O2 (anaerobic incubator).

Obligate Anaerobes needs Optimal Methods

- Obligate anaerobes can be culture in special reducing media such as sodium Thiglyclolate or in anaerobe chambers and handled in anaerobe hoods.



Displacement of Oxygen

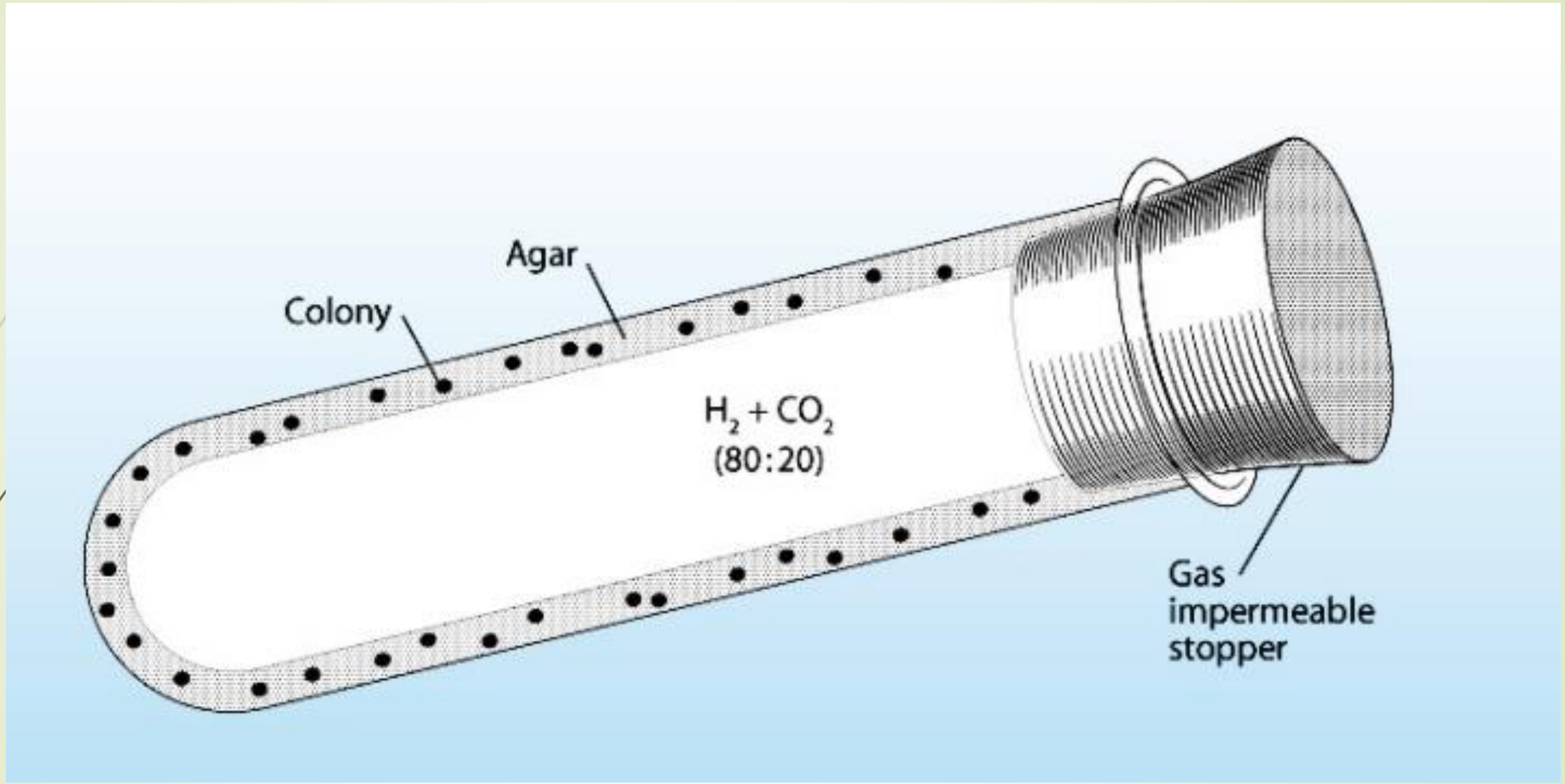
58

- By inert gases like Hydrogen, Nitrogen, Carbon dioxide or Helium
- •Use of lighted candle - Use up Oxygen, but some Oxygen is left behind Vacuum decicator - Unsatisfactory

