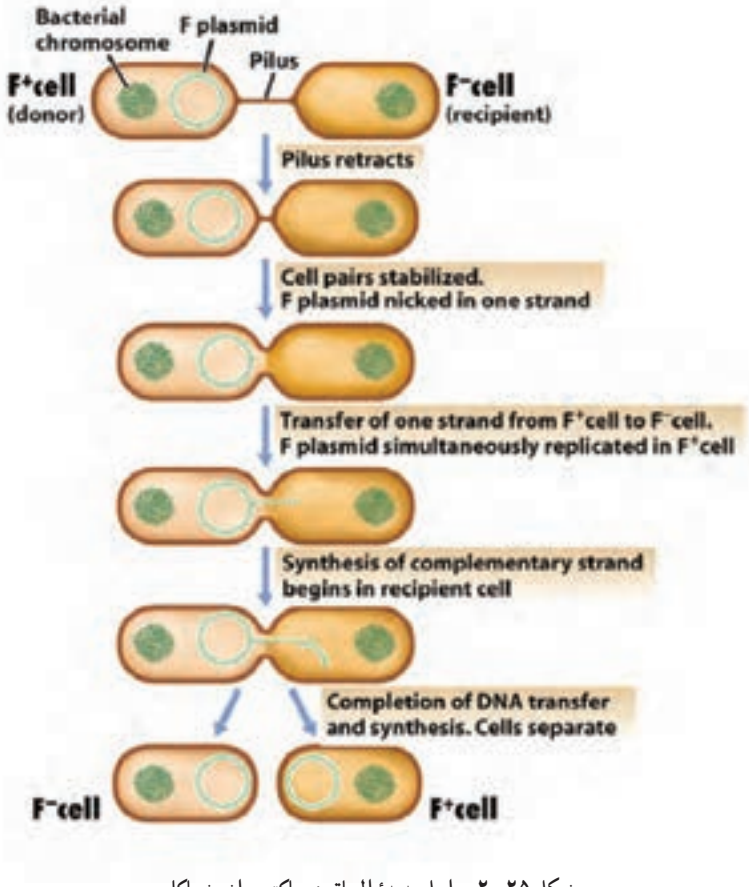
تولید مثل در باکتری‌ها

تولید مثل به دو صورت غیرجنسی شامل جوانه زدن، قطعه قطعه شدن و تقسیم‌دوتایی و جنسی (آمیختگی[1]) صورت می‌گیرد. آمیختگی یا الحاق نوع ویژه‌ای از دریافت مادهٔ ژنتیکی است. مواد ژنتیکی به چند طریق شامل الحاق، دگرگونی یا انتقال بی واسطه[2]، و انتقال با واسطه[3] بین باکتری‌ها منتشر می‌شوند. در همهٔ مکانیسم‌های انتقال، یک یاخته دهنده[4] وجود دارد که بخشی از مادهٔ وراثتی (DNA) خود را به یاخته گیرنده[5] می‌دهد. معمولاً پس از انتقال این بخش از DNA یاخته دهنده جزوی از یاخته گیرنده می‌شود و بقیهٔ آن به‌وسیلهٔ آنزیم‌های درون یاخته‌ای تجزیه می‌گردند. انتقال مواد ژنتیکی در باکتری‌ها پدیدهٔ متداولی نیست و تنها ممکن است در میان یک درصد کل جمعیت باکتری رخ دهد.

پدیدهٔ الحاق: این پدیده پیچیده ترین و در عین حال مهم‌ترین روش انتقال ژن در باکتری‌ها محسوب می‌شود و مطالعهٔ آن عمدتاً با استفاده از باکتری اشرشیاکلی صورت می‌گیرد (شکل ۲۵ــ۲). این عمل با واسطهٔ پلاسمید، که قطعهٔ DNA کوچک و حلقوی است و مستقل از کروموزوم یاخته‌ای تکثیر می‌یابد، انجام می‌شود. ژن‌های موجود در پلاسمید غالباً برای رشد یاخته حیاتی و اساسی نیستند. در واقع این پلاسمید حاوی ژن‌های سنتز کننده مژک های جنسی است که مسئول تماس و اتصال یاخته‌های دهنده و گیرنده و انتقال پلاسمید هستند.

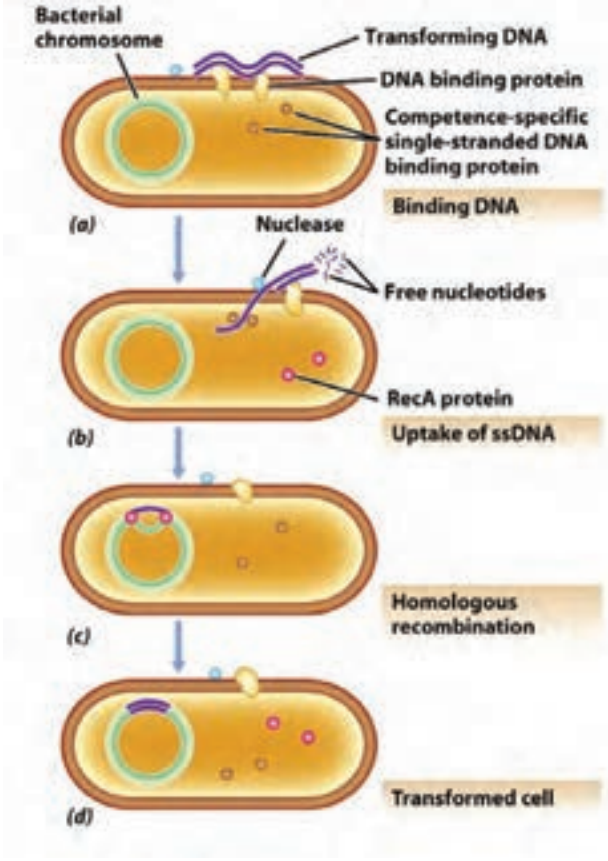


شکل ۲۵ــ۲ مراحل پدیدهٔ الحاق در باکتری اشرشیاکلی

در این روش اطلاعات ژنتیکی از طریق تماس مستقیم از یاخته‌ای به یاختهٔ دیگر انتقال می‌یابد یاخته‌دهنده یا نر دارای توانایی ایجاد مژک جنسی یا F را یاختهٔ F مثبت، و یاخته گیرنده یا مادهٔ فاقد آن را یاختهٔ F منفی می‌نامند. مژک F به‌صورت یک عضو لوله مانند برای انتقال یک طرفهٔ DNA از یاخته دهنده به گیرنده عمل می‌کند و با انقباض خود موجب نزدیک شدن دو یاخته به هم می‌شود. در این روش DNA پلاسمیدی به تنهایی یا به همراه DNA کروموزومی منتقل می‌شود. در برخی از یاخته‌های F مثبت، عامل F، ضمن شکسته شدن، به کروموزوم یاخته‌ای وارد می‌شود. در این حالت یاخته را HFr[6] می‌گویند. به هنگام الحاق یاختهٔ HFr به یاختهٔ F منفی، کروموزوم یاختهٔ HFr حاوی عامل F خرد می‌شود، همانندسازی می‌کند و تکثیر می‌یابد. در نتیجه نسخهٔ جدیدی از این کروموزوم یا بخشی از آن به یاخته گیرنده منتقل می‌شود. در اثر این عمل، یاخته‌گیرنده F منفی می‌تواند صاحب ژن‌های جدیدی شود.

۱ــ Conjugation
۲ــ Transformation
۳ــ Transduction
۴ــ Donor
۵ــ Recipient
۶ــ High frequency

ژن‌ها طی فرآیند انتقال بی واسطه، به صورت DNA برهنه به باکتری دیگر منتقل می‌شوند (شکل ۲۶ــ۲). این پدیده نخستین‌بار در سال ۱۹۲۸ توسط فردریک گریفیث و هنگام مطالعه بر روی باکتری *استرپتوکوکوس نومونیا* بدون درک دقیق مکانیسم آن نشان داده شد. این باکتری دارای دو نوع کپسول‌دار و بدون کپسول است که تنها نوع کپسول‌دار آن بیماری‌زاست. این دانشمند درصدد ایمن سازی موش علیه این بیماری با استفاده از تزریق محلول حاوی پنوموکوک بیماری‌زای کشته شده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد بود. او در حین انجام آزمایش‌های خود متوجه شد که موش تزریق شده با این نوع باکتری کشته شده، به بیماری مبتلا نمی‌شود ولی هنگامی که این باکتری‌های کشته شده با نوع غیر بیماری‌زای زنده، مخلوط و سپس تزریق شوند، موش‌ها به بیماری مبتلا می‌شوند. در این حالت، در خون موش‌هایی که در اثر بیماری مرده‌اند می‌توان باکتری‌های کپسول‌دار را یافت. وی از این آزمایش نتیجه گرفت که مواد وراثتی از باکتری‌های بیماری‌زا وارد یاخته‌های زنده شده و آن‌ها را از نظر ژنتیکی به‌گونه‌ای تغییر داده‌اند که به نوع کپسول‌دار تبدیل شده‌اند.



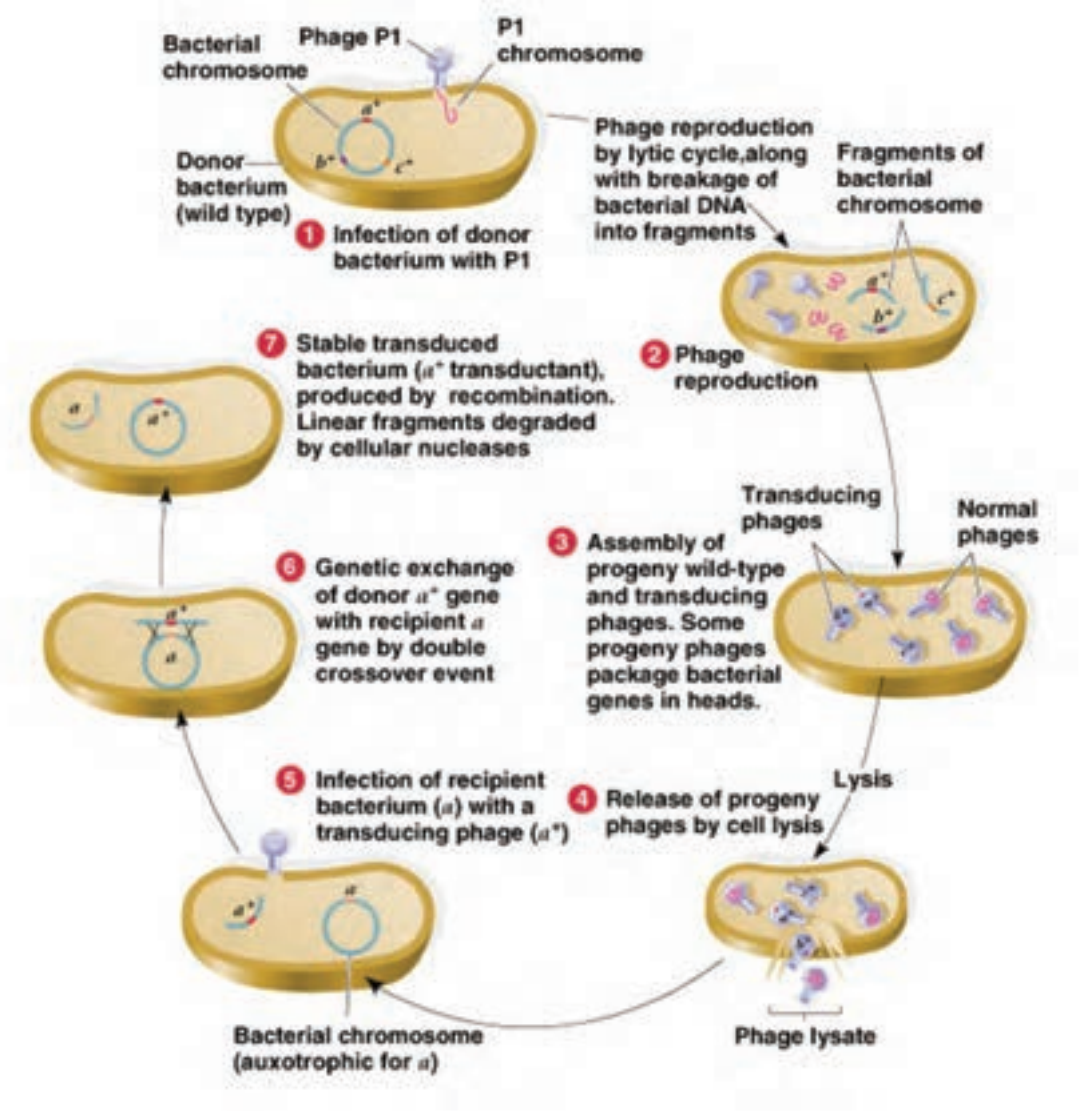
شکل ۲۶ــ۲ مراحل پدیده دگرگونی در باکتری اشرشیاکلی

در طبیعت برخی از باکتری‌ها احتمالاً پس از متلاشی شدن، DNA خود را در محیط، آزاد می‌کنند. بخش‌هایی از این DNA می‌تواند به‌وسیلهٔ باکتری‌های دیگر که در شرایط فیزیولوژیکی مستعد[1] دریافت و پذیرش DNA یاخته دهنده باشند جذب شوند و در آن‌ها صفت یا صفات جدیدی را ایجاد کنند. یاختهٔ دریافت‌کنندهٔ این ژن‌ها نوعی یاخته نوترکیب[2] است. این نوع دگرگونی یاخته‌ای در طبیعت تنها در میان انواع محدودی از باکتری‌ها دیده می‌شود. انتقال مواد ژنتیکی از طریق الحاق با انتقال از راه دگرگونی دو تفاوت اساسی دارد. یکی آن که الحاق به تماس مستقیم بین یاخته دهنده و گیرنده نیاز دارد. دیگر آن که یاخته‌های جفت شده در الحاق باید از دو نوع قابل جفت شدن باهم با واسطهٔ مژک‌های سطحی باشند، یعنی یاخته‌های دهنده باید دارای پلاسمید و یاخته های گیرنده فاقد آن باشند.

سومین مکانیسم انتقال مواد ژنتیکی در بین باکتری‌ها، از طریق فرآیند **انتقالِ باواسطه** است. در این فرآیند DNA برهنه از

۱ــ Competent ۲ــ Recombinant

یاخته‌ای به یاخته دیگر منتقل نمی‌شود بلکه به‌وسیلهٔ ویروس‌هایی به نام باکتریوفاژ[1] یا فاژ از یاخته‌های دهنده به یاخته‌های گیرنده می‌رود (شکل ۲۷ــ۲). در این فرآیند، ویروس به دیوارهٔ یاختهٔ میزبان متصل می‌شود و DNA خود را به درون آن تزریق می‌کند. به هنگام همانندسازی DNA میزبان و DNA ویروس، کروموزوم باکتری شکسته می‌شود و بخشی از آن در داخل غلاف پروتئینی ویروس جای می‌گیرد. در این صورت فاژ حاصله حاوی بخشی از DNA باکتری است. هنگامی که این فاژها باکتری‌های جدید را آلوده می‌کنند بخشی از DNA باکتری قبلی را به باکتری‌های جدید منتقل می‌سازند. در این انتقال هر بخشی از DNA باکتری اول و یا هر ژنی از باکتری دهنده می‌تواند به باکتری دوم یا باکتری گیرنده منتقل شود، لذا این نوع انتقال را عمومی[2] می‌گویند. در انتقال اختصاصی[3] DNA ناحیهٔ خاصی از کروموزوم میزبان به‌طور مستقیم وارد ژنوم ویروس می‌شود و جای‌گزین بخشی از ژنوم ویروس می‌گردد.



