بسم الله الرحمن الرحیم

کتاب معلّم

(راهنمای تدریس)

میکروبیولوژی

رشتهٔ امور دامی

۱۳۹۴

وزارت آموزش و پرورش
سازمان پژوهش و برنامه‌ریزی آموزشی

برنامه‌ریزی محتوا و نظارت بر تألیف : **دفتر تألیف کتاب‌های درسی فنی و حرفه‌ای و کاردانش**
نام کتاب : **کتاب معلّم میکروبیولوژی ـ ۵۵۲/۴**
مؤلفان : **شهلا شاهسوندی ، سعید بدیعی‌اردستانی و نبی‌الله مقیمی**
آماده‌سازی و نظارت بر چاپ و توزیع : **ادارهٔ کلّ چاپ و توزیع کتاب‌های درسی**
تهران : خیابان ایرانشهر شمالی ـ ساختمان شمارهٔ ۴ آموزش و پرورش(شهید موسوی)
تلفن : ۹ـ۸۸۸۳۱۱۶۱ ، دورنگار : ۸۸۳۰۹۲۶۶، کدپستی : ۱۵۸۴۷۴۷۳۵۹،
وب سایت : www.chap.sch.ir
مدیر امور فنی و چاپ : **لیدا نیک‌روش**
صفحه‌آرا : **شهرزاد قنبری**
حروفچین : **زهرا ایمانی‌نصر**
مصحح : **فرشته ارجمند ، شاداب ارشادی**
امور آماده‌سازی خبر : **فاطمه پزشکی**
امور فنی رایانه‌ای : **حمید ثابت‌کلاچاهی، ناهید خیام‌باشی**
ناشر : **شرکت چاپ و نشر کتاب‌های درسی ایران : تهران ـ کیلومتر ۱۷ جادّهٔ مخصوص کرج ـ خیابان ۶۱ (داروپخش)**
تلفن : ۵ـ ۴۴۹۸۵۱۶۱، دورنگار : ۴۴۹۸۵۱۶۰، صندوق پستی : ۱۳۹ـ ۳۷۵۱۵
چاپخانه : **شرکت چاپ و نشر کتاب‌های درسی ایران «سهامی خاص»**
سال انتشار و نوبت چاپ : **چاپ اوّل ۱۳۹۴**

حقّ چاپ محفوظ است.

شابک ۷-۱۹۶۷-۰۵-۹۶۴-۹۷۸ ISBN 978-964-05-1967-7

مقدمه

میکروب‌ها، عمدتاً شامل باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها هستند و طیف وسیعی از موجودات زنده را تشکیل می‌دهند، با تأکید براین تعریف، این کتاب برای هنرجویان رشتهٔ امور دامی در هنرستان‌های کشاورزی تألیف گردیده است. کتاب دارای چهار بخش آزمایشگاه میکروبیولوژی، باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌هاست و کتاب راهنمای آن نیز برهمین اساس نگارش شده است. در کتاب راهنمای معلم سعی بر این بوده که ضمن رفع نقایص کتاب درسی، به توضیح و تشریح بیشتر مضامین آن پرداخته شود و موضوعات کتاب از سطحی بالاتر برای هنرآموزان ارجمند توضیح داده شود و همینطور در اغلب موارد با آوردن عکس‌ها و توضیحات بیشتر ، به اقناع هنرآموزان و رفع معضلات کتاب درسی پرداخته شده است.

سعی شده است کتاب حاضر از پیوستگی و روانی ویژه‌ای برخوردار گردد، به‌طوری که هنرآموز را قادر سازد تا محتوای آن را به آسانی تدریس نماید.

میکروبیولوژی علمی آزمایشگاهی است، از این رو لازم است بخش وسیعی از اوقات آموزش این درس در آزمایشگاه سپری شود. حجم کم کتاب درسی نیز حکایت از این دارد.

راهنمای هنرآموز میکروبیولوژی باید به این نیاز اساسی هنر آموزان؛ یعنی افزایش سطح علمی کتاب و رفع نقایص آن، پاسخی در خور بدهد که امیدواریم در این امر موفق شده باشد. توصیهٔ نویسندگان کتاب به مدرسین و هنرآموزان ارجمند آن است که با مطالعهٔ فصل به فصل کتاب حاضر و پس از رفع نقایص کتاب درسی به تدریس آن اهتمام ورزند.

فهرست

مقدمه

فصل اول: آزمایشگاه میکروبیولوژی ۱

اهداف آموزشی ۲
واژه‌ها و اصطلاحات مهم ۲
رویکردهای آموزشی ۳
پیام‌های اصلی ۳
دانستنی‌های مورد نیاز هنرآموز ۴
فعالیت‌های پیشنهادی ۴
موارد ارزش‌یابی ۴
شرایط مکانی، ساختمانی و ایمنی در آزمایشگاه میکروبیولوژی ۴
دستورالعمل‌های ایمنی و بهداشتی در آزمایشگاه ۶
هودهای ایمنی ۶
مواد شیمیایی خطرناک در آزمایشگاه ۹
معرفی علائم هشدار دهنده بر روی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایشگاه ۱۱
اتوکلاو ۱۲
آون ۱۴
اتو یا اینکوباتور(گرم‌خانه) ۱۵
بن ماری یا حمام آبی ۱۶
جار بی‌هوازی ۱۷
سانتریفوژ ۱۸
میکروسکوپ ۲۰
خودآزمایی ۲۴

فصل دوم: باکتری‌ها ۲۵

اهداف آموزشی ۲۶
واژه‌ها و اصطلاحات مهم ۲۶
رویکردهای آموزشی ۲۹
پیام‌های اصلی ۲۹
دانستنی‌های مورد نیاز هنرآموز ۲۹
فعالیت‌های پیشنهادی ۲۹
موارد ارزش‌یابی ۳۰
یوکاریوت و پروکاریوت ۳۰
باکتری ۳۲
باکتری‌های پست ۳۸
باکتری‌های عالی یا رشته‌ای ۳۹

رشد در باکتری‌ها ۴۱
رشد تصاعدی و زمان تقسیم در باکتری‌ها ۴۲
عوامل مورد نیاز در رشد باکتری‌ها ۴۳
رنگ‌آمیزی اسپور به روش شفر ــ فولتون ۴۷
تولید مثل در باکتری‌ها ۴۸
بیماری‌های مهم باکتریایی ۵۱
رنگ‌آمیزی اسید فست یا زیل نلسن ۵۵
کشت و تکثیر باکتری در آزمایشگاه ۶۰
انواع محیط کشت ۶۴
محیط‌های کشت افتراقی یا جداکننده ۶۵
محیط‌های کشت انتخابی ۶۵
محیط‌های کشت غنی شده ۶۶
روش تهیهٔ محیط کشت ۶۶
روش کشت در محیط مایع ۶۸
روش تهیهٔ محیط کشت جامد پیش ریخته ۶۸
کشت بر روی محیط جامد پیش ریخته در پلیت ۶۹
کشت درسطح محیط جامد ۷۰
کشت آمیخته ۷۰
کشت جامد در لوله ۷۱
کشت عمقی یا عمودی ۷۱
کشت شیب‌دار ۷۱
تعیین تعداد باکتری ۷۲
رنگ‌های مورد استفاده در آزمایشگاه باکتری شناسی ۷۲
انواع رنگ‌آمیزی در باکتری‌ها ۷۳
تقسیم‌بندی باکتری‌ها براساس رنگ‌آمیزی دیوارهٔ سلولی ۷۳
خودآزمایی ۷۷

فصل سوم: ویروس‌ها **۷۹**

اهداف آموزشی ۸۰
واژه‌ها و اصطلاحات مهم ۸۰
رویکردهای آموزشی ۸۱
پیام‌های اصلی ۸۱
دانستنی‌های مورد نیاز هنرآموز ۸۲
فعالیت‌های پیشنهادی ۸۲
ارزش‌یابی ۸۲
ویروس‌ها ۸۲
کشف ویروس‌ها ۸۳
ساختمان شیمیایی ویروس ۸۳

طبقه‌بندی ویروس‌ها ۸۴
چرخهٔ زندگی ویروس‌ها ۸۷
انواع ویروس‌ها ۸۸
ویروس‌های گیاهی ۸۸
ویروس‌های جانوری ۸۸
ویروس‌های باکتریایی ۹۰
کشت ویروس‌ها در آزمایشگاه ۹۳
رشد و تکثیر ویروس درکشت یاخته ۹۳
انواع کشت یاخته در آزمایشگاه ۹۵
رشد و تکثیر ویروس در تخم‌مرغ جنین‌دار ۹۶
رشد و تکثیر ویروس در حیوان‌های آزمایشگاهی ۹۷
رشد و تکثیر باکتریوفاژها در شرایط آزمایشگاه ۹۷
بیماری‌های مهم ویروسی در میزبانان مختلف ۹۷
خودآزمایی ۱۰۳

فصل چهارم: قارچ‌ها **۱۰۴**

اهداف آموزشی ۱۰۵
واژه‌ها و اصطلاحات مهم ۱۰۵
رویکردهای آموزشی ۱۰۶
پیام‌های اصلی ۱۰۶
دانستنی‌های مورد نیاز هنرآموز ۱۰۶
فعالیت‌های پیشنهادی ۱۰۷
ارزش‌یابی ۱۰۷
قارچ‌ها ۱۰۷
ساختار قارچ ۱۰۷
تولید مثل در قارچ‌ها ۱۰۸
رده بندی در قارچ‌ها ۱۱۰
کلنی قارچ‌ها ۱۱۵
بررسی و مطالعهٔ میسلیوم قارچ در آزمایشگاه ۱۱۵
عوامل مؤثر در رشد قارچ‌ها ۱۱۶
کشت قارچ‌ها در آزمایشگاه ۱۱۷
مطالعه و بررسی ریخت‌شناسی کلنی قارچ‌ها ۱۱۷
اشکال ریزبینی قارچ‌ها ۱۱۹
بیماری‌های قارچی طیور ۱۱۹
انواع مایکوتوکسین‌ها ۱۲۱
خودآزمایی ۱۲۴

منابع **۱۲۵**

فصل ۱

آزمایشگاه میکروبیولوژی

اهداف آموزشی

هدف کلی

کاربرد دستگاه‌ها وابزار آزمایشگاه میکروبیولوژی

هدف‌های جزئی

۱ــ شناخت مقررات آزمایشگاه میکروبیولوژی؛

۲ــ کاربرد ابزار و دستگاه‌های آزمایشگاه میکروبیولوژی؛

۳ــ نگه‌داری دستگاه‌ها و رعایت نکات ایمنی مربوط به آن‌ها.

واژه‌ها و اصطلاحات مهم

- اسید
- حلّال
- آئروسل
- سمپلر
- مواد بیولوژیک
- مواد اسیدی
- هودهای ایمنی
- عفونت اکتسابی
- بور
- سترون
- میکرون
- اسید هیدروکلریک
- اسید سیانیدریک
- دیاتیل اتر
- فنل
- کربن دی سولفید
- سیلیس
- کلروفرم
- باز
- معرف
- پی پت
- میکروسکوپ
- لنز چشمی
- مواد قلیایی
- میکروب شناسی
- فیلترهای هپا
- سیلیکات
- لامپ یو.وی (UV)
- آمونیاک
- دی اکسیدکربن
- اتانول
- متانول
- بنزن
- آزبست
- استن
- سیکلوهگزان
- دی اتیل اتر
- اتیل الکل
- تولوئن
- اسید سولفوریک
- اسید هیدروکلریدریک
- آب اکسیژنه
- هیدروکربن
- اعصاب مرکزی
- شناساگر
- استنشاق
- بنزیل کلرید(کلروتولوئن)
- دی‌متیل‌سولفات(متیل سولفات)
- ۱ـ۴ـ دی اکساید (دی اتیلن اکسید)
- ناراحتی کرونر
- اتیل استات (استیک اسید)
- اتیلن دی کلرید (۱و۲ دی کلرواتان)
- اکسید کننده
- ارگانیسم
- دی متیل سولفوکسید
- هگزان
- متلین کلراید
- استالدئید(استیک اسید)
- تری متیل آمین
- ترکیبات کلردار
- استونیتریل(متیل سیانید)
- ترکیبات هالوژنه
- حشره کش
- بنزن (بنزول)
- کلروفرم (تری کلرومتان)
- دی متیل سولفو اکسید (د.ام.اس.او)
- قرنیه
- اپی کلروهیدرین (۱ـ کلرو ۲ـ۳ اپوکسی پروپان)
- کونژوکتیویت
- فرمالین (محلول فرمالدئید)
- اتوکلاو
- اسپور

آب مقطر
تنظیم کنندهٔ حرارت
پنس
کاغذ کرافت
لاستیک سیلیکون
ویال شیشه‌ای
اینکوباتور
سولفات مس
بنزین
دترژنت
بن ماری
جار بی‌هوازی
بی هوازی
هیدروژن
گاز پک

باسیلوس استئاروترموفیلوس
پتری دیش
اسکالپل
پلی پروپیلن
گریس
باسیلوس سوبتیلیس
رشد بهینه
ساولون
تینر
سدیم کلراید
سرد کننده
اکسیژن
نیتروژن
دی اکسید کربن
دانه‌های پالادیوم

کاتالیزور
سانتریفوژ
نیروی فراگریز
عدسی چشمی
ایمرسیون
چشمی رامزدن
لامپ هالوژن
لامپ تنگستن
کندانسور
میکروسکوپ الکترونی
حد تفکیک
میکرومتر
تنگستن
آند
چگالی

متیلن بلو
نیروی گریز از مرکز
بوکت
عدسی شیئی
چشمی هویگنس
دیافراگم
لامپ جیوه
لامپ گزنون
وضوح
شار الکترون
تخلیص
انگستروم
کاتد
تفنگ الکترونی
گریس

رویکردهای آموزشی

باتوجه به درس میکروبیولوژی هنرجویان، در هر فصل در آزمایشگاه اقدام به انجام کار عملی می‌کنند. فصل اول، به‌منظور آشنایی با دستگاه‌ها و ابزار آزمایشگاهی مفهوم آن‌ها به‌طورکامل برای هنرجویان بیان شود.

پیام‌های اصلی

دانشی و مهارتی

هنرجو:

- با مقررات آزمایشگاه میکروبیولوژی آشنا می‌شود و آن‌ها را به کار می‌بندد.
- با وسایل و تجهیزات مورد استفاده در آزمایشگاه میکروبیولوژی آشنا می‌شود.
- از وسایل و تجهیزاتی که در آزمایشگاه میکروبیولوژی موجود است به درستی استفاده می‌کند.
- با فناوری و وسایل جدید آشنا می‌شود.

نگرشی

هنرجو:

- دربارهٔ میکروب‌ها کنجکاوی می‌کند.
- کارهای علمی دانشمندان را ارج می‌نهد.
- به اهمیت رعایت مقررات در حفظ سلامتی خود پی می‌برد.
- در برابر حفظ وسایل آزمایشگاهی احساس مسئولیت می‌کند.

دانستنی‌های مورد نیاز هنرآموز

- مطالعهٔ فصل اول، (بخش راهنمای هنرآموز)او را با نکات بسیار ضروری از شروع، ادامه و خاتمهٔ کلاس درس آشنا می‌کند.
- هنرآموز باید نکات ایمنی کار با دستگاه‌ها و مواد آزمایشگاهی را به طور کامل بداند.
- هنرآموز باید چگونگی عمل و طرز کار دستگاه‌ها را بداند.

فعالیت‌های پیشنهادی

- هنرآموز می‌تواند با استفاده از اسلاید و پاورپوینت[1] هنرجویان را با نکات ایمنی، زیست محیطی و بهداشتی آشنا کند.
- هنرآموز می‌تواند هنرجویان را در گروه‌های مختلف، برای تهیهٔ پوسترهای نکات ایمنی، زیست محیطی و بهداشتی در آزمایشگاه تشویق نماید.
- هنرآموز می‌تواند هنرجویان را برای تهیهٔ لیستی از نکات ایمنی و کار با دستگاه‌های مختلف آزمایشگاه میکروبیولوژی برای نصب در محل دستگاه تشویق نماید.

موارد ارزش‌یابی

- هنرآموز می‌تواند از طریق امتحان مکتوب یا شفاهی از هنرجویان در مورد نکات ایمنی، زیست ــ محیطی و بهداشتی پرسش نماید.
- هنرآموز می‌تواند با تهیهٔ علامت‌های اخطار و نصب آن‌ها بر روی مواد مورد استفاده در آزمایشگاه، در خصوص این علائم از هنرجویان پرسش نماید.
- هنرآموز می‌تواند دربارهٔ کار با میکروسکوپ، سترون‌کردن وسایل و محیط‌های کشت آزمایشگاهی، کار با بن‌ماری و اینکوباتور از هنرجو آزمون عملی بگیرد.

شرایط مکانی، ساختمانی و ایمنی در آزمایشگاه میکروبیولوژی

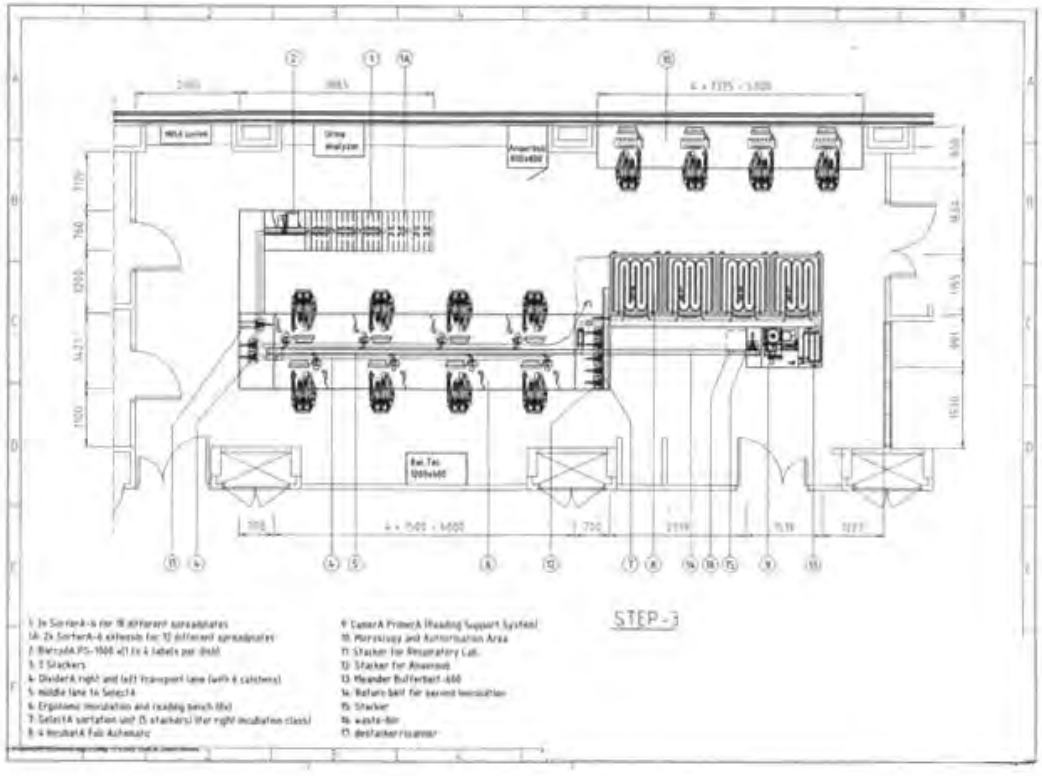
قبل از هرگونه طراحی باید عملکرد و وسعت‌کاری آزمایشگاه، تعداد و اندازهٔ تجهیزات و نیز نیروی کاری مورد نیاز را مدنظر قرار داد. باید توجه کرد که بخش‌های اداری کاملاً از بخش‌های فنی آزمایشگاه مجزا باشد و افراد برای دسترسی به آن‌ها، مجبور نباشند که از بخش‌های دیگر عبور نمایند. فضای آبدارخانه و رخت‌کن نیز باید با فاصلهٔ مناسب از قسمت‌های فنی آزمایشگاه قرار داشته باشد.

در یک آزمایشگاه باید :

- الزامات و قوانین کشور در موقع احداث بنا از جهت وقوع بلایای طبیعی مثل زلزله، آتش‌سوزی و غیره رعایت شود.
- سقف‌ها، دیوارها و کف آزمایشگاه باید صاف و در مقابل مایعات، موادشیمیایی و سایر مواد ضدعفونی کننده‌ای که معمولاً در آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند مقاوم باشند.
- سطوح کاری باید به اسیدها، بازها، حلّال‌ها، و سایرمواد شیمیایی، همچنین به مایعات، درجهٔ حرارت کم و زیاد، ضربه و مواد ضدعفونی‌کننده مقاوم و جنس آن‌ها به گونه‌ای باشد که سنگینی وسایل را تحمل کنند.
- دست‌شویی در همهٔ اتاق‌ها و ترجیحاً در کنار دربِ خروجی نصب گردد و بهتر است که شیرهای آب با حرکت آرنج، فشارپا و غیره باز شوند.

۱ــ Power point

- سرویس‌های بهداشتی به تعداد کافی و به طور جداگانه برای کارکنان زن و مرد وجود داشته باشد.
- منبع نیروی برق مستقل برای پشتیبانی از وسایل و تجهیزات در زمان قطع برق وجود داشته باشد.
- سیستم سیم کشی داخلی دارای هادی متصل به زمین باشد.
- منبع ذخیرهٔ آب با کیفیت مناسب برای شست‌وشوی وسایل، دست و غیره باید در نظر گرفته شود.
- فضای مناسبی به صورت انبار برای ذخیره نمودن مواد، معرف‌ها و وسایل باید در نظر گرفته شود.
- کل ساختمان از سیستم امنیتی مناسبی برخوردار باشد.
- تمام مناطق آزمایشگاه باید از سیستم روشنایی مناسب و کافی(نور طبیعی یا مصنوعی) برخوردار باشد تا شرایط کارکرد ایمن فراهم شود.
- در بخش‌هایی که مواد سوزاننده، خورنده یا دیگر موادشیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرند، باید جایگاه ثابتی را برای شست‌وشوی چشم درنظر گرفت.
- در مکان‌هایی که با مواد آلوده کارمی‌شود و احتمال ایجاد آئروسل[1] وجود دارد، هودهای ایمنی نصب شود. تهویهٔ مکانیکی یا طبیعی هوا در اتاق‌های آزمایشگاه باید به نحو مطلوبی انجام پذیرد.
- محیط کاری از درجهٔ حرارت مناسب و مطلوبی برخوردار باشد.
- در آزمایشگاه مکانی برای ارائهٔ کمک‌های اولیه در نظر گرفته شود.
- مکان مناسبی برای نگه‌داری پسماندها قبل از دفع در نظر گرفته شود.
- در آزمایشگاه دوش‌های اضطراری، مخصوصاً در بخش‌هایی که از مواد شیمیایی سوزاننده استفاده می‌شود، نصب شود (تعداد دوش‌ها بستگی به وسعت کاری و فضای آزمایشگاه دارد).



شکل ۱ــ ۱ــ طرح ساختمانی یک آزمایشگاه

۱ــ ذرات معلق آلوده در هوا

دستورالعمل‌های ایمنی و بهداشتی در آزمایشگاه

محافظت شخصی : استفاده از دهان برای کشیدن مواد مختلف به‌وسیلهٔ پی‌پت اکیداً ممنوع است. امروزه وسایل مختلفی برای برداشتن نمونه مانند سمپلر، پی‌پت‌های اتوماتیک و نظایر آن‌ها وجود دارد که باید در آزمایشگاه‌ها و مراکز پزشکی مورد استفاده قرار گیرند. به‌خصوص استفاده از پی‌پت دهانی برای کشیدن مواد اسیدی، بازها و مواد سوزاننده خطرناک است.

کشیدن سیگار : کشیدن سیگار درمحل کار ممنوع است، زیرا سیگار روشن یک منبع احتراق برای مواد قابل اشتعال است. دود سیگار یا پیپ در کاربرد بعضی از وسایل اشکالات فراوانی را به‌وجود می‌آورد. پراکنده شدن خاکستر سیگار روی وسایل الکترونیک و میکروسکوپ تأثیر بسیار سوئی دارد. برداشتن سیگار از روی میز کار و گذاشتن آن بر روی لب‌ها راهی برای آلوده شدن به میکروب‌ها و مواد سمی است.

خوردن و آشامیدن : خوردن و آشامیدن در منطقهٔ کار ممنوع است. نمونه‌های آزمایشی مانند خون، ادرار و مدفوع، خلط و غیره محتوی تعداد زیادی میکروب‌های بیماری‌زاست که بر روی میزهای آزمایشگاهی و یا در یخچال قرار داده می‌شوند. گذاشتن غذا و آشامیدنی در یخچالی که نمونه‌های آزمایشگاهی، مواد بیولوژیک و مواد شیمیایی در آن گذاشته می‌شود ممنوع است.

شست‌وشوی دست : طی کار روزانه، دست‌ها باید به‌طور مرتب بعد از خارج کردن دستکش از دست، قبل از ترک آزمایشگاه و قبل از خوردن غذا شسته شوند.

روپوش و لباس محافظ : لباس معمول برای کارمندان آزمایشگاه روپوش یا کت سفیدی است که بر روی لباس معمولی پوشیده می‌شود. کفش باید راحت و با ته لاستیکی باشد و سطح پا را بپوشاند. در هنگام کار از پوشیدن کفش‌های جلوباز و یا سوراخ‌دار باید اجتناب شود. لباس‌های محافظ مانند ماسک، دستکش، عینک‌های محافظ و کفش‌های یک بار مصرف باید در اختیار کارکنان قرار گیرد تا در مواقع ضروری پوشیده شود.

لنز چشمی : بعضی از لنزها به‌خصوص نوع نرم آن جاذب انواع حلّال‌ها هستند. در افرادی که از لنز استفاده می‌کنند پاشیده‌شدن مواد اسیدی و قلیایی و اسپری‌کردن بعضی از مواد ممکن است باعث بروز حوادث ناگواری شود. این افراد در صورت مواجه شدن با خطر تا بخواهند لنز را از چشم خود خارج کنند ممکن است به چشم آسیب برسد. بنابراین در آزمایشگاه به جای لنز بهتر است از عینک استفاده شود.

راه خروج و کریدورها : راه خروج و کریدورها نباید به هیچ وجه با وسایل مختلف مسدود شود. میزها، صندلی‌ها و سطل‌های زباله باید طوری قرار گیرند که سبب بسته شدن راه‌های خروجی نشوند. درب‌های آزمایشگاه و سایر بخش‌ها نباید مسدود و یا قفل باشند.

هودهای ایمنی

هودهای ایمنی، مهم‌ترین وسیله در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی سطوح دوم و سوم[1] است و تمامی فعالیت‌های میکروب شناسی و یا سایر آزمایش‌ها باید در داخل هودهای ایمنی انجام شوند. هود ایمنی به‌صورت یک سد محافظ اولیه در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی به‌کار رفته و برای حفاظت کارکنان از عفونت‌های اکتسابی طراحی شده است. این هودها در انتهای اتاق اصلی آزمایشگاه، که مکانی با کمترین رفت و آمد است، نصب می‌شوند تا اختلالی در جریان هوای هود ایجاد نشود. در هود، ذرات هوا هنگام ورود وخروج از داخل

۱ــ سطح یکم ایمنی زیستی ــ آزمایشگاه‌های اولیه (آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و آموزش پایه)، سطح دوم ایمنی زیستی ــ آزمایشگاه‌های اولیه (آزمایشگاه‌های خدماتی اولیه بهداشتی ــ خدمات تشخیصی، تحقیقاتی)، سطح سوم ایمنی زیستی ــ آزمایشگاه با محدودیت (آزمایشگاه‌های خدمات تشخیصی ویژه، تحقیقاتی)، سطح چهارم ایمنی زیستی ــ آزمایشگاه با بالاترین محدودیت (آزمایشگاه‌هایی که با عوامل خطرناک بیماری‌زا سروکار دارند.)

فیلترهای هپا[1] عبور می‌کنند. فیلترهای هپا از صفحاتی از جنس الیاف بورو سیلیکات ساخته شده که برای بالابردن سطح تماس در آن‌ها، به‌طور پلیسه مانندی تاخورده‌اند. این فیلترها می‌توانند ۹۵ درصد از ذرات با قطر ≤۰/۳ میکرون را جذب کنند. براساس توصیهٔ شرکت سازنده، فیلترهای مورد استفاده باید به‌طور منظم تعویض شوند. هود زیست ایمنی در سه دسته و کلاس I، II و III موجود است. زمانی که هودهای زیست ایمنی و تکنیک‌های استاندارد آزمایشگاه میکروب شناسی با هم به‌کار روند، هر یک از هودهای زیست ایمنی سطوح مختلفی از ایمنی را فراهم خواهند کرد.

نکات ضروری در کار با هودهای ایمنی

ـ هودهای ایمنی باید توسط شرکت‌های فروشندهٔ معتبر، از نظر وضعیت مناسب سیستم و کارایی درست هود، تأیید شده باشد. این شرکت‌ها باید گواهی مهارت و خبرگی لازم از مؤسسات مرتبط داشته باشند.

ـ تمام هودهایی که برای محصولات و بافت‌های انسانی یا عوامل عفونی یا عوامل بالقوه عفونی استفاده می‌شوند، باید به‌طور سالانه از نظر صحت کارکرد تأیید شوند.

ـ هودهایی که برای مواد و عوامل غیرعفونی استفاده می‌شوند، حداقل باید هر دو سال یک‌بار از نظر صحت کارکرد تأیید شوند.

ـ تمامی آزمایش‌ها باید در داخل هود ایمنی انجام شود.

ـ قبل از شروع کار، باید هواکش هود مدتی کار کند.

ـ قبل از شروع کار، باید وسایل در کابین هود گذاشته شوند.

ـ حداقل فاصله بین کابین و شخص باید ۱۵ سانتی‌متر باشد.

ـ در پایان کار دست‌ها را نباید بی‌درنگ از کابین خارج کرد. بعد از اتمام کار، باید هود ایمنی به مدت چند دقیقه روشن بماند تا تمامی آلودگی‌های احتمالی موجود از کابین خارج شوند.

ـ قبل از خارج کردن وسایل از هود، باید سطوح خارجی آن‌ها با الکل ۷۰ ٪ یا مواد مناسب، ضدعفونی شوند.

ـ درصورت ریخته شدن مواد آلودهٔ داخل هود، سطح آن باید با الکل ۷۰ ٪ یا مواد مناسب دیگر، ضدعفونی شود.

ـ هیچ وسیله‌ای نباید روی قسمت بالای هود گذاشته شود. فیلتر هپا ممکن است خراب شود و در تنظیم جریان هوا اختلال ایجاد کند.