McIntosh & Filde's Jar

59

- Hydrogen gas is passed in
- •Catalyst helps to combine Hydrogen & O2
- •Reduced Methylene blue remains colorless if anaerobiosis is achieved


Agar
Colony
$H_2 + CO_2$
(80:20)
Gas
impermeable
stopper

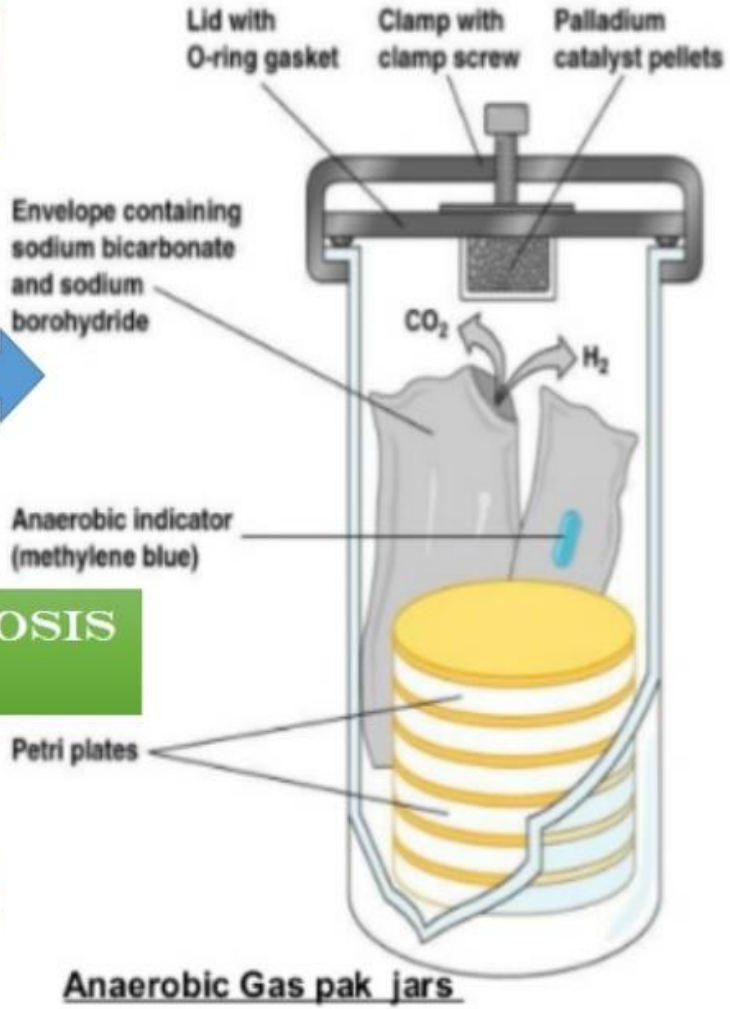
Anaerobic Disposable Plastic Bags

1. First inoculate specimen into Robertson's cooked meat medium for 48-72 hours.

2. Sub culture on solid medium (blood agar) with gentamycin and metronidazole as shown

METHOD OF ANAEROBIOSIS (MOST COMMON)

4. After incubation agar having positive growth



Anaerobic Gas pak jars

3. Put blood agar plate in this jar or Macintosh Filde's jar for 48 hours and incubate at 37 ^{0}C

Thank You