شکل ۲۷ــ۲ مراحل پدیدهٔ انتقال عمومی در باکتری اشرشیاکلی

۱ــ Bacteriophage ۲ــ Generalized transduction ۳ــ Specialized transduction

بیماری‌های مهم باکتریایی

بیماری مزمن تنفسی طیور

بیماری مزمن تنفسی[1] طیور یا مایکوپلاسموز[2] که در بوقلمون‌ها با نام سینوزیت عفونی شناخته شده است توسط گونه‌های باکتری مایکوپلاسما ایجاد می‌شود. مایکوپلاسماها کوچک‌ترین میکروارگانیسم‌های هسته‌دار دارای DNA، بدون دیوارهٔ سلولی و با توانایی رشد روی محیط‌های مصنوعی غنی شده هستند. این باکتری اغلب میزبان‌های محدودی دارد. چندین گونه از مایکوپلاسماهای پرندگان شناسایی شده‌اند. اما چهار گونهٔ آن در پرندگان اهلی بیماری ایجاد می‌کنند. عامل بیماری تنفسی در ماکیان *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکم*[3] است که در اثر تماس مستقیم، پرندگان حامل، یا به وسیلهٔ تخم منتقل می‌شوند؛ به این ترتیب که عفونت ناحیهٔ فالوس[4] در جنس نر به آلوده شدن منی و سپس مجرای تخم پرندهٔ ماده منجر می‌شود. زیان های اقتصادی چون کاهش کیفیت لاشه، کاهش مصرف دان، کاهش کیفیت و میزان تولید تخم مرغ و افزایش هزینه های درمانی از عواملی هستند که بیماری فوق را به یکی از پرهزینه‌ترین مشکلات پیش روی صنعت تولید طیور در سراسر دنیا تبدیل کرده‌اند.

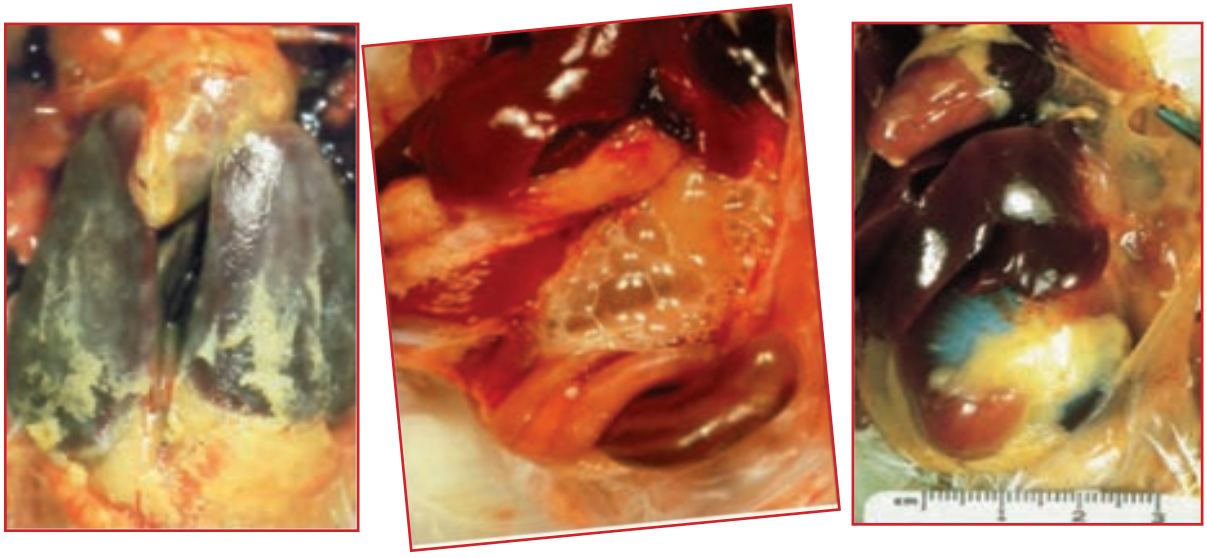
نخستین بار تشخیص دقیق این بیماری در بوقلمون‌ها، در سال ۱۹۰۵ میلادی توسط دود[5] در انگلستان صورت گرفت. وی بیماری فوق را Epizootic Pneumoenteritis نامید. در سال ۱۹۳۵ میلادی، نلسون[6] اجسام کوکوباسیلی شکل مرتبط با بیماری در جوجه‌ها را شناسایی کرد و موفق شد آن‌ها را در جنین تخم مرغ، کشت بافت و همچنین محیط کشت فاقد سلول، رشد دهد. در سال ۱۹۴۳ میلادی، دلاپلان[7] واستارت[8] میکروارگانیسم‌های فوق را از جنین جوجه های مبتلا به CRD جدا کردند. در اوایل دههٔ ۱۹۵۰ میلادی،مارخام[9] و وانگ[10] و نیز وان روکل[11] و السیوک[12] طی گزارش‌های جداگانه، کشت موفقیت آمیز این میکروارگانیسم از جوجه و بوقلمون را اعلام کردند و آن را جزو گروه (Pleuropneumonia Mycoplasma Spp) قرار دادند.

بیماری مایکوپلاسموز با کاهش رشد و نشانه‌های عمومی بیماری‌های تنفسی مانند صداهای تنفسی و خرخر کردن، سرفه و عطسه، ترشحات چشم و بینی، آماس ملتحمه و تورم شدید کیسه‌های هوایی همراه است (شکل ۲۸ــ۲). در بوقلمون‌ها تورم سینوس‌های زیر کاسهٔ چشمی دیده می‌شود. در جوجه های گوشتی (۸ــ۳ هفتگی) نشانه ها آشکارتر از پرندگان بالغ بوده و بیماری شدیدتر است. به‌طور معمول، تظاهرات کلینیکی این بیماری به آهستگی گسترش می‌یابد و با تغییر هوا شدت آن نیز متغیر است. دورهٔ بیماری طولانی است و ممکن است ماه‌ها ادامه داشته باشد. کاهش رشد و وضعیت فیزیکی ضعیف نشانهٔ وجود یک بیماری مزمن است.

شکل ۲۸ــ۲ علایم بالینی بیماری مایکوپلاسموز در طیور شامل کاهش رشد، تورم صورت، و عفونت قرنیه و ملتحمه

۱ــ CRD
۲ــ Mycoplasmosis
۳ــ Mycoplasma galisepticum
۴ــ Phallus
۵ــ Dodd
۶ــ Nelson
۷ــ Delaplane
۸ــ Stuart
۹ــ Markham
۱۰ــ Wong
۱۱ــ Van Roekel
۱۲ــ Olesiuk

در واقع، بیماری کیسهٔ هوایی[1] بیانگر التهاب کیسه‌های هوایی بر اثر درگیری پرنده با مایکوپلاسماست. کیسه‌های هوایی ضخیم و کدر حاوی ترشحات مخاطی یا پنیری بوده و ممکن است در دیوارهٔ آن‌ها فولیکول‌های لنفوییدی تکثیر یافته باشند (شکل ۲۹ــ۲).



شکل ۲۹ــ۲ یافته های کالبدگشایی بیماری مایکوپلاسموز درطیور

علاوه بر *مایکوپلاسما گالی سپتیکم*، که از نظر اقتصادی مهمترین مایکوپلاسمای پرندگان است، سویه‌های *مایکوپلاسما سینوویه*[2]، *مایکوپلاسما مله آگریدیس*[3]، و *مایکوپلاسما آیووا*[4] نیز درواقع عوامل بیماریزای طیور شناخته می‌شوند. *مایکوپلاسما سینوویه* در ماکیان و بوقلمون، و گونه‌های دیگر پرندگان در ایجاد بیماری تنفسی و تورم مفاصل دخالت دارد. *مایکوپلاسما مله آگریدیس* فقط بوقلمون‌ها را مبتلا می کند و *مایکوپلاسما آیووا* موجب کاهش جوجه درآوری و بروز تلفات دیررس جنینی در بوقلمون می‌شود.

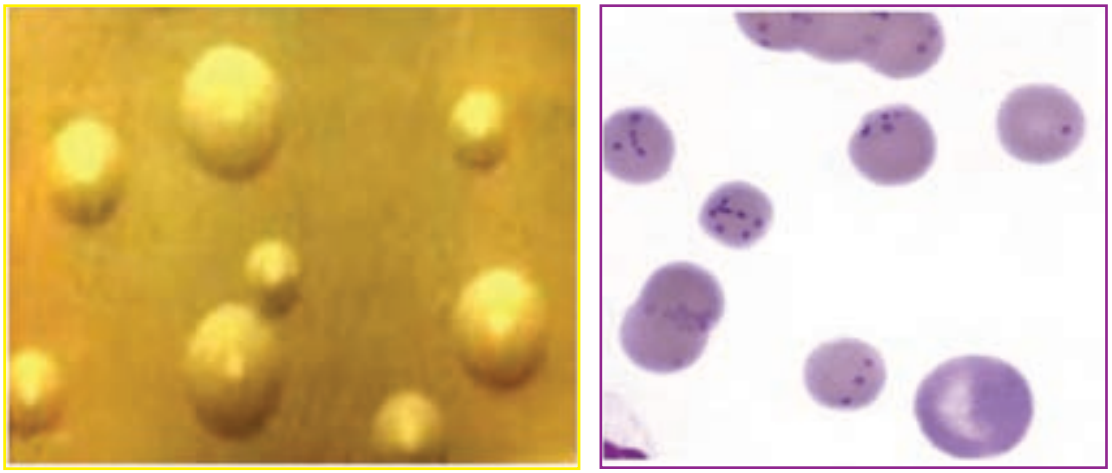
شناسایی عامل بیماری: در انواع مختلفی از محیط‌های کشت مایع یا آگار که دارای تمامی اجزای موردنیاز باکتری مانند گلوکز و همچنین عصارهٔ مخمرباشد مانند محیط فری[5]، می‌توان مایکوپلاسماهای پرندگان را تکثیر کرد. درصورتی که به این محیط میزان ۱۰ تا ۱۵ درصد سرم خوک، اسب یا پرندگانی که مدت سی دقیقه در دمای ۵۶ درجه غیر فعال شده است اضافه شود، به محیط بسیار مناسبی برای رشد اکثر مایکوپلاسماها تبدیل می‌شود.

معمولاً کشت‌های مایع حساس‌تر از کشت های جامد هستند. نمونه‌های نای، شکاف شوان[6]، قطعاتی از کیسه هوایی متورم، زرده و بخشی از غشای زرده، سوآب پنبه‌ای آغشته به ترشحات نای، کیسه هوایی و سایر بافت‌ها، مایع مفصلی و یا سینوس‌های متورم برای کشت و جداسازی باکتری مایکوپلاسما مناسب هستند. در صورت رشد مایکوپلاسما در محیط فری و یا گلوکز تخمیر شده، pH محیط کشت کاهش می‌یابد. از این خاصیت برای مشاهدهٔ رشد باکتری به‌صورت اختصاصی در محیط با افزودن معرف فنل رد[7] استفاده می‌شود. این معرف در محیط اسیدی از قرمز به نارنجی یا زرد تغییر رنگ می‌دهد. پس از زرد شدن معرف، گرم‌خانه‌گذاری محیط‌های کشت نباید ادامه یابد. زیرا برخی از گونه‌های مایکوپلاسما مانند *مایکوپلاسما سینوویه* نسبت به کاهش pH محیط و اسیدی آن حساس‌اند. این باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و طی ۳ تا ۵ روز رشد می کند. این درحالی است که در مواردی ممکن است جداسازی این باکتری به زمان بیشتر و پاساژهای متوالی نیازمند باشد.

۱ــ Air saculitis
۲ــ M.synoviae
۳ــ M.meleagridis
۴ــ M.iowae
۵ــ Frey
۶ــ Choanal cleft
۷ــ Phenol red

گونه‌های مختلف مایکوپلاسما پرگنه‌های کوچک و صاف به قطر ۰/۱ تا ۱ میلی متر با مرکز برآمدهٔ شبیه تخم مرغ نیمرو شده، ۴ تا ۵ روز پس از کشت ایجاد می‌کنند. این میکروارگانیسم را می‌توان به خوبی با رنگ گیمسا[۱] یا رنگ‌آمیزی گرم رنگ‌آمیزی نمود. مایکوپلاسما در زیر میکروسکوپ نوری به‌صورت کروی با اندازهٔ ۰/۵ــ۰/۲۵ میکرومتر دیده می‌شود (شکل ۳۰ــ۲). در بررسی با میکروسکوپ الکترونی به دلیل نبود دیوارهٔ سلولی، اشکال قمقمه‌ای، رشته‌ای یا اجسامی قطبی مشاهده خواهند شد.

گونه های مایکوپلاسما با استفاده از روش‌های سرولوژی مانند آگلوتیناسیون سرم بر روی پلیت[۲]، بازدارندگی از هماگلوتیناسیون[۳]، و الایزا[۴] و نیز روش‌های مولکولی شناسایی می‌شوند. غربال‌گری[۵] گله‌های طیور از نظر آلودگی با مایکوپلاسماهای بیماری‌زا، با آزمایش SPA انجام می‌شود. اگرچه این آزمایش سریع و کم هزینه، حساسیت[۶] زیادی دارد اما امتیاز کمتری دارد. در نتیجه واکنش‌های مثبتِ کاذب[۸] خواهد داشت. گله‌هایی که در آزمایش SPA، واکنش مثبت دارند باید با آزمایش HI و یا کشت تأیید شوند.



(ب) (الف)

الف) اَشکال کروی و درون سلولی مایکوپلاسما به رنگ بنفش تیره در زیر میکروسکوپ
ب) کلنی میکوپلاسما بر روی محیط کشت جامد
شکل ۳۰ــ۲

بیماری سل گاوی

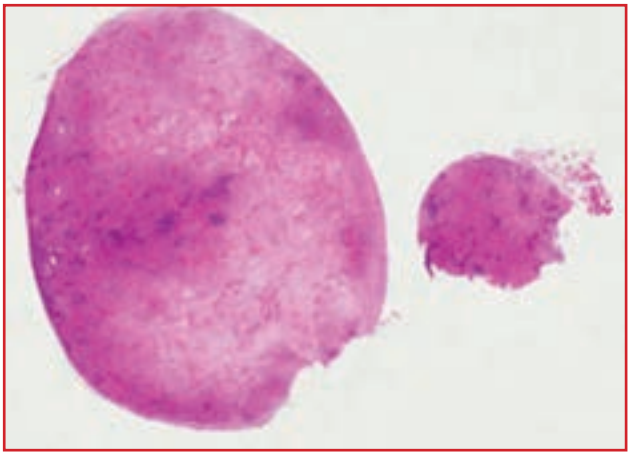
بیماری سل در تمامی کشورهای دنیا گزارش شده است و خصوصاً در گاوهای نژاد شیری اهمیت فراوانی دارد. این بیماری در گاو با ایجاد توبرکل[۹] های پیشرونده در اندام‌های مختلف بدن ناشی از آلودگی با مایکوباکتریوم بوویس[۱۰] مشخص می‌شود. صرف نظر از مرگ ومیر ناشی از بیماری سل، میزان تولید شیر در حیوانات آلوده به مایکوباکتریوم بوویس ۲۵ــ۱۰ درصد کاهش می‌یابد. بیماری سل گاوی از نظرگاه بهداشت عمومی در جوامع انسانی نیز حائز اهمیت است. سهولت و فراوانی انتشار عامل بیماری به خصوص در محیط‌هایی که بیماری سل گاوی تحت کنترل نیست، می‌تواند این بیماری را به یک بیماری مشترک مهم بین حیوان و انسان تبدیل کند. علاوه بر گاو، انسان، بز و خوک نیز نسبت به آلودگی با این باکتری حساس هستند اما گوسفند و اسب نوعی مقاومت طبیعی را نشان می‌دهند. میکروب سل از راه تنفس، خلط، مدفوع (از طریق جراحات روده‌ای و هم از طریق خلط بلع شده از جراحات ریوی)، شیر، ادرار، ترشحات رحمی و واژن، و همچنین از طریق ترشحات عقده های لنفی باز شده به محیط دفع می‌شود. گاوهای با جراحت

۱ــ Giemsa
۲ــ Serum agglutination plate (SPA)
۳ــ Hemagglutination inhibition (HI)
۴ــ ELISA
۵ــ Screening
۶ــ Sensetivity
۷ــ Specificity
۸ــ False positive
۹ــ Tubercle
۱۰ــ Mycobacterium bovis

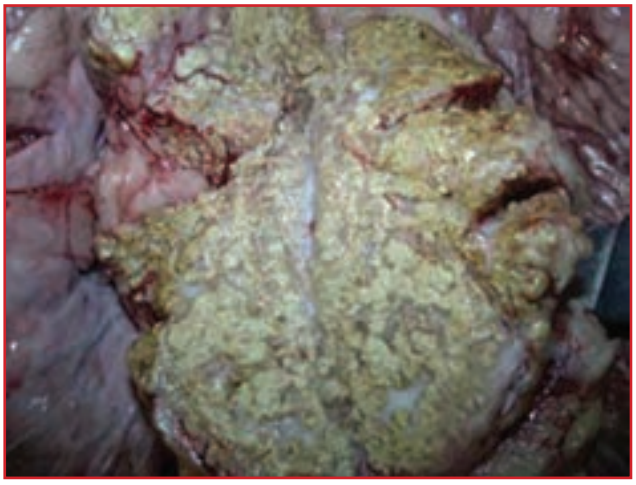
پیشرفته بیماری انتشار دهنده‌های مشخص بیماری‌اند. زیرا باسیل‌ها از طریق این دسته دام‌ها به نوعی با جـریان هوای تنفسی، پوست یا لومن روده در ارتباط هستند. ممکن است گاوها در مرحلهٔ اول بیماری پیش از آنکه هر گونه جراحتی نشان دهند، مایکو باکتریای زنده را از طریق موکوس بینی و نای خود دفع کنند.