ـ بعد از اتمام کار برای سترون کردن هود، باید لامپ (UV)[2] حداقل مدت نیم ساعت روشن شود.

ـ قبل از تعویض فیلترهای هود ایمنی، باید داخل آن ضدعفونی شود.

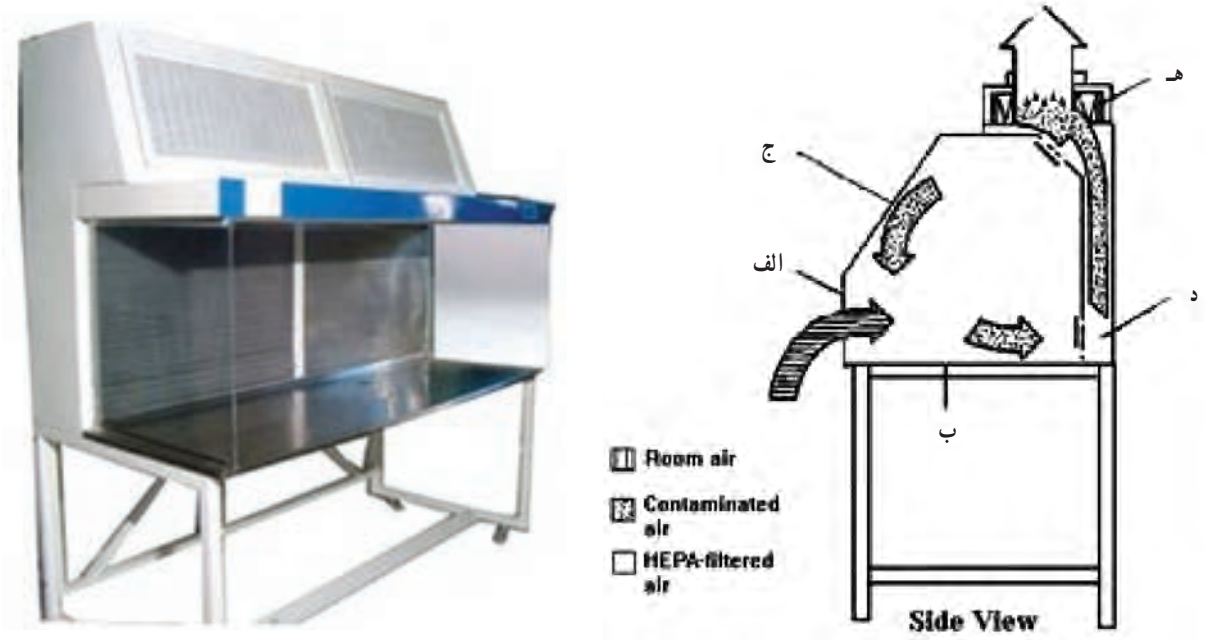
هودهای ایمنی کلاس I : از هودهای ایمنی کلاس I، هم برای محافظت افراد و هم محیط آزمایشگاه استفاده می‌شود. اما برای محافظت مواد و محصولات از قبیل آنچه برای کارهای سترون کشت بافت استفاده می‌شود، مناسب نیست و برای کارکردن با عواملی که خطر کم یا متوسط دارند مناسب است. در هودهای ایمنی کلاس I، ذرات هوای اتاق آزمایشگاه وارد هود می‌شوند و از فیلترهای هپا عبور می‌کنند(شکل ۲ـ۱). سرعت حرکت هوای داخل هود حدود ۰/۷ تا ۱ متر بر ثانیه است. هوای فیلتر شده از ساختمان آزمایشگاه خارج می‌شود. گرچه این نوع هودها، موجب حفاظت کارکنان آزمایشگاهی می‌شوند ولی در حین کار از آلوده‌شدن نمونه‌ها و وسایل داخل هود جلوگیری نمی‌کنند.

هودهای ایمنی کلاس II : هودهای ایمنی کلاس II برای محافظت افراد، محیط، مواد و محصولات طراحی شده‌اند. تفاوت اصلی هودهای کلاس I و کلاسII، تصفیهٔ جریان هوا توسط فیلترهای هپاست، که از قسمت جلویی سطح کار وارد هود کلاسII می‌شود. در هودهای ایمنی کلاس II، ذرات هوای اتاق آزمایشگاه وارد هود می‌شود، از داخل فیلتر هپا عبور می‌کند و داخل هود

۱ـ Particular Air High Efficiency

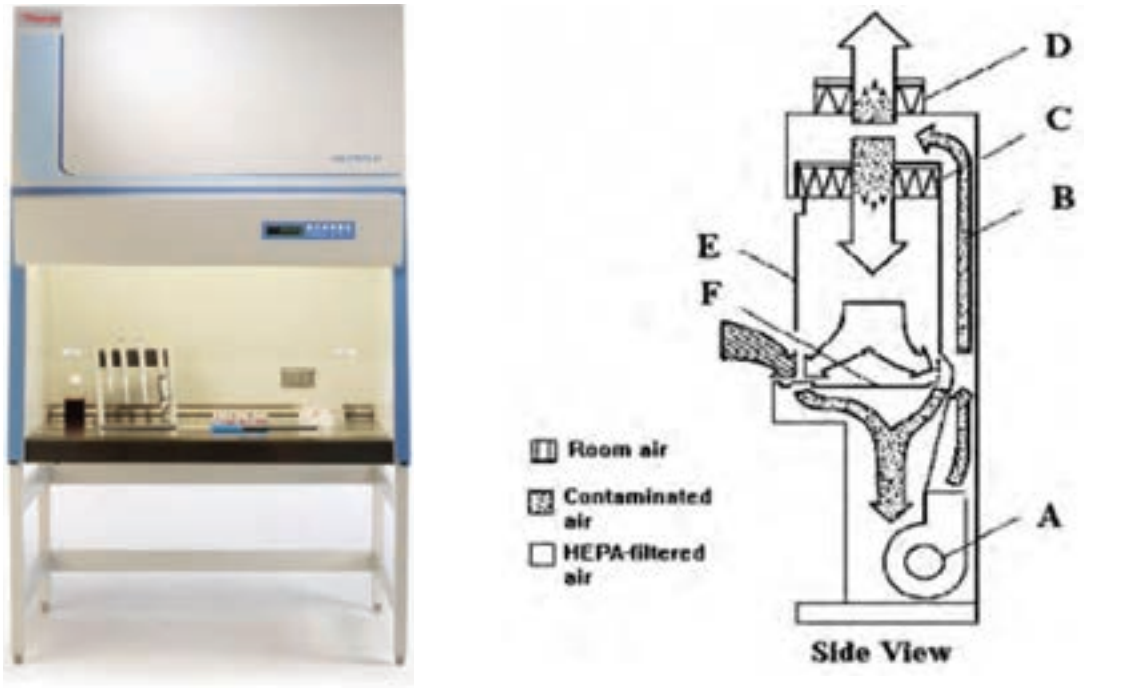
۲ـ Ultraviolaet

در چرخش است (شکل ۳ــ۱). درنتیجه این نوع هود، علاوه بر حفاظت از کارکنان آزمایشگاهی، امکان آلوده شدن نمونه‌ها و وسایل درون هود را به حداقل می‌رساند. حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد از هوای تصفیه شده به خارج از ساختمان انتقال می‌یابد.



الف) دریچه جلویی ب) سطح کار ج) صفحهٔ محافظ د) دریچهٔ خروج هوا هـ) فیلتر هپا

شکل ۲ــ۱ــ شکل و اجزای هود زیست ایمنی کلاس I

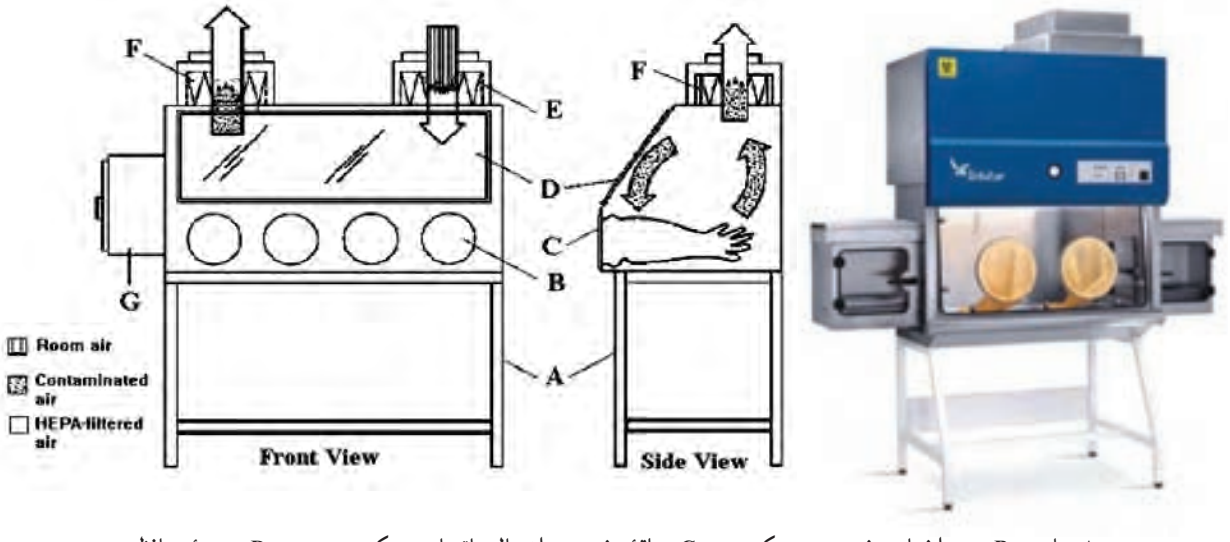


الف) مکندهٔ هوا ب) فضای پشتی انتقال هوا ج) محل فیلتر هپا د) دریچهٔ خروج گاز هـ) شیشهٔ محافظ

شکل۳ــ۱ــ شکل و اجزای هود زیست ایمنی کلاس II

در هنگام کار با هود ایمنی کلاسII باید قسمت‌های مشبک جلو و عقب هود کاملاً آزاد باشد و با وسایل اضافی و در هم برهم مسدود نشود، زیرا این کار سبب اختلال یا قطع جریان هوا می‌شود و می‌تواند برای افراد، محیط و مواد و محصولات خطرساز باشد. از انجام حرکات شدید و ناگهانی در داخل و خارج هود اجتناب کنید. استفاده از شعلهٔ گاز در هود ایمنی ممنوع است، گرما سبب اختلال در جریان هوا می‌شود و شعله می‌تواند به فیلتر هپا آسیب برساند. همچنین گاز فضا را پرمی‌کند و بازگشت مجدد هوای فیلتر شده به هود عملاً کم می‌شود.

هود ایمنی کلاس III : این هودها در موقع کار با عوامل فوق‌العاده خطرناک زیستی و زمانی، که ایجاد محدودیت مطلق مورد نیاز است، استفاده می‌شود. این هود طوری طراحی شده است که بالاترین سطح محافظت را برای پرسنل، محیط کار و مواد تأمین می‌کند. فیلتر هپا اساسی‌ترین قسمت این هود ایمنی است (شکل ۴ــ۱) و ۹۹/۹۷ درصد تمام ذراتی را که اندازهٔ آن‌ها ۰/۳ میکرون باشد جدا می‌کند. در مورد ذراتی که اندازهٔ آن‌ها از ۰/۳ میکرون بیشتر باشد کارایی فیلتر به مراتب بیشتر است. به منظور هدایت جریان هوا در فیلتر، صفحات فیلترهای هپا توسط تیغه‌هایی از جنس آلومینیوم ازهمدیگر جدا شده‌اند.



A : پایه B : سوراخ‌های مخصوص دستکش C : حلقهٔ مخصوص اتصال ساق‌های دستکش به هود D : شیشهٔ محافظ

E : فیلتر هپا دریچهٔ ورودی هوا E : فیلتر هپا دریچهٔ خروجی هوا G : اتوکلاو

شکل ۴ــ۱ــ شکل و اجزای هود زیست ایمنی کلاس III

مواد شیمیایی خطرناک در آزمایشگاه

در آزمایشگاه مواد شیمیایی به سه حالت جامد، گاز یا مایع موجود است. هر کدام از حالات فوق بر فیزیولوژی موجود زنده آثار مختلفی دارند.

- مواد شیمیایی به حالت گازی دارای بخار و یا ذرات معلقی هستند که از راه تنفس وارد ریه‌ها می‌شوند و آثار فیزیولوژیک خود را به صورت زیر ظاهر می‌کنند :

۱ــ مواد التهاب‌آور و محرک، مانند آمونیاک و اسید هیدروکلریک؛

۲ــ مواد خفگی‌آور ساده، مانند دی‌اکسیدکربن و اسید سیانیدریک؛

۳ــ مواد بیهوش‌کننده و مخدر، مانند اتانول، دیاتیل اتر؛

۴ــ سموم سیستمیک، مانند متانول، فنل‌ها، بنزن و کربن دی سولفید؛

۵ــ ذرات معلق مانند آزبست و سیلیس.

- مواد شیمیایی مایع نیز فیزیولوژی موجود زنده را به اَشکال زیر تحت تأثیر قرار می‌دهند :

۱ــ حلّال‌های آلی نظیر استن، کلروفرم، سیکلوهگزان، دی اتیل اتر، دی متیل سولفوکسید، اتیل الکل، هگزان، متانول، تولوئن، متلین کلراید و غیره که علاوه بر اشتعال‌پذیری آثار مسموم کنندگی دارند. برخی نیز خاصیت سرطان‌زایی و ناباورکنندگی را نشان می‌دهند.

۲ــ معرف‌های معدنی و محلول مانند اسید سولفوریک، اسید هیدروکلریدریک، آمونیاک، آب اکسیژنه و غیره ترکیباتی هستند که همگی سوزاننده و برخی خورنده‌اند و هر یک اثر فیزیولوژیکی متفاوتی دارند.

- مواد شیمیایی جامد نیز می‌توانند باعث مسمومیت یا آثار دیگر شوند.

واکنش گرها

اکثر حلّال‌ها دارای حد مجاز مواجههٔ شغلی هستند و صدمات شیمیایی ایجاد می‌کنند. صدمات شیمیایی ممکن است داخلی یا خارجی باشد. صدمات خارجی شامل مواجههٔ پوستی با مواد خورنده یا سوزش آور و صدمات داخلی شامل تأثیرات سمی یا خورندهٔ مواد جذب شده توسط بدن است. حلّال‌های مورد استفاده در آزمایشگاه به چند گروه الکل‌ها، ترکیبات کلردار و هیدروکربن‌ها تقسیم می‌شوند. مواجهه با این گروه از ترکیبات، دارای تأثیرات بهداشتی متفاوتی است. الکل‌ها عموماً دارای تأثیر سمی درونی و قابلیت تحریک مخاط و خواب آلودگی هستند. هیدروکربن‌های کلردار باعث رخوت و بی‌هوشی می‌شوند و به سیستم اعصاب مرکزی و کبد آسیب وارد می‌کنند. هیدروکربن‌ها پس از مواجههٔ طولانی با پوست، تحریک پوستی ایجاد می‌کنند.

واکنش‌گرهای آلی به چهار گروه دسته‌بندی می‌شوند : اسیدها، ترکیبات هالوژنه، معرف‌ها و شناساگرها و حشره‌کش‌ها. بسیاری از اسیدهای معدنی و آلی حد مجاز مواجههٔ شغلی دارند. این حدود آستانهٔ مجاز، نشان‌دهندهٔ بیشترین غلظت هوایی است که کارکنان می‌توانند با آن مواجه شوند. بخار این اسیدها شدیداً برای چشم و سیستم تنفسی تحریک کننده است. اسیدهای مایع یا جامد سریعاً می‌توانند باعث سوختگی شدید پوست و چشم شوند. زمانی‌که اسیدها برای افزایش میزان حل شدن مواد آلی گرم می‌شوند خطر بیشتری دارند، چون واکنش آن‌ها بر روی پوست بسیار سریع‌تر است. شناسایی خطرات احتمالی مواد شیمیایی، کارکنان آزمایشگاه‌ها را آگاه می‌کند که هنگام استفاده از آن‌ها برای حفظ سلامتی خود و جلوگیری از بروز خطرات احتمالی نهایت مراقبت لازم را بنمایند. بنابراین، به اختصار به بعضی از مواد شیمیایی که ممکن است خطرآفرین باشند پرداخته می‌شود :

- **استالدئید (استیک الدئید)** : سوزش شدید موضعی، سوختن شدید، استنشاق طولانی آن مانند مواد مخدر اثر می‌گذارد.
- **استونیتریل (متیل سیانید)** : در صورتی که بلعیده شود ممکن است کشنده باشد. از طریق پوست ممکن است جذب شود و در صورت تماس با اسیدها ممکن است گازهای سمی تولید کند.
- **بنزن (بنزول)** : سرطان‌زاست و ایجاد اریتم و سوختگی می‌کند. در اثر تماس با پوست، جذب می‌شود و در صورت استفادهٔ طولانی ممکن است به کم خونی شدید منجر شود.
- **بنزیل کلرید (کلروتولوئن)** : شدیداً برای پوست، چشم و مخاط سوزش‌آور است. از طریق تماس با پوست جذب می‌شود و مقدار فراوان آن سبب اختلال در سیستم اعصاب مرکزی می‌شود.

- **کلروفرم (تری کلرومتان)** : ممکن است سرطان‌زا باشد. بر روی قرنیه ایجاد سوزش می‌کند. تنفس طولانی مدت آن ممکن است سیستم قلبی و تنفسی را دچار اختلال کند و به مرگ منتهی شود.
- **دی متیل سولفات (متیل سولفات)** : سرطان‌زاست. تماس از راه پوست یا مخاط با مادهٔ مایع یا بخار آن حتی برای مدت‌کوتاه سبب سوزش شدید و تورم می‌شود. در صورت تماس طولانی‌تر سبب ناراحتی کرونر و احتقان ریوی می‌گردد و ممکن است بین سه تا چهار روز به مرگ منجر شود.
- **دی متیل سولفواکسید (د.ام.اس.او)** : بر روی پوست اثر می‌گذارد و سبب سوزش آن می‌شود. می‌توان آن را جزو مواد اثر گذارنده بر روی جنین طبقه‌بندی کرد.
- **۱ــ۴ دی اکساید (دی اتیلن اکسید)** : سرطان‌زاست و از طریق تماس با پوست جذب می‌شود. در اثر برخورد حاد سبب سوزش چشم و دستگاه تنفسی می‌گردد و برخورد مداوم سبب ناراحتی‌هایی در کبد و کلیه می‌شود.
- **اپی کلروهیدرین (۱ــ کلرو۲ــ۳ اپوکسی پروپان)** : در مسمومیت مزمن می‌تواند سبب ضایعات کلیوی گردد و در مسمومیت حاد ممکن است به علت فلج تنفسی، به مرگ منجر شود.
- **اتیل استات (استیک اتر)** : از طریق پوست جذب می‌شود. بر روی سطح مخاط‌ها به‌ویژه مخاط لثه، چشم و راه‌های تنفسی اثر می‌گذارد. تأثیر مکرر آن موجب ناراحتی‌های کونژوکتیویت و تاری قرنیه می‌شود.
- **اتیلن دی کلرید (۲ و ۱ دی کلرواتان)** : اثر شدید سوزش در محل تماس باقی می‌گذارد. مسمومیت مزمن در طی چند ماه ممکن است اشتها را کاهش دهد و موجب استفراغ و دل به هم‌خوردگی شود.
- **فرمالین (محلول فرمالدئید)** : سوزش شدید موضعی می‌دهد و اگر بلعیده شود موجب استفراغ شدید و اسهال می‌شود.
- **فنل (کربولیک اسید)** : در اثر تماس این ماده با پوست، محل آسیب دیده، سفید، چین خورده و نرم می‌شود و سوزش شدیدی احساس می‌گردد. ممکن است در فاصلهٔ سی دقیقه، به دلیل اثر روی سلسله اعصاب مرکزی، به مرگ بینجامد.
- **تری متیل آمین** : سوزانندهٔ قوی موضعی است و تنفس بخار آن به شدت خطرناک است.

معرفی علائم هشدار دهنده بر روی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایشگاه

مواد شیمیایی‌ای که در آزمایشگاه نگه‌داری می‌شوند باید دارای برچسب علایم باشند (شکل ۵ــ۱). برخی از این علایم هشداردهنده عبارت‌اند از :

EX (Explosive) : قابل انفجار، در جایی غیر از انبار مواد نگه‌داری شود.

O (Oxidizing _ Fire Promoting) : اکسید کننده ــ قابل اشتعال، تماس با مواد قابل اشتعال به حداقل برسد.

T (Toxic) : سمی.

T+ (Very Toxic) : بسیار سمی، تماس با بدن به هرشکلی محدود شود (رعایت حداکثر موارد ایمنی).

Xn (Harmful) : مضر، نباید با دست تماس پیدا کند.

F4 (Extremely Flamable) : به شدت قابل اشتعال، در دمای زیرصفر نگه‌داری شود.

F (Highly Flamable) : نگه‌داری در دمای زیر $21^{\circ}C$

C (Corrosive) : خورنده، از تماس با کلیهٔ سطوح بدن جلوگیری شود.

Xi (Irritant) : کم خطرترین.

شکل ۵ــ۱ــ برخی علایم هشدار دهنده روی برچسب مواد شیمیایی

اتوکلاو

اتوکلاو[۱] دستگاهی است که به وسیلهٔ آن وسایل آزمایشگاهی، محیط‌های کشت و محلول‌ها و مواد مصرفی آلوده با استفاده از حرارت مرطوب سترون می‌شوند. این دستگاه در سال ۱۸۷۹ توسط چارلز چامبرلند[۲] اختراع شد. برتری اتوکلاو نسبت به سایر دستگاه‌های حرارتی استفاده از بخار آب است که امکان سترون کردن لوازم دارای قسمت‌های پلاستیکی را فراهم می‌کند. اگرچه اتوکلاو بهترین وسیله برای سترون سازی است، اما طولانی شدن مرحلهٔ گرمایی کیفیت مواد مغذی را در محیط‌های کشت پیچیده، که حاوی قندها، مواد معدنی و فلزی هستند، کاهش می‌دهد. بنابراین برای چرخهٔ سترون سازی باید از زمان‌های کوتاه‌تر و دماهای بالاتر استفاده کرد تا علاوه بر آنکه آسیب کمتری به محیط کشت وارد می‌شود، برای ارگانیسم‌ها کشنده‌تر باشد. اتوکلاو قادر است بخار آب اشباع شده را در فشار ۱۵ پوند با حرارت ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد تولید کند. بخار ایجاد شده موجب تخریب ساختمان میکروب‌ها و اسپور آن‌ها می‌شود. چرخهٔ سترون‌سازی شامل مراحل زیر است :

- **مرحلهٔ ۱** : زمان بالا رفتن دما در محفظهٔ اتوکلاو ($121^{\circ}C$ ــ ۲۰)؛
- **مرحلهٔ ۲** : زمان نفوذ گرما به داخل ظرف محیط کشت ($121^{\circ}C$ ــ ۱۰۰<)؛
- **مرحلهٔ ۳** : زمان نگه‌داری در دمای مقرر ($121^{\circ}C$ ــ ۱۲۱)؛
- **مرحلهٔ ۴** : زمان پایین آمدن دمای محفظه ($80^{\circ}C$ ــ ۱۲۱).

این دستگاه طوری تنظیم شده است که بعد از رسیدن به این فشار بخار و درجهٔ حرارت، بلافاصله وارد مرحله سترون کردن می‌شود و مدت ۱۵ دقیقه به همان حالت باقی می‌ماند. دستگاه دارای یک شیر اطمینان است که به‌صورت خودکار بخار اضافی موجود در مخزن را حین کار به بیرون هدایت می‌کند تا شرایط ثابت بماند. قبل از شروع، شیر خروج هوا باز گذاشته می‌شود تا هوای داخل دستگاه تخلیه شود و بخار آب تمام سطوح و منافذ را بپوشاند. در این حالت عمل سترون کردن به طور کامل انجام می‌شود. پس از خاموش کردن اتوکلاو و خارج شدن بخار آب از شیر خروجی می‌توان دربِ دستگاه را باز کرد. بعد از آن‌که فشار اتاقک اتوکلاو به صفر و دمای آن به حدود $60^{\circ}C$ رسید کنار دربِ اتوکلاو بایستید و آن‌را باز کنید. منتظر بمانید تا ظروف کمی خنک شوند، سپس آن‌ها را با دستکش مقاوم به حرارت، حمل کنید.

۱ــ Autoclave ۲ــ Charles Chamberland

نکات ضروری کار با دستگاه اتوکلاو

ـ بهتر است جهت جلوگیری از تشکیل رسوب در دستگاه اتوکلاو، از آب مقطر استفاده نمایید.

ـ سطح آب درون دستگاه نباید از انتهای پایین دیگ بالاتر رود.

ـ پیچ‌های درب را باید کاملاً محکم بست. برای این منظور باید پیچ‌های روبه‌روی هم بسته شود تا درب دستگاه به‌طور یک‌نواخت محکم گردد و بخار آب از آن خارج نشود.

ـ استفاده از دماهای بیشتر از میزان لازم و مدت زمان طولانی‌تر تفاوتی در نتیجهٔ حاصل ندارد.

ـ ظروف دارای محلول را نباید پر کرد و حداقل بخشی از ظروف باید خالی باشد.

ـ درب ظروف، مخصوصاً آن‌هایی را که حاوی محلول‌اند کاملاً نبندید، بلکه مقداری آن را شل کنید تا بخار آب ایجاد شده از آن خارج شود.

ـ هنگام روشن بودن دستگاه، به بارگذاری یا خارج نمودن وسایل و مواد، اقدام نکنید.

ـ هنگام روشن بودن دستگاه و اتصال آن به پریز، اتوکلاو را تمیز نکنید.

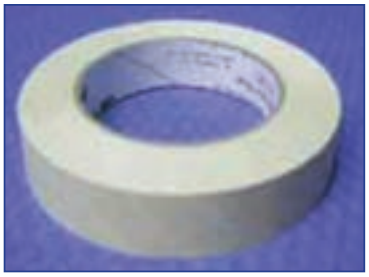
ـ پیچ‌های محکم کنندهٔ درب را در هنگام کار دستگاه دستکاری نکنید.

پس از اتمام زمان لازم، برای بازکردن درب دستگاه به صورت زیر عمل کنید :

منبع حرارت را خاموش و دریچهٔ خروج بخار را آهسته بازکنید تا فشار داخل دستگاه به صفر برسد و پس از آن درب دستگاه را باز نمایید.

کنترل کیفیت اتوکلاو

برای کنترل کیفیت اتوکلاو از آزمایش شیمیایی و آزمایش بیولوژیک استفاده می‌شود. برای آزمایش شیمیایی از نوارهای اتوکلاو استفاده می‌شود. این نوارها وقتی به دمای معینی رسیدند تغییر رنگ می‌دهند. مانند نوار کاغذی TST که سه عامل زمان، بخار و دما را کنترل می‌کند و از زرد به بنفش تغییر رنگ می‌دهد، یا نوارهای سیاه در زمینهٔ سفید که در دمای ۱۲۱درجه نوارهای سیاه از بین می‌روند. می‌توان از برچسب ثبت سترونی[1] نیز استفاده کرد که علاوه بر سنجش سترونی، امکان ثبت تاریخ، نام کاربر و نام محیط کشت برروی آن وجود دارد. برای آزمایش بیولوژیک از ویال حاوی اسپور باسیلوس استئاروترموفیلوس[2] با شمارهٔ شناسایی ATCC 7953[3] استفاده می‌شود (شکل۶ـ۱). اگر اتوکلاو به دمای مورد نظر نرسیده باشد با قراردادن ویال این باکتری در گرمخانه، اسپورهای آن جوانه خواهند زد. متابولیسم اسپورها، pH محیط را تغییر می‌دهند و باعث تغییر رنگ محیط خواهند شد.



(الف)

(ب)

الف) برچسب ثبت سترونی

ب) ویال‌های حاوی اسپور باسیلوس استئاروترموفیلوس زمانی که دمای اتوکلاو به حد مورد نظر نرسیده باشد از زرد به بنفش تغییر رنگ می‌دهد.

شکل ۶ـ۱

۱ـSterility_Record ۲ـBacillus Stear Other Mophilus ۳ـAmerican Type Culture collection

آون

فور یا آون برای سترون کردن موادی که کاملاً تحت‌نفوذ بخار قرار نمی‌گیرند، اما می‌توانند دمای بالای موردنیاز مثل ۱۶۰ـ۱۸۰°C را به مدت سه ساعت تحمل کنند به‌کار می‌رود. درجهٔ حرارت داخل آون توسط یک دماسنج به تنظیم‌کنندهٔ حرارت[1] متصل است که دما را نشان می‌دهد. آون به‌ویژه برای ظروف شیشه‌ای مثل لوله آزمایش، پتری دیش، پی‌پت و نیز برای وسایل فلزی مثل پنس، اسکالپل و قیچی به‌کار می‌رود (شکل ۷ـ۱).

شکل ۷ـ۱ـ نمونه‌ای از آون آزمایشگاهی

نکات ضروری کار با دستگاه آون

ـ برای بسته‌بندی این وسایل می‌توان از فویل آلومینیومی یا کاغذ کرافت و سر بطری‌های پنبه‌ای استفاده کرد.

ـ حدود ۲ سانتی‌متر از انتهای فوقانی پی‌پت‌ها را با پنبهٔ غیرجاذب ببندید و آن‌ها را در ظرفِ فلزی استوانه‌ای شکل قرار دهید، سپس درب آن را ببندید.

ـ درپوش لوله‌های آزمایش را با کاغذ آلومینیومی بپوشانید و آن‌ها را به‌طور عمودی در جا لوله‌ای قرار دهید. درپوش، لبهٔ لوله را طی مدت ذخیره‌سازی از آلودگی از طریق هوا حفظ می‌کند.

ـ در صورتی می‌توان بطری‌های درپیچ‌دار را در آون سترون کرد که درپوش و آستری آن‌ها از موادی مثل فلز، پلی پروپیلن یا لاستیک سیلیکون ساخته شده باشد تا در دمای سترون سازی از شکل طبیعی خارج نشود.

ـ پودر، روغن، چربی و گریس را در ظرف شیشه‌ای یا فلزی ودراندازه‌های کوچک، که از وزن ۱۰ گرم یا عمق ۱ سانتی‌متر تجاوز نکند، سترون نمایید.

ـ قبل از قراردادن ظروف شیشه‌ای در آون، از خشک بودن آن‌ها مطمئن شوید. مواد را به گونه‌ای در آون قرار دهید که هوای داغ در اطراف و مابین آن‌ها در جریان باشد.

ـ زمان نگه‌داری سترون سازی از زمانی آغاز می‌شود که اتاقک به دمای انتخابی برسد.

ـ به دلیل عایق بودن دستگاه، چند ساعت طول می‌کشد تا اشیای داخل آن خنک شوند. درب آون را باز نکنید تا اتاقک، ظروف و مواد داخل آن تا دمای حدود ۶۰°C خنک شوند. اگر به‌طور ناگهانی هوای سرد وارد دستگاه شود ممکن است ظروف شیشه‌ای ترک بخورند.

کنترل کیفیت آون

برای کنترل کیفیت آون از آزمایش شیمیایی و آزمایش بیولوژیک استفاده می‌شود. برای آزمایش شیمیایی از ویال شیشه‌ای

۱ـ Thermostat

Browne و مشاهدهٔ تغییر رنگ از قرمز به سبز استفاده می‌شود. برای آزمایش بیولوژیک از نوار کاغذی حاوی اسپور باسیلوس سوبتیلیس[1] با کد شناسایی ATCC 9372 استفاده می‌شود.

اتو یا اینکوباتور (گرم‌خانه)

دستگاهی است که گرمای لازم را برای رشد باکتری‌ها، بعد از مرحلهٔ کشت، فراهم می‌کند (شکل ۸ــ۱). برخی انکوباتورها جهت تأمین هوای موردنیاز، برای رشد بهینهٔ میکروب‌ها در محیط‌های کشت مایع به سیستم تکان دهنده[2] مجهز هستند (شکل ۹ــ۱) و برخی نیز برای رشد باکتری‌های خاص و به ویژه کشت سلول دارای سیستم تأمین CO_2 هستند (شکل ۱۰ــ۱).

شکل ۸ــ۱ــ نمونه‌ای از گرم‌خانهٔ سادهٔ آزمایشگاهی

شکل ۱۰ــ۱ــ نمونه‌ای از گرم‌خانهٔ مجهز به سیستم تأمین گاز دی اکسید کربن

شکل ۹ــ۱ــ نمونه‌ای از گرم‌خانهٔ رومیزی مجهز به سیستم تکان دهنده

۱ــ Bacillus subtilis

۲ــ Shaker

نکات ضروری کار با اینکوباتور

- اینکوباتور تا حد امکان باید در نزدیکی هودهای کشت سلولی یا هودهای میکروبی قرار داده شوند.
- اینکوباتور را برروی سطحی صاف و در حالت تعادل قرار دهید.
- از قرار دادن اینکوباتور در جای مرطوب و خیلی گرم، که محل مناسبی برای رشد باکتری‌هاست، خودداری کنید. هنگامی که درجهٔ حرارت اینکوباتور بر روی ۳۷ تنظیم می‌شود درجهٔ حرارت محیطی نباید از ۳۲ درجه بیشتر باشد.
- اینکوباتور را در نزدیک درهای اصلی یا جریانات هوایی و هواکش‌ها قرار ندهید.
- بعد از مشخص کردن مکان اینکوباتور باید تمام محل‌های اتصال گاز و آب در دستگاه را کنترل کنید.
- هنگامی که سیلندر متصل است از کار کردن با سیفون سیلندر خودداری کنید.
- از گذاشتن مواد فرّار یا قابل اشتعال (اتر،بنزین، الکل، پروپان) در اینکوباتور خودداری کنید.
- از آب تقطیر شده یا خالص برای پر کردن محفظهٔ آب جهت ایجاد رطوبت استفاده کنید و سطح آب در محل ذخیره همیشه کنترل شود. استفاده از مقادیر کم سولفات مس و یا ساولون برای جلوگیری از رشد قارچ‌ها و کپک‌ها در آب داخل اینکوباتور مناسب است.
- ظروف کشت سلول یا پلیت‌های باکتری‌ها را با فاصلهٔ از یکدیگر قرار دهید تا جریان هوا به خوبی صورت گیرد. اگر فاصلهٔ این ظروف کم باشد تعدیل دما و گاز CO_2 بین آن‌ها به خوبی صورت نمی‌گیرد.
- همیشه مراقب باشید که درب داخلی اینکوباتور خوب بسته شده باشد.
- برای تمیز کردن دستگاه از ریختن آب روی آن خودداری کنید.
- هنگامی که می‌خواهید اینکوباتور را تمیز کنید از برس زبر، اسید، بنزین یا تینر استفاده نکنید، این عمل باعث از بین رفتن رنگ دستگاه و صدمه به پوشش آن می‌شود. همچنین قسمت‌های پلاستیکی ممکن است دچار تغییر شکل گردند. هیچ‌وقت در قسمت‌های پلاستیکی از مواد شیمیایی فرّار مانند بنزین استفاده نکنید. مواد دترژنت بهترین انتخاب برای شست‌وشوی دستگاه‌اند.
- برای تمیز کردن داخل دستگاه از محلول سدیم کلراید یا محلول‌های هالوژن دار، محلول‌های قلیایی یا اسیدی قوی استفاده نکنید زیرا باعث خوردگی دیوارهٔ دستگاه می‌شود.
- برای جلوگیری از آلودگی در اینکوباتورها، قفسه‌ها و دیوارهٔ دستگاه همواره باید خشک باشد. در اثر باز ماندن درب دستگاه به مدت طولانی رطوبت موجود در اینکوباتور به صورت قطرات آب درمی‌آید و این قطرات روی قفسه و دیواره‌ها باعث رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌شود. در این موارد آب موجود را کاملاً خشک کنید و محل را به خوبی ضد عفونی نمایید، به خصوص اگر مقداری از محیط کشت روی قفسه یا داخل اینکوباتور ریخته شده باشد.
- در صورت مشاهدهٔ آلودگی در ظروف کشت، بلافاصله تمام آن‌ها را خارج کنید و داخل اینکوباتور را با الکل ۷۰٪ به‌خوبی ضدعفونی نمایید. قفسه‌ها را نیز می‌توانید در داخل فور یا آون قرار دهید تا سترون شوند.

بن ماری یا حمام آبی

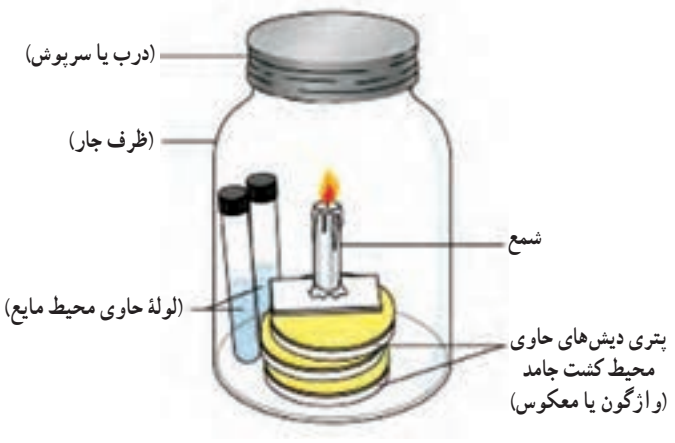
بن ماری وسیله‌ای است که به‌وسیلهٔ آب محتوی آن می‌توان حرارت معینی را ثابت نگه‌داشت. درجهٔ حرارت تا ۱۰۰ درجه قابل تنظیم است. در این حالت به آن بن ماری جوش می‌گویند. از این دستگاه می‌توان به منظور گرم‌خانه‌گذاری محیط‌های کشت مایع و ذوب کردن محیط‌های کشت استفاده کرد.

نکات ضروری کار با بن ماری

- محفظهٔ بن‌ماری باید همیشه حاوی مقدار کافی آب مقطر تمیز باشد. بنابراین، قبل از روشن کردن آن لازم است از کافی بودن حجم آب اطمینان حاصل کنید. خصوصاً زمانی که می‌خواهید دستگاه را شبانه یا برای مدت طولانی روی دمای بالای روشن تنظیم کنید. بدیهی است کم شدن آب آن باعث بروز آسیب در دستگاه و آتش سوزی خواهد شد.
- برای پر کردن بن‌ماری، از آب یک‌بار تقطیر استفاده نمایید. مراقب باشید که نمونهٔ مورد آزمایش شده درون آب نریزد. در صورت مشاهدهٔ آلودگی در آب بن‌ماری، بلافاصله آب آن‌را به طور کامل تخلیه و پس از شست‌وشوی محفظه، آن‌را از آب مقطر ایمنی پرنمایید.
- در صورت استفادهٔ بلند مدت، خصوصاً در دماهای بالا، دربِ محفظه را بسته نگه‌دارید تا از تغییر بیش از حد، فشار آمدن به دستگاه و کثیف شدن احتمالی آن جلوگیری شود.
- اگر می‌خواهید از سرد کننده[1] استفاده کنید، لازم است بن ماری را روی دمای مورد نظر تنظیم و آن‌را روشن نمایید. توجه داشته باشید که هنگام قرار دادن سر مارپیچ در آب، دمای آب بالاتر از دمای آزمایشگاه نباشد.
- از بن ماری‌های دقیق برای دماهای بالاتر از ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد استفاده نکنید.

جار بی‌هوازی

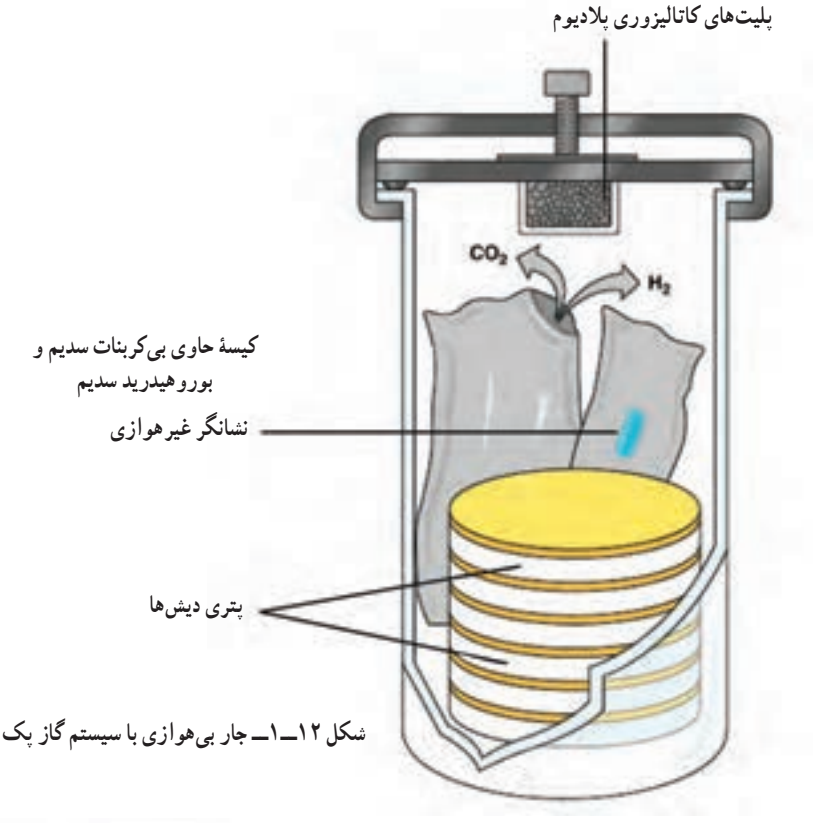
باکتری‌های بی‌هوازی اجباری باکتری‌هایی هستند که فقط درشرایط فاقد مولکول اکسیژن قادر به رشدند. می‌توان، بسته به میزان حساسیت این گروه به اکسیژن، از روش‌های متفاوت برای تأمین شرایط مورد نیاز رشد آن‌ها استفاده کرد. طریقهٔ کشت باکتری‌های بی‌هوازی در آزمایشگاه به این ترتیب است که بعد از انتخاب محیط کشت مناسب جهت کشت باکتری مورد نظر، پلیت یا لولهٔ کشت را در وسیله‌ای به‌نام جار بی‌هوازی قرار می‌دهند تا این وسیله شرایط یک محیط بی‌هوازی را برای باکتری ایجاد نماید. در واقع جار وسیله‌ای استوانه‌ای شکل و بزرگ و حاوی درب مخصوص است که برای کشت میکروب‌های بی‌هوازی در شرایط خلأ از آن استفاده می‌شود (شکل ۱۱ــ۱). در جار پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد به صورت وارونه قرار داده شده است و هوای موجود با روشن کردن شمع، با مخلوطی ازگازهای نیتروژن، هیدروژن و دی‌اکسیدکربن جای‌گزین می‌شود.



شکل ۱۱ــ۱ــ جار بی‌هوازی ساده

۱ــ Chiller

همچنین می‌توان از گاز پک مخصوص بی‌هوازی برای تولید شرایط در صورت نبودن اکسیژن استفاده کرد (شکل ۱۲ــ۱). دراین سیستم ازیک جار بی‌رنگ پلاستیکی با درپوش محکم استفاده می‌شود. عملکرد گاز پک به‌این صورت است که مواد داخل گاز پک طی واکنش با آب، اکسیژن محیط داخل جار را مصرف می‌کند و با حذف اکسیژن محیط، شرایط بی‌هوازی برای رشد باکتری فراهم می‌شود. گاز پک باعث تولید هیدروژن و دی اکسید کربن می‌شود. هیدروژن درحضور دانه‌های پالادیوم[۱] (در نقش کاتالیزور) موجود در درب جار، ترکیب می‌گردد و به صورت قطرات آب درجدارهٔ ظرف ظاهر می‌شود. تولید قطرات آب در جدارهٔ جار نشانگر عملکرد خوب کاتالیزور و حذف اکسیژن است.



شکل ۱۲ــ۱ــ جار بی‌هوازی با سیستم گاز پک

برای تأیید ایجاد شرایط بی‌هوازی می‌توان از نوارهای معرف‌های شیمیایی نیزاستفاده کرد. رایج ترین معرف شیمیایی متیلن بلو[۲] است که در صورت بودن اکسیژن به رنگ آبی ظاهر می‌گردد و در صورت نبودن اکسیژن احیا و بی‌رنگ می‌شود.

شکل ۱۳ــ۱ــ نمونه‌ای از سانتریفوژ رومیزی آزمایشگاهی

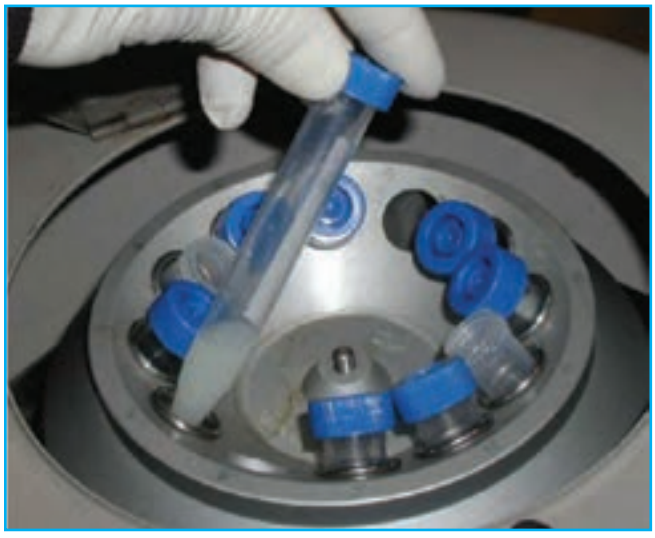
سانتریفوژ

سانتریفوژ[۳] یا دستگاه مرکز گریز دستگاهی است که در آن با استفاده از نیروی گریز از مرکز در سرعت بالا مواد را از یکدیگر جدا می‌کنند. در این دستگاه، محفظه‌ای که مواد جداشدنی در آن قرار دارد، معمولاً به کمک یک موتور به سرعت حول یک محور می‌چرخد (شکل۱۳ــ۱).

۱ــ Palladium ۲ــMethylene blue ۳ــ Centrifuge

اساس کار سانتریفوژ این است که هرگاه جسمی با سرعت معینی حول یک مرکز با محور دوران کند، نیرویی در جسم متحرک و در جهت عمود بر مسیر دوران و به سمت خارج از مرکز ایجاد می‌گردد که به نیروی فراگریز یا نیروی گریز از مرکز موسوم است. مقدار آن از رابطهٔ $F=MRW^2$ که در آن R شعاع دوران، M جرم جسم، V سرعت خطی و W سرعت زاویه‌ای است به‌دست می‌آید. محور دوران ممکن است به سه حال قائم، افقی یا مایل باشد.

معمولاً دستگاه سانتریفوژ را برای جدا کردن ذرات جامد از یک مایع یا تقسیم مخلوط مایعات به اجزای مختلف آن به کار می‌گیرند. مخلوط را درون لوله‌ای قرار می‌دهند، به‌طوری که با چرخش دستگاه، مخلوط به سمت خارج از مرکز حرکت می‌کند و حالت افقی قرار می‌گیرد (شکل ۱۴ــ۱). در این حالت، نیروی گریز از مرکز می‌خواهد که مخلوط را برخلاف مرکز سانتریفوژ براند و از این نقطه دور کند و ذرات یا مایع سنگین‌تر بیش‌تر به سمت بیرون (یا ته مخلوط) رانده می‌شود. وقتی سانتریفوژ از حرکت باز می‌ایستد، مواد به همین حالت غیر مخلوط می‌ماند. خون و سایر نمونه‌های بیولوژیکی را معمولاً به وسیله دستگاه سانتریفوژ جدا می‌کنند.



شکل ۱۴ــ۱ــ قراردادن لوله‌های محتوی مواد مورد آزمایش در سانتریفوژ

نکات ضروری هنگام کار با سانتریفوژ

- رعایت نکات ضروری و عمومی، هنگام کار با دستگاه سانتریفوژ با مراجعه به دستورالعمل مربوط به آن؛
- بازدید و بررسی مختصر، قبل از شروع به کار با سانتریفوژ (شکسته نبودن بوکت‌ها و...)؛
- مساوی بودن حجم مایع در لوله‌های سانتریفوژ،به منظور برقراری تعادل؛
- کنترل شدن صداها و لرزش‌های غیرعادی، در ابتدای حرکت؛
- تمیز کردن و ضدعفونی کردن سطوح داخلی سانتریفوژ با یک مادهٔ مناسب، بعد از اتمام کار. (در صورت ریختن نمونهٔ آلوده، باید قبل از به‌کارگیری، مجدداً ضدعفونی انجام شود)؛
- برای جلوگیری از تولید آئروسل، در مورد ترکیبات آلوده‌ای که راه سرایت آن‌ها از طریق ذرات ریز معلق در هواست، اقدامات ایمنی زیر لازم است :

الف) بوکت سانتریفوژ کاملاً محکم باشد؛

ب) برای لوله‌های سانتریفوژ از درب پیچ‌دار استفاده شود و موقع کار، درب لوله کاملاً بسته باشد؛
ج) درب سانتریفوژ، بلافاصله بعد از اتمام کار باز نشود؛
د) برای پیش‌گیری از انتشار آئروسل در فضای اتاق درب لوله‌های سانتریفوژ در زیر هود زیست ایمنی مناسب باز شود.

- گزارش کردن سریع موضوع، در صورت ریختن مواد خطرناک زیستی و ضدعفونی و نظافت آن، به روشی که برای تمیز کردن مواد خطرناک زیستی بیان شده است.

میکروسکوپ

چون اکثر میکروب‌ها کوچک‌اند و با چشم غیر مسلح قابل رؤیت نیستند، برای مطالعهٔ آن‌ها از ابزار خاصی به نام میکروسکوپ استفاده می‌شود. میکروسکوپ از نظر لغوی از دو بخش میکرو به‌معنی کوچک و سکوپ به معنی رؤیت (مشاهده) تشکیل شده است. میکروسکوپ انواع مختلفی دارد از جمله نوری، فاز متضاد، تداخلی، زمینه تاریک، پلاریزان و الکترونی.

میکروسکوپ نوری: میکروسکوپ‌های نوری معمولی که در تحقیقات بیولوژیکی و پزشکی به‌کار می‌روند، دو گروه هستند. یک گروه دارای چشمهٔ نوری مجزا از میکروسکوپ، و گروه دوم آن‌هایی که دارای چشمهٔ نوری تعبیه شده در میکروسکوپ‌اند (شکل ۱۵ــ۱). میکروسکوپ‌های معمولیِ مدرنِ مورد استفاده از نوع دوم است و تقریباً ساخت نوع اول و استفاده از آن منسوخ شده است.

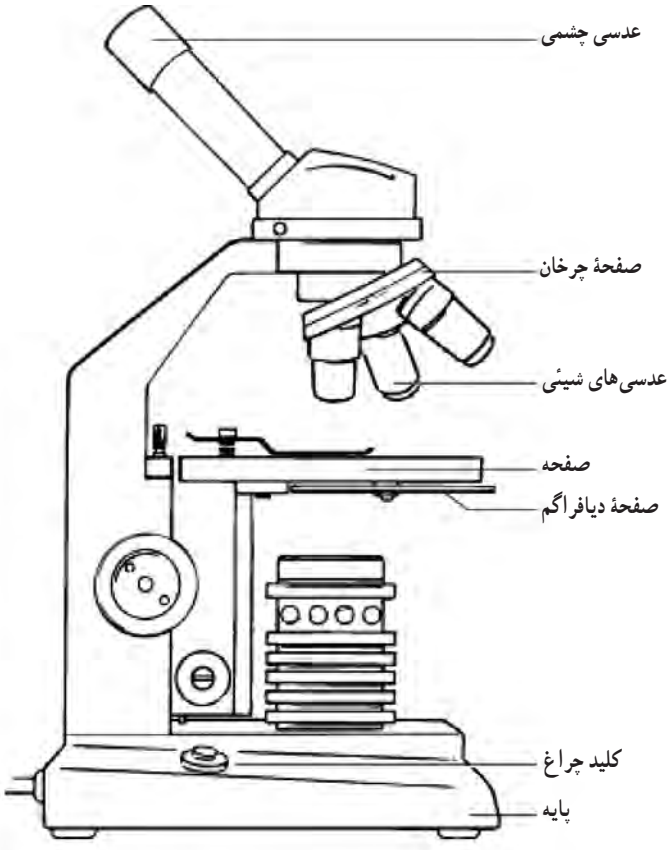
شکل ۱۵ــ۱ــ نمونه‌ای از میکروسکوپ نوری دو چشمی

اجزای اصلی میکروسکوپ نوری (شکل ۱۶ــ۱) عبارت‌اند از :

پایه*[1]** : که از دو بخش تشکیل شده است. یک بخش پایینی که بر روی میز محل مطالعه قرار می‌گیرد و دیگری ***ستون که اجزای مختلف میکروسکوپ به آن متصل می‌شود.

لولهٔ*[2] *میکروسکوپ : شامل دو گروه عدسی چشمی و شیئی است. در میکروسکوپ‌های معمولی چهار عدسی شیئی بر روی صفحهٔ چرخان نصب شده که سه عدسی اول در حالت خشک و عدسی بعدی در حالت ایمرسیون روغنی مورد استفاده قرار می‌گیرند. وظیفهٔ عدسی شیئی تهیهٔ تصویر بزرگ شده از جسم مورد نظر است. وظایفی که عدسی چشمی برعهده دارد عبارت است از : بزرگ‌سازی تصویر معکوس حاصله از عدسی شیئی، تشکیل تصویر مجازی از تصویر حاصله به‌وسیلهٔ عدسی شیئی، اندازه‌گیری و سنجش اجزای واقع در تصویر.

۱ــ Base ۲ــ Eyepiece



شکل ۱۶ــ۱ــ اجزای اصلی میکروسکوپ نوری

چشمی[۱] : دو نوع معمول آن‌ها یکی چشمی هویگنس[۲] و دیگری چشمی رامزدن[۳] است. چشمی هویگنس که به چشمی منفی معروف است دارای بزرگ‌نمایی ۱۰ و ۵ است. این چشمی از دو عدسی تشکیل شده که یک طرف هر کدام مسطح و طرف دیگر محدب است و بین این دو عدسی دیافراگم قرار می‌گیرد. سطح محدب هر دو عدسی به‌طرف پایین است. عدسی پایین پرتوهای رسیده از عدسی شیئی را جمع آوری و در محل دیافراگم یا در نزدیکی آن متمرکز می‌کند. عدسیِ چشمی این تصویر را بزرگ می‌کند و به‌صورت یک تصویر مجازی بزرگ شده به چشم مشاهده‌گر انتقال می‌دهد. کار دیافراگم کنترل شدت نور و کاهش خیره کنندگی نور رسیده به چشم بیننده است. اشکال عمدهٔ چشمی هویگنس محدود بودن میدان دید و تأمین نکردن راحتی کافی برای چشم است. چشمی رامزدن که به چشمی مثبت معروف است با دقت خوبی انحرافات عدسی‌ها را تصحیح می‌کند.

چشمهٔ مصنوعی نوری : این میکروسکوپ برای وضوح تصویر است. لامپ‌های مورد استفاده در میکروسکوپ‌ها عبارت‌اند از : لامپ هالوژن، جیوه، تنگستن و گزنون که با ولتاژ کم کار می‌کند.

کُندانسور[۴] : به مجموعهٔ عدسی‌های متمرکز کنندهٔ نور می‌گویند که وظیفهٔ آن متمرکزسازی نور بر روی نمونه است. بیشتر اشیایی که زیر میکروسکوپ مشاهده می‌شوند نسبت به نور شفاف هستند. اجزای آن‌ها تنها وقتی قابل مشاهده است که نسبت به زمینه دارای وضوح[۵] (وضوح در شدت یا در رنگ) باشند.

۱ــ Objective ۲ــ Huygenian ۳ــ Ramsden ۴ــ Condenser ۵ــ Contrast

برخی از میکروسکوپ‌ها به دوربین مجهز هستند (شکل ۱۷ــ۱) که امکان مطالعهٔ دقیق‌تر و نیز ثبت آن در رایانه را فراهم می‌سازد.

شکل ۱۷ــ۱ــ نمونه‌ای از میکروسکوپ مجهز به دوربین

میکروسکوپ الکترونی: یکی از تجهیزات بزرگ علمی میکروسکوپ الکترونی است (شکل ۱۸ــ۱). دستگاه ساده‌ای از این میکروسکوپ برای اولین بار در سال ۱۹۴۰ میلادی ساخته شد و به‌وسیلهٔ آن زیست شناسان توانستند اجزای بیشتری از یک سلول را مشاهده کنند. بعداز جنگ جهانی میکروسکوپ الکترونی توسط چارلز اتلی[۱] وهمکارانش تکمیل شد. میکروسکوپ الکترونی براساس قوانین نوری کار می‌کند و مانند تمام میکروسکوپ‌ها از دو عدسی شیئی و چشمی تشکیل شده است. ولی در این دستگاه به‌جای نور از شار الکترون (پرتوهای الکترونی) پرانرژی استفاده می‌شود.

از آنجایی‌که طول موج تابش الکترون بسیار کوتاه‌تر است تصاویر به‌دست‌آمده، نسبت به میکروسکوپ‌های نوری، دارای بزرگ‌نمایی بیشتری هستند. حد تفکیک (R) به‌طول موج نوری بستگی دارد که به نمونه می‌تابد. در حقیقت بین این دو، رابطهٔ مستقیمی وجود دارد. یعنی هر قدر طول موج تابشی کوچک‌تر باشد، R نیز کوچک‌تر و قدرت جداسازی بیشتر است. حد تفکیک با میکروسکوپ الکترونی برای ملکول‌های تخلیص شدهٔ زیستی، حدود ۰/۱ نانومتر و برای سلول‌ها ۲ نانومتر است که دست کم ۱۰۰ برابر قوی‌تر از بهترین میکروسکوپ‌های نوری است. میکروسکوپ الکترونی با قدرت تفکیک بالا حتی می‌تواند در دل دانه‌ای بسیار کوچک با قطری در حد میکرومتر نفوذ کند و عناصر تشکیل دهندهٔ آن را نشان دهد.

دراین دستگاه، الکترون پر انرژی از یک منبع الکترون خارج می‌شود و تحت شتاب می‌گیرد. بنابراین نور حاصل در مسیر خود از روزنه‌های تعبیه شده در یک فلز و یا از لنزهای مغناطیسی عبور می‌کند. برای تفکیک دو نقطهٔ نزدیک‌تر از ۲۵۰۰ آنگستروم باید از میکروسکوپ الکترونی استفاده کرد، زیرا طول موج الکترون از طول موج نور کمتر است. میکروسکوپ الکترونی شعاع الکترون را از داخل مقطع بسیار نازکی عبور می‌دهد. چون تراکم مواد در تمام قسمت‌های نمونه مورد مطالعه یک‌سان نیست، میزان الکترونی که از قسمت‌های مختلف عبور می‌کند متفاوت است. درنتیجه تصویری از قسمت‌های تاریک و روشن آن به‌دست می‌آید. میکروسکوپ الکترونی دارای یک قسمت لوله‌ای شکل است که الکترون می‌تواند آزادانه از آن عبور کند. در قسمت بالای لوله یک قطب منفی

۱ــ Charles Oatley

الکتریکی به شکل رشته سیم نازک وجود دارد که جنس آن از تنگستن است. این قسمت آن‌قدر حرارت داده می‌شود تا بتواند از خود الکترون آزاد کند .این عمل با ایجاد اختلاف پتانسیل از ۲۰۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ ولت بین کاتد و آند صورت می‌گیرد. در نتیجه یک شعاع الکترونی به‌سوی پایین قسمت لوله‌ای شکل شتاب داده می‌شود. به این سیستم، تفنگ الکترونی می‌گویند. در طول لوله عدسی‌هایی همگرا اندازه و روشنایی شعاع الکترونی را قبل از برخورد با نمونه مورد مطالعه کنترل می‌کنند. مقطع مورد بررسی روی یک صفحهٔ مشبک دایره شکلی قرار داده می‌شود. شعاع الکترونی پس از عبور از مقطع و قبل از این که به حد بزرگ‌نمایی نهایی برسد، از میان عدسی‌هایی شیئی عبور می‌کند و تنظیم می‌شود. سپس توسط عدسی‌هایی برروی صفحهٔ زیر میکروسکوپ منعکس می‌شود. چگالی بزرگ‌نمایی بیشتر میکروسکوپ‌ها از ۵۰ تا ۸۰۰۰۰۰ برابر است. صفحهٔ زیر میکروسکوپ که از مواد فسفردار پوشانیده شده است در مقابل پرتو الکترون از خود نور تولید می‌کند. در زیر این صفحه یک دوربین عکاسی قرار دارد که از تصویرِ روی صحنه عکس می‌گیرد.

شکل ۱۸ــ۱ــ میکروسکوپ الکترونی

خودآزمایی

۱ـ نکات ایمنی را که قبل از ورود به آزمایشگاه باید رعایت کنیم، نام ببرید.