راه ورود باکتری، معمولاً از طریق تنفسی یا گوارشی است. راه تنفسی دروازهٔ همیشگی ورود باکتری در گاوهایی است که در جایگاه بسته (گاوداری) نگه‌داری می‌شوند. این راه حتی در گاوهای موجود در چراگاه‌ها نیز روش انتقال آلودگی است. ایجاد آلودگی از طریق گوارشی در چراگاه‌ها به علت اینکه مدفوع می‌تواند غذا و آب آشامیدنی را آلوده کند، محتمل‌تر است. آب‌های آشامیدنی راکد، تحت شرایط طبیعی آب‌های تا ۱۸ روز پس از استفادهٔ آب توسط یک دام مسلول، ممکن است آلوده باقی بمانند. نوشیدن شیر آلوده به‌وسیلهٔ دام‌های جوان یکی از روش‌های معمول انتشار بیماری سل است. آلودگی داخل رحمی (از راه جفت‌گیری) و آلودگی داخل پستانی (با استفاده از سیفون‌های آلودهٔ پستانی یا از طریق فنجانک‌های آلودهٔ ماشین‌های شیردوش) از راه‌های کمتر معمول آلودگی هستند. در دامداری‌هایی که دام‌ها به‌طور متراکم نگه‌داری می‌شوند احتمال انتقال آلودگی بیشتر است. در گاوهای گوشتی، به‌دلیل وضعیت نگه‌داری آن‌ها، شدت آلودگی کمتر است.

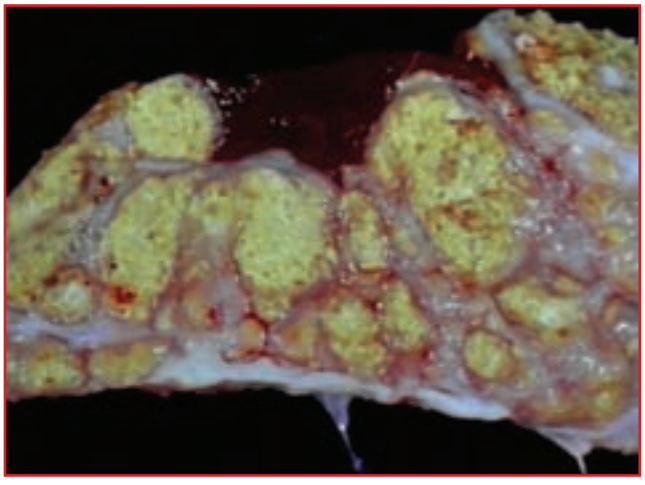
بزها کاملاً نسبت به عامل سل گاوی حساس‌اند و چنانچه در مجاورت گله‌های گاو آلوده قرار گیرند بروز بیماری می‌تواند تا ۷۰ درصد نیز برسد. گوسفند، دامی مقاوم درنظر گرفته می‌شود اما تحقیقات انجام شده در نیوزلند نشان داده است که بیماری سل می‌تواند تا ۵ درصد گله‌های گوسفند را آلوده نماید. همچنین بیماری سل ممکن است در گوزن، آهو، گاومیش، شتر، میمون و سایر حیوانات یک منطقه و همچنین پرندگان بروز نماید. همهٔ حیوانات فوق می‌توانند منشأ آلودگی برای گاو محسوب شوند (شکل‌های ۳۱ــ۲، ۳۲ــ۲و۳۳ــ۲).



شکل ۳۱ــ۲ دانهٔ سلی تشکیل شده در مرحلهٔ اولیه بیماری



شکل ۳۲ــ۲ جراحات مزمن ریهٔ محتوی مادهٔ غلیظ پنیری به رنگ زرد



شکل ۳۳ــ۲ برونکوپنومونی همراه با پرخونـی و چرک پنیری شکل در اطراف جراحات ریوی

شناسایی عامل بیماری : عامل سل گاوی مایکوباکتریوم‌بوویس (راستهٔ اکتینو میستال، خانوادهٔ مایکو باکتریاسه و جنس مایکوباکتریا) در برابر حرارت، خشکی واغلب ضد عفونی کننده‌ها مقاوم است. تابش مستقیم نور خورشید می‌تواند باعث تخریب باکتری شود. مایکوباکتریوم‌بوویس در گرما و رطوبت می‌تواند به مدت هفته‌ها زنده باقی بماند. این باکتری همانند همهٔ مایکوباکتریوم‌ها دیوارهٔ سلولی بسیار ضخیمی دارد و در لایهٔ سطحی خود از یک کپسول منتشر، یک دیوارهٔ دو لایه‌ای و غشای پلاسمایی تشکیل شده که احتمالاً بقای میکروب را در محیط‌های نامساعد (چه در محیط و چه در داخل سلول میزبان) حفظ می‌کند. دیوارهٔ سلولی مایکوباکتریوم‌ها از نظر ساختمان شیمیایی ترکیبی از پپتیدوگلیکان، آرابینوگالاکتان و اسیدمایکولیک[1] و همچنین لیپیدهایی همانند مایکوزیدها، فاکتور طنابی[2] و سولفالیپیدها هستند، که در آسیب‌زایی باسیل‌های سل نقش دارند. اجزای دیوارهٔ سلولی، خصوصاً اسید مایکولیک، رنگ‌هایی نظیر کربول فوشین[3] را حفظ می‌کنند و به هنگام رنگ‌زدایی به‌وسیلهٔ اسیدهای رقیق (پدیدهٔ اسید فست[4]) موجب مقاومت باکتری می‌شوند.

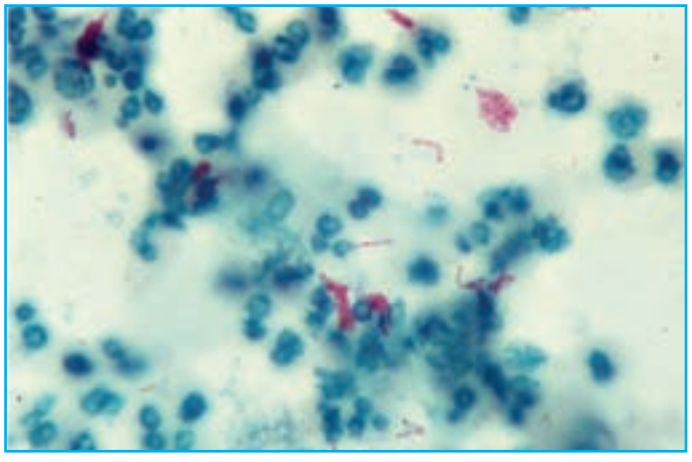
رنگ‌آمیزی اسیدفست یا زیل نلسن[5]

رنگ‌آمیزی تشخیصی است که میزان و درجهٔ مقاومت سلول‌های رنگ شده در برابر رنگ‌بری اسیدها را تعیین می‌کند. خاصیت مقاومت در برابر اسیدها در بعضی مایکوباکتریوم‌ها و اکتیومیست‌ها به مقدار زیاد لیپیدی بستگی دارد که در آن‌ها موجود است. برای رنگ‌آمیزی این باکتری‌ها از حرارت و رنگی که گرایش قوی به سلول باکتری دارد استفاده می‌شود. در این روش از محلول اسید ــ الکل، که عامل بی‌رنگ‌کننده است، استفاده می‌شود و بعد هم رنگ‌آمیزی دوم باکتری‌ها انجام می‌گردد. باکتری‌های اسید فست، کندتر از سایر میکروارگانیسم‌ها، در برابر اسید ــ الکل بی رنگ می‌شوند و بعد از رنگ‌آمیزی دوم، رنگ اولیهٔ خود را حفظ می‌کنند.

مواد و رنگ لازم جهت رنگ‌آمیزی

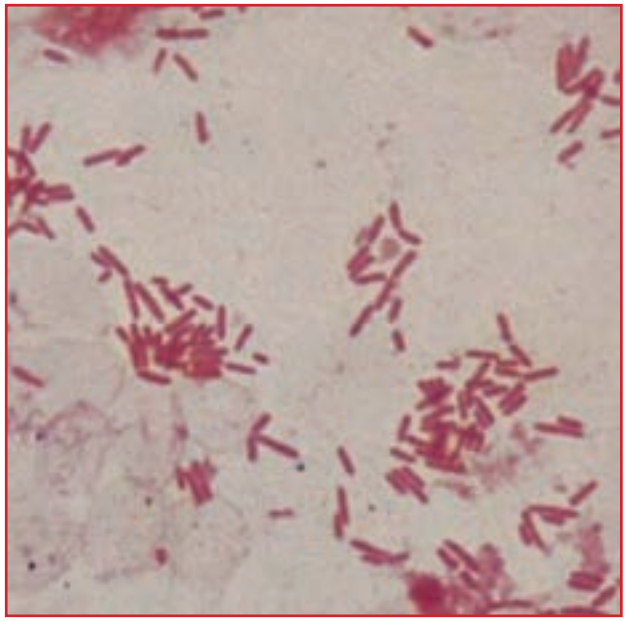
۱) رنگ کربول فوشین ۲) اسید ــ الکل ۳) رنگ بلودو متیلن یا مالاشیت گرین

روش رنگ‌آمیزی : بعد از تهیه، گسترش و ثابت کردن آن، رنگ فوشین را روی لام می‌ریزیم و به مدت ۵ دقیقه لام را از پایین به‌طور متناوب روی شعله حرارت می‌دهیم، به طوری که رنگ نجوشد و فقط بخار شود. با کم شدن رنگ باید مجدداً رنگ اضافه کرد. پس از سرد شدن لام را شست‌شو می‌دهیم. لام را حدود یک دقیقه داخل اسید ــ الکل فرو می‌بریم و سپس آن را شست‌وشو می‌دهیم. این عمل را آن‌قدر تکرار می‌کنیم تا رنگ لام پوست پیازی شود. رنگ بلودو متیلن را به مدت ۳۰ ثانیه روی لام می‌ریزیم و شست‌شو می‌دهیم، بعد از خشک شدن لام را زیر میکروسکوپ با درشت نمایی ۱۰۰ × مشاهده می‌کنیم. باکتری‌های اسید فست به رنگ صورتی در زمینهٔ آبی و سایر باکتری‌ها به رنگ آبی دیده می‌شوند. در صورت استفاده از رنگ مالاشیت گرین، باکتری‌های اسید فست به رنگ قرمز و سایر باکتری‌ها به رنگ سبز دیده می‌شوند (شکل ۳۴ــ۲).



شکل ۳۴ــ۲ رنگ‌آمیزی زیل نلسن. مایکوباکتریوم اسید فست به رنگ قرمز و سایر باکتری‌ها به رنگ سبز دیده می‌شوند

۱ــ Mycolic acid ۲ــ Cord factor ۳ــ Carbol fushin ۴ــ Acid fast ۵ــ Ziehl ــ Neelsen



شکل ۳۵ــ۲ رنگ‌آمیزی گرم باکتری سودوموناس

بیماری پوسیدگی بالهٔ ماهی

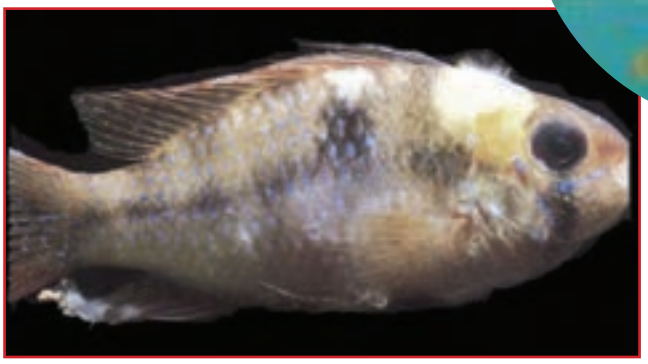
بیماری دم خوره یا پوسیدگی باله[۱] توسط باکتری‌های گروه سودوموناس[۲] ایجاد می‌شود. سلول‌های این باکتری میله‌ای‌شکل، گرم منفی و غیرمتحرک‌اند و اسپور تولید نمی‌کنند (شکل ۳۵ــ۲).

آلودگی با سودوموناس باعث ریختن باله‌ها و فاسد شدن ماهی‌ها می‌شود. در این بیماری باله‌های شنا و دمی ماهی دچار تغییرات می‌شوند و گاهی هم از بین می‌روند. در مرحلهٔ اولیهٔ بیماری پوسیدگی باله‌ها، خط سفید کم و بیش واضح در طول لبه‌های خارجی بالهٔ شنا ظاهر می‌شود و به‌تدریج به سمت قاعدهٔ آن پیش می‌رود. کم‌کم قسمت‌هایی از لبهٔ خارجی بالهٔ شنا از بین می‌رود و شعاع‌های آن لخت می‌شود (شکل ۳۶ــ۲). باظهور زخم، لبهٔ خارجی در اثر تحلیل رفتن نسوج نرم بین باله‌ها حالت رشته رشته پیدا می‌کند (شکل ۳۷ــ۲). در انتها، زخمی روی بدن ماهی باقی می‌ماند که در مرحلهٔ بعد، این محل مورد هجوم اجرام ریزبینی دیگر مانند قارچ‌ها قرار می‌گیرد (شکل ۳۸ــ۲) و تا سر حد مرگ ماهی پیش می‌رود. این حالت در ماهیان آکواریومی و آزاد ماهیان به‌وفور دیده می‌شود. تراکم زیاد، دمای بالا، بدی تغذیه (کمبود اسید فولیک[۳] و اینوزیتول[۴]) و یا افزایش ویتامین A ممکن است باعث گسترش پوسیدگی باله و دم شود.