استفاده از روپوش سفید آزمایشگاه، دستکش و در صورت لزوم عینک، ماسک و کفش ضروری است. لباس‌های خود را روی جا لباسی قرار دهید و از گذاشتن آن روی میز آزمایشگاه خودداری کنید.

۲ـ از نظر شما دلیل ممنوعیت خوردن و آشامیدن در آزمایشگاه میکروبیولوژی چیست ؟

به علت آلودگی‌ای که در آزمایشگاه وجود دارد، امکان سرایت آلودگی از طریق خوردن و آشامیدن وجود دارد. ضمناً ممکن است مواد خوراکی سبب ایجاد آلودگی در محیط آزمایشگاه نیز بشود.

۳ـ چرا بایستی پس از هر آزمایش، علاوه بر وسایل مورد استفاده، میزهای کار را نیز ضد عفونی کرد ؟

امکان آلوده شدن سطوح به وسیلهٔ میکروارگانیسم‌ها وجود دارد.

۴ـ کاربرد هر یک از دستگاه‌های زیر را شرح دهید.

گرم‌خانه (آون)، اتوکلاو، تکان دهندهٔ مکانیکی

اتوکلاو: دستگاهی است که از آن جهت سترون‌کردن محیط‌های کشت و محلول‌های مقاوم به‌حرارت استفاده می‌شود.

تکان‌دهندهٔ مکانیکی: برای یک‌نواخت کردن محتوای ظروف مناسب است و کارش شکستن مجموعه‌های میکروبی در لولهٔ ارلن است. برای این منظور دستگاه باید در جهت پایین و بالا حداقل به‌مدت هفت ثانیه کار کند.

آون: دستگاهی است که از آن جهت سترون نمودن وسایل، ابزارها و ظروف مقاوم در برابر حرارت استفاده می‌شود.

فصل ۲

باکتری‌ها

اهداف آموزشی

هدف کلی

شناخت باکتری‌ها و بیماری‌هایی که از طریق دام وطیور ایجاد شده‌اند.

هدف‌های جزئی

۱ــ شناخت باکتری‌ها و اجزاء آن‌ها
۲ــ طبقه‌بندی باکتری‌ها
۳ــ آشنایی با تولیدمثل باکتری‌ها
۴ــ شناخت روش‌های بیماری‌زایی باکتری‌ها
۵ــ شناخت بیماری‌های مهم دام و طیور که توسط باکتری‌ها ایجاد می‌شود.
۶ــ شناخت انواع مختلف محیط‌های کشت
۷ــ شناخت نحوهٔ کشت باکتری‌ها به صورت هوازی و بی هوازی
۸ــ شناخت رنگ‌های مورد نیاز برای رنگ‌آمیزی باکتری‌ها
۹ــ شناخت تثبیت و رنگ‌آمیزی باکتری‌ها
۱۰ــ شناخت نحوهٔ شمارش باکتری‌ها

واژه ها واصطلاحات مهم

- یوکاریوت
- سلول
- باکتری
- جلبک
- پروتوزوئرها
- غشای سیتوپلاسمی
- کلروپلاست
- پروکاریوت
- میکروارگانیسم
- آرکی باکتر
- قارچ
- کروموزوم
- میتوکندری
- واکوئل
- دستگاه گلژی
- لیزوزم
- میوز
- آندوسیتوز
- پروژنوت
- نوکلوییید
- میکروتوبول
- شبکهٔ آندوپلاسمی
- ضریب رسوب
- میتوز
- اگزوسیتوز
- فیلوژنی
- تاژه
- فلاژین

میکرون
باسیل شاربن
شبکهٔ فیبریلی
گرانول
متابولیسم
دیوارهٔ سلولی
فشار اسمزی
پنی سیلین
اتصالات پپتیدی
استرپتوکوک
گلوله‌های شیشه ای
هیبرید
ان ـ استیل گلوکز آمین
فسفو لیپید
مزوزوم
ژن تار
اسید آمینه
استرپتوکوکوس نومونیا
کلنی صاف
اسلایم
یونیزه
قلاب
حلقهٔ داخلی
حلقهٔ خارجی
دو تاژه
تار
تار کوتاه
ادغام جنسی
باکتری نر
تقسیم سلولی
گرم منفی
باسیلوس آنتراسیس
بیماری کزاز

باسیل سیاه زخم
باسیل سیاه سرفه
کروماتین
آندوسپور
شیمیوسنتز
پروتوپلاست
آنتی بیوتیک
ترانس پپتیداز
استافیلوک
آنتی ژن
امواج اولتراسونیک
پپتیدوگلیکان
ان ـ استیل مورامیک اسید
استرول
پلاسمید
نسخه برداری
کپسول
کلنی مخاطی
کلنی خشن
رنگ‌آمیزی منفی
رشته
جسم پایه
میله
تک تاژه
چند تاژه
پیلین
تار جنسی
درآمیختگی
باکتری ماده
گرم مثبت
متابولیک
کلستریدیوم تتانی
ضدعفونی کننده

باکتری پست
کوکوس
اسپریل
میسیلیوم
اکتینومیستال
اسپورانژیوم
هماتوکسیلین ـ ائوزین
اگزون
متان زا
نمک دوست
مایکوباکتریوم لپره
ترپونما پالیدوم
ریکتسیا
کلامیدیا
تراخم
رشد لگاریتمی
جهش یافته
اتوتروف
نیترات
هوازی اجباری
میکروآئروفیل
بی هوازی اجباری
لاکتوباسیل اسیدوفیلوس
اسید لاکتیک
بیماری وبا
سلول رویشی
قانقاریای گاوی
اگزوتوکسین
افتراقی
سافرانین
جوانه زدن
تقسیم دوتایی
انتقال بی واسطه

باکتری عالی
ویبریون
اسپیروکت
اکتینومیست
کورینه فرم
میکروکلنی
نقرهٔ متنامین
اینترون
احیا کننده
گرمادوست
بیماری جذام
بیماری سفلیس
تیفوس
بیماری مقاربتی
مضاعف شدن
جهش
ساپروفیت
هتروتروف
نیتریت
سودوموناس آئروژینوزا
کمپیلوباکتر ژژونی
اشرشیا کلی
لیستریا مونوسیتوژنز
واژن
ویبریو کلرا
اسپورزایی
کلستریدیوم پرفرنجنز
بوتولیسم
رنگ‌آمیزی شفر ـ فولتون
مالاشیت گرین
غیر جنسی
قطعه قطعه شدن
الحاق

یاخته دهنده
استرپتوکوکوس نومونیا
نوترکیب
انتقال عمومی
مزمن تنفسی
مایکوپلاسموز
فالوس
کیسهٔ هوایی
مایکوپلاسما سینوویه
مایکوپلاسما آیووا
شکاف شوان
فنل رد
سرولوژی
هماگلوتاسیون
غربال گری
مایکوباکتریوم بوویس
سیفون
اسید مایکولیک
فاکتور طنابی
کربول فوشین
بیماری دم خوره
سودوموناس
اینوزیتول
آئروموناس
کورک
اسید پانتوتنیک
هموراژیک
یرسینیا روکری

انتقال با واسطه
یاخته گیرنده
شرایط فیزیولوژیکی مستعد
باکتریوفاژ
انتقال اختصاصی
سینوزیت عفونی
مایکوپلاسما گالی سپتیکم
تظاهرات کلینیکی
فولیکول لنفوییدی
مایکوپلاسما ملهآگریدیس
محیط فری
سوآب
رنگ گیمسا
آگلوتاسیون
الایزا
توبرکل
موکوس
آرابینوگالاکتان
مایکوزید
سولفالیپید
اسید فست
پوسیدگی باله
اسید فولیک
فرونکلوزیس
ریبونوکلئات
برانشیومایکوزیس
اگزوفتالمی
آگار

محیط کشت
۳-۶ ان هیدرو ـ الفا ـ ال ـ گالاکتوز
پپتون
ریزوییدی
رنگیزه
پلیت کانت آگار
آگار خون دار
همولیز
محیط لیزین دکربوکسیلاز براث
لیزین
کادوارین
مانیتول سالت آگار
لاکتوز منفی
نمک صفراوی
سلنیت سدیم
مزور
لوپ
کشت دولایه
اندول استیک
کلروفرم
سوکروز
سوسپانسیون
روش مک فارلند
کروموژن منفی
قرمز کنگو
سودان سیاه
گروه کربوکسیل
فضای پری پلاسمیک

بتا ـ دی گالاکتوز
جلبک های دریایی
پرگنه
مضرس
دفیبرینه
نوترینت آگار
استافیلو کوکوس اورئوس
همولیزین
دکربوکسیله کردن
آلکالین آمین
مک کانگی آگار
لاکتوز مثبت
کریستال ویوله
سالمونلا
کالیبره
هیتر
آنس
هیدروژن سولفوره
کواکس
آنزیم تریپتوفاناز
سولفات آمونیوم فریک
کدورت سنجی
کلرید باریم
اسید پیریک
تولوئیدن بلو
اسید ریبونوکلئیک
هتروپلیمر اسید تیکوییک

رویکردهای آموزشی

باتوجه به فصل دوم، که در خصوص باکتری‌ها توضیح داده شده است، هنرجویان می‌توانند با تقسیم بندی موجودات بر مبنای یوکاریوتی و پروکاریوتی آشنا شوند. همچنین با ساختمان و ترکیب شیمیایی، تولید مثل، نحوهٔ رشد و اثرعوامل مختلف محیطی بر رشد آن‌ها،رنگ‌آمیزی، شناسایی باکتری‌ها و شمارش تعداد آن‌ها در محیط‌های مختلف آشنا شوند و با استفاده از این اطلاعات علائم بیماری‌هایی را که باکتری‌ها در دام وطیور ایجاد می‌کنند درک نمایند، همین طور نحوهٔ کشت آزمایشگاهی باکتری‌ها را یاد گیرند.

پیام‌های اصلی

دانشی و مهارتی

هنرجو:

- با مفهوم سلول‌های پروکاریوت و یوکاریوت در دنیای حیات آشنا می‌شود.
- با ساختمان باکتری و اجزای آن آشنا می‌شود.
- با تغذیه و تولید مثل باکتری‌ها آشنا می‌شود.
- با بیماری‌های مهم باکتریایی دام آشنا می‌شود.
- با انواع محیط‌های کشت باکتری‌ها آشنا می‌شود.
- چند محیط کشت باکتری را تهیه و رشد باکتری‌ها را بر روی آن‌ها بررسی می‌کند.
- با انواع رنگ‌ها و روش‌های رنگ‌آمیزی باکتری‌ها آشنا می‌شود.
- چند گسترهٔ باکتری را تهیه و با انجام رنگ‌آمیزی، آن‌ها را بررسی می‌کند.
- با انواع روش های شمارش باکتری‌ها آشنا می‌شود.
- تعداد باکتری‌ها را در یک نمونهٔ غذایی شمارش می‌کند.

نگرشی

هنرجو:

- با انجام دادن آزمایش و کار گروهی در آزمایشگاه میکروبیولوژی، روحیهٔ تحقیق و همکاری را در خود تقویت می‌کند.
- با انجام دادن آزمایش و کار گروهی درخصوص باکتری‌ها نسبت به محیط پیرامون خود کنجکاو می‌شود.

دانستنی‌های مورد نیاز هنرآموز

- هنرآموز با مطالعهٔ فصل دوم (بخش راهنمای هنرآموز) برای ارائهٔ بهتر مطالب کتاب به دانستنی‌های مورد نیاز دست می‌یابد.
- هنرآموز به علائم بیماری‌های باکتریایی در دام وطیور آشنا می‌شود.
- هنرآموز به چگونگی طرز کار عملی انواع کشت و تهیهٔ محیط کشت و رنگ‌آمیزی باکتری‌ها احاطهٔ کامل می‌یابد.

فعالیت‌های پیشنهادی

- هنرآموز می‌تواند با استفاده از اسلاید و پاورپوینت، هنرجویان را با علائم بیماری‌های باکتریایی در دام و طیور آشنا کند.
- هنرآموز می‌تواند کارهای عملی مربوط به رنگ‌آمیزی را به‌طور گروهی در بین هنرجویان در هر جلسه آزمایشگاه انجام دهد.

- هنرآموز می‌تواند در رده‌بندی باکتری‌ها، هنر جویان را جهت تهیهٔ پوستر آن‌ها تشویق کند.
- هنرآموز می‌تواند تفاوت های سلول یوکاریوت و پروکاریوت را از طریق تنظیم جدول و استفاده از آن ارائه دهد.
- هنرآموز می‌تواند با تهیهٔ فیلم‌های آموزشی طرز کشت باکتری در لوله یا خطی را به هنرجویان نمایش دهد.
- هنرآموز می‌تواند هنرجویان را به ایزوله‌کردن باکتری از خاک یا هوا یا ... در آزمایشگاه (به صورت یک فعالیت خارج کلاسی) تشویق کند.

موارد ارزش‌یابی

- هنرآموز می‌تواند از طریق امتحان کتبی یا شفاهی از هنرجویان در مورد سلول‌های پروکاریوت و یوکاریوت پرسش نماید.
- هنرآموز می‌تواند از ساختمان باکتری‌ها، تغذیه و تولیدمثل آن‌ها و بیماری‌هایی که عامل آن باکتری هستند پرسش نماید.
- هنرآموز می‌تواند از انواع محیط‌کشت، نحوهٔ تهیهٔ آن‌ها وانواع رنگ‌ها و رنگ‌آمیزی و تهیهٔ گسترش و نحوهٔ شمارش آن‌ها،آزمون عملی بگیرد.

یوکاریوت و پروکاریوت

واحد بنیادی حیات، سلول نام دارد. در کرهٔ خاکی تنها دو نوع سلول توسط کلیهٔ ارگانیسم‌های زنده تولید می‌شود. سلول‌های پروکاریوت دارای هستهٔ ابتدایی، و سلول‌های یوکاریوت دارای هستهٔ حقیقی و غشای هسته هستند. عبارت پروکاریوت مرکب از دو واژه پرو به معنی پیش و کاریوت به معنی هسته است. این عبارت برای سلولی به‌کار می‌رود که فاقد هسته و اندامک‌های محدود به غشاست. به‌طور کلی میکروبیولوژی دربارهٔ میکروارگانیسم‌های پروکاریوتی (باکتری و آرکی باکتر[1]) و میکروارگانیسم‌های یوکاریوتی (شامل جلبک‌ها، قارچ‌ها، پروتوزوئرها، گیاهان و جانوران) بحث می‌کند. این صفات اصلی، پروکاریوت‌ها را از یوکاریوت ها متمایز می‌سازد :

- پروکاریوت‌ها هسته ندارند. غشای هسته و هستک نیز ندارند و فقط دارای یک کروموزوم اصلی به صورت یک حلقهٔ منفردند.
- غشای سیتوپلاسمی واندامک های محدود به غشا، مانند میتوکندری، کلروپلاست و واکوئل، دستگاه گلژی، شبکهٔ آندوپلاسمی و لیزوزوم در پروکاریوت‌ها دیده نمی‌شود.
- ریبوزوم پروکاریوت‌ها ضریب رسوب ۷۰ s دارد که با نوع یوکاریوتی متفاوت است.
- در پروکاریوت‌ها تقسیمات میوزی و میتوزی وجود ندارد.
- بر خلاف پروکاریوت‌ها، فرآیندهای اندوسیتوز[2] و اگزوسیتوز[3] فقط در یوکاریوت ها انجام می‌شود.

اکثر محققان منشأ کلیهٔ موجودات زنده را از ساختاری بسیار ساده‌تر از پروکاریوت‌های امروزی یعنی پروژنوت[4] می‌دانندکه از آن‌ها سه خط تکاملی مستقل اشتقاق یافته و سبب پیدایش پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها شده است. این‌که پروکاریوت‌ها و یا یوکاریوت‌ها کدام یک زودتر بر روی کرهٔ زمین ظاهر شده‌اند، کاملاً مشخص نیست، اما مطالعات بر روی تفاوت‌های ژنتیکی بین یوباکترها، آرکی‌باکترها و یوکاریوت‌ها نشان می‌دهد که هر سه گروه از دنیای مشترکی مشتق شده‌اند (شکل ۱ــ۲). براساس تشابه توالی DNA[5]، به نظر می رسد که آرکی باکترها و یوکاریوت ها قبل از جداشدن از هم از باکتری‌ها منشعب شده اند.

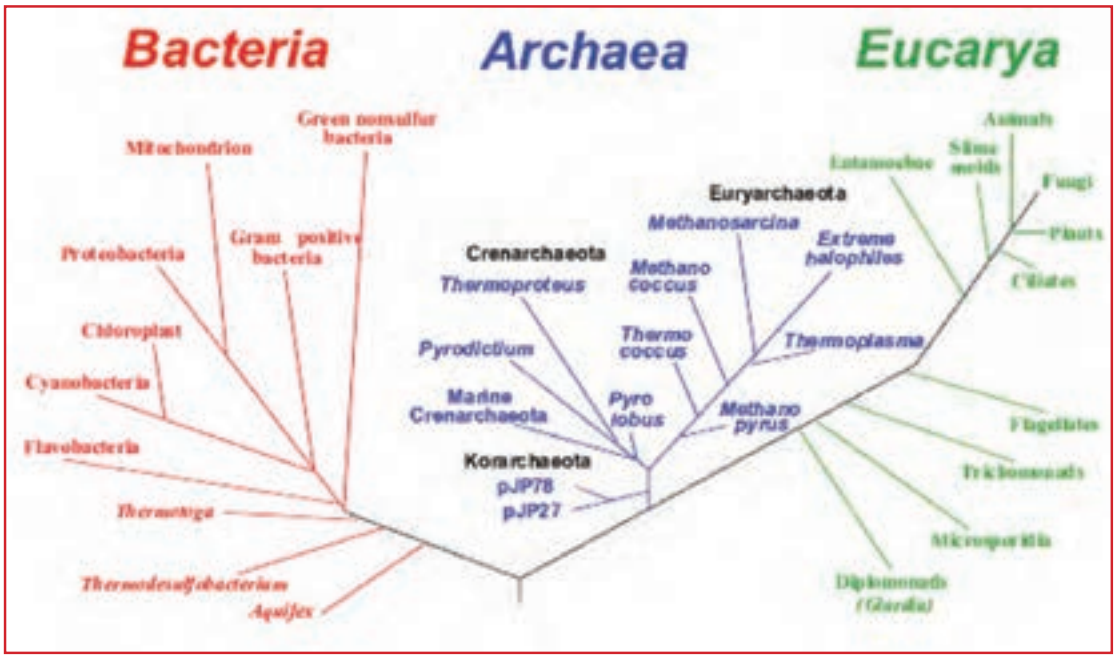
۱ــ Archaebacteria

۲ــ Endocytosis — فرایندی که در طی آن ذرات جامد یا مایع به یاخته وارد می‌شود.

۳ــ Exocytosis — فرایندی که در طی آن ذرات دفعی از یاخته خارج می‌شود.

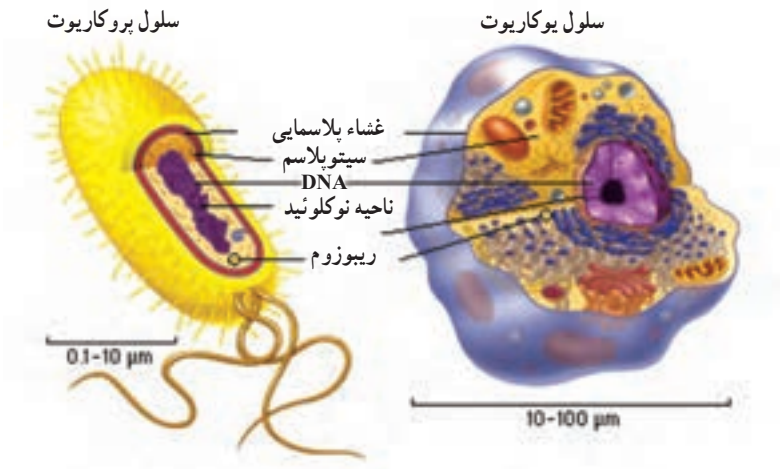
۴ــ Progenote

۵ــ Deoxyribonucleic acid — مولکول دو رشته ای که حاوی تمام اطلاعات ژنتیکی (صفات ارثی)است و تقریباً در همهٔ موجودات زنده این نقش را بر عهده دارد.



شکل ۱ــ۲ درخت فیلوژنی بیانگر ارتباط بین پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها

در سلول یوکاریوتی، مادهٔ ژنتیکی عمدتاً در هسته[۱] متمرکز است. بخش اندکی نیز درون اندامک‌های درون سلولی نظیر میتوکندری و کلروپلاست دیده می‌شود، درحالی‌که از نظر محتویات سلولی، باکتری‌ها سلول‌های ساده‌ای هستند (شکل ۲ــ۲). مادهٔ ژنتیکی سلول پروکاریوتی، که از لحاظ کمیت ۷۰۰ مرتبه کمتر از مادهٔ ژنتیکی نوع یوکاریوتی است، در ناحیهٔ شبه هسته‌ای موسوم به نوکلوئید[۲] متمرکز شده است. دو نوع سلولی پروکاریوتی و یوکاریوتی از لحاظ جنس وسیلهٔ حرکتی‌شان یعنی تاژه[۳] نیز متفاوت‌اند. به‌طوری‌که تاژه سلول یوکاریوتی عمدتاً از جنس پروتئین استوانه‌ای شکل میکروتوبول[۴] است. در حالی‌که تاژک سلول پروکاریوتی از جنس پروتئین فلاژلین[۵] است. فرآیندهای آندوسیتوز و اگزوسیتوز را فقط در انواع یوکاریوتی می‌توان یافت و پروکاریوت‌ها فاقد آن هستند.



شکل ۲ــ۲ شکل شماتیک سلول‌های پروکاریوت و یوکاریوت

۱ــ Nucleus ۲ــ Nucleoid ۳ــ Flagellum ۴ــ Microtubule ۵ــ Flagellin

باکتری

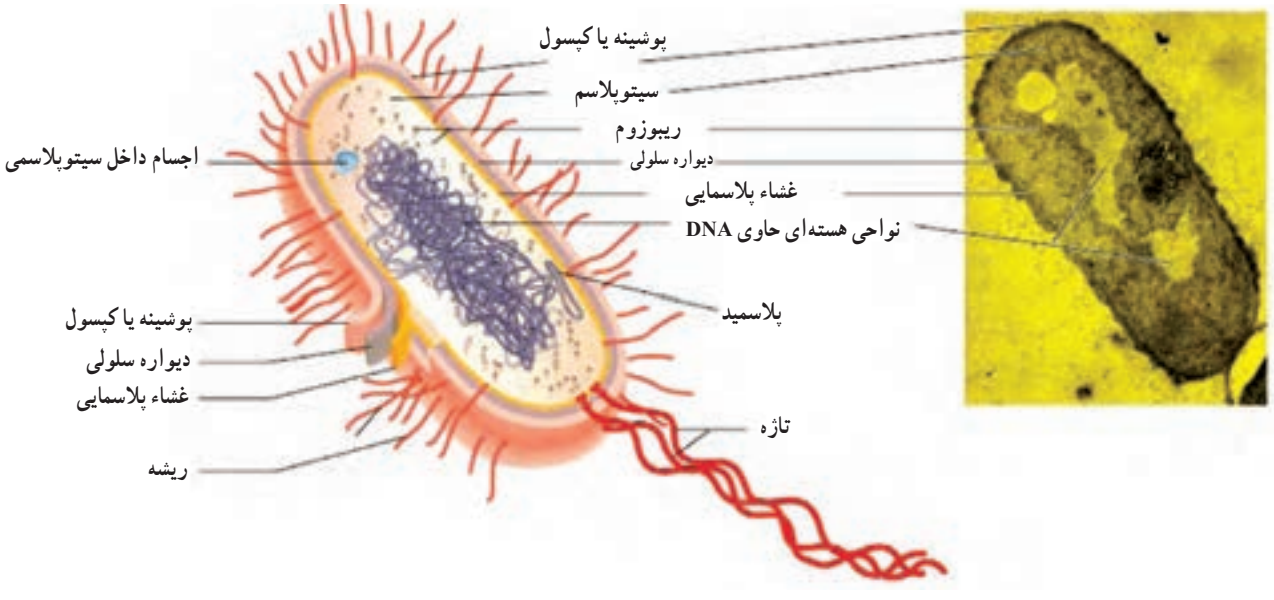
واژهٔ باکتری یعنی چه؟ باکتری از واژه ای یونانی به معنای میلهٔ کوچک گرفته شده است. باکتری‌ها متنوع‌ترین میکروارگانیسم‌ها هستند. تعداد کمی از آن‌ها برای انسان و حیوانات و گیاهان بیماری‌زاست. به‌طورکلی بدون فعالیت آن‌ها، حیات بر روی زمین مختل می‌شود، زیرا باکتری‌ها ساختمان ساده‌ای دارند و می‌توان به آسانی بسیاری از آن‌ها را در شرایط آزمایشگاه کشت داد. دربارهٔ نحوهٔ رشد و مرگ، متابولیسم، و ژنتیک آن‌ها تحقیقات گسترده‌ای انجام شده است. واحد اندازه گیری باکتری‌ها میکرون است، هر میکرون یک هزارم میلی‌متر است که به آن مو هم می‌گویند. باکتری‌ها حدود ۰/۱ تا ۱۰ میکرون طول دارند. مثلاً اندازهٔ باکتری‌های کروی شکل در حدود یک موست. طول باسیل سیاه زخم (باسیل شارین) حدود ۴ تا ۸ مو و ضخامت آن ۱ تا ۵ مو و طول باسیل سیاه سرفه ۱ تا ۵ مو و ضخامت آن ۰/۳ تا ۰/۵ موست.

ساختار باکتری

باکتری‌ها هستهٔ سازمان یافته ندارند، DNA و پروتئین‌های همراه آن‌ها درون ناحیهٔ نوکلئوتیدی قرار دارند و اجزای سلولی آن‌ها در سیتوپلاسم پراکنده‌اند. در واقع این شبکه فیبریلی و کروماتین مرکزی توسط سیتوپلاسم بی‌شکل حاوی ریبوزوم‌ها احاطه شده‌است. اجسام داخل[1] سیتوپلاسم یا گرانول‌های ذخیرهٔ انرژی، بسته به گونه‌های باکتری، ماهیت شیمیایی متفاوتی دارند ومقدار آن‌ها به مرحلهٔ رشد و محیط بستگی دارد. بعضی از ساختمان‌های سلولی از قبیل آندوسپورها فقط به تعداد کمی از باکتری‌ها محدود می‌شوند. کروموزم‌های غیرمشابه و جداگانه درآن‌ها وجود ندارد و در باکتری‌ها، واکوئل دیده نمی‌شود. بیشتر آن‌ها بدون کلروفیل هستند و متابولیسم [2] خود را از راه شیمیوسنتز انجام می‌دهند.

ساختار و اجزای ساختمانی باکتری‌ها (شکل ۳ــ۲) به شرح زیر است :

دیوارهٔ سلولی[3] : برخلاف سلول‌های جانوری و انسانی باکتری‌ها دارای دیوارهٔ سلولی هستند. دیوارهٔ سلولی پوشش خارجی

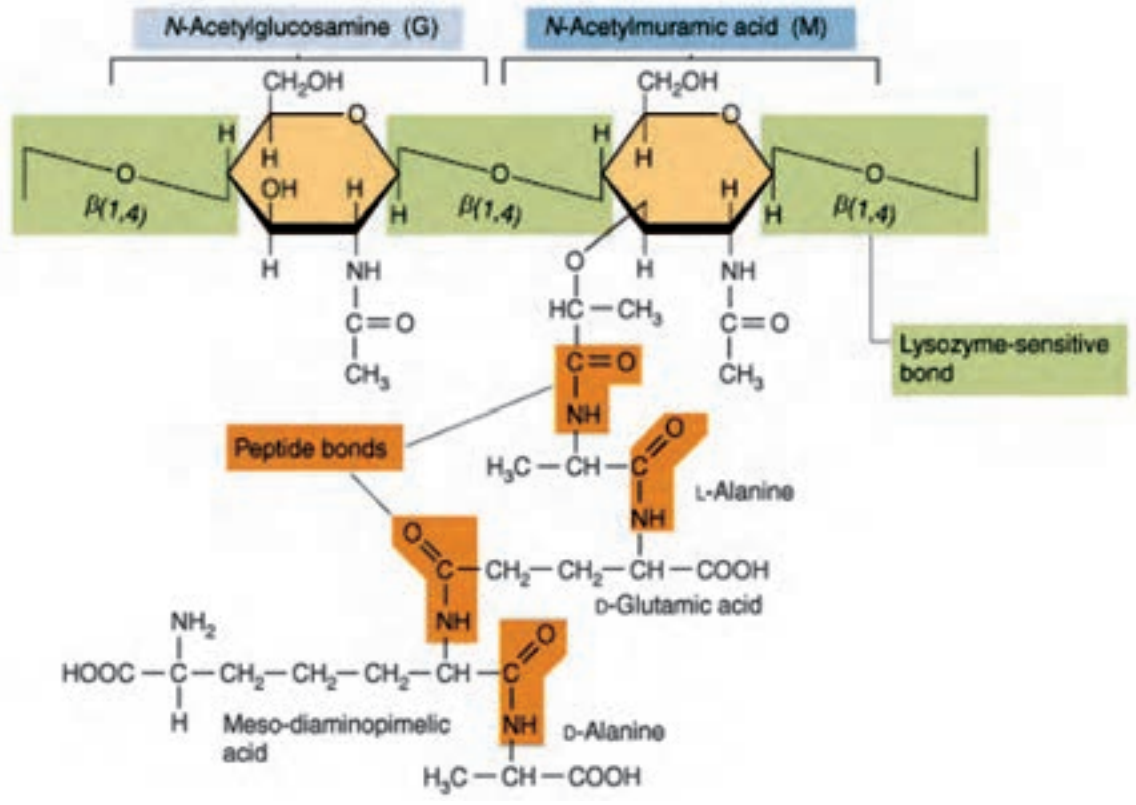


شکل ۳ــ۲ شکل شماتیک ساختارهای یک باکتری

۱ــ Inclusion body ۲ــ Metabolism ۳ــ Cell wall

محکم و سفتی است که شکل باکتری را حفظ می‌کند. به علاوه، پروتوپلاست (غشای سیتوپلاسمی و محتویات آن) را احاطه و از آسیب فیزیکی و شرایط کاهش فشار اسمزی محیط خارج حفاظت می‌کند و نقش مهمی در محافظت باکتری در برابر فشار اسمزی خارج سلولی دارد، این فشار باعث خارج شدن محتویات باکتری و در نهایت مرگ باکتری می‌شود. دیوارهٔ سلولی، باکتری سلول را در مقابل شرایط نامساعد محیطی محافظت می‌کند. محل اثر بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مانند پنی‌سیلین دیوارهٔ سلولی است. پنی‌سیلین با غیرفعال‌سازی آنزیم ترانس پپتیداز[1] از ساخته شدن اتصالات پپتیدی ممانعت می‌کند و به این ترتیب دیوارهٔ سلولی باکتری تشکیل نمی‌شود.

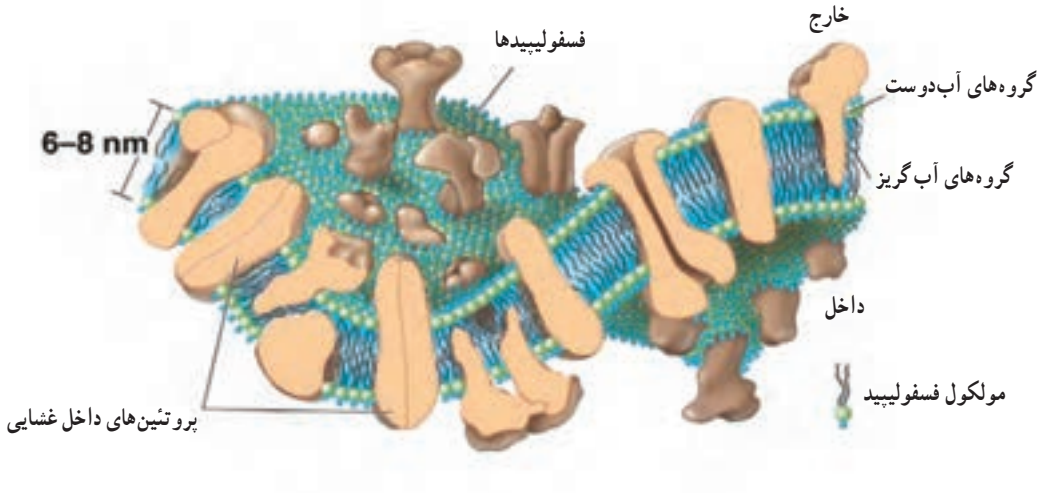
وجود دیواره برای رشد و تقسیم باکتری‌ها لازم است. در موقع تقسیم باکتری در سطح استوایی (وسط)، سلول باکتری به درون رشد می‌کند و دیوارهٔ عرضی تشکیل می‌دهد و سرانجام به جدا شدن و تشکیل دو سلول منجر می‌شود. در بسیاری از گونه‌های باکتری‌ها، سلول‌های جدید می‌توانند چسبیده به‌هم باقی بمانند و یک گروه تشکیل دهند. مثل استافیلوکوک‌ها که حالت خوشه‌ای دارند و یا استرپتوکوک ها که مثل دانه‌های تسبیح زنجیرهای بلند تشکیل می‌دهند. همچنین دیوارهٔ سلولی محل تجمع عوامل آنتی‌ژن است، که باکتری‌ها را توسط این آنتی ژن‌ها از هم تمیز می‌دهند. عمده خصوصیات آنتی ژنی باکتری از دیوارهٔ سلولی آن ناشی می‌شود. دیوارهٔ سلولی را می‌توان با وسایل به خصوصی از قبیل گلوله‌های شیشه‌ای و امواج اولتراسونیک[2] از سلول جدا کرد. جنس دیواره از مولکول هیبریدی موسوم به پپتیدوگلیکان[3] است. بخش قندی دیوارهٔ سلولی از واحدهای ان ــ استیل گلوکز آمین[4] و ان ــ استیل مورامیک اسید[5] تشکیل شده است (شکل ۴ــ۲). این واحدها رشته‌های پلیمری قندی ایجاد می‌کنند که با زنجیره‌های کوتاه پپتیدی به‌هم وصل می‌شوند.



شکل ۴ــ۲ بخش قندی مولکول پپتید وگلیکان در دیوارهٔ سلولی باکتری

۱ــ Transpeptidase ۲ــ Ultrasonic ۳ــ Peptidoglycan ۴ــ N ــ acetylglucosamine ۵ــ N ــ acetylmuramic acid

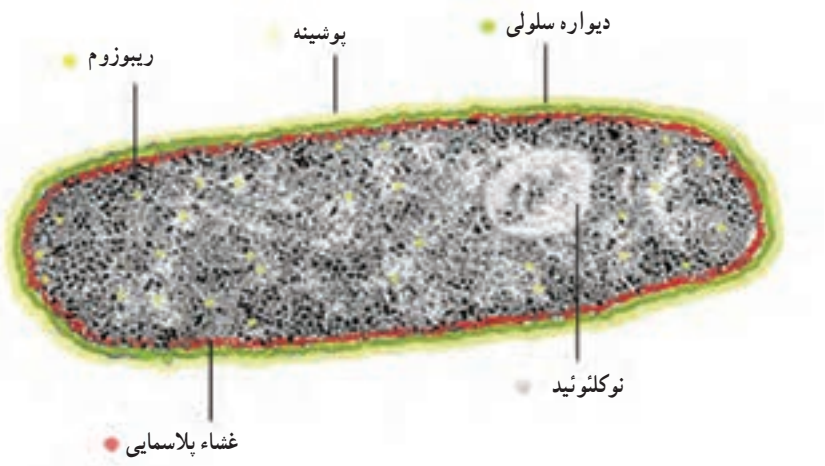
غشای سیتوپلاسمی[1] : غشای سیتوپلاسمی، غشای داخلی نیز نامیده می‌شود. غشای سیتوپلاسمی به صورت پردهٔ نازکی در داخل دیوارهٔ باکتری قرار دارد و متشکل از مولکول‌های چربی، فسفو لیپید و پروتئینی است (شکل ۵ــ۲). این غشا در پروکاریوت‌ها از غشای سیتوپلاسمی در یوکاریوت‌ها به سبب نداشتن استرول متمایز می‌شود. چین‌خوردگی‌های غشای سیتوپلاسمی به درون سلول، ساختارهای ویژه‌ای به نام مزوزوم[2] ایجاد می‌کند. کروموزوم‌های باکتری‌ها به مزوزوم‌ها متصل‌اند. غشا همچنین به‌صورت یک سد اسمزی برای سلول عمل می‌کند و دارای سیتوپلاسم انتقال دهنده برای مواد محلول است و انتقال تولیدات سلولی را در مقابل با محیط خارج سلولی تنظیم می‌کند. غشای سیتوپلاسمی سلول یوکاریوت و پروکاریوت تقریباً با همدیگر مشابه است. البته از لحاظ حضور لیپید و پروتئین و کربوهیدرات‌های خاص با همدیگر تفاوت‌هایی نیز دارند. منتها از لحاظ برهم‌کنش فیزیکی و شیمیایی مولکول‌های تشکیل‌دهنده با هم شباهت‌های زیاد دارند. غشا شامل دولایهٔ فسفولیپیدی همراه با پروتئین‌هاست، اما غشای سلول باکتری فاقد استرول است.



شکل ۵ــ۲ غشای سیتوپلاسمی باکتری متشکل از فسفولیپید و پروتئین. بخش‌های آب دوست و آب گریز مشخص شده‌اند.

هسته : هسته یا نوکلئوید سلول را می‌توان بعد از رنگ‌آمیزی اختصاصی با میکروسکوپ نوری مشاهده کرد. مادهٔ هسته‌ای باکتری‌ها شامل یک مولکول حلقوی DNA دو رشته‌ای است که کروموزوم اصلی نامیده شده و جایگاه عمدهٔ ژن‌های باکتری است و در حالت باز شده تقریباً یک میلی‌متر طول دارد. این مادهٔ هسته‌ای به طور متراکم درون باکتری و به درون مزوزوم فرورفته در غشای سیتوپلاسمی چسبیده، اما مثل سلول‌های یوکاریوت توسط غشای هسته احاطه نشده است (شکل ۶ــ۲). غالب باکتری‌ها علاوه بر کروموزوم اصلی، واجد یک یا چند DNA دو رشته‌ای و حلقوی کوچک آزاد موسوم به پلاسمید[3] هستند. ژن تار وگاه ژن مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک روی پلاسمید است. RNA [4] پروکاریوتی را به صورت rRNA[5]، mRNA[6] و tRNA[7] نشان می‌دهند. هرسه RNA پروکاریوتی به‌وسیلهٔ یک نوع RNA پلیمر نسخه‌برداری[8] می‌شوند. اطلاعات موجود در mRNA همزمان با نسخه‌برداری به پروتئین ترجمه می‌شود، در حالی که rRNA جزئی از تشکیلات ساختمانی ریبوزوم[9] یا ماشین ساخت پروتئین است و tRNA در انتقال اسید آمینه به ریبوزوم نقش دارد.

۱ــ Cytoplasmic membrane ۲ــ Mesosome ۳ــ Plasmid
۴ــ Ribonucleic acid مولکول تک رشته ایست که از روی DNA رونویسی می‌شود و به عنوان الگو برای ساختن پروتئین ها عمل می کند.
۵ــ Ribosomal RNA ۶ــ Messenger RNA ۷ــ Transfer RNA ۸ــ Transcription ۹ــ Ribosome

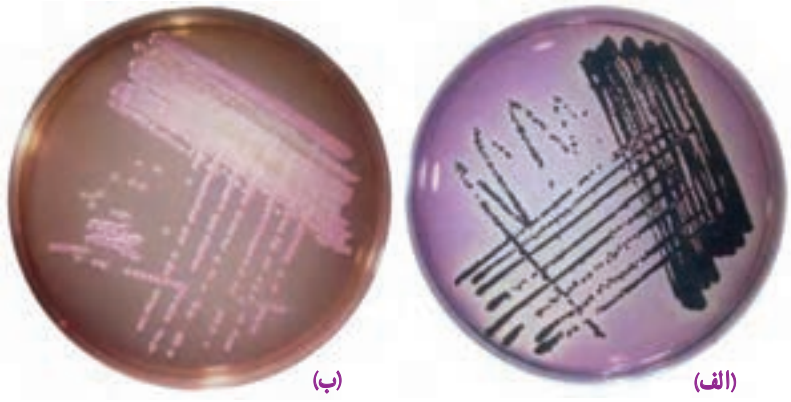


شکل ۶ــ۲ موقعیت هسته در سلول باکتری

سیتوپلاسم : بیش از ۵۰ درصد پروتئین سلول در سیتوپلاسم قرار دارد و آنزیم‌های متابولیسمی راه‌های گلیکولیز و بسیاری از آنزیم‌های چرخه کربس، انواع کاتالازها، دهیدروژنازها و مواد حد واسط چرخه‌های متابولیکی در سیتوپلاسم وجود دارد.

پوشینه یا کپسول : در بعضی از باکتری‌ها، غشای ضخیم ژلاتینی چسبناکی (گلیکوکالیکس)[۱] در خارج دیوارهٔ سلولی قرار داشته و دیواره اسکلتی را احاطه کرده است. کپسول توسط باکتری‌ها ساخته و به خارج ترشح می‌شود و جنس آن بیشتر از پلی‌ساکاریدهاست که در آب محلول و غیر یونی است. لایهٔ کپسول که ضخامت های متفاوت و چسبندگی متغیر دارد، به‌صورت یک سد اسمزی بین باکتری و محیط اطراف آن عمل می‌کند و در واقع نقش حفاظتی دارد.

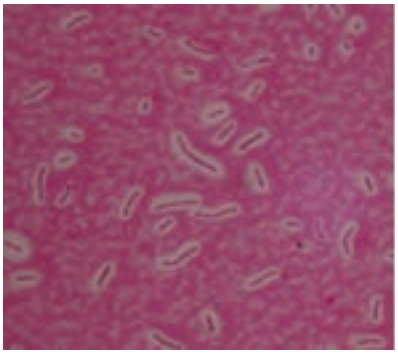
کپسول مانع از عمل بیگانه خواری گلبول‌های سفید می‌شود در تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا، کپسول باعث اتصال باکتری به سلول میزبان می‌شود و از این طریق، تهاجم به باکتری بیماری‌زا کمک می‌کند. قدرت بیماری‌زایی باکتری‌ها اغلب با تولید کپسول همراه است، به‌گونه‌ای که وجود کپسول شدت بیماری‌زایی و عفونت‌زایی را افزایش می‌دهد. مثلاً در باکتری *استرپتوکوکوس نومونیا*[۲] اگر توانایی تولید کپسول در باکتری از بین برود این باکتری غیر بیماری‌زا می‌شود. اگر باکتری قدرت کپسول‌سازی خودش را از دست بدهد، قدرت بیماری‌زایی خود را نیز از دست می‌دهد و در مقابل دستگاه ایمنی بدن میزبان مقاومتی نخواهد داشت. باکتری‌های کپسول‌دار در محیط جامد، کلنی‌های مخاطی[۳] یا صاف[۴] تولید می‌کنند. در مقابل، باکتری‌های فاقد کپسول کلنی‌های خشن[۵] دارند (شکل ۷ــ۲).

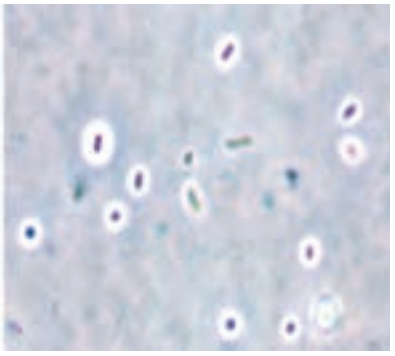


الف) کلنی خشن باکتری بدون کپسول
ب) کلنی صاف باکتری کپسول‌دار روی محیط کشت جامد
شکل ۷ــ۲

۱ــ Glycocalyx ۲ــ Streptococous ۳ــ Mucoid ۴ــ Smooth ۵ــ Rough

برخی از باکتری‌ها ماده‌ای ژله مانند و خارج سلولی به نام اسلایم[1] تولید می‌کنند که از کپسول به سطح سلول چسبیده و در آب محلول بسیار سست‌تر می‌باشد. برای مشاهدهٔ کپسول می‌توان از رنگ‌آمیزی منفی[2] استفاده کرد (شکل ۸ــ۲). به‌طورکلی در عمل رنگ‌آمیزی، شرط رنگ پذیری یک سلول، یونی بودن آن است. زیرا بین نواحی یونیزهٔ سطح سلول و اجزای یونیزهٔ مولکول‌های رنگ، پیوند به‌وجود می آید. در نتیجه بین بارهای مخالف موجود در سطح سلول و مولکول‌های رنگ پیوند یونی تشکیل می‌شود و باکتری رنگ می‌گیرد. چون کپسول ماهیت غیریونی دارد، نمی‌توان آن را رنگ‌آمیزی کرد.

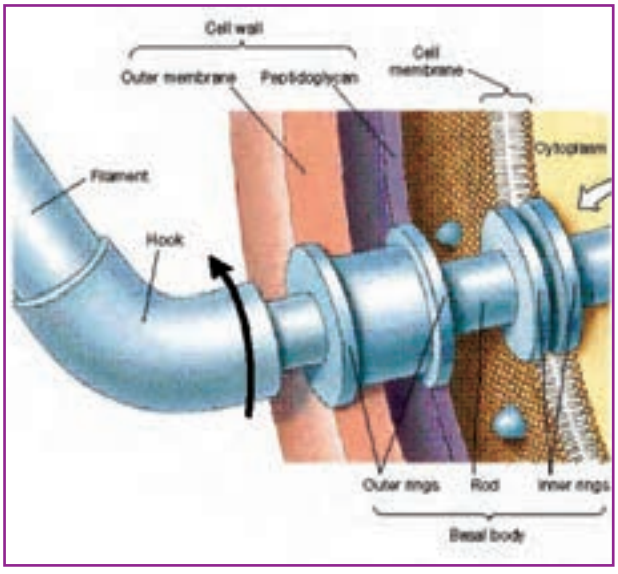




شکل ۸ــ۲ رنگ‌آمیزی کپسول

بنابراین برای مشاهدهٔ آن در زیر میکروسکوپ، زمینهٔ باکتری رنگ‌آمیزی می‌شود و در نتیجه، امکان دیدن کپسول باکتری به صورت هالهٔ شفاف و بی‌رنگ در اطراف سلول باکتری فراهم می‌گردد. در روش رنگ‌آمیزی منفی برای تثبیت گسترش از حرارت استفاده نمی‌شود. چون در اثر حرارت، باکتری احاطه شده با کپسول از شکل طبیعی خود خارج می‌شود.

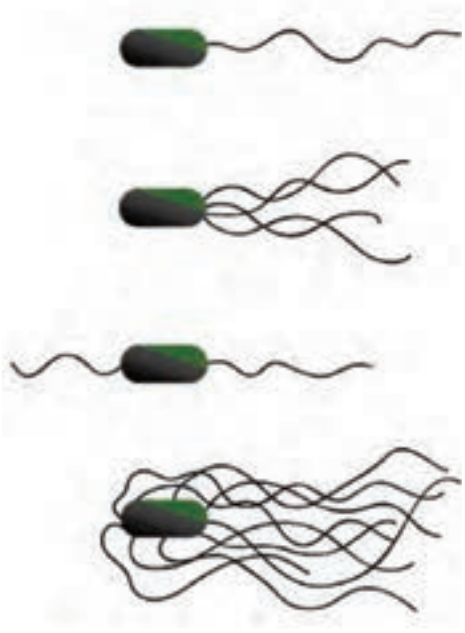
تاژه : حدود نیمی از باکتری‌های شناخته شده قادر به تحرک هستند. این‌ها دارای وسیلهٔ حرکتی هستند که تاژه خوانده می‌شود و معمولاً طول آن چند برابر طول باکتری است. تاژهٔ باکتری‌ها ۱۴ــ۳ میکرون طول و ۰/۰۲ میکرون قطر دارد. تاژه‌ها از سه قسمت رشته[3]، قلاب[4] و جسم پایه[5] تشکیل شده‌اند که پایه در غشای پلاسمایی قرار گرفته است (شکل ۹ــ۲). جسم پایه شامل حلقه‌های داخلی[6]، میله[7] و حلقه‌های خارجی[8] است. رشته‌های پروتئینی به طول و قطر یک‌سان از جنس فلاژلین ساخته شده‌اند. تاژهٔ باکتری به یک قلاب انعطاف‌پذیر وصل است که این قلاب نیز به پروتئین حلقوی متصل است و در نیمهٔ داخلی و خارجی غشای سیتوپلاسمی باکتری قرار دارد. چرخش این پروتئین های حلقوی باعث حرکت تاژه می‌شود.



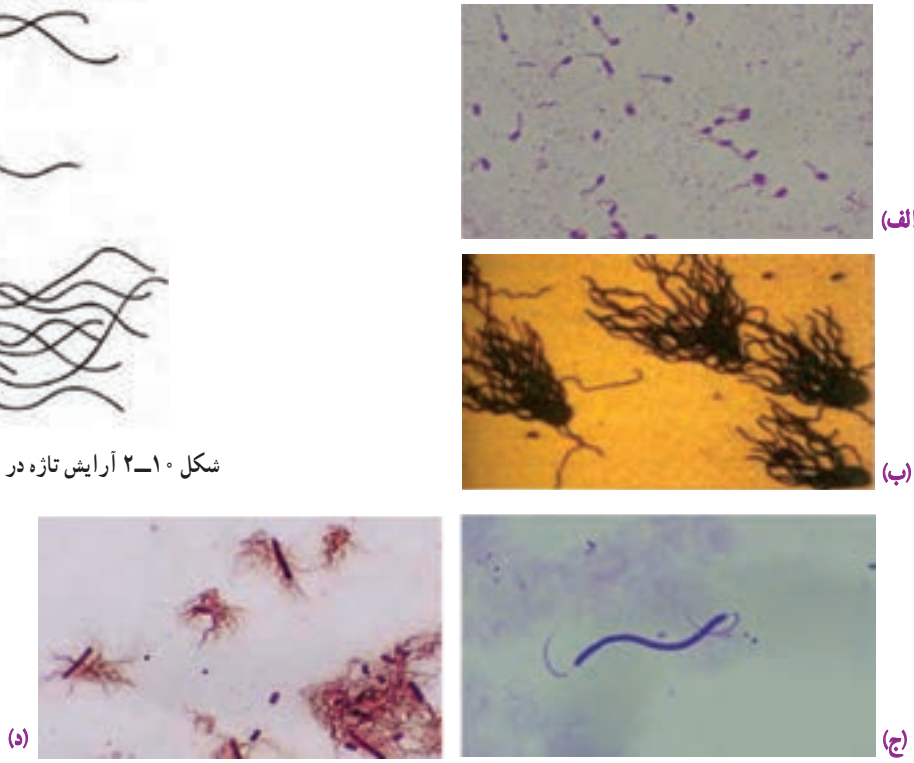
شکل ۹ــ۲ شکل شماتیک تاژه و اجزای آن

۱ــ Slime
۲ــ Negative staning
۳ــ Filament
۴ــ Hook
۵ــ Basal body
۶ــ Inner rings
۷ــ Rod
۸ــ Outer rings

آرایش تاژه در باکتری‌های تاژه‌دار به‌صورت تک تاژه[1]، یک دسته تاژه در یک انتها[2]، دو تاژه در دو انتها[3] و چند تاژه[4] است (شکل‌های ۱۰ــ۲ و ۱۱ــ۲)



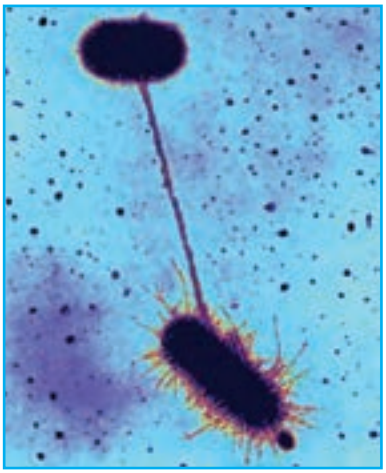
شکل ۱۰ــ۲ آرایش تاژه در باکتری‌های تاژه‌دار به صورت شماتیک



الف) تک تاژه ب) یک دسته تاژه در یک انتها ج) دو تاژه در دو انتها د) چند تاژه

شکل ۱۱ــ۲ آرایش تاژه در باکتری‌های تاژه‌دار در زیر میکروسکوپ

تار[5] : در لاتین به معنی موست و از تاژه مستقیم‌تر، نازک‌تر و کوتاه‌تر است و در عمل تحرک بی‌تأثیر است. تارلولهٔ پروتئینی توخالی است که از زیر واحدهای پروتئینی موسوم به پیلین[6] تشکیل شده است. باکتری‌ها اغلب واجد دو نوع تار کوتاه[7] و بلند هستند. تار کوتاه (چسبنده[8]) در اتصال باکتری به یک سطح نقش دارد. تار بلند (تار جنسی[9]) که تار F هم نامیده می‌شود در انتقال مادهٔ ژنتیکی از یک باکتری به باکتری دیگر، که همان فرآیند ادغام جنسی یا درآمیختگی[10] است، دخالت دارد (شکل ۱۲ــ۲). ژن تار اغلب روی پلاسمید باکتری است و پلاسمیدی را که واجد ژن تار است فاکتورF می‌نامند. باکتری



شکل ۱۲ــ۲ تار جنسی در فرآیند درآمیختگی جنسی بین دو باکتری

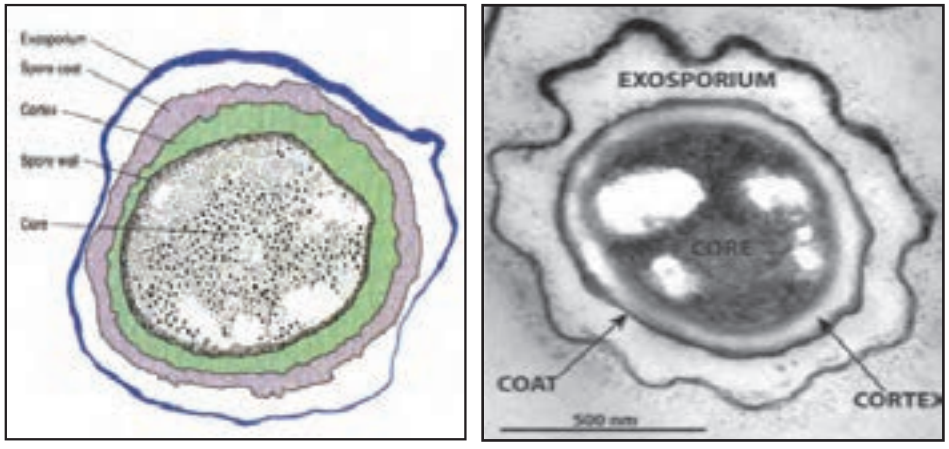
۱ــ Monotrichous ۲ــ Lophotrichous ۳ــ Amphitrichous ۴ــ Peritrichous ۵ــ Pili

۶ــ Pillin ۷ــ Fimberia ۸ــ Adhesion ۹ــ Sexual ۱۰ــ Conjugation

واجد ژن تار را F+ یا باکتری نر[1]، و باکتری فاقد ژن تار را به‌صورت F− یا باکتری ماده[2] نشان می‌دهند.

مزوزوم‌ها : از فرورفتگی غشای سیتوپلاسمی به درون سیتوپلاسم حاصل می‌شود و اغلب در محل تقسیم دیواره وجود دارند و در عمل تقسیم DNA و تقسیم سلولی دخالت می‌کنند. مزوزوم‌ها در باکتری‌های گرم مثبت به مراتب بیشتر از باکتری‌های گرم منفی دیده می‌شوند. مزوزوم‌ها در باکتری‌های گرم مثبت در تقسیم کروموزمی و نیز در در متابولیسم سلولی نقش دارند.

اسپور[3] (هاگ درونی) : اجسامی کوچک و از نظر متابولیکی غیر فعال و دارای دیواره‌ای ضخیم‌اند (شکل ۱۳ــ۲) و توسط غشای سیتوپلاسمی باکتری‌های جنس باسیلوس (مانند باسیلوس آنتراسیس[4] مولد بیماری سیاه زخم) و جنس کلستریدیوم (مانند کلستریدیوم تتانی[5] مولد بیماری کزاز) ساخته می‌شوند. اغلب باکتری‌ها در محیطی بیشتر زنده می‌مانند که علاوه بر دارا بودن منابع غذایی، گرم و مرطوب باشد، در غیر این صورت از بین می‌روند، اما بعضی از باکتری‌ها در شرایط نامساعد اسپور می‌سازند. اسپور پوسته‌ای سخت است که در داخل دیوارهٔ باکتری تشکیل می‌شود. مواد سلولی باکتری در داخل این پوسته محفوظ می‌ماند. اسپور در مقابل شرایط نامساعد محیطی بسیار مقاوم است و در محیط‌های خشک، محیط‌های دارای مواد ضد عفونی کننده و در آب جوش به مدت چندین ساعت زنده می‌ماند. محل قرار گرفتن اسپورها در درون باکتری‌ها متفاوت است ولی در هر گونهٔ باکتری این محل ثابت است. اسپورها می‌توانند برای دوره‌های طولانی در سرمای انجماد و یا در شرایط بسیار خشک غیر فعال باقی بمانند و در صورت مساعد شدن محیط فعال شوند.



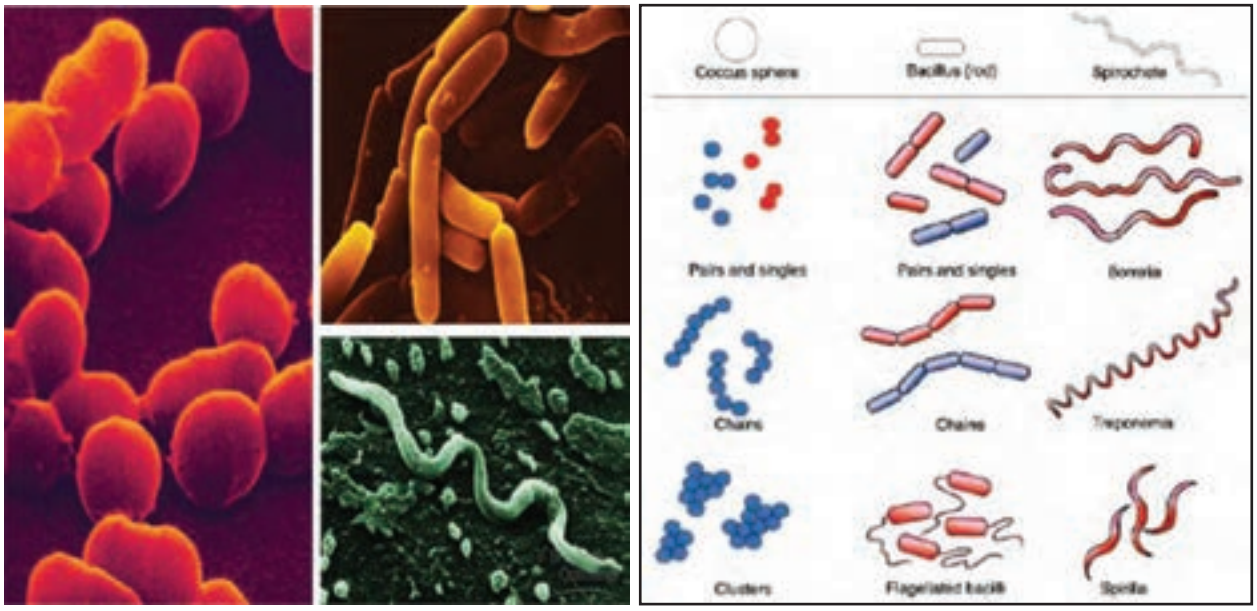
شکل ۱۳ــ۲ اسپور باکتری و اجزای آن

باکتری‌ها از نظر شکل به شش گروه گرد، دراز، خمیده، مارپیچی، فنری و منشعب تقسیم می‌شوند. پنج گروه اول را باکتری‌های پست و گروه ششم را باکتری‌های عالی گویند.

باکتری‌های پست

این باکتری‌ها تک یاخته‌ای هستند. اگر کروی یا بیضوی باشند، کوکوس؛ اگر میله‌ای شکل یا دراز باشند، باسیل؛ اگر خمیده باشند، ویبریون و چنان‌چه مارپیچی شکل و غیرقابل انعطاف باشند، اسپریل و اگر فنری و قابل انعطاف باشند،اسپیروکت نامیده می‌شوند (شکل ۱۴ــ۲).