شکل ۳۶ــ۲ خوردگی لبهٔ خارجی بالهٔ دمی در بیماری پوسیدگی دم ماهی

۱ــ Fin rot ۲ــ Psedomonas ۳ــ Folic acid ۴ــ Inositol

شکل ۳۷ــ۲ رشته رشته شدن بالهٔ دمی در بیماری پوسیدگی دم ماهی



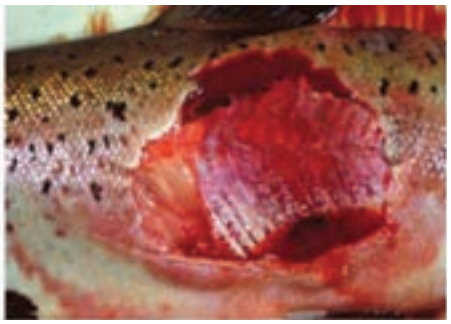
شکل ۳۸ــ۲ هجوم قارچ ها در بیماری پوسیدگی بالهٔ ماهی

سایر بیماری‌های باکتریایی ماهیان عبارت‌اند از :

فرونکلوزیس[۱] : یکی از شایع ترین بیماری‌های میکروبی آزاد ماهیان است و توسط باکتری‌های گروه آئروموناس[۲] ایجاد می‌شود (شکل‌های ۴۰ــ۲ و ۴۱ــ۲). منظرهٔ میکروسکوپی این باکتری شبیه باکتری سودوموناس است. بیماری فرونکلوزیس با افزایش درجهٔ حرارت، کم شدن میزان اکسیژن محلول در آب، وجمعیت زیاد ماهیان ارتباط دارد. این بیماری ممکن است در هر سنی ماهیان را مبتلا سازد ولی در بین ماهیان انگشت قدی شایع‌تر و خطرناک‌تراست. مهم‌ترین علامت این بیماری تغییرشکل طحال است که به شکل قرمز در می‌آید. کبد بی‌رنگ و خونریزی‌های وسیع در تمام سروزهای سطحی دیده می‌شود. ماهی تغذیه نمی‌کند و خون به داخل روده‌ها وارد و روی پوست کورک‌های متعدد دیده می‌شود (شکل ۳۹ــ۲). درشکل مزمن، بیماری کورک‌ها به قسمت‌های زیرین پوست می‌روند و به عضلات می‌رسند (شکل ۴۰ــ۲).

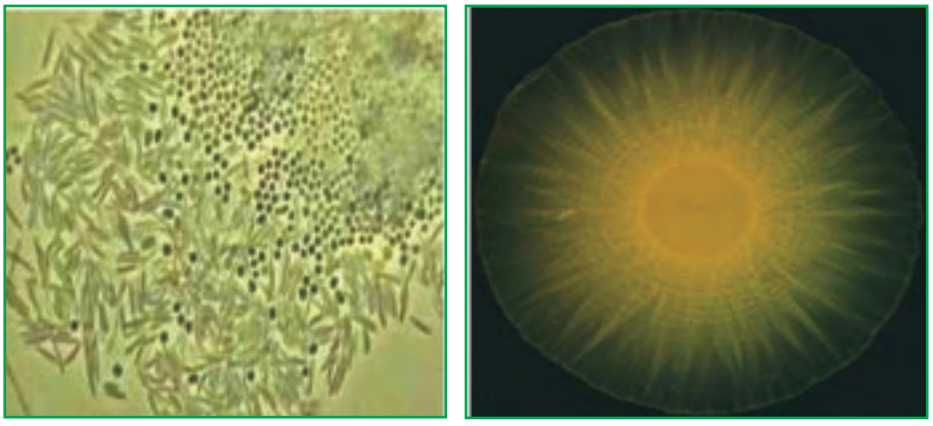
شکل ۳۹ــ۲ کورک پوستی در بیماری فرونکلوزیس آزاد ماهیان

۱ــ Furunculosis ۲ــ Aeromonas



شکل ۴۰ــ۲ آسیب عضلانی در بیماری فرونکلوزیس آزاد ماهیان

بیماری باکتریال آبشش[1] : بیماری آبشش، که در آن آبشش کاملاً باز و قرمز رنگ و از حالت عادی خارج است و گاهی هم در زیر آن خونریزی رخ می‌دهد، در اثر آلودگی به میکسوباکتر[2] (شکل ۴۱ــ۲) ایجاد می‌شود.



شکل ۴۱ــ۲ پرگنهٔ میکسوباکتر بر روی محیط کشت جامد و منظرهٔ میکروسکوپی آن

در ماهی بیمار طریقهٔ شنا کردن تغییر می‌کند و با سرعت به سطح آب می‌آید، سپس بی‌حس می‌شود و آرام می‌گیرد. در مراحل اولیه، ماهی کاملاً بی‌اشتها می‌گردد و آبشش‌ها متورم می‌شوند. صفحات آبششی به‌تدریج به‌هم می‌چسبند و رنگ پریده می‌شوند (شکل ۴۲ــ۲). آبشش‌ها کاملاً باز می‌شوند و تشکیلات کرکی ــ پنبه ای مانند، روی سرپوش‌های آبششی ظاهر می‌گردد، در نتیجهٔ این تغییرات شدید، تنفس ماهی‌ها مختل می‌گردد و باعث می‌شود به سطح آب بیایند. ادامهٔ روند این بیماری تلفات ماهی‌ها را به همراه خواهد داشت.

۱ــ Bacterial gill disease (BGD)

۲ــ Myxobacteria

الف) تورم و به هم چسبیدن صفحات آبششی
ب) رنگ پریدگی صفحات آبششی در بیماری باکتریال آبشش
شکل ۴۲ــ۲

علاوه بر بیماری باکتریال آبشش، چندین نوع دیگر بیماری آبشش در ماهیان دیده می‌شود، شامل بیماری آبشش تغذیه‌ای که در اثر کمبود اسید پانتوتنیک ایجاد می‌شود. بیماری آبشش هموراژیک، که با ظهور اتساع‌های شریانی به اندازهٔ دانه‌های شن در مویرگ‌های آبششی مشخص است و عامل آن آلودگی‌های شیمیایی، حشره‌کش‌ها و انگل‌های خونی است. همچنین برانشیو مایکوزیس بیماری آبششی است که در اثر آلودگی آبشش با قارچ ایجاد می‌شود. در تمام این حالات، یکی از بارزترین نشانه‌ها افزایش ترشحات موکوسی در آبشش‌هاست.

بیماری باکتریال کلیه[۱] : هنگامی که درجهٔ حرارت افزایش یابد بیماری کلیه بیشتر به‌صورت یک بیماری مزمن و پنهان بروز می‌کند. در ماهی مبتلا، برآمدگی حباب مانند و یا برجستگی به صورت مناطق بیضی و یا دایره‌ای شکل در طول خط پهلو دیده می‌شود (شکل۴۳ــ۲). پوست ماهی تیره می‌گردد و ماهی‌ها در اثر بدی تغذیه نیم کور یا کور می‌شوند. بعضی همه گیری‌ها در پاییز و بعضی در بهار رخ می‌دهد. مرگ و میر تدریجی است ولی ناگهان افزایش می‌یابد.

بیماری دهان قرمز[۲] : این بیماری در قزل‌آلاهای رنگین‌کمان مشاهده می‌شود (شکل ۴۴ــ۲). عامل آن یرسینیا روکری[۳] است. قرمزی دهان و سرپوش آبشش و نیز ساقهٔ دم و پایهٔ باله‌ها، التهاب و تخریب فک ها علایم اولیهٔ بیماری هستند (شکل ۴۵ــ۲). ماهی بی‌حال می‌شود و به رنگ تیره درمی‌آید. در موارد مزمن بیماری، خونریزی چشم و کوری اگزوفتالمی، حرکت بدون هدف، اتساع شکمی، رنگ پریدگی آبشش‌ها و لاغری دیده می‌شود (شکل ۴۶ــ۲).

شکل ۴۳ــ۲ برجستگی بیضی شکل خط پهلو در بیماری باکتریال کلیه

۱ــ Bacterial kidney disease (BKD)
۲ــ Red mouth disease (RMD)
۳ــ Yersinia ruckeri

شکل۴۴ــ۲ زبان قرمز و متورم ماهی قزل آلا در بیماری دهان قرمز

شکل۴۵ــ۲ التهاب و تخریب فک ها در بیماری دهان قرمز

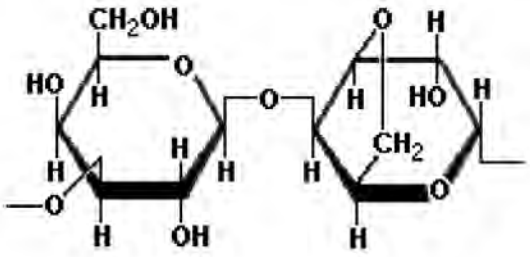
شکل۴۶ــ۲ خونریزی چشم و اتساع شکم در بیماری دهان قرمز مزمن

کشت و تکثیر باکتری در آزمایشگاه[1]

میکروب یک موجود تک سلولی بوده و قادر است کلیهٔ اعمال حیاتی خود را به طور مستقل انجام دهد، بدون آن‌که نیاز به‌سلول دیگری داشته باشد. این اصل بیانگر آن است که میکروب‌ها هم به غذا، آب، موادآلی و معدنی احتیاج دارند. به محیط مغذی که حاوی کلیهٔ نیازمندی‌های یک باکتری باشد و رشد آن را تأمین کند محیط کشت[2] گفته می‌شود. این محیط حاوی منبع کربن ونیتروژن، عناصر ضروری و ویتامین‌های مورد نیاز باکتری است. برخی از انواع محیط‌های کشت، علاوه بر فراهم آوردن شرایط رشد و تکثیر باکتری‌ها، دارای ترکیباتی هستند که در تشخیص و شناسایی آن‌ها نیز کاربرد دارند. محیط‌های کشت به‌صورت پودر تولید شده و آمادهٔ مصرف هستند.

برای به‌دست آوردن یک کشت موفق باید شرایط مناسب برای رشد باکتری شامل مواد غذایی مورد نیاز، دمای مطلوب رشد، رطوبت کافی، نمک‌های آلی، pH مناسب و بودن یا نبودن اکسیژن فراهم شود. محیط‌های کشت به سه دسته تقسیم می‌شوند : محیط کشت مایع[3]، محیط کشت جامد[4] و محیط کشت نیمه جامد[5]. محیط‌های کشت جامد به علت دارا بودن آگار[6] در ترکیب خود، جامد هستند. آگار (شکل ۴۷ــ۲) پلی‌ساکارید خطی است که از بتا ــ دی گالاکتوز و ۳ــ۶ ان هیدروــ آلفا ــ الــگالاکتوز[7] تشکیل شده است.

۱ــ In vitro
۲ــ Culture medium
۳ــ Broth
۴ــ Solid
۵ــ Semi solid
۶ــ Agar
۷ــ Beta_D_galactose + 3_6 anhydro_alpha_L_galactose



شکل ۴۷ــ۲ فرمول شیمیایی باز آگار

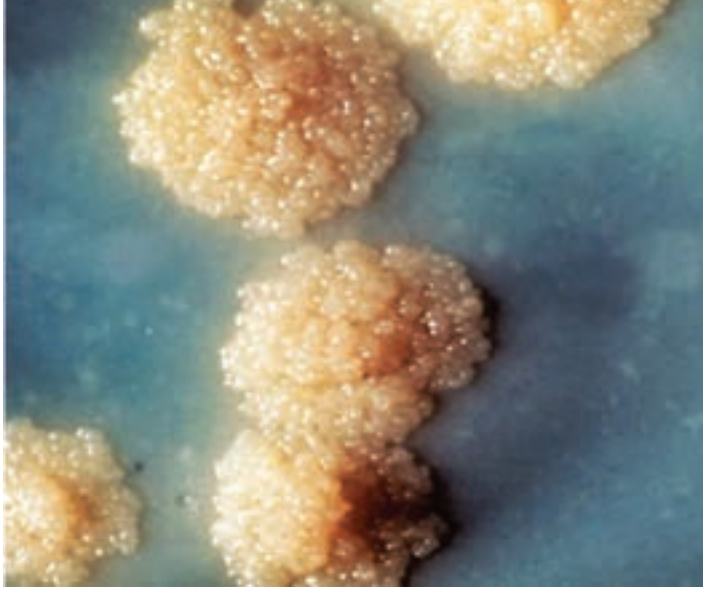
آگار به‌وسیلهٔ تعدادی از جلبک‌های دریایی ساخته می‌شود و هیچ میکروبی توانایی استفاده از آن را به‌صورت منبع انرژی ندارد. آگار با سایر ترکیبات موجود در محیط کشت مانند عصارهٔ گوشت، پپتون، قند، معرف‌ها، بازدارنده‌ها وغیره واکنش نمی‌دهد. حتی پس از سترون شدن در اتوکلاو نیز تغییر ساختار یا رنگ نمی‌دهد. آگار بر خلاف ژلاتین، حرارت ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد را، که برای رشد تمام باکتری‌های بیماری‌زا مناسب است، تحمل می‌کند. دمای ذوب آن ۹۵ درجه و دمای بسته شدن آن حدود ۴۳ درجهٔ سانتی‌گراد است. مقدار آگار محیط کشت نیمه جامد نسبت به محیط جامد کمتر است و ۱ تا ۵٪ آگار دارد. این نوع محیط‌های کشت، هنگامی که بررسی حرکت باکتری‌ها مورد نظر باشد، مورد استفاده قرار می‌گیرند.

شکل ۴۸ــ۲ کدورت ایجاد شده در لولهٔ سمت چپ در مقایسه با لولهٔ سمت راست بر اثر رشد باکتری

برای انجام کشت در محیط مایع کافی است مقداری از نمونه به محیط اضافه شود. باکتری در محیط مایع پس از مدت زمان لازم (حدود ۴ ساعت) به صورت کدورت یک‌نواخت، غیریک‌نواخت و یا پردهٔ ظریفی درسطح محیط کشت ظاهر می‌شود (شکل ۴۸ــ۲). در صورتی که باکتری در محیط جامد کشت داده شود، پس از طی مدت لازم، حدود ۱۸ تا ۲۴ ساعت به صورت پرگنه[1] درسطح محیط ظاهر می‌شود (شکل ۴۹ــ۲). به‌جز بعضی از مایکوباکترها، که زمان رشد آن‌ها سه تا شش هفته طول می‌کشد (شکل ۵۰ــ۲). در واقع مجموعه‌ای از باکتری‌ها که بر روی محیط کشت کنار هم رشد می‌کنند، تشکیل نقاط برجسته‌ای روی محیط کشت می‌دهند که اندازهٔ آن‌ها متفاوت است و به محیط کشت، میزان رشد، و تکثیر باکتری بستگی دارد. این مجموعه را پرگنه می‌نامند.

شکل ۴۹ــ۲ پرگنه های مختلف باکتری‌ها بر روی محیط کشت جامد

۱ــ Colony



شکل ۵۰ــ۲ پرگنهٔ باکتری مایکوباکتر بر روی محیط کشت جامد

برای شناسایی اولیهٔ میکروارگانیسم‌ها توجه به ویژگی‌های ظاهری پرگنه ضروری است (شکل ۵۱ــ۲). این خصوصیات عبارت‌اند از :

در محیط‌های جامد (شکل ۵۲ــ۲) :

شکل[۱] : گرد[۲]، نامنظم[۳]، رشته‌ای[۴] یا ریزوییدی[۵] است.

اندازه : قطر پرگنه برحسب میلی‌متر چقدر است؟ (کلنی‌هایی را، که قطرشان کمتر از یک میلی‌متر است، نقطه‌ای یا سوزنی می‌نامند).

رنگ : پرگنه چه رنگی دارد و رنگیزهٔ[۶] موجود در آن، محلول در آب است یا خیر؟

سطح : آیا سطح پرگنه نرم[۷] است یا خشن[۸]، کدر است یا شفاف و براق؟

برجستگی[۹] : ظاهر پرگنه برآمده، تخت وغیره است؟

لبه[۱۰] : اطراف پرگنه مضرس[۱۱]، صاف، چین خورده و غیره است؟

قوام : آیا پرگنه به آسانی با آب آمیخته می‌شود؟ در این صورت، آیا محلول یک‌نواختی به دست می‌آید یا این‌که به‌صورت دانه دانه است؟

بو : پرگنه بودار و یا بدون بوست؟

در محیط‌های مایع

مقدار رشد : کم، متوسط، زیاد، رشدی وجود ندارد.

پرده[۱۲] **یا غشا**

پرده یا پوسته‌ای بر روی سطح محیط مایع وجود ندارد.