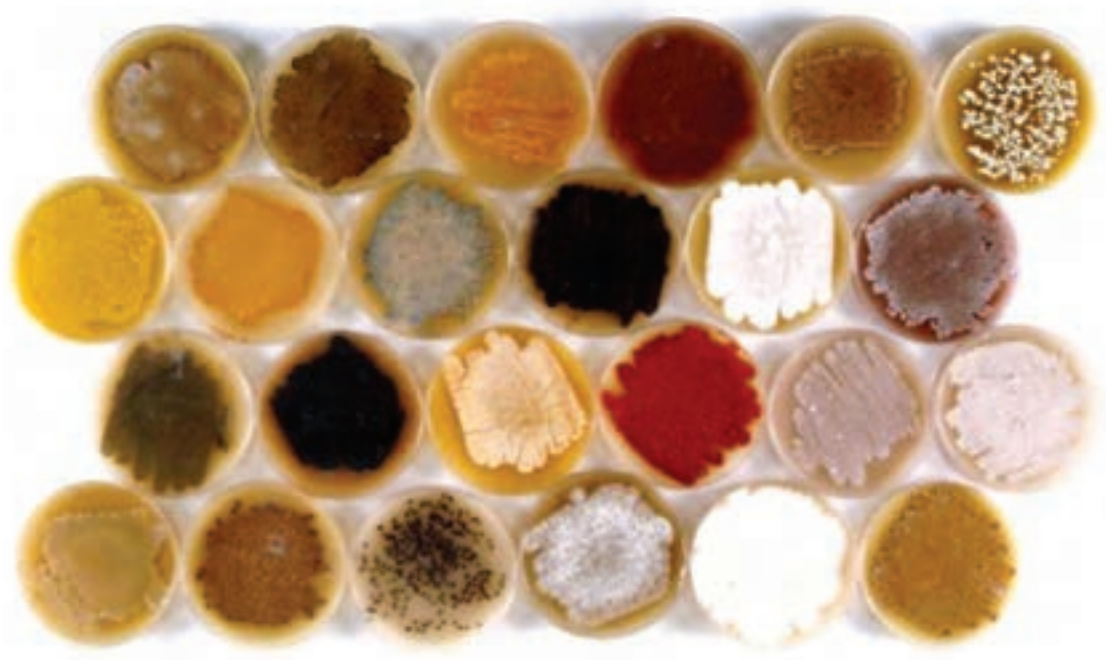
۱ــ Male ۲ــ Female ۳ــ Spore ۴ــ Bacillus anthracis ۵ــ Clostridium tetani



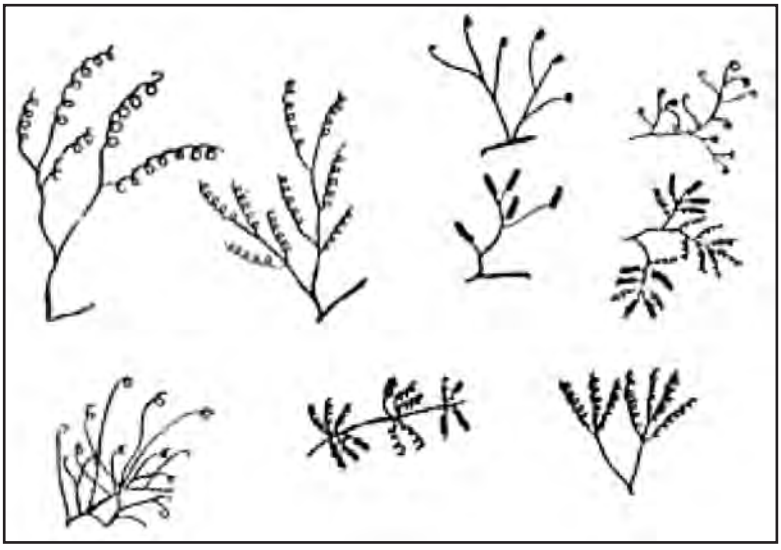
شکل ۱۴ــ۲ اشکال کوکوس، باسیل و اسپریل باکتری‌ها

باکتری‌های عالی یا رشته‌ای

این باکتری‌ها رشته مانند و بیشتر غلاف‌دارند و اغلب شاخه‌های حقیقی ایجاد می‌کنند و میسلیوم تشکیل می‌دهند و چون تشکیلات منشعب ایجاد می‌کنند، اکتینومیست نامیده می‌شوند. کلنی اکتینومیست‌ها واجد رنگدانه‌های مختلف است و معمولاً در محیط‌های کشت حاوی پروتئین، رنگدانه‌های قابل حل ارغوانی و قهوه‌ای رنگ ایجاد می‌کنند (شکل ۱۵ــ۲).



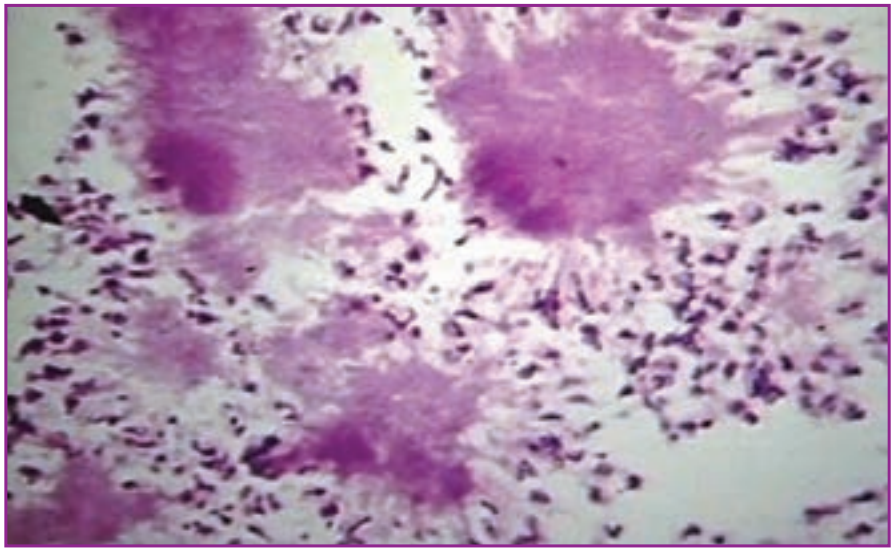
شکل ۱۵ــ۲ رنگدانه‌های ایجاد شده توسط باکتری اکتینومیست بر روی محیط کشت



شکل ۱۶ــ۲ انواع میسلیوم در باکتری‌های رشته‌ای

اکتینومیست‌ها باکتری‌های گرم مثبتی هستند که در راستهٔ اکتینومیستال وابسته به باکتری‌های گروه کورینه فرم قرار می‌گیرند. این باکتری‌ها در بافت و در محیط‌های کشت، سلول‌های کشیده و رشته مانند صاف یا مواج ایجاد می‌نمایند که تا حدود یک میکرومتر قطر دارند و ممکن است یک شاخه‌ای یا دو شاخه‌ای باشند و گاهی در سطح محیط کشت، رشدی مشابه میسلیوم‌های هوایی دارند. رشته‌ها از طریق قطعه قطعه شدن به اجسام کوکسی، باسیلی و یا هر دو شکل تقسیم می‌شوند (شکل ۱۶ــ۲). اسپورهای حاصله ممکن است منفرد، خوشه‌ای یا زنجیره‌ای باشند و یا درون یک اسپورانژیوم تولیدشوند.

اکتینومیست‌ها در بافت، دانه یا گرانول گوگردی ایجاد می‌کنند (شکل ۱۷ــ۲)، که در واقع میکروکلنی ارگانیسم در بافت محسوب می‌شود. دانه‌های گوگردی مربوط به آن‌ها به‌خوبی با هماتوکسیلین ــ ائوزین[۱]، و نقره متنامین[۲] رنگ‌آمیزی می‌شوند. این ارگانیسم‌ها واجد آنزیم‌هایی هستند که باعث مرگ باکتری‌ها و برخی از قارچ‌ها می‌شوند. با توجه به این خصوصیت، در تهیهٔ آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از این ارگانیسم‌ها استفاده شده است. بیماری حاصله از اکتینومیست‌ها مزمن است و مانند سایر بیماری‌های باکتریایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها حساس و نسبت به داروهای ضدقارچی مقاوم هستند. به علت شباهت ضایعات حاصله از اکتینومیست‌ها با ضایعات قارچی، این بیماری‌ها را در قسمت مربوط به بیماری‌های قارچی مورد مطالعه قرار می‌دهند.



شکل ۱۷ــ۲ اجسام کوکسی و باسیلی شکل گرم مثبت اکتینومیست در یک گرانول گوگردی

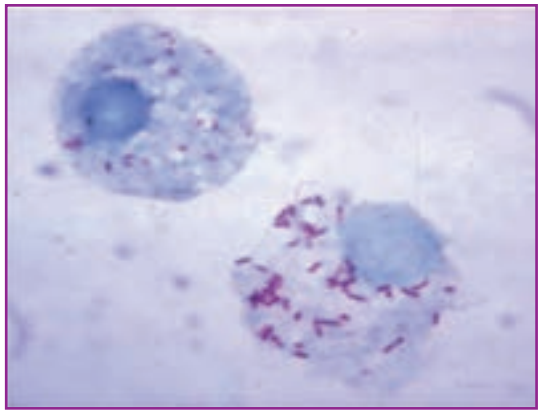
۱ــ Hematoxilin ــ eosin ۲ــ Silver metenamine

دستهٔ دیگر پروکاریوت‌ها آرکی باکترها هستند. باکترها دارای DNA تک رشته‌ای فاقد اگزون[1] و اینترون[2] هستند ولی آرکی‌باکترها نواحی اینترون و اگزون دارند. آرکی باکترها از نظر میکروسکوپی شبیه باکترها هستند، اما از نظر ترکیب شیمیایی و فعالیت‌های حیاتی بسیار با هم تفاوت دارند. بسیاری از آرکی باکترها در شرایط نامعمول و بسیار سخت محیطی[3] مانند دمای بالا، غلظت بالای نمک، و یا pH پایین توانایی ادامهٔ حیات دارند. عده‌ای از آن‌ها دارای فعالیت شیمیایی منحصر به‌فردند و گاز متان از CO_2 و H_2 تولید می‌کنند. آرکی باکترها شامل گروه‌های عمدهٔ زیرند : ۱ــ متان زا[4] (در سیستم های صنعتی برای تبدیل مواد زاید به سوخت مفید اهمیت دارند) ۲ــ احیا کنندهٔ سولفات ۳ــ نمک دوست[5] (یک نمونه از این میکروارگانیسم‌ها در بلور نمک یافت شده است که بیش از ۲/۳ میلیون سال عمر دارد) ۴ــ به شدت گرما دوست و احیا کنندهٔ گوگرد ۵ــ فاقد دیوارهٔ سلولی.

در سال ۱۹۸۱ آرکی باکترهای گرما دوست[6] از چشمه‌های آب گرم کف اقیانوس‌ها به دست آمدند که قادر به رشد در حرارت ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد بودند. در فاصله‌ای کم‌تر از یک سال، میکروبی درکف اقیانوس کشف شد که در ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کرد. این درجهٔ حرارت به اندازه‌ای است که کاغذ را خود به‌خود و بدون دخالت شعله، مشتعل می‌سازد. قرار گرفتن یک ارگانیسم در دمای زیاد به این معنی که سیتوپلاسم به جوش می‌آید، پروتئین‌ها کیفیت طبیعی خود را از دست می‌دهند، DNA به رشته‌ای جداگانه تفکیک می‌شود و در ساختمان و وظایف چربی‌ها اختلال ایجاد می‌شود در نتیجه سلول از بین می‌رود. این امر را در مورد آرکی باکترها چگونه می‌توان توجیه کرد؟ بخشی از پاسخ را می‌توان مرتبط با عمقی دانست که این میکروارگانیسم زندگی می‌کند. آب در عمق ۲۵ هزار متری که محل رشد و زندگی آرکی باکترهای گرما دوست است در ۲۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد هم به جوش نمی آید و بنابراین سیتوپلاسم سلولی به جوش نمی‌آید. در برخی از این میکروارگانیسم‌ها آنزیم‌هایی با عملکرد مشابه انواع باکتری‌ها یافت می‌شوند که با اندکی تفاوت در ساختار و توالی اسید آمینه‌هایشان می‌توانند حرارت‌های بالاتری را تحمل کنند. ساختمان مولکولی غشا و نحوهٔ قرار گرفتن چربی‌های آن در میکروارگانیسم‌های به شدت گرما دوست[7] به طریقی است که مقاومت آن را نسبت به حرارت زیاد می‌کند.

رشد در باکتری‌ها

اغلب باکتری‌ها درمحیط کشت مصنوعی رشد می‌کنند، در عین حال هنوز نتوانسته‌اند بعضی باکتری‌ها مانند مایکوباکتریوم لپره[8] (عامل بیماری جذام) و ترپونما پالیدوم[9] (عامل بیماری سفلیس) را در محیط مصنوعی رشد دهند. برخی دیگر از باکتری‌ها مثل ریکتسیا[10] (عامل تیفوس) و کلامیدیا[11] (عامل بیماری مقاربتی و تراخم) فقط درون سلول‌های میزبان تکثیر شده (شکل ۱۸ــ۲) و در محیط کشت حاوی سلول رشد می‌کنند.



شکل ۱۸ــ۲ اشکال باکتری ریکتسیا به رنگ ارغوانی درون سلول دیده می‌شوند.

قطعاتی از ژن هستند که رونوشت آن‌ها توسط RNA برای ساخت پروتئین به اندامک ساخت پروتئین منتقل می‌شود. ۱ــ Exon

۲ــ Intron

قطعاتی از ژن‌های کد کننده پروتئین هستند که از RNA رونویسی شده جدا می‌شوند و برعکس اگزون هستند یعنی از آن‌ها در تولید پروتئین استفاده نمی‌شود.

۳ــ Extreme ۴ــ Methanogen ۵ــ Halophile ۶ــ Thermopile ۷ــ Hyperthermophile

۸ــ Mycobacterium lepra ۹ــ Treponema palidum ۱۰ــ Rikettsia ۱۱ــ Chlamydia

رشد تصاعدی و زمان تقسیم در باکتری‌ها

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. زمان لازم برای دو برابر شدن تعداد مشخصی باکتری، زمان تقسیم نامیده می‌شود. بیشتر باکتری‌ها در فاصلهٔ ۲۰ دقیقه به حداکثر رشد خود می‌رسند و قادر به تولید مثل می‌شوند. تکثیر باکتری‌ها به طور معمول از راه تقسیم دوتایی صورت می‌گیرد (شکل ۱۹ــ۲) و چگونگی افزایش آن‌ها تابع تصاعد هندسی است.

الف) در باکتری‌های باسیلی ب) در باکتری‌های کوکسی شکل

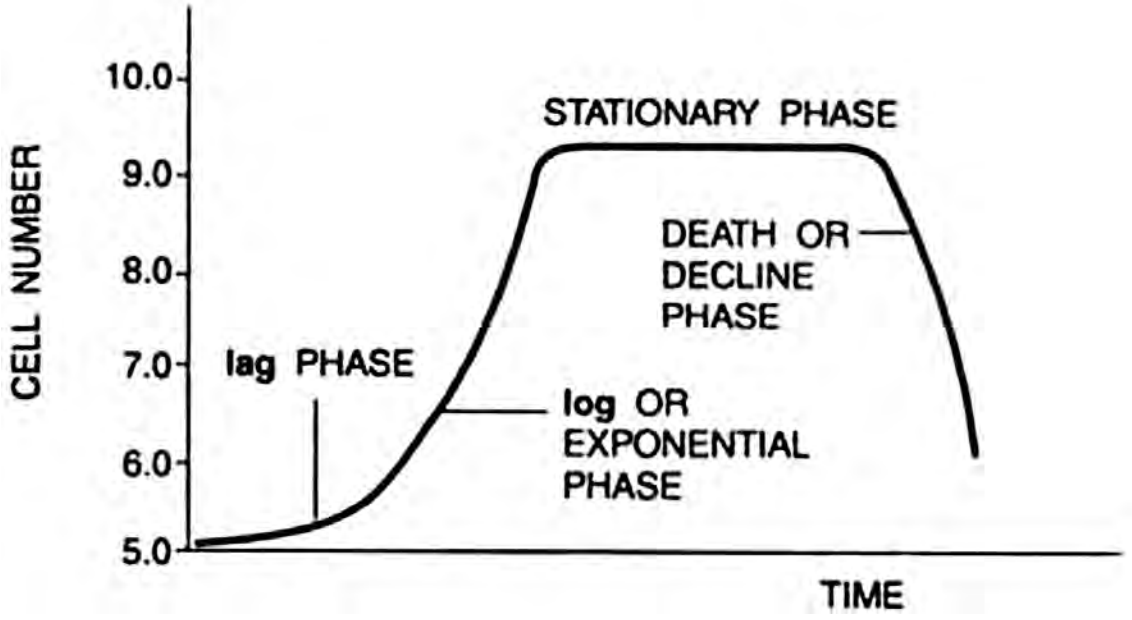
شکل ۱۹ــ۲ تقسیم دوتایی

در شرایط محیطی مناسب، یک باکتری بعد از بیست دقیقه به دو باکتری تبدیل می‌شود. بیست دقیقه بعد، از آن چهار باکتری به وجود می‌آید و به همین ترتیب تعداد باکتری‌ها به ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶ و... می‌رسد. اگر روش تکثیر باکتری‌ها تا ۲۴ ساعت ادامه یابد، از یک باکتری، توده‌ای به وزن دو هزار تن به وجود خواهد آمد. این چنین تعداد یاخته‌ها با سرعت شگفت‌آوری افزایش می‌یابد؛ بنابراین هر نسل دارای دو برابر تعداد یاخته‌های نسل پیشین است و به هنگام رشد فعال، نرخ افزایش جمعیت میکروبی به صورت نمایی است. شمارهٔ باکتری‌ها در هر مقطعی از زمان بستگی به تعداد اولیهٔ جمعیت و شمارهٔ نسل‌های به‌وجود آمده دارد. این رابطه با فرمول $B_f = Bi \times 2^n$ نمایش داده می‌شود که در آن Bf شمارهٔ نهایی باکتری‌ها، Bi تعداد اولیهٔ جمعیت و n شمارهٔ تعداد نسل‌هاست.

طول زمانی را که تعداد جمعیت دو برابر می‌شود، زمان مضاعف شدن[۱] گویند. تعیین زمان مضاعف با استفاده از فرمول $G = t/3.3\log_2(b/B)$ صورت می‌گیرد. در این فرمول G زمان مضاعف شدن، t طول زمانی که شمارهٔ یاخته از نقطهٔ B مرحلهٔ لگاریتمی به نقطهٔ b می‌رسد، B جمعیت اولیه، b جمعیت پس از زمان t که بر مبنای $\log_2$ محاسبه می‌شود. ۳/۳ عامل تبدیل $\log_2$ به $\log_{10}$ است. زمان مضاعف شدن معمولاً تحت شرایط ثابت فیزیکی و شیمیایی برای هر باکتری ثابت است. رشد لگاریتمی میکروب‌ها تا هنگامی ادامه خواهد یافت که مواد غذایی در محیط وجود داشته باشد و از تجمع مواد زاید و سمی حاصل از دگرگشت به گونه‌ای جلوگیری شود. در صورت برقرار نبودن شرایط فوق میزان رشد باکتری رو به کاهش می‌گذارد و منحنی عمومی رشد دارای چهار مرحلهٔ وقفه، رشد نمایی، رشد ثابت و مرگ ایجاد خواهد شد (نمودار ۱ــ۲).

در عمل، باکتری‌هایی که دارای خواص یک‌سانی باشند به‌ندرت یافت می‌شوند. حتی باکتری‌هایی که از یک سلول منشأ می‌گیرند ممکن است از نظر یک یا چند صفت با یکدیگر متفاوت باشند. این تفاوت ها نتیجهٔ تغییراتی است که به علت جهش[۲] ژنی در سلول‌های باکتری پدید می‌آیند. این باکتری‌ها جهش یافته[۳]، نامیده می‌شوند که از نظر بعضی از خواص نظیر ساختمان آنتی‌ژن، حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها وغیره با سایر باکتری‌های مشابه اختلاف دارند. سهولت تغییرپذیری در باکتری‌ها مربوط به سرعت تقسیم آن‌هاست.

۱ــ Duplicated time ۲ــ Mutation ۳ــ Mutant



نمودار ۱ــ ۲ منحنی رشد در باکتری

زمان تقسیم یا مدت زمانی که برای تولید یک سلول جدید در باکتری‌ها لازم است، حدود بیست دقیقه و درمورد انسان بیست سال است. مثلاً یک سلول باکتری در مدت ۱۸ ساعت ۵۴ نسل به‌وجود می‌آورد. درحالی‌که برای ایجاد همین تعداد نسل انسان بیش از یک هزار سال زمان لازم است. پس جهش ژنی در باکتری‌ها نسبت به موجودات عالی خیلی سریع و قابل ملاحظه است.

عوامل مورد نیاز در رشد باکتری‌ها

بیشتر باکتری‌ها نمی‌توانند مانند سلول‌های گیاهان سبز غذاسازی کنند. بنابراین باید غذای آماده شده را از محیط خود بگیرند. بعضی از باکتری‌ها غذای خود را از مواد بی‌جان مانند گوشت، شیر، موادقندی و سایر فرآورده‌های غذایی ما و نیز از اجساد جانداران می‌گیرند. این قبیل باکتری‌ها ساپروفیت هستند. باکتری‌های ساپروفیت یکی از علل اصلی فاسد شدن مواد غذایی هستند. اما اگر غذای باکتری از بدن گیاه یا جانور زنده تأمین شود، باکتری انگل خواهد بود. بیشتر بیماری‌های واگیر را همین گروه از باکتری‌ها ایجاد می‌کنند. باکتری‌ها آنزیم‌های پرقدرتی می‌سازند که در درون سلول یا بیرون از آن می‌توانند ترکیبات غذایی را تجزیه کنند و مواد لازم برای سلول آن‌ها را فراهم سازند.

عناصر اصلی مورد نیاز برای تغذیه باکتری‌ها عبارت‌اند از :

ــ عناصر اصلی شامل کربن، اکسیژن، هیدروژن و فسفر

ــ عناصر جزئی شامل سولفور، پتاسیم، منیزیم، کلسیم و گلیسرین

ــ عناصر فیزیولوژیک شامل آهن، منگنز، مس، روی و آلومینیوم

ــ فاکتورهای رشد شامل ویتامین‌ها، آمینواسیدها و مقداری مواد شکل یافتهٔ دیگر که برای ترکیب اسیدهای آمینه و سایر سازه‌ها به‌کار می‌روند.

کربن : باکتری‌ها برحسب نوع ترکیباتی که به‌صورت منبع کربن استفاده می‌کنند به دوگروه اصلی باکتری‌های اتوتروف[۱] (خودخوار)

۱ــ Autotroph

و هِتروتروف[1] (دیگر خوار) طبقه‌بندی می‌شوند. باکتری‌های اتوتروف کربن معدنی را از دی‌اکسیدکربن و نیتروژن را از آمونیاک، نیترات‌ها و نیتریت‌ها به‌دست می‌آورند. این باکتری‌ها از نظر پزشکی اهمیت چندانی ندارند. باکتری‌های هتروتروف به ترکیبات آلی به‌صورت منبع اصلی کربن و انرژی نیاز دارند. اغلب باکتری‌های مهم پزشکی هتروتروف هستند.

اکسیژن : باکتری‌ها بر حسب نیاز به اکسیژن به چهار گروه طبقه بندی می‌شوند.

۱ــ هوازی اجباری[2] : فقط در حضور اکسیژن رشد می‌کنند، مانند سودوموناس آئروژینوزا[3].

۲ــ میکروآئروفیل[4] : در غلظت کم اکسیژن بهتر رشد می‌کنند، مانند کمپیلوباکتر ژژونی[5].

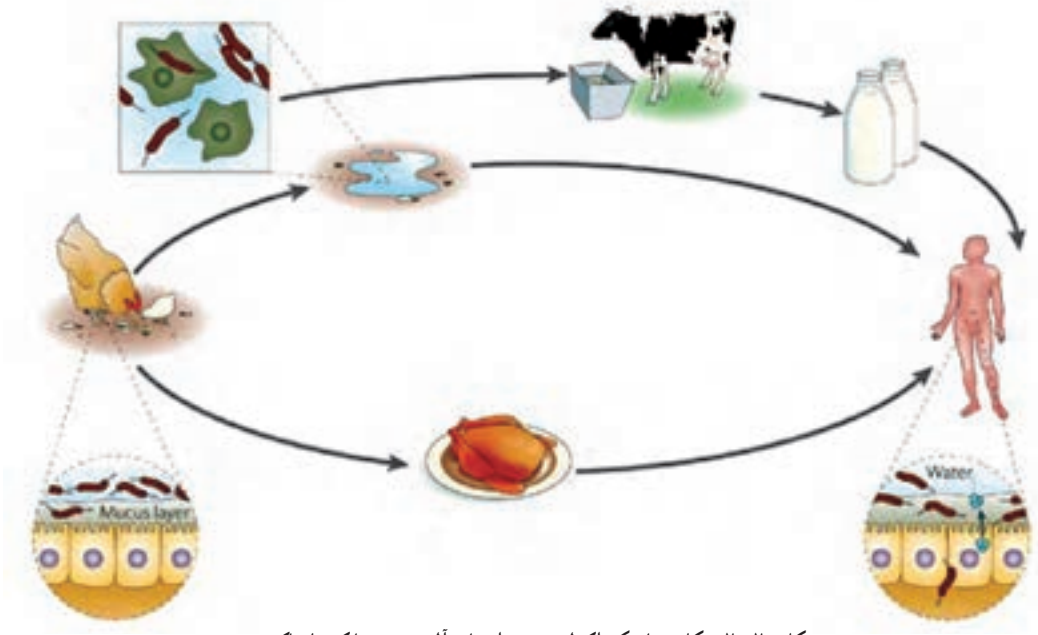
۳ــ بی هوازی اختیاری[6] : در حضور و در غیاب اکسیژن قادر به رشدند، مانند اشرشیاکلی[7].

۴ــ بی هوازی اجباری[8] : فقط در غیاب اکسیژن آزاد رشد می‌کنند، مانند کلستریدیوم تتانی.

دما : تقریباً همهٔ باکتری‌های بیماری زا در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد رشد بهینه دارند. بعضی از باکتری‌ها که در دمای پایین (صفر تا ۴ درجه) و یا دمای بیش از ۳۷ درجه هم رشد می‌کنند، در میکروب شناسی غذایی مهم هستند، مانند لیستریا مونوسیتوژنز[9] که یک عامل مسمویت غذایی است و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به آهستگی رشد می‌کند و یا کمپیلوباکتر ژژونی (شکل ۲۰ــ۲) که دمای مناسب برای رشد آن ۴۲ درجه است.

CO_2 : باکتری‌ها برای رشد CO_2 لازم دارند. مقادیر مناسب CO_2 یا در هوا وجود دارد و یا باکتری‌ها CO_2 لازم را در خلال سوخت و ساز تولید می‌کنند.

pH : رشد بهینهٔ اکثر باکتری‌های بیماری‌زا در pH بازی خفیف بین ۷/۲ تا ۷/۶ صورت می‌گیرد، اما چند مورد استثنا وجود دارد. لاکتوباسیل اسیدوفیلوس[10] که در واژن زنان بالغ وجود دارد در محیط اسیدی (pH= ۴) بهتر رشد می‌کند. این باکتری اسید لاکتیک تولید می‌کند که باعث اسیدی شدن ترشحات واژن می‌شود و از ایجاد عفونت توسط بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا

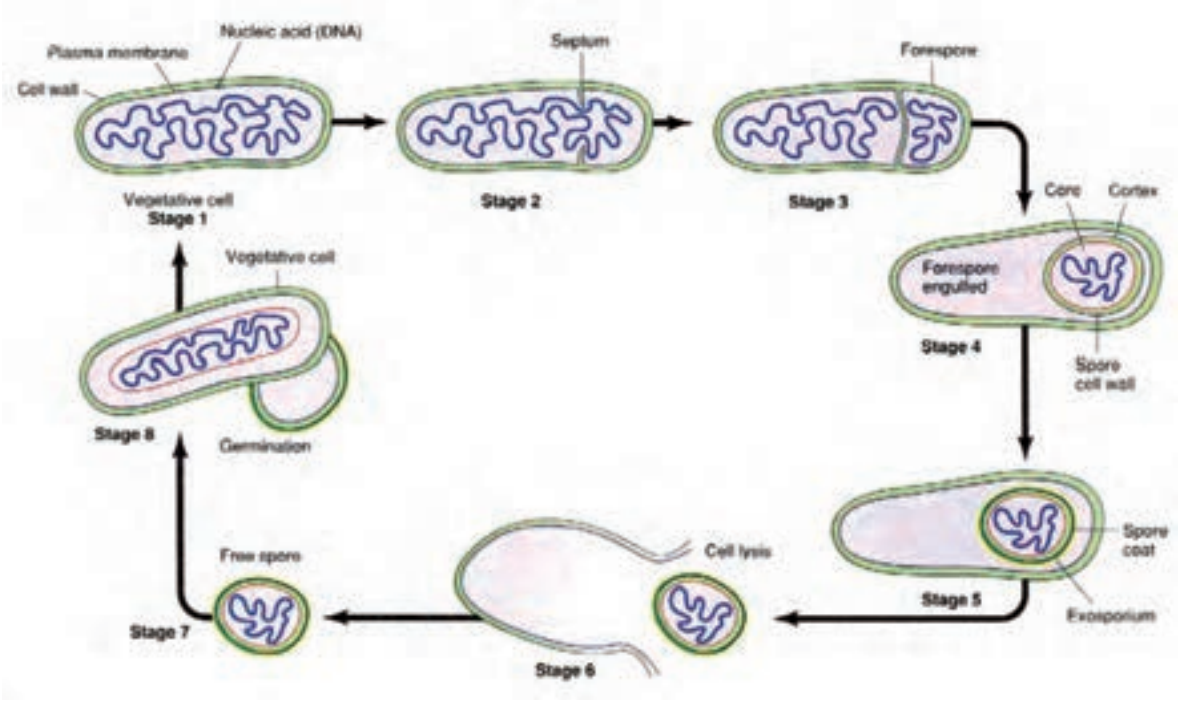


شکل ۲۰ــ۲ شکل شماتیک اکولوژی و راه های آلوده شدن با کمپیلوباکتر ژژونی

۱ــ Heterotroph ۲ــ Obligate aerobe ۳ــ Pseudomonas aeroginosa ۴ــ Microaerophile ۵ــ Campilobacter jejuni
۶ــ Facultative anaerobe ۷ــ Escherichia coli ۸ــ Obligate anaerobe ۹ــ Listeria monocytogenes
۱۰ــ Lactobacillus acidophilus

که محیط اسیدی باعث از بین رفتن آن‌ها می‌شود جلوگیری می‌کند. در مقابل، ویبریوکلرا[1] عامل بیماری وبا در محیط قلیایی (pH=۸/۵) بهتر رشد می‌کند.

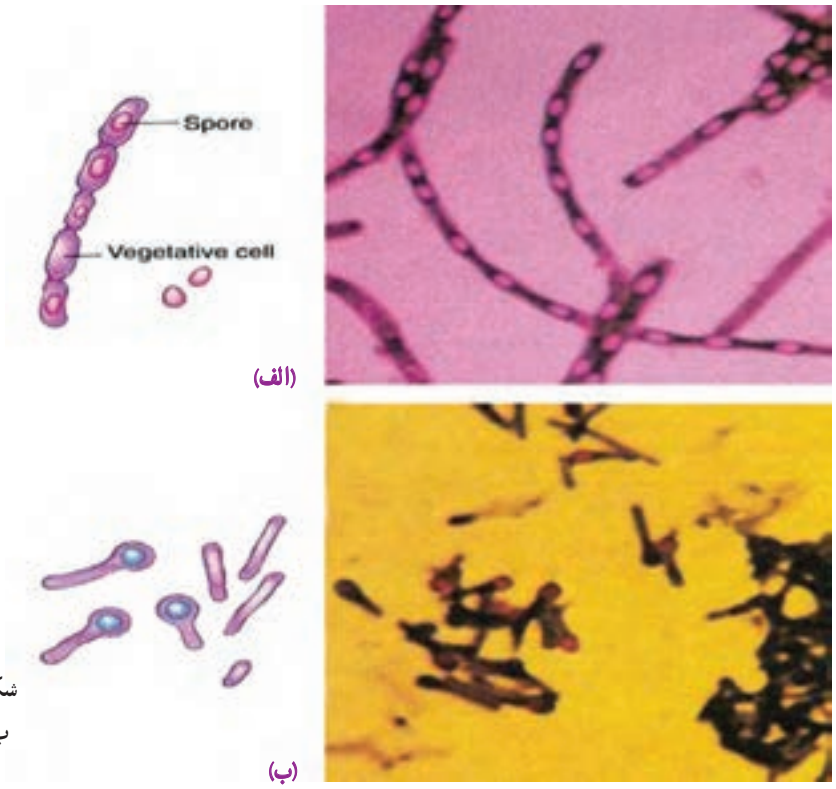
بعضی از باکتری‌ها وقتی در وضعیت کم غذایی یا در شرایط نامطلوب قرار می‌گیرند، پوسته‌ای سخت به دور خود ترشح می‌کنند و به حالتی درمی‌آیند که به آن اسپور می‌گویند (شکل ۲۱ــ۲). اسپورها نسبت به شرایط نامساعد نظیر دمای بالا، تشعشع و وجود مواد شیمیایی از قبیل ضد عفونی کننده‌ها بسیار مقاوم هستند، به‌نحوی که ساعت‌ها در آبِ در حال جوش زنده می‌مانند و از بین نمی‌روند و هنگامی که در جایی قرار می‌گیرند که غذا، گرما و رطوبت در حد مطلوب وجود دارد به باکتری فعال تبدیل می‌شوند و به سرعت تکثیر می‌یابند. اسپورها، در پاسخ به کمبود مواد غذایی، طی فرآیند پیچیدهٔ اسپورزایی[2] تشکیل می‌شوند و پس از تکمیل شدن ساختمان، مانند تخم یا سلولی گرد درون سلول سازندهٔ اسپور ظاهر می‌گردند.



شکل ۲۱ــ۲ مراحل شماتیک اسپورزایی و تبدیل اسپور به سلول رویشی

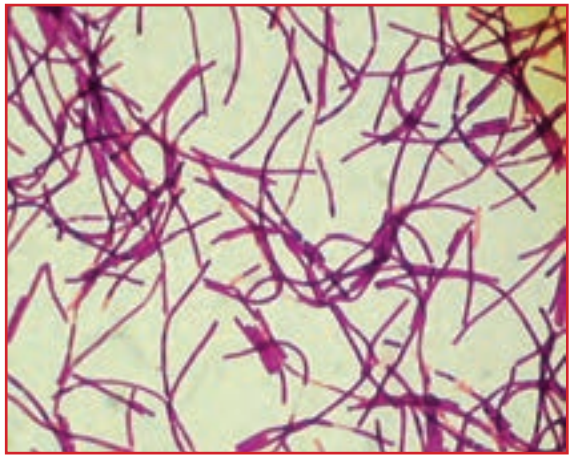
اسپور بخشی ازچرخهٔ زندگی باکتری‌های گرم مثبت میله‌ای شکل (دو جنس باسیلوس و کلستریدیوم) و در واقع یک مرحلهٔ خفته یا غیر فعال از زندگی باکتری است. اسپورزایی در باکتری‌ها بر خلاف آنچه در بعضی گیاهان عالی دیده می‌شود، نوعی تکثیر تولیدمثلی نیست. زیرا هر باکتری فقط یک اسپور تولید می‌کند و هر اسپور به نوبهٔ خود به یک سلول رویشی[3] (باکتری فعال) تبدیل می‌شود. بنابراین در گونه های مولد اسپور، مانند سایر گونه‌های باکتریایی، تکثیر از طریق تقسیم دوتایی باکتری انجام می‌شود. اندازه و محل قرار گرفتن اسپور در داخل باکتری نیز برای تشخیص و تفکیک باکتری‌ها اهمیت دارد. مثلاً اسپورها می‌توانند در مرکز، نزدیک به انتها و یا در انتهای یاخته قرار گیرند (شکل ۲۲ــ۲). قطر اسپور می‌تواند بزرگ‌تر یا کوچک‌تر از خود باکتری باشد. اگر اسپور قطر بیشتری نسبت به یاخته رویشی داشته باشد موجب تورم یا بزرگی و تغییر شکل باکتری می‌شود.

۱ــ Vibrio cholera ۲ــ Sporulation ۳ــ Vegetative



شکل ۲۲ــ۲ الف) اسپور باسیلوس آنتراسیس در مرکز
ب) اسپور کلستریدیوم تتانی در انتهای سلول باکتری

کلستریدیوم‌های بی‌هوازی مانند کلستریدیوم پرفرنجنز[۱] مولد قانقاریای گاوی (شاربن علامتی)، کلستریدیوم بوتولینوم[۲] عامل مسمومیت غذایی یا بوتولیسم کشنده و کلستریدیوم تتانی از مهم‌ترین باکتری‌های اسپورزا هستند. تمام این کلستریدیوم‌های اسپورزا سم خارجی[۳] قوی تولید می‌کنند که اغلب کشنده هستند. قوی‌ترین اگزوتوکسین توسط کلستریدیوم بوتولینوم تولید می‌شود. مصرف مقدار بسیار کم از مادهٔ غذایی دارای سم بوتولیسم معمولاً موجب مرگ می‌شود. برآورد شده است که یک بطری کوچک حاوی سم بوتولیسم برای کشتن تمام مردم کرهٔ زمین کافی است.

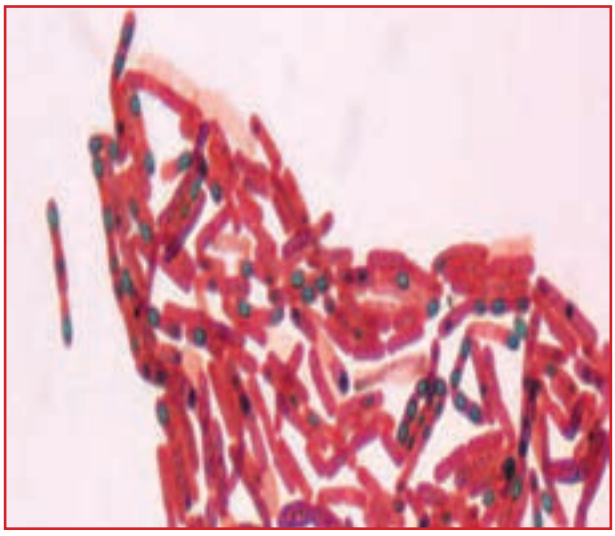


شکل ۲۳ــ۲ رنگ‌آمیزی اسپور به روش ساده

به دوطریق می‌توان اسپورها را زیر میکروسکوپ مشاهده نمود :

۱ــ اسپور پوشش مقاومی است که در برابر نفوذ رنگ مقاومت می‌کند. بنابراین در رنگ‌آمیزی ساده می‌توان اسپورها را به صورت ناحیه رنگ نشده در داخل سلول رویشی (باکتری مولد) مشاهده کرد (شکل ۲۳ــ۲).

۱ــ Clostridium perferengens ۲ــ Cl. butolinum ۳ــ Exotoxin



شکل ۲۴ــ۲ رنگ‌آمیزی اسپور به روش شفرــ فولتون

۲ــ اگر تعداد اسپورهای موجود کم باشد و یا اگر از داخل باکتری مولد خارج شوند و در گستره به صورت پراکنده باشند اغلب توسط رنگ‌آمیزی ساده و یا گرم قابل مشاهده نخواهند بود، در این حالت رنگ‌آمیزی شفرــ فولتون[۱] که یک رنگ‌آمیزی افتراقی است برای مشاهدهٔ آندوسپور و سلول رویشی به‌کار می‌رود. با استفاده از این روش خود اسپور رنگ می‌گیرد و اسپورهای آزاد به آسانی قابل رؤیت خواهند بود. در مشاهدهٔ میکروسکوپی لام رنگ‌آمیزی شده، اسپورها درون سلول رویشی قرمز رنگ، به صورت بخش‌های بیضوی یا کروی کوچک سبز رنگ مشاهده می‌شوند (شکل ۲۴ــ۲). در این روش برای نفوذ رنگ اولیه (مالاشیت گرین[۲]) به داخل پوشش اسپور از حرارت استفاده می‌شود. مالاشیت گرین به آسانی از باکتری‌های مولد شسته می‌شود زیرا دیوارهٔ سلولی باکتری‌هایِ بدون اسپور بر اثر حرارت آسیب دیده و پاره شده است، بنابراین سلول رویشی رنگ دوم، یعنی سافرانین[۳] را جذب می‌کند. در این حالت اسپورها گرد و یا بیضی به رنگ سبز؛ و سلول‌های رویشی به رنگ قرمز دیده می‌شوند.

رنگ‌آمیزی اسپور به روش شفرــ فولتون

از یک باکتری مولد اسپور مانند باسیلوس سوبتیلیس[۴] گستره‌ای تهیه و طبق معمول آن را با حرارت تثبیت کنید. سپس :

۱ــ لام را به رنگ مالاشیت گرین (۵ گرم در ۱۰۰ سی سی آب مقطر) آغشته کنید.

۲ــ لام آغشته به رنگ را حرارت دهید تا رنگ بخار شود. این عمل را با وارونه کردن شعلهٔ گاز بر روی لام و عبور شعله به تناوب از روی رنگ انجام دهید. وقتی که رنگ شروع به بخار شدن کرد شعله را کنار ببرید. زمانی که تبخیر متوقف شد دوباره کار را تکرار کنید و نگذارید رنگ بجوشد. مدت ۳ تا ۵ دقیقه به همین ترتیب عمل کنید و اگر مالاشیت گرین کاملاً از روی لام تبخیر شد دوباره مقداری رنگ به لام اضافه کنید.

۳ــ بگذارید لام سرد شود تا نشکند. به موازات سرد شدن لام رنگ را اضافه کنید.

۴ــ رنگ اضافی را از روی لام خالی کنید و به‌مدت ۳۰ ثانیه لام را با آب بشویید.

۵ــ لام را روی تشتک رنگ‌آمیزی قرار دهید و آن را با سافرانین (۰/۵ گرم در ۱۰۰ سی سی آب مقطر) آغشته کنید و بگذارید یک دقیقه بماند.

۶ــ رنگ اضافه را خالی کنید و لام را بشویید.

۷ــ لام را در هوا خشک کنید.

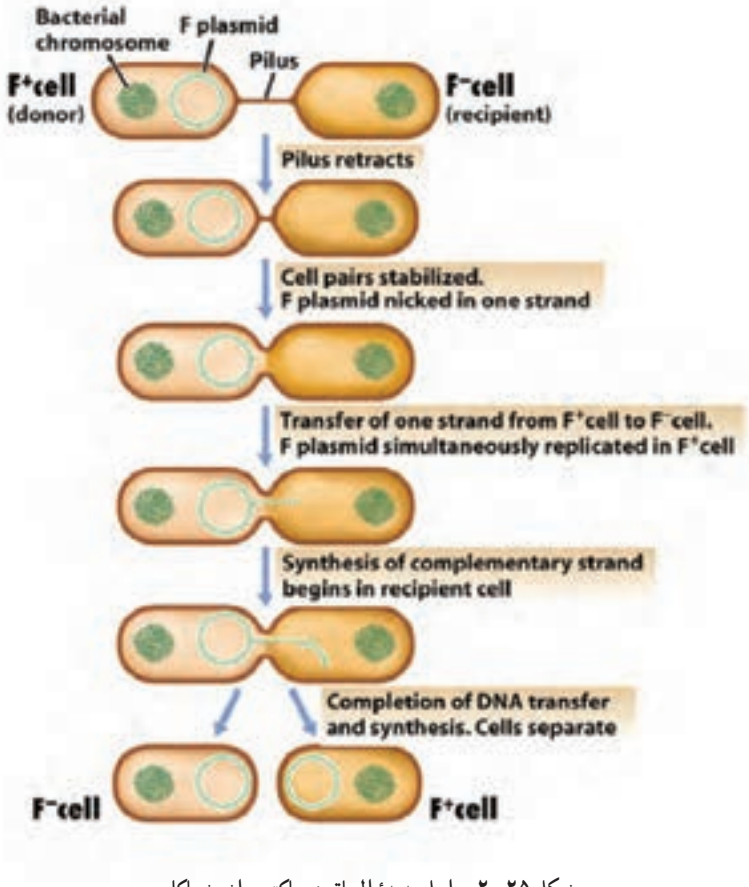
۸ــ لام رنگ‌آمیزی شده را که بر روی آن یک قطره روغن سدر ریخته‌اید توسط عدسی ۱۰۰ در زیر میکروسکوپ مشاهده کنید.

۱ــ Schaeffer ــ Fulton ۲ــ Malachite green ۳ــ Safranin ۴ــ Bacillus subtilis

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.

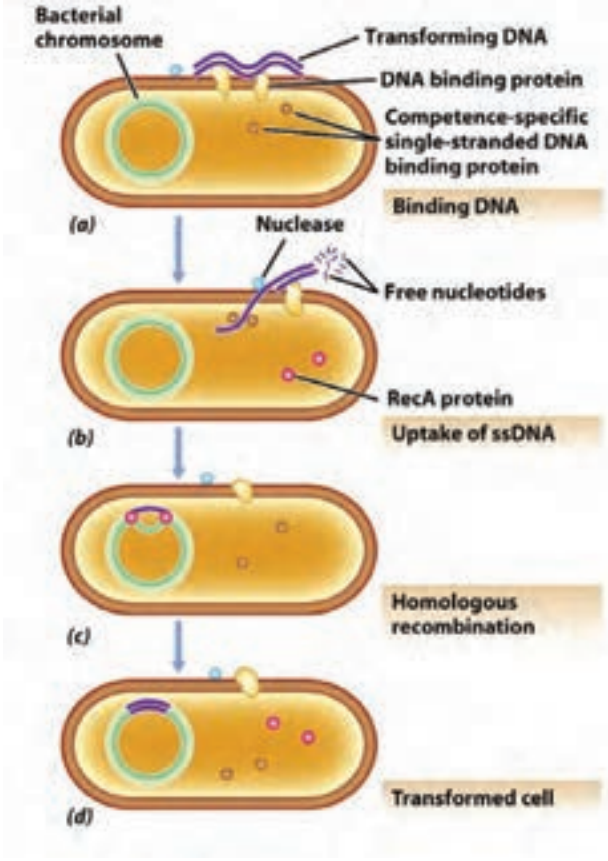


شکل ۲۵ــ۲ مراحل پدیدهٔ الحاق در باکتری اشرشیاکلی

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.



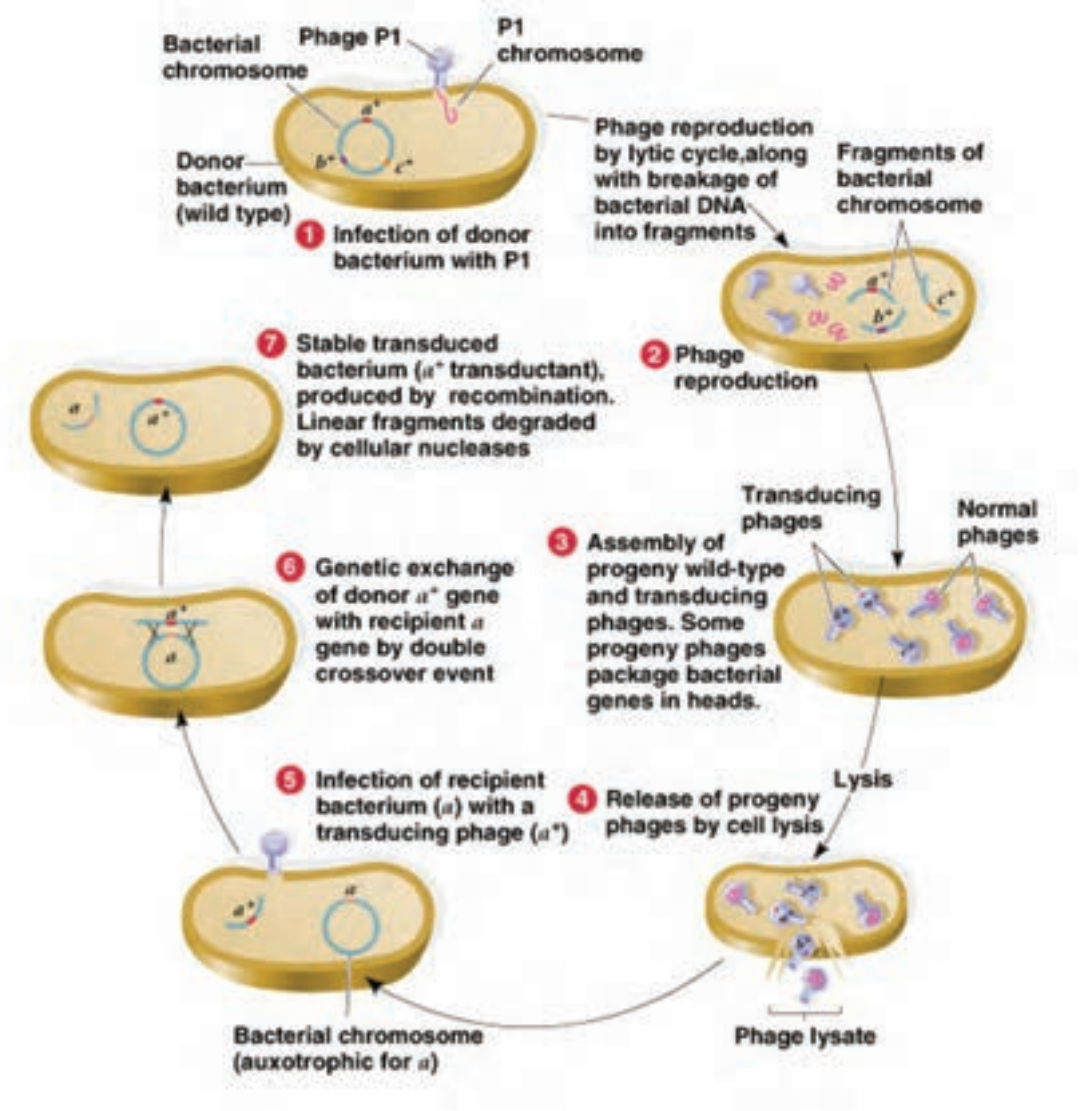
شکل ۲۶ــ۲ مراحل پدیده دگرگونی در باکتری اشرشیاکلی

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.

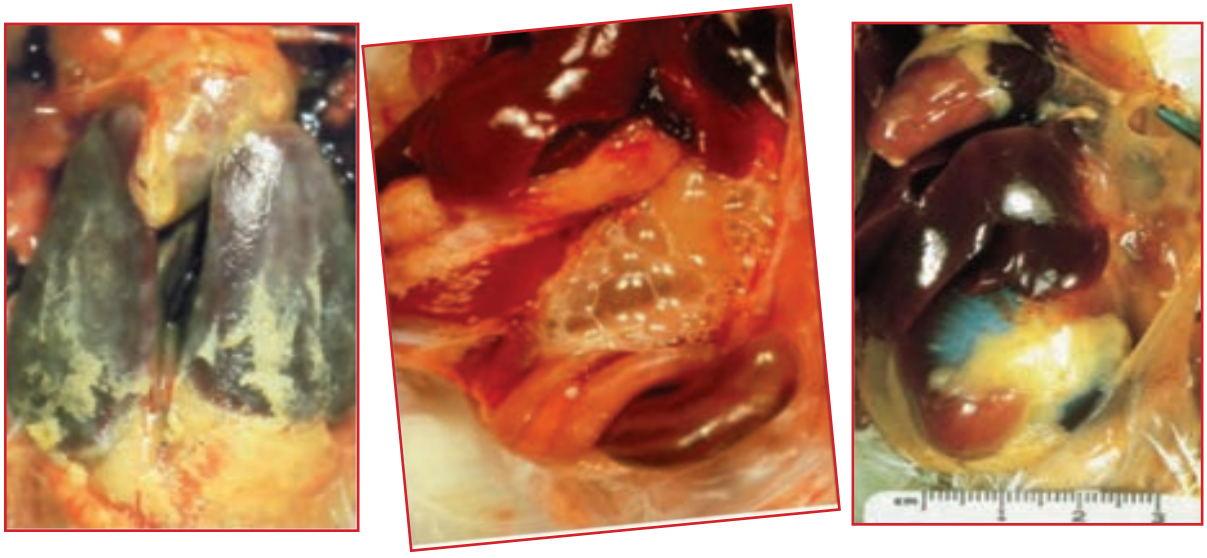
نخستین بار تشخیص دقیق این بیماری در بوقلمون‌ها، در سال ۱۹۰۵ میلادی توسط دود[5] در انگلستان صورت گرفت. وی بیماری فوق را Epizootic Pneumoenteritis نامید. در سال ۱۹۳۵ میلادی، نلسون[6] اجسام کوکوباسیلی شکل مرتبط با بیماری در جوجه‌ها را شناسایی کرد و موفق شد آن‌ها را در جنین تخم مرغ، کشت بافت و همچنین محیط 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.

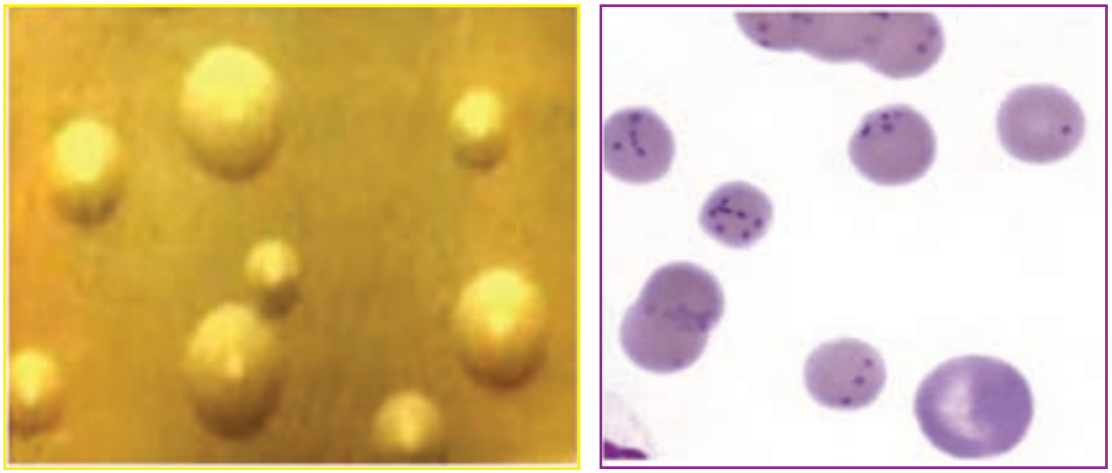
شناسایی عامل بیماری: در انواع مختلفی از محیط‌های کشت مایع یا آگار که دارای تمامی اجزای موردنیاز باکتری مانند گلوکز و همچنین عصارهٔ مخمرباشد مانند محیط فری[5]، می‌توان مایکوپلاسماهای پرندگان را تکثیر کرد. درصورتی که به این محیط میزان ۱۰ تا ۱۵ درصد سرم خوک، اسب یا پرندگانی که مدت سی دقیقه در دمای ۵۶ درجه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

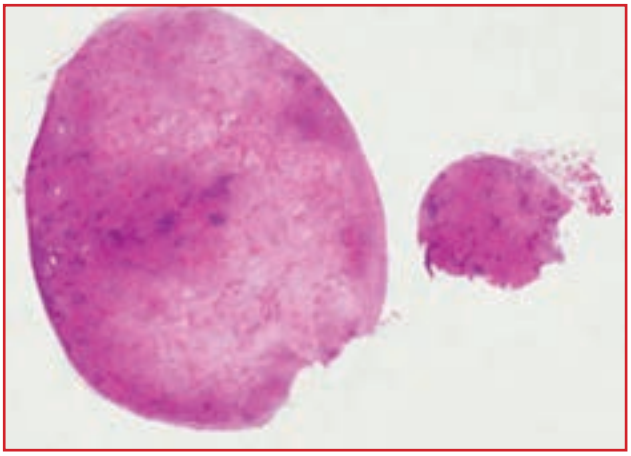
بیماری سل در تمامی کشورهای دنیا گزارش شده است و خصوصاً در گاوهای نژاد شیری اهمیت فراوانی دارد. این بیماری در گاو با ایجاد توبرکل[۹] های پیشرونده در اندام‌های مختلف بدن ناشی از آلودگی با مایکوباکتریوم بوویس[۱۰] مشخص می‌شود. صرف نظر از مرگ ومیر ناشی از بیماری سل، میزان تولید شیر در حیوانات آلوده به مایکوباکتریوم 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

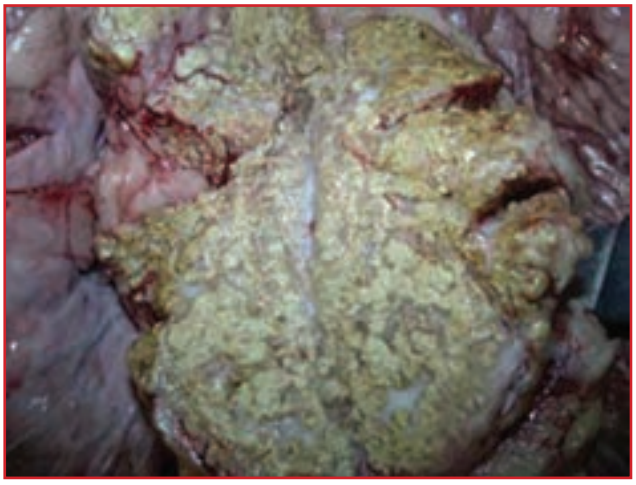
پیشرفته بیماری انتشار دهنده‌های مشخص بیماری‌اند. زیرا باسیل‌ها از طریق این دسته دام‌ها به نوعی با جـریان هوای تنفسی، پوست یا لومن روده در ارتباط هستند. ممکن است گاوها در مرحلهٔ اول بیماری پیش از آنکه هر گونه جراحتی نشان دهند، مایکو باکتریای زنده را از طریق موکوس بینی و نای خود دفع کنند.

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.

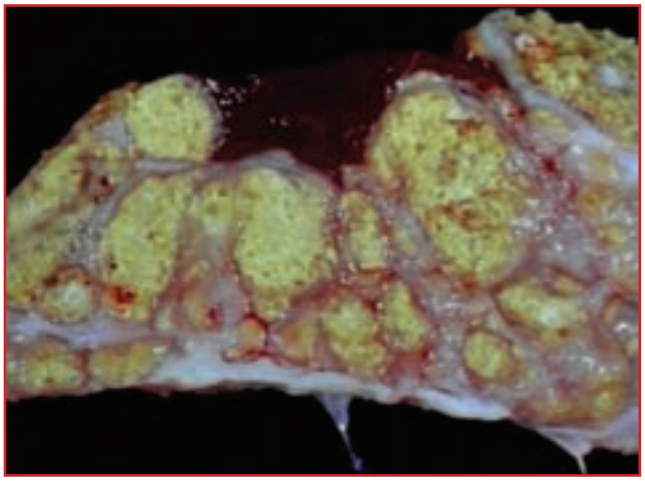
بزها کاملاً نسبت به عامل سل گاوی حساس‌اند و چنانچه در مجاورت گله‌های گاو آلوده قرار گیرند بروز بیماری می‌تواند تا ۷۰ درصد نیز برسد. گوسفند، دامی مقاوم درنظر گرفته می‌شود اما تحقیقات انجام شده در نیوزلند نشان داده است که بیماری سل می‌تواند تا ۵ درصد گله‌های گوسفند را آلوده نماید. همچنین بیماری سل ممکن 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.