پرده بر روی سطح وجود دارد که ممکن است با تکان دادن پاره شود یا نشود.

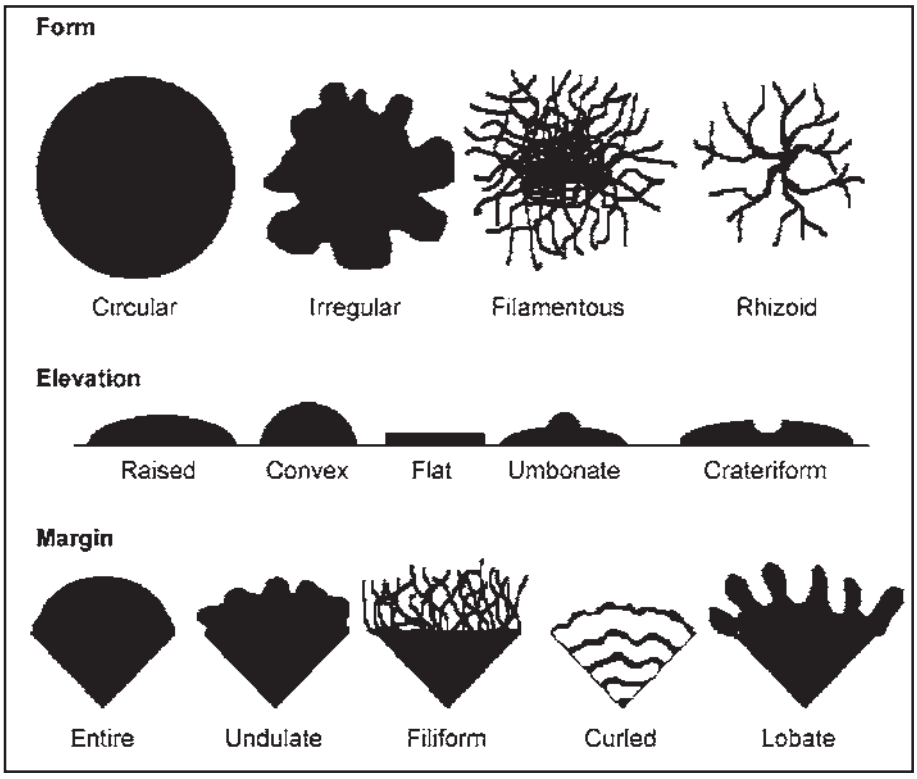
کدورت[۱۳] : کدورت یک‌نواخت و یک‌سان است.

ته نشست یا رسوب[۱۴]

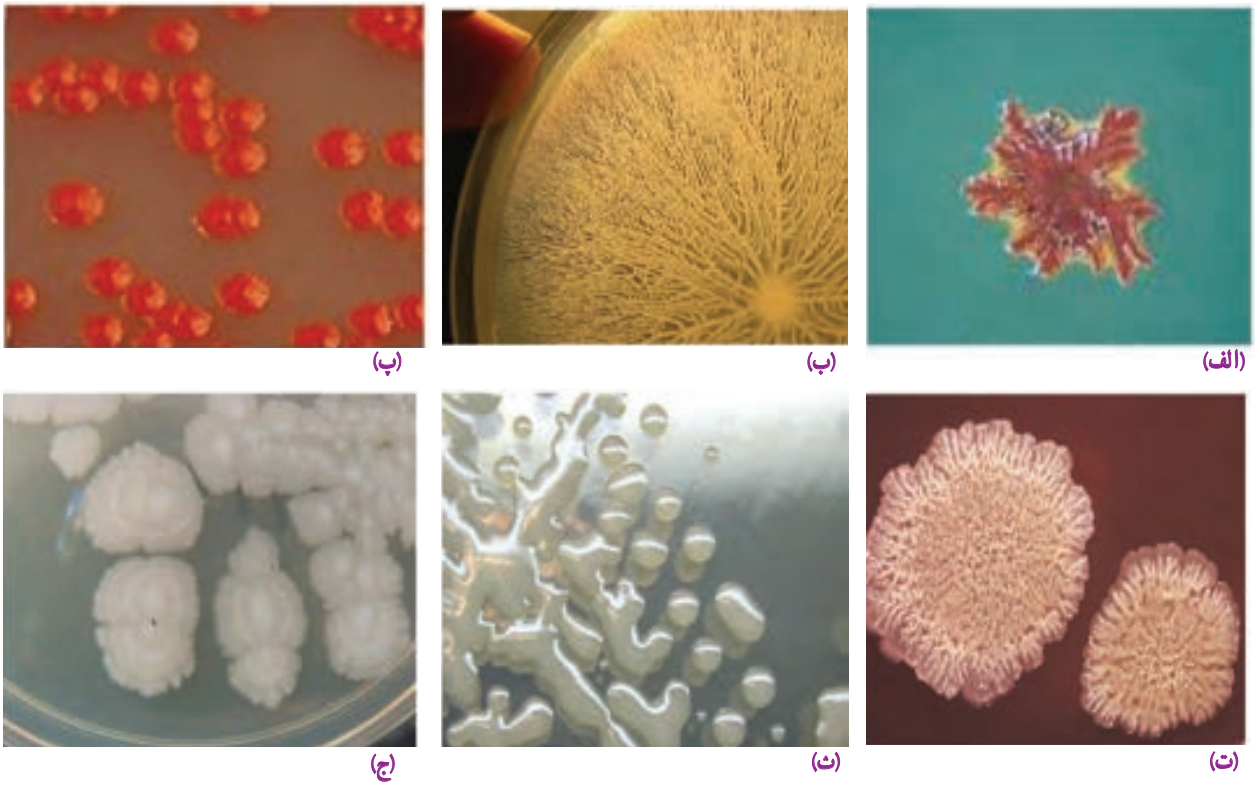
ته نشت وجود ندارد.

ته نشست وجود دارد. در این صورت یا با تکان دادن متلاشی می‌شود یا نمی‌شود.

۱ــ Form	۲ــ Circular	۳ــ Irregular	۴ــ Filamentous	۵ــ Rizoid
۶ــ Pigment	۷ــ Smooth	۸ــ Rough	۹ــ Elevation	۱۰ــ Margin
۱۱ــ Undulate	۱۲ــ Pellicle	۱۳ــ Turbidity	۱۴ــ Sediment	



شکل ۵۱ــ۲ شکل، لبه و برجستگی‌های مختلف در پرگنهٔ انواع باکتری‌ها



الف) پرگنهٔ نامنظم ب) پرگنهٔ ریزوییدی پ) پرگنهٔ دارای رنگیزه ت) پرگنهٔ با ظاهر چین خورده ث) پرگنهٔ با سطح نرم ج) پرگنهٔ با لبهٔ مضرس

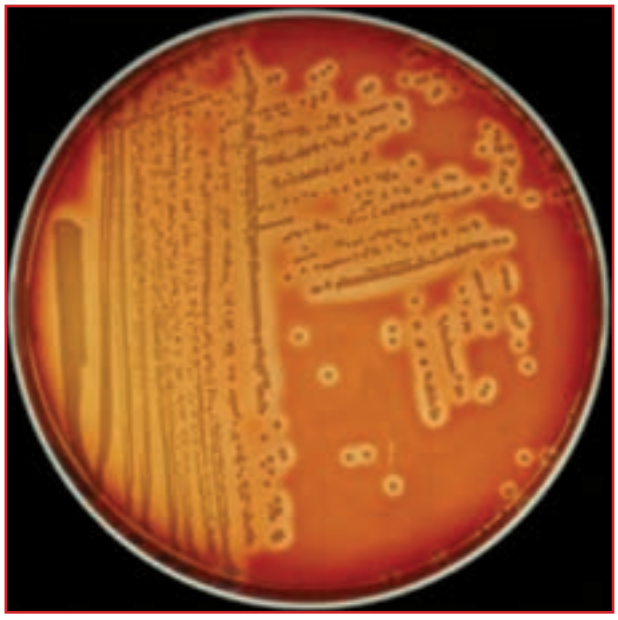
شکل ۵۲ــ۲ خصوصیات پرگنهٔ باکتری بر روی محیط کشت جامد

باکتری‌ها را می‌توان بر روی محیط‌های مختلف، در پلیت یا در لوله کشت داد. انتخاب نوع ظرف بستگی به نوع کشت دارد. برای کشت‌هایی که محیط آن مایع است از ظروف لوله‌ای استفاده می‌شود و محیط‌های جامد هم در پلیت و هم در لوله کشت داده می‌شوند. بیشتر محیط‌های کشت که درپلیت مصرف می‌شوند، محیط‌های کشت عمومی هستند که برای تهیهٔ مواد غذایی لازم جهت رشد باکتری ساخته شده‌اند. گاه محیط‌های کشت عمومی را با اضافه کردن اجزای مغذی مانند شیر بی‌چربی، خون دفیبرینه گوسفند، زردهٔ تخم مرغ و سرم که موجب افزایش سرعت رشد باکتری‌های دیر رشد می‌شوند، غنی می‌کنند. این مواد مغذی را نمی‌توان با محیط اصلی اتوکلاو همراه کرد، زیرا حرارت ساختمان آن‌ها را تخریب می‌کند. این مواد، ضمن جداگانه سترون شدن، به محیط کشت اضافه می‌شوند.

انواع محیط کشت

محیط‌های کشت را از نظر ترکیب شیمیایی، دارا بودن مواد غذایی و یا مواد بازدارنده می‌توان به چند دسته تقسیم کرد :

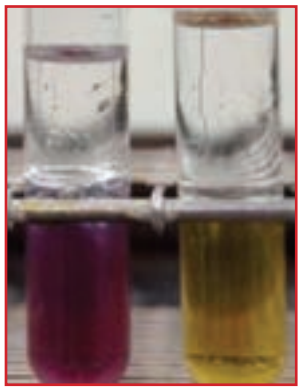
محیط کشت عمومی : محیط کشت عمومی برای تکثیر و جداسازی باکتری‌ها بکار می‌رود. این محیط‌ها کلیهٔ مواد لازم را برای رشد باکتری دارند و حدود ۸۰٪ از باکتری‌ها می‌توانند در آن رشد کنند. این محیط‌ها فاقد هرگونه مهارکننده و معرف‌اند، بنابراین با رشد باکتری‌های مختلف بر روی آن هیچ‌گونه تغییر رنگی مشاهده نمی‌شود. پلیت کانت آگار[۱]، نوترینت آگار[۲]، و آگار خون‌دار[۳] مثال‌هایی از این‌گونه محیط‌های کشت هستند. در محیط آگار خون‌دار، علاوه بر تأمین رشد، باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ آهن خون مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*[۴] از باکتری‌های فاقد این توانایی متمایز می‌شوند. باکتری‌های دارای خاصیت همولیز آنزیم همولیزین تولید می‌کنند. این آنزیم در محیط آگار خون دار باعث پاره (لیز) شدن گلبول‌های قرمز می‌گردد و در نتیجه هاله‌ای شفاف اطراف کلنی باکتری مولد آن دیده می‌شود (شکل ۵۳ــ۲). بسته به نوع باکتری یکی از این سه حالت مشاهده می‌شود : همولیز کامل (β) که باکتری واجد همولیزین است واطراف پرگنه منطقه شفافی ایجاد می‌کند، همولیز ناقص (α) که باکتری واجد همولیزین است ولی نسبت لیز کمتر از ۵۰ درصد است و اطراف پرگنه هالهٔ سبز رنگ ایجاد می‌کند، عدم همولیز (γ) که باکتری فاقد این آنزیم است.



شکل ۵۳ــ۲ همولیز کامل (نوع بتا) باکتری استافیلوکوکوس اورئوس روی محیط آگار خون‌دار

۱ــ Plate count agar ۲ــ Nutrient agar ۳ــ Blood agar ۴ــ S.aureus

محیط‌های کشت افتراقی یا جدا کننده[1] : محیط‌های کشت افتراقی محیط‌هایی هستند که باکتری‌های مختلف در آن صفات خاص خود را نشان می‌دهند و زمانی مورد استفاده قرار می‌گیرند که با باکتری‌هایی با شکل و مشخصات اولیهٔ یک‌سان مواجه هستیم. این محیط ها ترکیباتی دارند که موجب می‌شوند برخی از باکتری‌ها در مقایسه با باکتری‌های دیگری که در همان محیط کشت رشد می‌کنند به شکل متفاوتی ظاهر شوند. مانند محیط لیزین دکربوکسیلاز براث[2] که به‌صورت محیط افتراقی در تمایز بین آنتروباکتریاسه‌ها به‌کار برده می‌شود. این محیط توان این باکتری‌ها را در دکربوکسیله کردن[3] اسید آمینه لیزین تعیین می‌کند (شکل۵۴ــ۲). همه آنتروباکتریاسه ها در نتیجهٔ تخمیر قند گلوکز، اسید تولید می‌کنند و محیط را به رنگ زرد در می‌آورند. چنانچه یک باکتری اسید آمینه مورد نظر را نیز دکربوکسیله کند آلکالین آمین و کادوارین[4] تولید خواهد شد. در نتیجهٔ قلیایی شدن محیط، رنگ بنفش مشاهده خواهد شد.



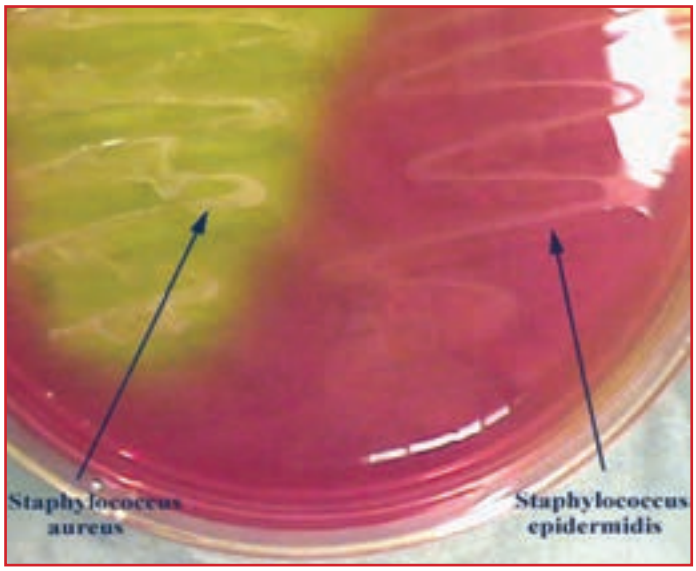
شکل ۵۴ــ۲ دکربوکسیله شدن اسیدآمینه لیزین توسط باکتری و تغییر رنگ محیط به بنفش در اثر تولید آلکالین آمین و کادوارین

محیط‌های کشت انتخابی[5] : بعضی از مواد مغذی دارای یک عامل انتخابی هستند که برای جداسازی یا کشت گروه خاصی از باکتری‌ها کاربرد دارد. عامل انتخابی معمولاً با جلوگیری از رشد ارگانیسم‌های ناخواسته، شرایط رشد سریع و مطلوب باکتری موردنظر را فراهم می‌کند. وقتی عامل انتخابی به محیط کشت اضافه می‌شود در این صورت محیط کشت را انتخابی می‌گویند، مانند محیط مک کانکی آگار[6] برای آنتروباکتریاسه‌ها و یا محیط مانیتول سالت آگار[7] برای استافیلوکوک‌ها. محیط مک کانکی آگار محیط انتخابی ــ افتراقی است که سبب رشد آنتروباکتریاسه[8]ها و نیز افتراق باکتری‌های گرم منفی لاکتوز مثبت از باکتری‌های لاکتوز منفی می‌شود. عمل انتخابی محیط به رنگ کریستال ویوله[9] و نمک صفراوی، که مانع رشد باکتری‌های گرم مثبت می‌شوند، بستگی دارد. باکتری‌های گرم منفی که روی این محیط رشد می‌کنند اگر توانایی استفاده از لاکتوز را داشته باشند (مانند اشریشیا کلی) کلنی‌هایی به رنگ قرمز ــ صورتی خواهند داشت که ناشی از تولید اسید از تخمیر لاکتوز و جذب آن توسط معرف قرمز خنثا[10] و تغییر رنگ معرف به قرمز است. کلنی باکتری‌هایی که قادر به تخمیر لاکتوز نیستند (مانند سالمونلا[11]) بی‌رنگ دیده می‌شوند (شکل ۵۵ــ۲).

شکل ۵۵ــ۲ رشد آنتروباکتریاسه‌ها روی محیط مک‌کانکی آگار وتفریق دو باکتری لاکتوز مثبت و لاکتوز منفی از یکدیگر با ایجاد تغییر رنگ معرف فنل رد

۱ــ Differential
۲ــ Lysine decarboxylase broth
۳ــ Decarboxylation
۴ــ Cadvarin
۵ــ Selective
۶ــ Mac ــ Conkey agar
۷ــ Mannitol salt agar
۸ــ Entrobacteriacae
۹ــ Crystal violet
۱۰ــ Neutral red
۱۱ــ Salmonella

محیط مانیتول سالت آگار حاوی ۷/۵ ٪ کلرید سدیم، قند مانیتول و معرف فنل رد است. غلظت بالای نمک آن عامل انتخابی شدن محیط و رشد نیافتن بسیاری از باکتری‌ها می‌شود. *استافیلوکوک اورئوس*، علاوه بر رشدروی این محیط، می‌تواند با تخمیر مانیتول اسید تولید کند که باعث کاهش pH می‌شود. در pH اسیدی فنل رد از قرمز به زرد تغییر رنگ می‌دهد (شکل ۵۶ــ۲). سایر استافیلوکوک‌ها قادر به تولید اسید نیستند و بر روی این محیط کلنی‌های قرمز تشکیل می دهند.



شکل ۵۶ــ۲ رشد استافیلوکوک‌ها روی محیط مانیتول سالت آگار وتفریق دو گونهٔ استافیلوکوک از یکدیگر با ایجاد تغییر رنگ معرف فنل رد

محیط‌های کشت غنی شده[۱] : این محیط ها معمولاً در مواردی به‌کار می‌روند که تعداد باکتری‌های مورد جست‌وجو در نمونهٔ مورد آزمایش کم باشد یا به‌دلیل وجود باکتری‌های دیگر جدا کردن آن با اشکال مواجه شود. این محیط‌ها امکان رشد برای باکتری‌ها را از نظر pH و مواد غذایی فراهم می‌سازند. مانند محیط کشت سلنیت F براث[۲] که برای جداسازی گونه‌های سالمونلا به‌کار می‌رود. این محیط حاوی سلنیت سدیم (یک نمک صفراوی) است و از رشد باکتری‌های گرم مثبت و بسیاری از باکتری‌های گرم منفی جلوگیری می‌کند. میزان تکثیر سالمونلا در این محیط، طی ۲۴ــ۱۲ ساعت اولیه، از رشد دیگر باکتری‌های روده‌ای سریع‌تر است.

روش تهیهٔ محیط کشت

اولین گام در تهیهٔ محیط کشت برآورد میزان کل محیط کشت مورد نیاز است. این مقدار از تعداد ظروف کشت و حجم مورد نیاز محیط به ازای هر ظرف به‌دست می‌آید. معمولاً برای هر پلیت با اندازهٔ متوسط، ۲۰ میلی‌لیتر محیط در نظر می‌گیرند. مطابق دستور کارخانهٔ سازنده، می‌توان مقدار لازم از محیط کشت را، که به‌صورت پودر است توزین و سپس با مقدار توصیه شدهٔ آب مقطر داخل ارلن، مخلوط کرد. برای توزین پودر با قرار دادن یک تکه کاغذ تمیز بر روی ترازو و کالیبره[۳] (صفر) کردن آن، به آرامی با یک قاشقک تمیز و خشک، پودر را روی کاغذ می‌ریزند و وزن آن را می‌سنجند (شکل ۵۷ــ۲ــ الف). آب مقطر را در یک مزور می‌ریزند و حجم دقیق آن را اندازه‌گیری می‌کنند. برای این‌که پودر به کف ارلن نچسبد و در هنگام حرارت دادن نسوزد، ابتدا مقداری از آب مقطر را در ارلن می‌ریزند و سپس پودر را به آن می‌افزایند. معمولاً حجم ارلن باید دوبرابر حجم محلول محیط کشت باشد تا در زمان حرارت دادن و به جوش آمدن، سرریز نگردد. هم زمان با تکان دادن ارلن، بقیهٔ آب مقطر نیز افزوده می‌شود.

برای انحلال کامل آگار، باید محلول را حرارت داد. به این منظور با قراردادن یک توری شعله پخش‌کن بر روی شعله و یا استفاده از هیتر[۴] (شکل ۵۷ــ۲ــ ب) ارلن حاوی محیط کشت به آرامی حرارت داده می‌شود تا زمانی که محیط بجوشد اما کف نکند و سرریز نشود. بهترین روش برای جلوگیری از ته گرفتن محیط کشت، قرار دادن آن در بن‌ماری جوش است. حرارت

۱ــ Enrichment ۲ــ Selenite F broth ۳ــ Calibrate ۴ــ Hiter

(الف)

(ب)

الف) توزین پودر محیط کشت

ب) حرارت دادن محیط کشت برای حل شدن کامل آگار

شکل ۵۷ــ۲

دادن باید تا شفاف شدن کامل محلول ادامه یابد. سپس دهانه ارلن را با پنبه بپوشانند و پنبه را با فویل آلومینیومی محکم می‌کنند. اگر هدف تهیهٔ محیط کشت مایع باشد به حرارت دادن نیازی نیست. در این صورت، محیط در حجم‌های مورد نظر در لوله‌های آزمایش سترون تقسیم و دربِ لوله‌ها با درپوش یا پنبه مسدود می‌شود. برای جلوگیری از پریدن پنبه‌ها سر لوله‌ها با کاغذ پوشانده می‌شود. سپس ارلن یا لوله‌های حاوی محیط کشت را در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد قرار می‌دهند تا سترون شود (شکل ۵۸ــ۲).

بعضی از محیط‌های کشت را، که به دمای بالا حساس‌اند (مانند محیط S_S آگار[1])، نمی‌توان در اتوکلاو قرار داد. روش سترون‌سازی این قبیل محیط ها توسط کارخانهٔ سازنده بیان شده است.

شکل ۵۸ــ۲ محیط کشت سترون شده

۱ــ Salmonella ــ Shigella agar

روش کشت در محیط مایع

انتقال باکتری از محیطی به محیط دیگر، معمولاً با سوزن کشت با نوک حلقه‌ای (لوپ[1]) یا آنس و یا توسط پی پت صورت می‌گیرد. برای کشت باکتری در محیط مایع :

۱ــ لوپ را در دست راست و طوری روی شعله بگیرید تا سرخ رنگ شود. گرم کردن لوپ باید تدریجی باشد، زیرا دمای زیاد باعث می‌شود باکتری به اطراف و یا به صورت آزمایش کننده پاشیده شود.

۲ــ چند ثانیه صبر کنید تا لوپ سرد شود.

۳ــ محیط حاوی باکتری (لوله یا پلیت) را در دست چپ بگیرید و درپوش لولهٔ آزمایش محتوی باکتری را توسط انگشت کوچک و کف دست بردارید و تا پایان کار آن را در همین حالت داشته باشید (هرگز نباید در پوش را روی میز قرار داد).

۴ــ دهانهٔ لولهٔ آزمایش را مقابل شعله نگاه دارید. برداشت میکروب باید در نزدیکی شعله انجام شود. دهانهٔ لوله را چند بار از روی شعله عبور دهید تا سترون شود، دقت کنید درب لوله را بیش از حد باز نگه ندارید. پس از برداشت، دهانهٔ لولهٔ آزمایش را کمی حرارت دهید و درپوش آن را بگذارید.

۵ــ لولهٔ حاوی محیط کشت را در دست چپ بگیرید و دهانهٔ آن را روی شعله سترون کنید.

۶ــ نوک آنسِ آلوده به باکتری مورد نظر را داخل محیط فرو ببرید و به آرامی تکان دهید تا باکتری‌ها در محیط پخش شوند، در مواردی که باکتری را از محیط کشت جامد برمی‌دارید، با نوک آنس کمی از پرگنه را بردارید و با رعایت مواردی که گفته شد آن را داخل محیط مایع فرو ببرید و به آرامی هم بزنید تا همگن شود.

۷ــ دهانهٔ لوله را مجدداً با شعله سترون کنید و درب آن را بگذارید.

۸ــ پس از پایان کشت، آنس را روی شعله سترون کنید و آن را در جای خود قرار دهید.

۹ــ محیط کشت را در گرم‌خانه قرار دهید.

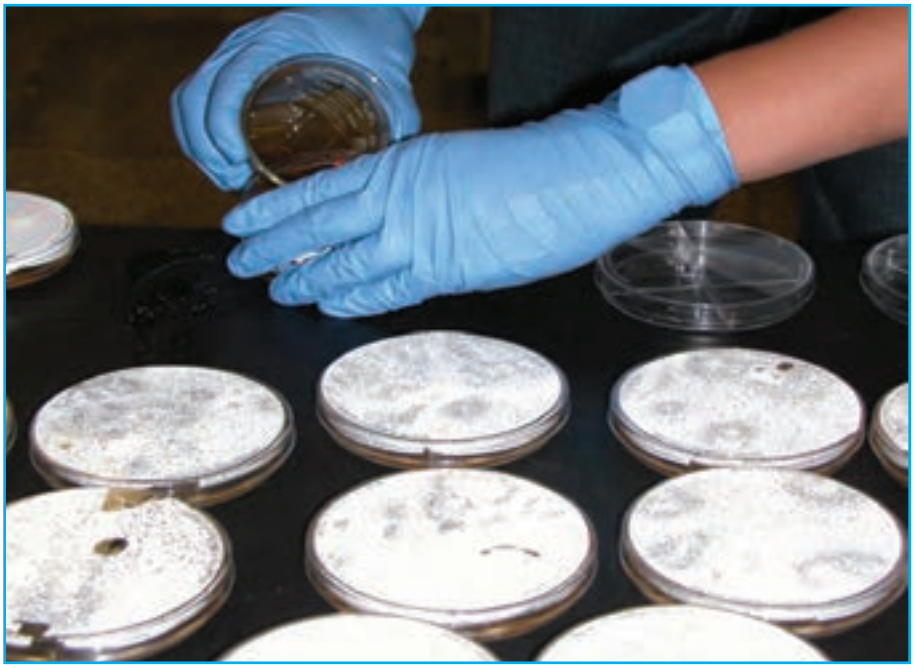
روش تهیهٔ محیط کشت جامد پیش ریخته

متناسب با باکتری‌ها و آزمایش های مورد نظر، می‌توان محیط‌های کشت جامد را در پلیت، لوله یا در ظروف دیگر تهیه کرد.

اگر حجم زیادی از محیط کشت جامد پیش ریخته مورد نیاز است باید از چند ارلن کوچک به جای یک ارلن بزرگ استفاده کرد، این عمل باعث سهولت تقسیم محیط کشت در پلیت‌ها می‌شود. برای توزیع در پلیت باید دمای محیط کشت حدود ۵۰ــ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد باشد (اگر دما بالاتر باشد بخار زیادی روی درب پلیت جمع می‌شود). بهترین راه برای حفظ این دما، استفاده از بن ماری ۵۰درجه است. بهتر است توزیع محیط کشت در پلیت ها زیر هود بیولوژیک انجام شود.

در صورت استفاده از میز آزمایشگاه، قبل از انجام کار باید میز را با ساولون ضد عفونی کرد(شکل ۵۹ــ۲). چنانچه تعداد پلیت‌ها کم باشد، یک شعله روی میز کار کافی است و اگر تعداد پلیت‌ها زیاد باشد آن‌ها را بین دو شعله می‌چینند، به طوری که درب آن‌ها رو به بالا باشد. با رعایت شرایط سترون، مقدار ۱۵ تا ۲۰ میلی لیتر از محیط کشت در پلیت های سترون ریخته می‌شود. پس از ریختن محیط در پلیت‌ها درب آن‌ها را می‌گذارند و روی میز کار قرار می‌دهند. بعد از بسته شدن آگار می‌توان پلیت ها را وارونه کرد تا سرد شوند. پلیت‌های آماده شده را می‌توان درون کیسه پلاستیکی قرار داده و دربِ کیسه را محکم بست و سپس در یخچال نگه‌داری کرد.

۱ــ Loop



شکل ۵۹ــ۲ توزیع محیط کشت در پلیت در روی میز کار آزمایشگاه

کشت بر روی محیط جامد پیش ریخته در پلیت

کشت بر روی محیط جامد پیش ریخته در پلیت به سه صورت انجام می‌شود (شکل ۶۰ــ۲) :

کشت خطی بر روی سطح محیط جامد : با این روش می‌توان باکتری را به طور خطی توسط آنس بر روی سطح محیط جامد کشت داد. به این ترتیب که ابتدا به‌وسیلهٔ یک آنس سترون شده مقداری از پرگنه باکتری را برمی‌دارند و آن را روی سطح محیط به‌صورت خط‌های موازی و در چند جهت می‌کشند.

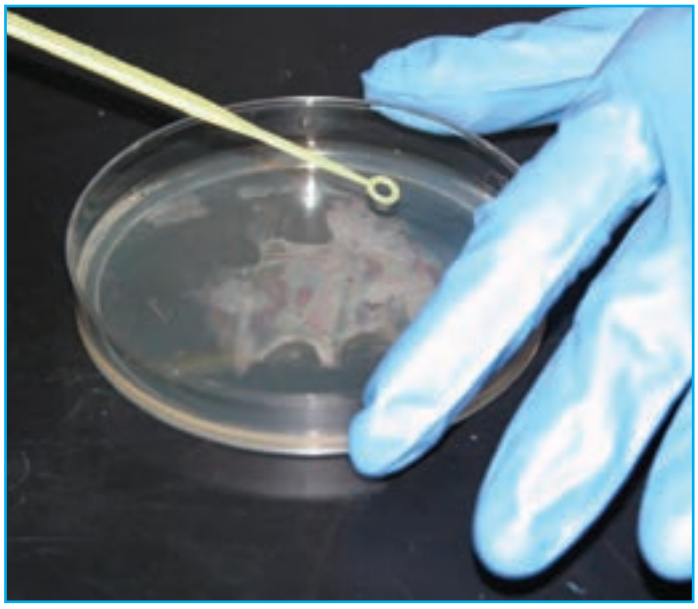
شکل ۶۰ــ۲ کشت پلیت حاوی محیط جامد در زیر هود بیولوژیک

در کشت‌های خطی برای به‌دست آوردن کلنی‌های تک می‌توان پلیت را به چهار قسمت تقسیم کرد. در قسمت اول ابتدا نوک لوپ را که محتوی پرگنهٔ باکتری است به‌صورت خط‌های موازی و تقریباً روی هم می‌کشند و بعد خطوط را در قسمت دوم از انتهای خطوط منطقهٔ اول در جهت دیگر ادامه می‌دهند. در منطقهٔ سوم و چهارم هم به همین صورت عمل می‌کنند. خصوصیت این روش این است که وقتی خطوط موازی روی سطح محیط کشیده می‌شوند از تراکم باکتری‌ها کاسته می‌شود و در منطقهٔ دیگر، وقتی از انتهای خط منطقهٔ قبلی استفاده می‌شود درواقع تراکم بسیار کمتری از باکتری‌ها وجود دارد. به این ترتیب در منطقهٔ آخر می‌توان «پرگنه‌های تک» داشت (شکل ۶۱ــ۲)، که پرگنهٔ خالص نامیده می‌شوند. پس از گرم‌خانه‌گذاری می‌توان پرگنه‌های

رشد یافته بر سطح محیط کشت را مشاهده کرد. برای انجام کشت خطی از مایعات، فقط یک‌بار آنس را داخل لولهٔ محتوی باکتری می‌کنند و آن را روی محیط پیش ریخته قرار می‌دهند. سپس مراحل فوق انجام می‌شود.

کشت در سطح محیط جامد : روش کشت سطحی بیشتر برای مایعات، مانند شیر یا آب مشکوک به آلودگی، کاربرد دارد. در این روش با استفاده از پی‌پت سترون، مقدار مشخص از رقت معینی از باکتری را بر روی سطح محیط جامد می‌ریزند و با کمک آنس یا میلهٔ مخصوص آن را کاملاً در سطح محیط پخش می‌کنند (شکل ۶۲ــ۲). باید توجه داشت که هنگام انجام این کشت، سطح محیط خشک باشد.

شکل ۶۱ــ۲ کشت خطی بر روی محیط جامد و ظهور کلنی‌های تک از باکتری



شکل ۶۲ــ۲ پخش کردن مایع روی سطح محیط کشت

کشت آمیخته[1] : در این روش میزان یک میلی لیتر از کشت مایع باکتری را درکف پلیت سترون می‌ریزند و ۲۰ــ۱۵ میلی لیتر از محیط کشت مورد نظر، که قبلاً سترون شده و حرارت آن به حدود ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد رسیده است، اضافه می‌کنند. مایع و محیط کشت با حرکات دورانی (به صورت عدد ۸ انگلیسی) کاملاً با هم مخلوط می‌شوند. در صورت لزوم باکتری را با لایهٔ نازکی از همان محیط کشت می‌پوشانند که دراین حالت به آن کشت دولایه[2] گفته می‌شود.

۱ــ Pour plate ۲ــ Bilayer culture

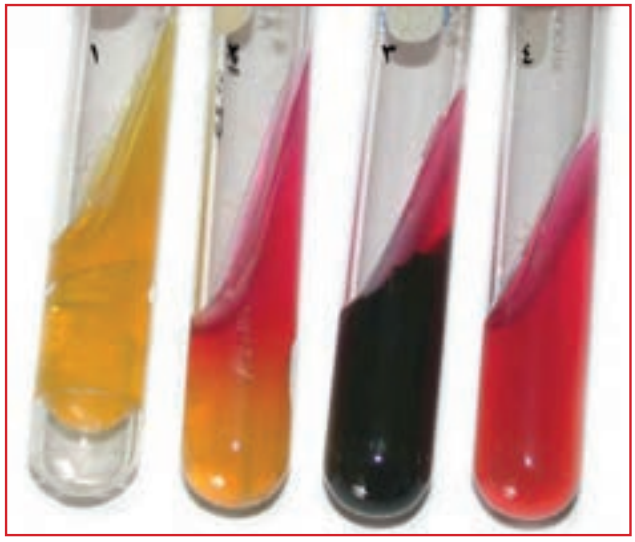
کشت جامد در لوله

کشت عمقی یا عمودی[1] : حدود ۵ تا ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت را در لولهٔ آزمایش می‌ریزند و به‌طور عمودی قرار می‌دهند تا آگار ببندد و محیط کشت سرد شود. سپس توسط سوزن کشت یا آنس نوک تیز سترون شده در کنار شعله، از پرگنهٔ باکتری مقداری را برمی‌دارند و آن را به‌صورت عمودی در مرکز این محیط تا انتها فرو می‌برند. آنس باید بدون هیچ‌گونه تغییر حالتی از همان مسیر خارج شود. ویژگی این‌گونه محیط‌های کشت تقسیم‌بندی باکتری‌ها براساس نیازمندی به اکسیژن و چگونگی رشد آن‌هاست. در انتهای محیط کشت درون لوله، میزان اکسیژن کمتر از قسمت سطحی آن است. چنانچه باکتری هوازی باشد رشد آن در قسمت سطحی بیشتر است و اگر بی‌هوازی باشد رشد آن در قسمت عمقی بیشتر خواهد بود. نمونهٔ کشت عمودی، محیط کشت SIM[2] است. با استفاده از این محیط می‌توان سه خصوصیت مختلف باکتری، یعنی تولید هیدروژن سولفوره، تولید اندول و حرکت را به‌طور هم‌زمان ارزیابی کرد. سیاه شدن محیط نشانهٔ تولید گاز هیدروژن سولفوره توسط باکتری و واکنش آن با سولفات آهن و در نتیجه تشکیل رسوب سیاه رنگ سولفور آهن است. تولید اندول توسط باکتری، با افزودن معرف کواکس[3] و کلروفرم به محیط و ظهور رنگ ارغوانی در سطح کشت قابل ردیابی است (شکل ۶۳ــ۲). باکتری‌های دارای آنزیم تریپتوفاناز[4] قادرند طی سری واکنش‌های شیمیایی، تریپتوفان موجود در پپتون محیط را اکسید کنند و اندول استیک تولید نمایند. نیمه جامد بودن محیط اجازهٔ پخش شدن و در نتیجه کدر نمودن محیط را به باکتری‌های متحرک می‌دهد. باکتری‌های فاقد حرکت فقط مسیر خط کشت را کدر می‌کنند. درصورتی که باکتری کشت شده متحرک باشد و هیدروژن سولفوره نیز تولید کند، رنگ سیاه در محل رشد باکتری پخش می‌شود.

شکل ۶۳ــ۲ تولید هیدروژن سولفوره، تولید اندول و نبودن حرکت در محیط SIM

کشت شیب دار[5] : حدود ۵ میلی لیتر از محیط کشت جامد ذوب شده در لولهٔ آزمایش ریخته می‌شود و پس از سترون کردن، لوله‌ها را به صورت کج به‌گونه‌ای می‌خوابانند که سطح محیط کشت شیب‌دار باشد. باکتری مورد نظر را با سوزن کشت در عمق و سطح محیط یا به وسیلهٔ آنس در سطح شیب‌دار کشت می‌دهند. با آنس نوک تیز با حفظ شرایط سترون از پرگنه باکتری برمی‌دارند و در کنار شعله، نوک آنس را ابتدا به‌صورت عمودی وارد قسمت عمودی محیط کشت می‌کنند و بعد به آرامی آن را از همان مسیر خارج می‌سازند. سپس بدون این‌که نوک آنس از محیط جدا شود آن را به حالت زیگزاک روی سطح شیب‌دار می‌کشند. این روش برای تشخیص سویه‌های باکتری ویژگی فوق‌العاده‌ای است. مثلاً ممکن است درکشت یک نوع باکتری، رنگ قسمت عمودی محیط کشت تغییر کند که نشانهٔ بی‌هوازی یا بی‌هوازی اختیاری بودن باکتری است. اگر باکتری فقط در قسمت شیب‌دار رشد نماید و رنگ آن قسمت تغییر می‌کند، که نشانهٔ هوازی بودن آن است. نمونهٔ آن محیط سه قندی آهن‌دار[6] است. این محیط افتراقی برای شناسایی باسیل‌های گرم منفی براساس توانایی تخمیر قندهای لاکتوز، گلوکز، سوکروز و نیز تولید گاز SH_2 به‌کار می‌رود. در نتیجهٔ احیای تیوسولفات سدیم، SH_2 تولید می‌شود. این گاز با سولفات آمونیوم فریک محیط ترکیب می‌شود و رسوب سیاهی را ایجاد می‌کند. تخمیر قندها با تغییر رنگ معرف فنل رد نشان داده می‌شود (شکل ۶۴ــ۲).

۱ــ Stab culture
۲ــ Sulfide ــ Indol ــ Motility
۳ــ Kovacs
۴ــ Tryptophanase
۵ــ Slant (slope) culture
۶ــ Triple Sugar Iron agar (TSI)



لولهٔ شمارهٔ ۱ : باکتری تخمیرکنندهٔ گلوکز و نیز لاکتوز و سوکروز مقدار زیادی اسید تولید کرده و رنگ محیط را زرد کرده است. تولید گاز همراه با ایجاد ترک و حباب در محیط است.

لولهٔ شمارهٔ ۲ : مواد قلیایی در اثر دکربوکسیلاسیون اکسیداتیو پپتون تولید شده و مقدار کم اسید تولید شده در سطح را خنثا کرده است. بنابراین بالای لوله، قرمز و ته آن زرد است.

لولهٔ شمارهٔ ۳ : باکتری کشت داده شده قادر است گاز SH_2 تولید کند.

لولهٔ شمارهٔ ۴ : تغییر نکردن رنگ محیط نشان‌دهندهٔ تخمیر نشدن قندهاست که در این صورت احتمالاً باکتری آنتروباکتریاسه نیست.

شکل ۶۴ــ۲ واکنش های بیوشیمیایی در محیط سه قندی آهن دار

تعیین تعداد باکتری‌ها

برای تعیین تعداد باکتری روش‌های متعددی وجود دارد، مانند شمارش کلنی و کدورت سنجی. روش کدورت سنجی ازساده‌ترین روش‌های تعیین تعداد باکتری‌ها در محیط مایع حاوی باکتری است. برای سنجش کدورت سوسپانسیون می‌توان کدورت آن راتوسط دستگاه کدورت سنج[۱] اندازه گیری کرد، سپس آن را با جداول مربوطه مقایسه و تعداد باکتری‌ها را اعلام نمود. می‌توان کدورت را با استفاده از لوله‌های کدورت استاندارد (روش مک فارلند[۲]) و به طور چشمی مقایسه کرد. برای این منظور، براساس جدول زیر لوله‌های مک‌فارلند را با مخلوط کردن مقادیر متفاوت از اسید سولفوریک ۱ درصد و کلرید باریم ۱ درصد تهیه کنید. لولهٔ مورد آزمایش را در کنار هر یک از ده لوله استاندارد قرار دهید و میزان کدورت آن‌ها را با هم مقایسه کنید.

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
کلرید باریم (ml)	۰/۱	۰/۲	۰/۳	۰/۴	۰/۵	۰/۶	۰/۷	۰/۸	۰/۹	۱
اسید سولفوریک (ml)	۹/۹	۹/۸	۹/۷	۹/۶	۹/۵	۹/۴	۹/۳	۹/۲	۹/۱	۹
تعدادتقریبی باکتری	۳	۶	۹	۱۲	۱۵	۱۸	۲۱	۲۴	۲۷	۳۰

رنگ‌های مورد استفاده در آزمایشگاه باکتری شناسی

رنگ‌های حیاتی مورد استفاده در آزمایشگاه باکتری شناسی در سه گروه طبقه بندی می‌شوند :

الف) رنگ‌های اسیدی : رنگ‌های اسیدی آنیونی و دارای کروموژن منفی هستند و با قسمت هایی از سلول که دارای بار مثبت‌اند، مانند پروتئین ها، ترکیب می‌شوند. از این رنگ‌ها می‌توان به اسید پیریک، قرمز کنگو و فوشین اسیدی اشاره کرد.

۱ــ Turbidometer

۲ــ Mac Farland nephelometery standard

ب) رنگ‌های بازی : این رنگ‌ها کاتیونی و دارای کروموژن مثبت‌اند و با قسمت هایی از سلول که دارای بار منفی هستند، مانند DNA و RNA، ترکیب می‌شوند. از این رنگ‌ها می‌توان به متیلن بلو، کریستال ویوله، سافرانین و تولوئیدن بلو اشاره کرد.

پ) رنگ‌های خنثا : این رنگ‌ها فاقد بارالکتریکی‌اند و با قسمت هایی از سلول که فاقد بار هستند ترکیب می‌شوند، مانند رنگ سودان سیاه که برای رنگ‌آمیزی دانه‌های چربی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

انواع رنگ‌آمیزی در باکتری‌ها

رنگ‌آمیزی ساده : برای مشاهدهٔ شکل، آرایش و ریخت شناسی سلول باکتری به‌کارمی‌رود. در این نوع رنگ‌آمیزی ترجیحاً از یک رنگ بازی استفاده می‌شود که براساس تبادل بارهای مثبت و منفی و برقراری یک اتصال یونی بین مولکول‌ها عمل می‌کند. چون سطح سلول باکتری به سبب تجزیهٔ گروه‌های کربوکسیل حاصل از تجزیهٔ اسیدهای آمینه و یا به دلیل تجزیهٔ اسیدهای ریبونوکلئیک در سیتوپلاسم، دارای بار منفی است بین بارهای مثبت و منفی جاذبه ایجاد می‌شود و سطح سلول باکتری رنگ می‌گردد.

رنگ‌آمیزی افتراقی : برای مشاهدهٔ ساختمان های مختلف باکتری، افتراق ترکیب دیوارهٔ سلولی، مشاهدهٔ کپسول، اسپور و... در آزمایشگاه به‌کار برده می‌شود.

روش تهیهٔ گستره باکتری روی لام برای انجام رنگ‌آمیزی

برای رنگ‌آمیزی باکتری‌ها، ابتدا باید یک گسترهٔ میکروبی از باکتری مورد آزمایش تهیه کرد. برای این کار :

۱ــ یک لام تمیز بردارید و یک قطره آب مقطر روی آن بریزید.

۲ــ با استفاده از نوک آنس که آن را با شعله سترون کرده‌اید، مقداری از پرگنهٔ باکتری را کنار شعله از روی محیط کشت بردارید و در یک قطره آب روی سطح لام پخش کنید. در صورتی که باکتری درون محیط مایع کشت شده است به قطرهٔ آب نیازی نیست. می‌توانید با آنس نوک گرد، حجمی از باکتری رشد کرده در محیط مایع را بردارید و آن را روی سطح لام پخش کنید.

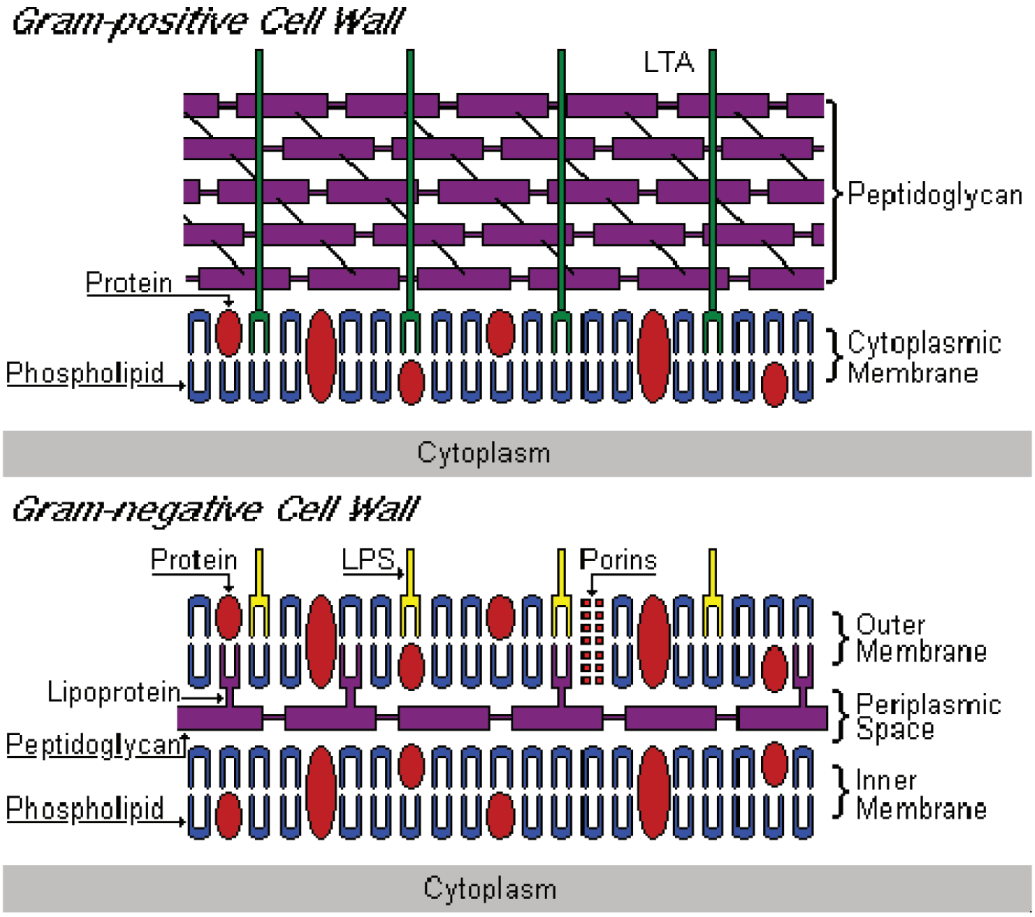
۳ــ صبر کنید تا لام در مجاورت جریان هوا خشک شود.

۴ــ گسترهٔ روی لام را با استفاده از حرارت ثابت کنید. یعنی لام را چند بار از روی حرارت شعله عبور دهید تا گسترهٔ روی لام ثابت گردد و به هنگام رنگ‌آمیزی از روی لام کنده نشود.

تقسیم‌بندی باکتری‌ها براساس رنگ‌آمیزی دیوارهٔ سلولی

باکتری‌ها را می‌توان بر اساس نوع واکنش آن‌ها در روش رنگ‌آمیزی گرم، که مربوط به دیوارهٔ سلولی آن‌هاست، به دو گروه بزرگ تقسیم نمود. باکتری‌هایی که در روش رنگ‌آمیزی گرم به رنگ بنفش در می آیند گرم مثبت و آن‌هایی که رنگ قرمز به خود می گیرند گرم منفی نامیده می‌شوند. این فرآیند به افتخار متخصص بافت شناسی کریستین گرم[1] نام‌گذاری شد. اگرچه هر دو گروه یعنی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارای دیوارهٔ سلولی هستند ولی فرق بین این دو گروه مربوط به خواصی است که در ساختمان این دیواره وجود دارد (شکل ۶۵ــ۲).

۱ــ Christian Gram

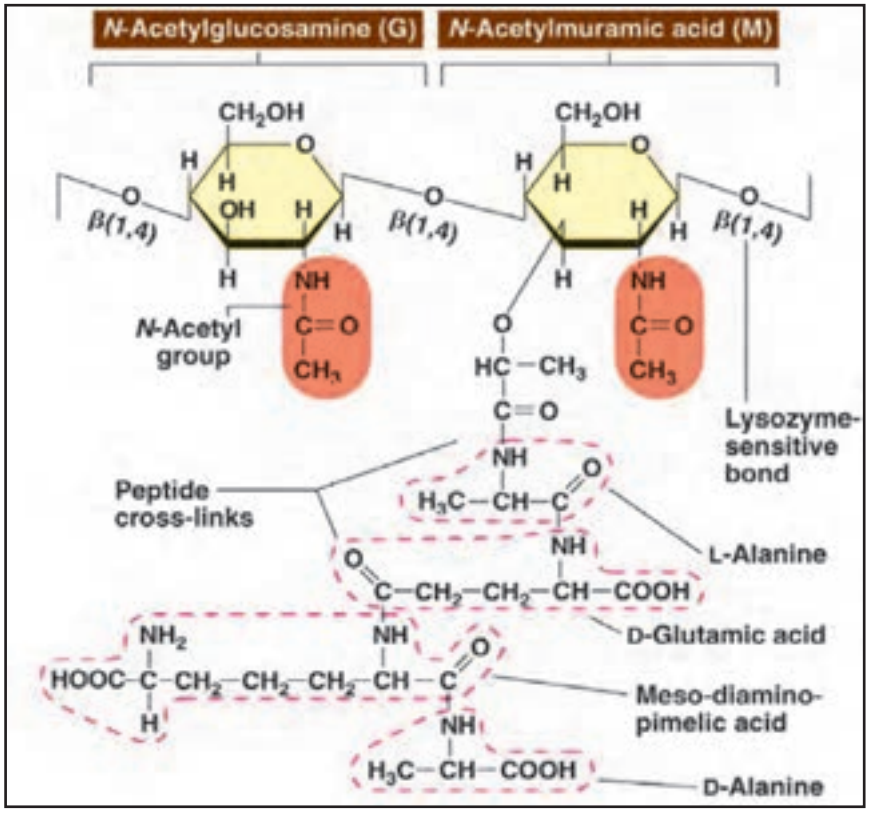


شکل ۶۵ــ۲ نمایش تفاوت دیوارهٔ سلولی در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

باکتری گرم مثبت واجد دیوارهٔ سلولی تک‌لایه و ضخیم با قطری حدود ۲۰ تا ۸۰ نانومتر است. در ساختار دیوارهٔ سلولی این باکتری‌ها هتروپلیمر اسید تیکوییک[۱] وجود دارد که باکتری‌های گرم‌منفی فاقد آن هستند. دیوارهٔ سلولی باکتری‌های گرم مثبت از لایهٔ ضخیمی ازپلی ساکارید پپتیدوگلیکان[۲] تشکیل شده است که در باکتری‌های گرم منفی ضخامت آن به حداقل می‌رسد. در دیوارهٔ سلولی باکتری‌های گرم منفی مقدار چربی بیشتری به‌کار رفته است. خارج دیوارهٔ سلولی باکتری گرم منفی به‌وسیلهٔ غشای خارجی[۳] احاطه می‌شود. بین غشای خارجی و دیوارهٔ سلولی فضایی وجود دارد که فضای پری پلاسمیک[۴] نامیده می‌شود. در فضای پری پلاسمیک، سموم و آنزیم‌های باکتری با غلظت زیادی تجمع یافته‌اند. این سموم و آنزیم ها روی اجزای سلول باکتری تأثیر ندارند و فقط موادی را هضم می‌کنند که برای باکتری مضر است. اساس ساختمان در پپتیدوگلیکان از واحدهای تکرار شونده پلی ساکاریدهای ان‌ــاستیل گلوکزآمین[۵] و ان‌ــ استیل مورامیک اسید[۶] ساخته شده است (شکل ۶۶ــ۲).

در رنگ‌آمیزی به روش گرم، براساس این تفاوت مهم در دیوارهٔ سلولی از دو نوع رنگ استفاده می‌شود. زمانی که رنگ اول یا محلول کریستال ویوله بر روی گسترهٔ باکتری ریخته می‌شود، رنگ با ریبونوکلئات موجود در دیوارهٔ سلولی ترکیب می‌گردد و کمپلکس کریستال ویوله ــ ریبونوکلئات را به‌وجود می آورد. با افزودن محلول ید که ترکیبی فلزی است، ید به کمپلکس رنگ متصل می‌شود و

۱ــ Teicoic acid
۲ــ Poptidoglycan
۳ــ Outer membrane
۴ــ Preplasmic space
۵ــ N ــ Acetylglucosamine
۶ــ N ــ Acetylmuramic acid



شکل ۶۶ــ۲ واحدهای تکرار شوندهٔ پلی ساکاریدی پپتیدوگلیکان

ترکیب رنگی نامحلول کریستال ویوله ــ ید ــ ریبونوکلئات را ایجاد می‌کند. این پیوند در باکتری‌های گرم مثبت بسیار پایدار است و در مرحلهٔ بعد توسط مادهٔ رنگ بر (الکل ــ استن) شکسته نمی‌شود و رنگ بنفش کریستال ویوله را در خود حفظ می‌کند. در نتیجه زیر میکروسکوپ باکتری‌های گرم مثبت به رنگ بنفش دیده می‌شوند. در باکتری‌های گرم منفی این کمپلکس ایجاد نمی‌شود. از طرف دیگر در دیوارهٔ سلولی باکتری‌های گرم منفی مقدار چربی بیشتری به‌کار رفته است. چربی‌ها در الکل استن محلول‌اند و در اثر شست‌شو با حلّال رنگ‌بر، چربی‌ها از دیوارهٔ سلولی خارج می‌گردد و رنگ کریستال ویوله هم از سطح باکتری خارج می‌شود. این امر باعث بی‌رنگ شدن سریع باکتری‌های گرم منفی می‌شود. بنابراین بعد از افزوده شدن رنگ دوم (سافرانین یا فوشین)، این رنگ به دیوارهٔ سلولی باکتری‌های گرم منفی جذب می‌شود (شکل ۶۷ــ۲). در بررسی میکروسکوپی، باکتری‌های گرم منفی به رنگ قرمز دیده می‌شوند.

شکل ۶۷ــ ۲ مراحل شماتیک رنگ‌آمیزی گرم در باکتری

نکات مهم در مراحل رنگ‌آمیزی گرم

۱ــ حرارت بیش از اندازه برای ثابت کردن گستره باعث پاره شدن دیوارهٔ سلولی باکتری می‌شود. بنابراین باکتری گرم مثبت رنگ کریستال ویوله را هنگام رنگ بری از دست می دهد و رنگ ثانویه را جذب می کند. در نتیجه باکتری گرم مثبت، به صورت گرم منفی دیده می‌شود.

۲ــ اگر گستره ضخیم باشد، ممکن است در مرحلهٔ رنگ بری به درستی رنگ نشود و این امر سبب بروز خطا در تشخیص گرم منفی یا گرم مثبت بودن باکتری خواهد شد.

۳ــ رنگ بری بیش از اندازه ممکن است باعث پاره شدن دیوارهٔ باکتری گرم مثبت شود، در نتیجه باکتری با از دست دادن رنگ کریستال ویوله رنگ ثانویه را جذب می کند و به صورت گرم منفی دیده می‌شود.

۴ــ هنگام تهیهٔ گسترهٔ روی لام، سن کشت باکتری نباید از ۲۴ ساعت بیشتر باشد، زیرا در محیط کشت‌های کهنه قابلیت نفوذ دیوارهٔ سلولی باکتری دستخوش تغییراتی می‌شود که خاصیت گرم مثبت بودن را از دست می‌دهد.

۵ــ غلظت درست و تازه بودن رنگ‌ها در کیفیت رنگ‌آمیزی مؤثر است.

خصوصیات باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

۱ــ باکتری‌های گرم مثبت نسبت به پنی سیلین و مواد ضد باکتریایی حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی هستند.

۲ــ گرم منفی سخت رشدترند و نیازهای غذایی پیچیده تری نسبت به باکتری‌های گرم مثبت دارند.

۳ــ باکتری‌های گرم منفی نسبت به مواد اسیدی و قلیایی قوی و آنزیم لیزوزیم حساس‌ترند. بنابراین پاره شدن دیوارهٔ سلولی و متلاشی شدن آن‌ها آسان‌تر از باکتری‌های گرم مثبت انجام می‌شود.

۴ــ خاصیت گرم مثبت بودن یک باکتری در شرایط دشوار محیطی مانند کمبود مواد غذایی درکشت‌های کهنه، از بین می‌رود اما خاصیت گرم منفی بودن تحت هیچ شرایطی از بین نمی‌رود. به هنگام تشخیص باید به این نکته هم توجه داشت که در لام رنگ‌آمیزی شده برای باکتری گرم مثبت، ممکن است باکتری‌های گرم منفی هم دیده شود، اما در لام رنگ شده از کشت خالص یک باکتری گرم‌منفی هرگز باکتری‌های گرم مثبت دیده نمی‌شوند.

۱ـ تفاوت‌های استافیلوکوک‌ها و کوکسی‌ها را توضیح دهید.

کوکسی‌ها باکتری‌های کروی شکل‌اند و هرگاه این باکتری‌ها در کنار هم قرار گیرند و به شکل خوشه دیده شوند به آن‌ها استافیلوکوک گویند.

۲ـ واژه‌های زیر را تعریف کنید.

اسپریل: باکتری‌های مارپیچی شکل را اسپریل گویند.

پروتوپلاست: محتویات داخل سلول را پروتوپلاست گویند.

مرحله رشد لگاریتمی : مرحله‌ای از رشد باکتری‌هاست که باسرعت صورت می‌گیرند و در طی آن باکتری‌ها به سرعت افزایش می‌یابند. این مرحله ۵ تا ۸ ساعت به طول می‌انجامد.

باکتری‌های مزوفیل: باکتری‌هایی است که در درجهٔ حرارت معتدل فعالیت نمایند.

فتواتوتروف: موجوداتی است که دارای رنگدانه‌اند و می‌توانند از انرژی خورشید استفاده نمایند.

۳ـ تمام یون های فلزی مورد نیاز را می‌توان به شکل نمک‌های کاتیونی غیرآلی **و به‌صورت غذا در اختیار میکروارگانیسم ها قرار داد .**

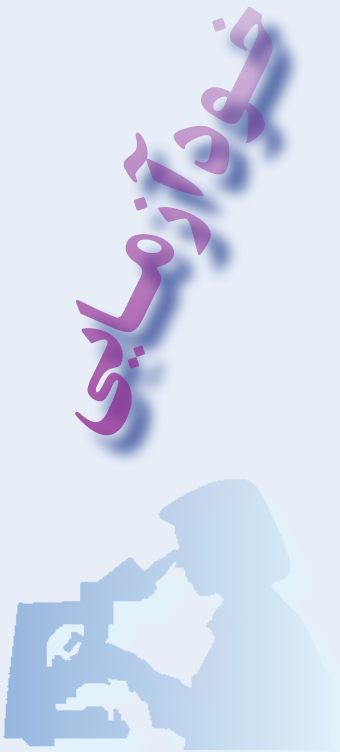
۴ـ تقسیم دوتایی باکتری‌ها را توضیح دهید .

در شرایط مساعد از نظر مواد غذایی، دما و مواد گازی اندازهٔ باکتری افزایش می‌یابد و سپس به دو سلول مشابه تقسیم می‌شود و تا وقتی که شرایط مساعد باشد، این دو سلول می‌توانند مانند سلول والد رشد کنند و با همان سرعت تقسیم شوند. تکثیر باکتری‌ها معمولاً از راه تقسیم دوتایی صورت می‌گیرد وچگونگی افزایش آن‌ها تابع تصاعد هندسی است.

۵ـ مراحل مختلف تشکیل اسپور در باکتری را شرح دهید.

بعضی از باکتری‌ها وقتی در وضعیت کم غذایی یا در شرایط نامطلوب قرار می‌گیرند، پوسته ای سخت به دور خود ترشح می‌کنند و به حالتی درمی آیند که به آن اسپور می‌گویند. اسپورها نسبت به شرایط نامساعد، نظیر دمای بالا، تشعشع و وجود مواد شیمیایی از قبیل ضد عفونی کننده‌ها بسیار مقاوم‌اند.

اسپورها در پاسخ به کمبود مواد غذایی طی فرآیند پیچیدهٔ اسپورزایی شکل می‌گیرند و پس از تکمیل شدن به یک سلول باکتری تبدیل می‌شوند.



۶ـ نحوهٔ انتقال بیماری سی ـ آر ـ دی چگونه است ؟

بیماری از طریق مادران آلوده و تخم مرغ به جنین و در نتیجه جوجه‌ها انتقال می‌یابد. هم‌چنین بیمار از طریق تماس مستقیم طیور آلوده و همین‌طور گردوخاک، هوای آلوده، تهویهٔ نادرست و ترشحات مرغان انتقال می‌یابد.

۷ـ علایم بیماری سل در دام ها را نام ببرید.

در دام های مبتلا به سل سرفه‌های کوتاه و دردناک، لاغری، کاهش اشتها، نشخوارنامنظم، بالارفتن درجهٔ حرارت، تورم غددلنفاوی و گاهی نفخ شکم مشاهده می‌شود.

۸ـ تشعشعات یونیزه کننده را نام ببرید.

شامل اشعهٔ ایکس، بتا و گاما و غیر آن‌هاست.

۹ـ محیط‌های کشت نیمه جامد را شرح دهید.

محیط‌های کشتی هستند مابین مایع و جامد. گرچه آن‌ها شبیه محیط‌های کشت جامدند و مواد سفت کننده ای مانند آگار و ژلاتین را در برمی‌گیرند و به دلیل کم بودن مادهٔ سفت کننده در آن‌ها، حالت ژله‌ای دارند. این محیط‌های کشت، برای تشخیص باکتری‌های خاص متحرک به‌کار می‌روند.