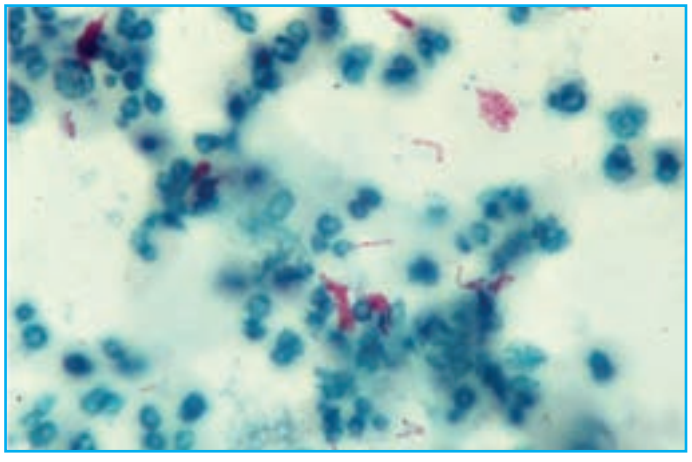
رنگ‌آمیزی اسیدفست یا زیل نلسن[5]

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

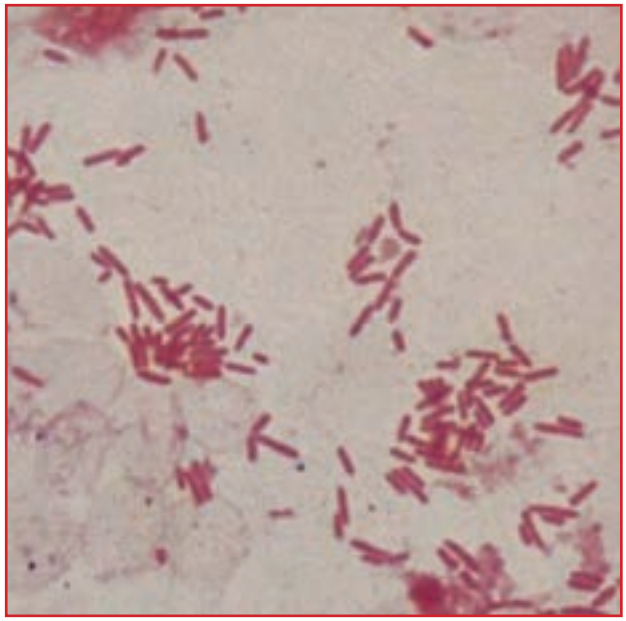
۱) رنگ کربول فوشین ۲) اسید ــ الکل ۳) رنگ بلودو متیلن یا مالاشیت گرین

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

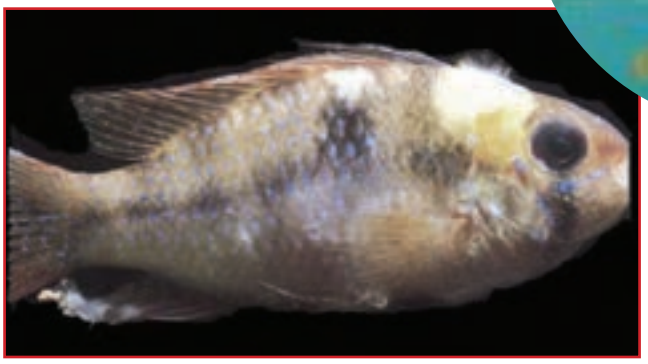
بیماری دم خوره یا پوسیدگی باله[۱] توسط باکتری‌های گروه سودوموناس[۲] ایجاد می‌شود. سلول‌های این باکتری میله‌ای‌شکل، گرم منفی و غیرمتحرک‌اند و اسپور تولید نمی‌کنند (شکل ۳۵ــ۲).

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



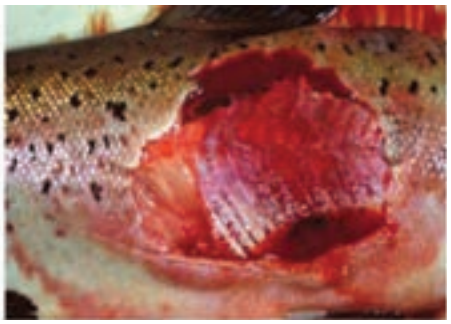
شکل ۳۸ــ۲ هجوم قارچ ها در بیماری پوسیدگی بالهٔ ماهی

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).

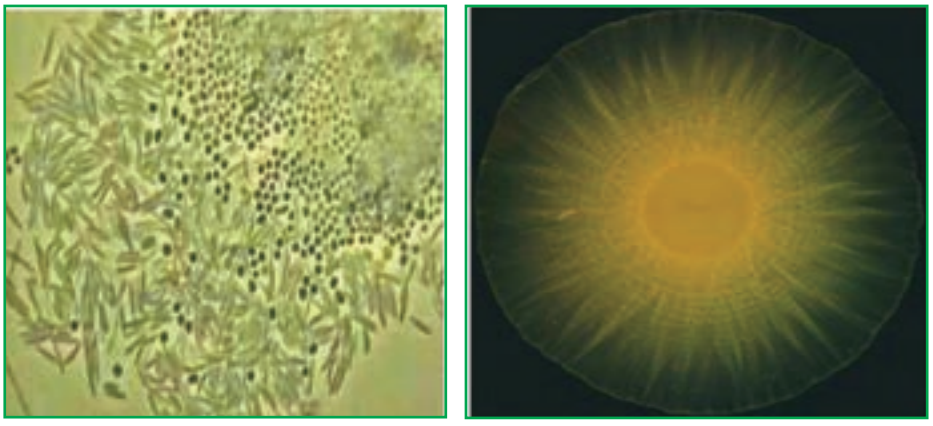
شکل ۳۹ــ۲ کورک پوستی در بیماری فرونکلوزیس آزاد ماهیان

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

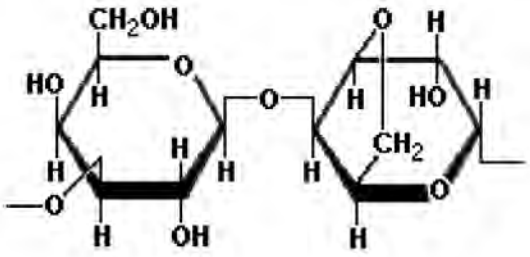
شکل۴۶ــ۲ خونریزی چشم و اتساع شکم در بیماری دهان قرمز مزمن

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

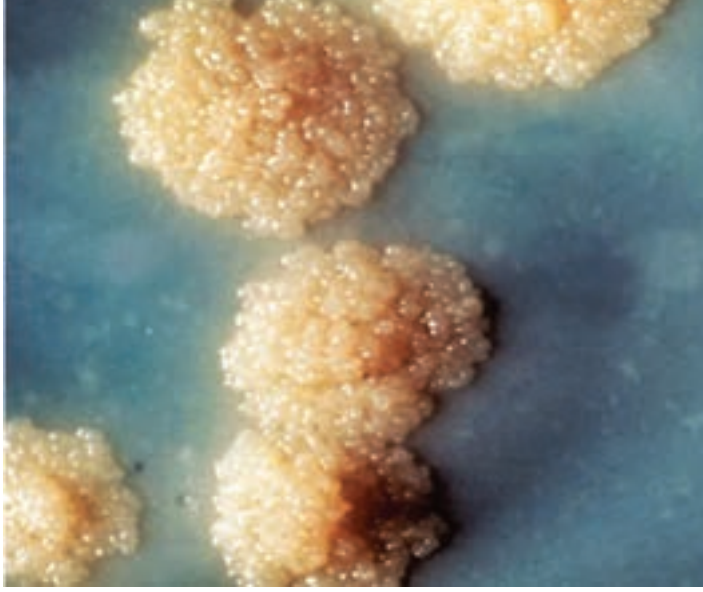
آگار به‌وسیلهٔ تعدادی از جلبک‌های دریایی ساخته می‌شود و هیچ میکروبی توانایی استفاده از آن را به‌صورت منبع انرژی ندارد. آگار با سایر ترکیبات موجود در محیط کشت مانند عصارهٔ گوشت، پپتون، قند، معرف‌ها، بازدارنده‌ها وغیره واکنش نمی‌دهد. حتی پس از سترون شدن در اتوکلاو نیز تغییر ساختار یا رنگ نمی‌دهد. آگار 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.

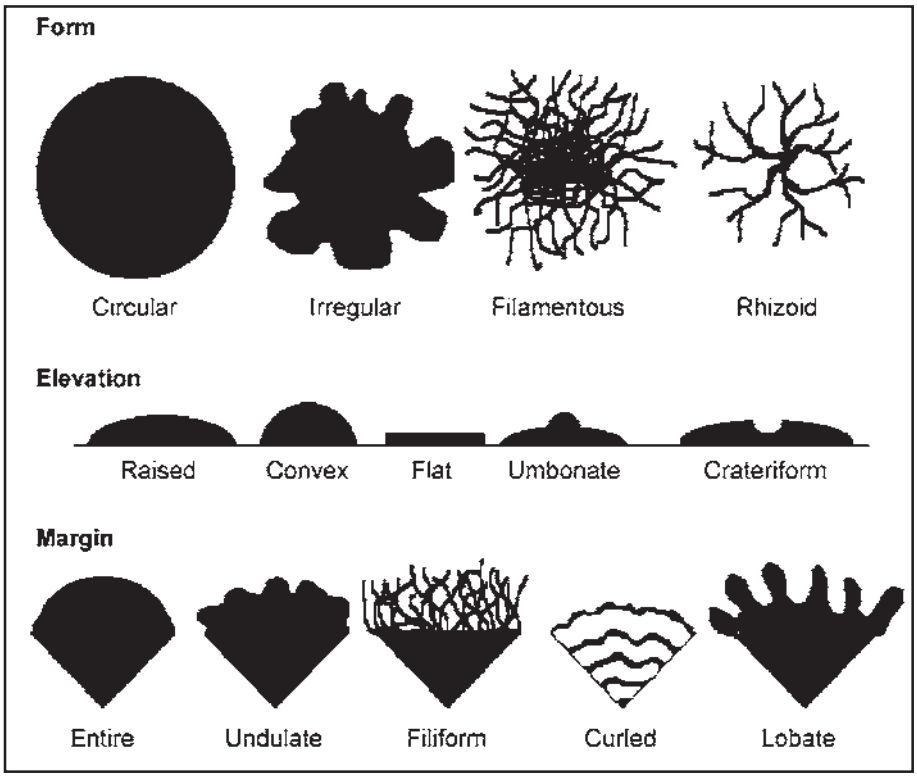
کدورت[۱۳] : کدورت یک‌نواخت و یک‌سان است.

ته نشست یا رسوب[۱۴]

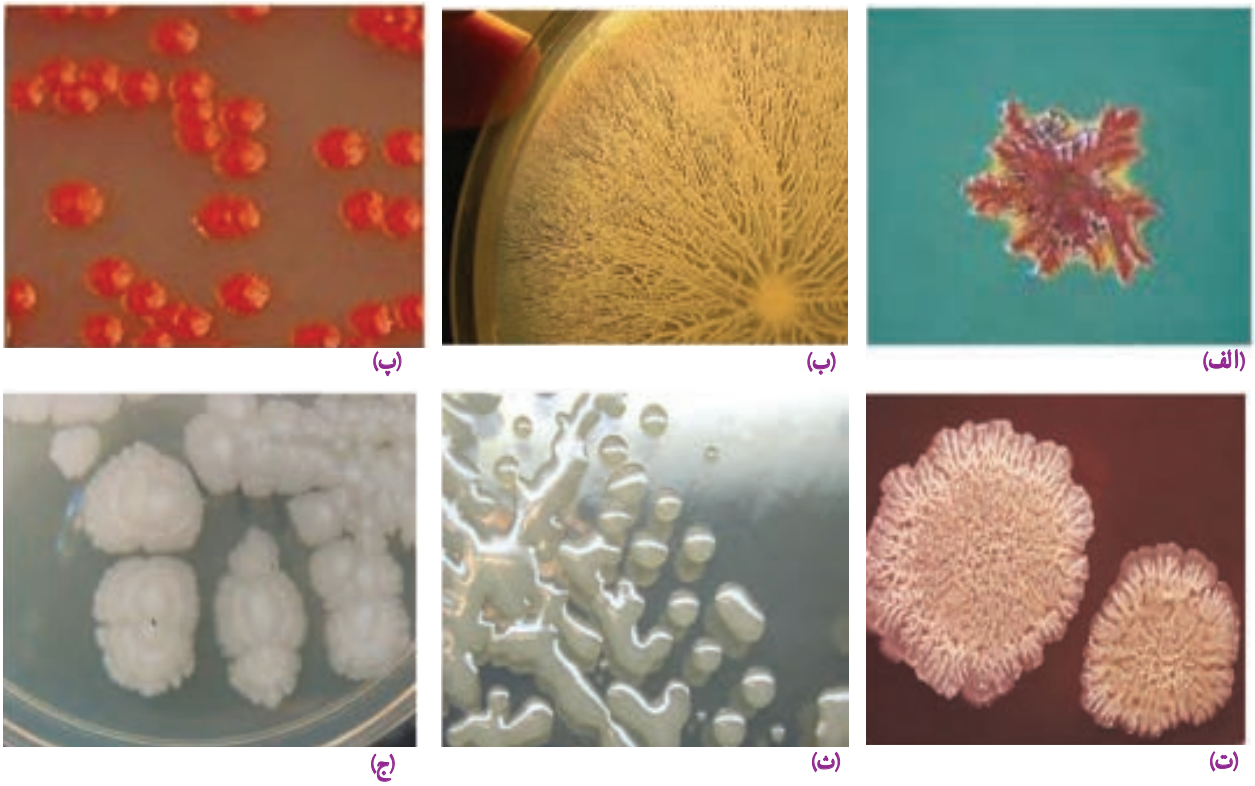
ته نشت وجود ندارد.

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

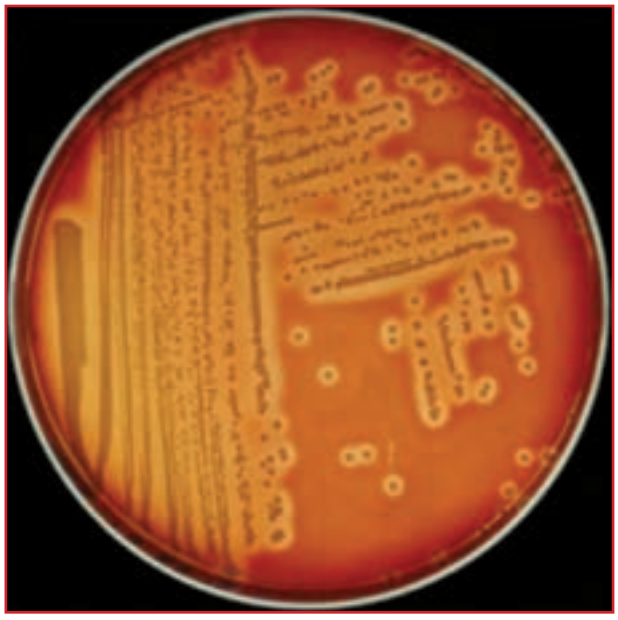
شکل ۵۲ــ۲ خصوصیات پرگنهٔ باکتری بر روی محیط کشت جامد

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 :

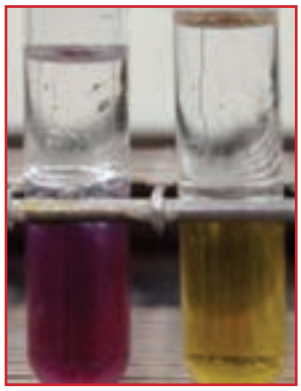
محیط کشت عمومی : محیط کشت عمومی برای تکثیر و جداسازی باکتری‌ها بکار می‌رود. این محیط‌ها کلیهٔ مواد لازم را برای رشد باکتری دارند و حدود ۸۰٪ از باکتری‌ها می‌توانند در آن رشد کنند. این محیط‌ها فاقد هرگونه مهارکننده و معرف‌اند، بنابراین با رشد باکتری‌های مختلف بر روی آن هیچ‌گونه تغییر رنگی مشاهده نمی‌شود. 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.



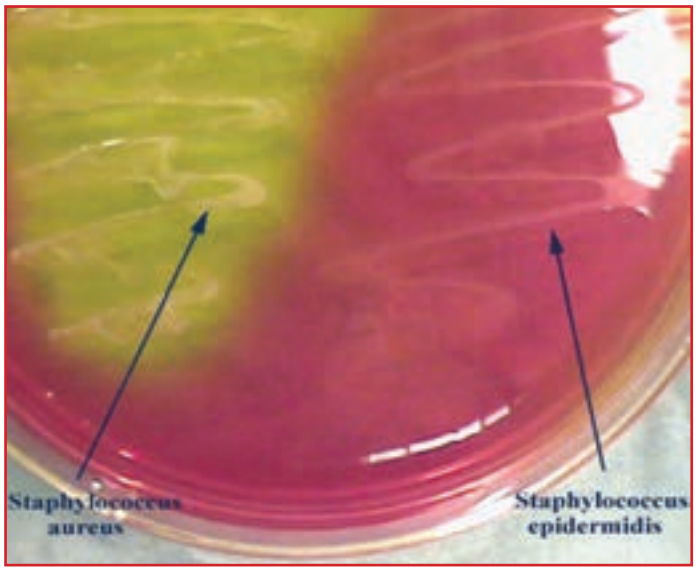
شکل ۵۴ــ۲ دکربوکسیله شدن اسیدآمینه لیزین توسط باکتری و تغییر رنگ محیط به بنفش در اثر تولید آلکالین آمین و کادوارین

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.

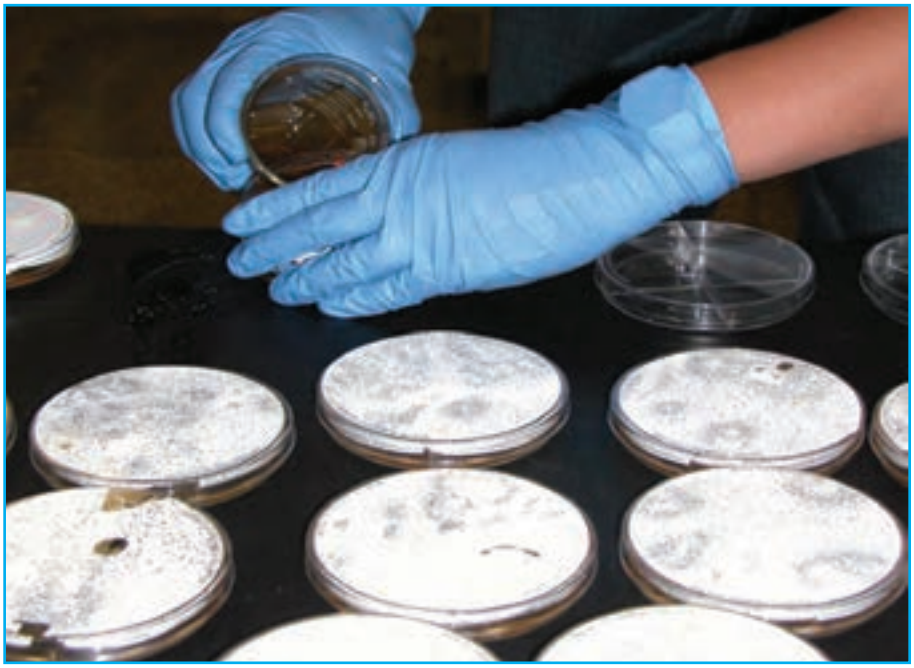
روش تهیهٔ محیط کشت جامد پیش ریخته

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.

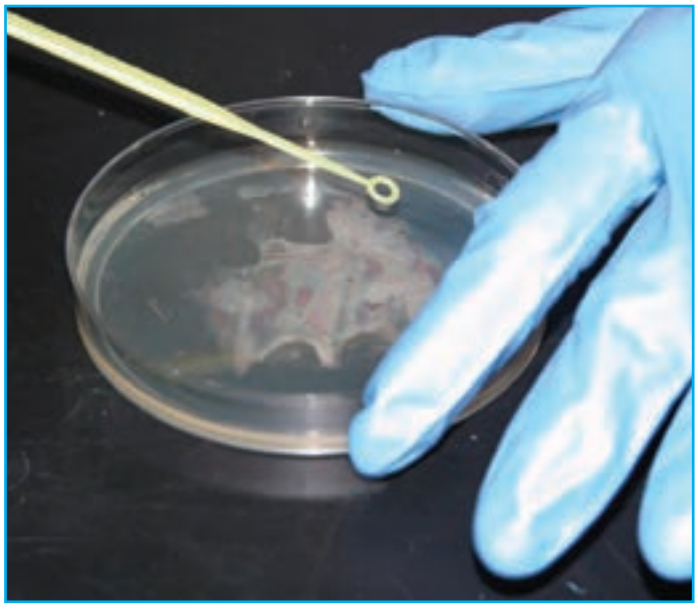
شکل ۶۰ــ۲ کشت پلیت حاوی محیط جامد در زیر هود بیولوژیک

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

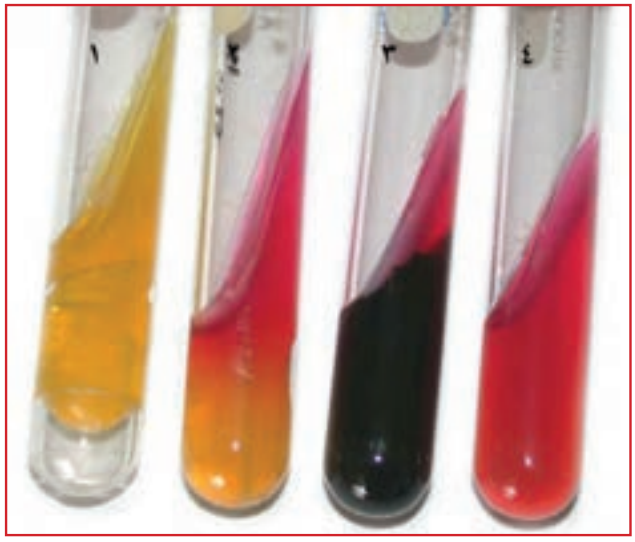
کشت جامد در لوله

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.

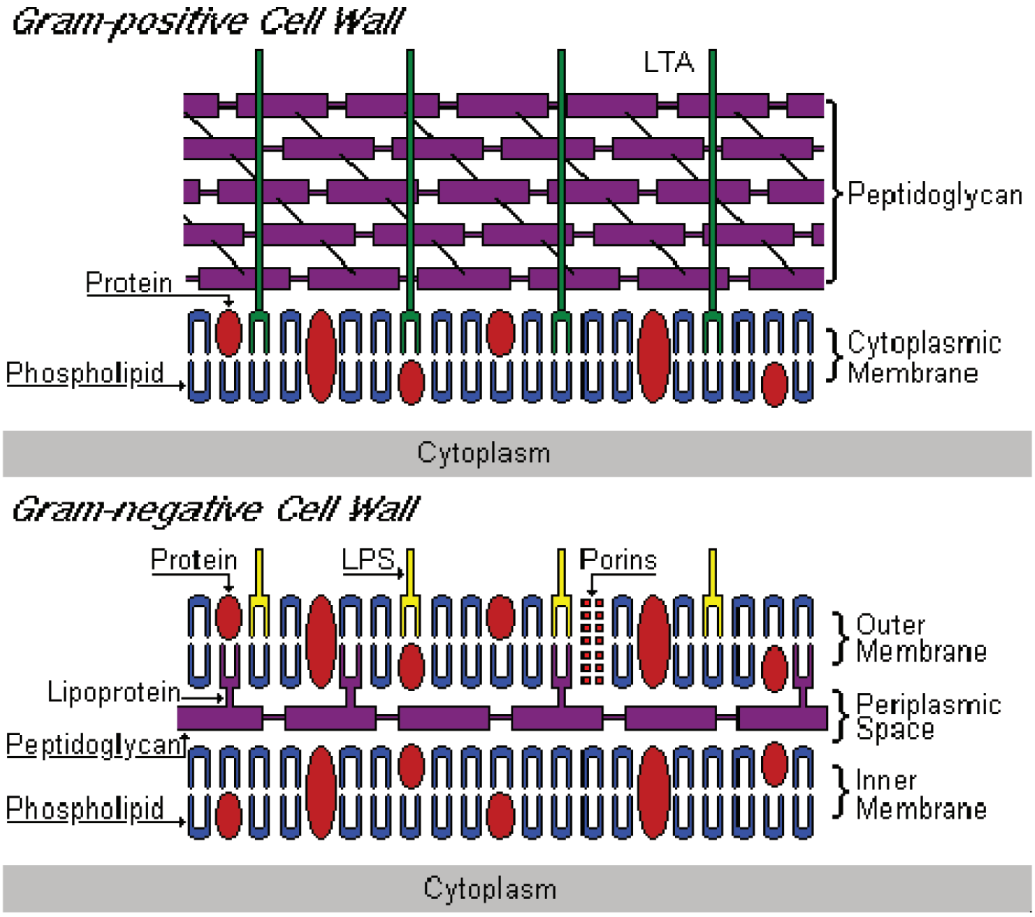
۳ــ صبر کنید تا لام در مجاورت جریان هوا خشک شود.

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

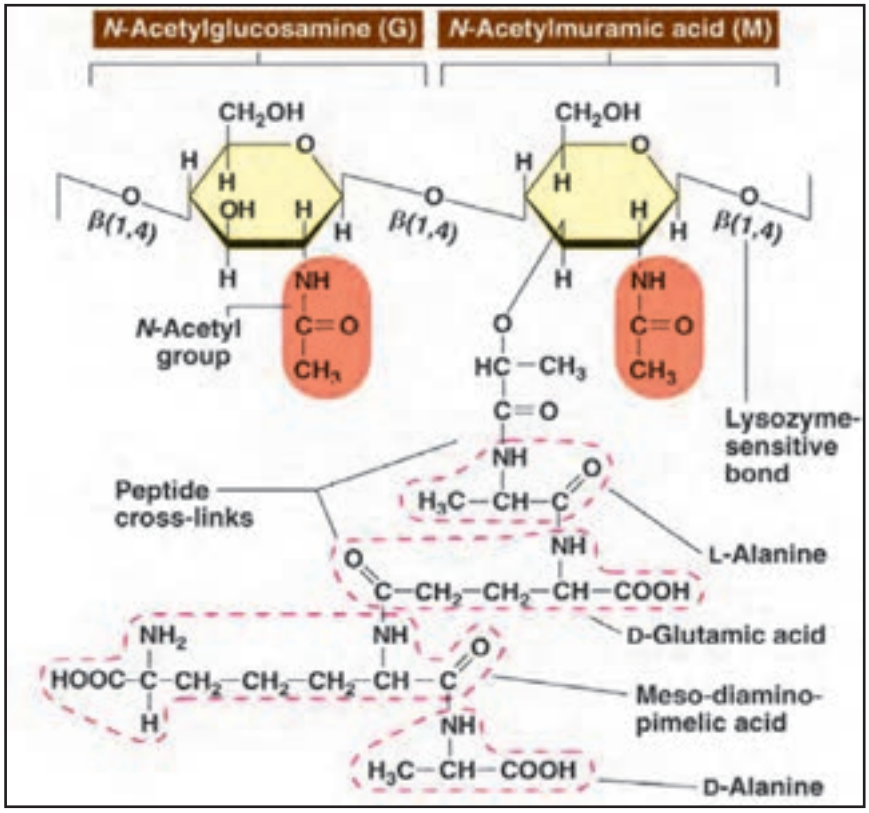


شکل ۶۵ــ۲ نمایش تفاوت دیوارهٔ سلولی در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

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 .**

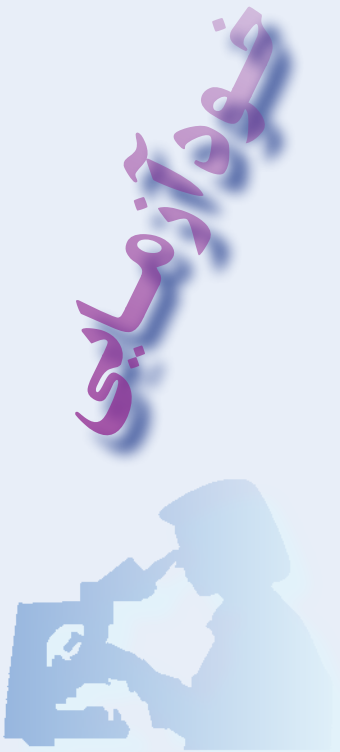
۴ـ تقسیم دوتایی باکتری‌ها را توضیح دهید .

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.

فصل ۳

ویروس‌ها

اهداف آموزشی

هدف کلی

آشنایی با ویروس‌ها و بیماری‌های ایجاد شده توسط آن‌ها در دام وطیور

هدف‌های جزئی

۱ــ آشنایی با تاریخچهٔ کشف ویروس‌ها

۲ــ آشنایی با ساختمان و ترکیب شیمیایی ویروس‌ها

۳ــ طبقه‌بندی ویروس‌ها

۴ــ آشنایی با چرخهٔ زندگی ویروس‌ها

۵ــ آشنایی باانواع ویروس‌ها در عالم گیاهی و جانوری و باکتریایی

۶ــ آشنایی باروش‌های کشت سلولی برای تکثیر ویروس‌ها

۷ــ شناخت بیماری‌های ویروسی مهم دام و طیور و مشترک بین انسان، دام و طیور.

واژه‌ها واصطلاحات مهم

- ویروس
- تشکیلات ژنومی
- ویریون
- ویروس گیاهی
- باکتریوفاژ
- آدنو ویروس
- پاکس ویروس
- ویرال
- خانواده
- ویریده

- کپسید
- کپسومر
- ویروس جانوری
- ویروس باکتریایی
- توالی ژن
- ارتومیکسو ویروس
- همانند سازی
- راسته
- زیر خانواده
- ویرینه

- آنفلوآنزا
- بیوسنتز
- پرو ویروس
- گلسنگ
- توبرا ویروس
- توبامو ویروس
- ویروس کوتولگی زرد سیب زمینی
- بی مهرگان
- پاکس ویروس
- پارامیکسو ویروس

- چسبیدن
- لیزوژنی
- لیتیک
- خزه
- نماتد
- رابدو ویروس
- تک یاختگان
- بند پایان
- میکسو ویروس
- سرخک

اوریون
نیوکاسل
زونا
آبله مرغان
باکتریولوژی
پریمات
بیوشیمیایی
نکروز
ذرات لاتکس
ایمونواسی
آزمایش ارزیابی پلاک
تخمدان
آنزیم پروتئولیتیک
دیپلوییید
فرمانتور
پردهٔ کوریو آلانتیک
حفرهٔ آمنیوتیک
تاریک بینی
پارافین
نمونهٔ بالینی

پاراآنفلوآنزا
هرپس ویروس
تبخال
تقارن
فاژ لامبدا
کشت یاخته
اثر سیتوپاتیک
واکنش زنجیرهٔ پلی‌مراز
آزمایش‌های سرولوژی
روش‌های بیولوژی
دستگاه تنفس
تیروییید
ترپسین
واکسن
یاخته‌های جنینی
حفرهٔ آلانتوییک
کیسهٔ زرده
تنتورید
تلقیح
آنتی سرم

ایدز
بیماری‌هاری
تکنولوژی
فرمل
زوج سمان
تیپ
آفتوویروس
آمونیوم
هیدروکسید سدیم
اسید سیتریک
پاکس
اسکار
سویه ولوژن
سویه مزوژن
لاسوتا
نکروز غدد لنفاوی
نوکلئوپروتئین
هماگلوتینین
آسیب زایی

صفاق
آندمیک
نوروتروپ
تب برفکی
میوکاردیت
پیکورناویریده
یدوفور
هیپوکلریت
کربنات سدیم
بثورات وزیکولی
نکروز نسجی
پارامیکسو ویروس
هرتس
سویه لنتوژن
طاعون گاوی
موربیلو ویروس
آنتی ژنیستیه
نورآمینیداز

رویکردهای آموزشی

باتوجه به فصل سوم، که حاوی مطالبی درخصوص ویروس‌هاست، هنرجویان می‌توانند باموجوداتی به نام ویروس آشنا شوند و از ساختمان و ترکیب شیمیایی، نحوهٔ تولید مثل، نحوهٔ رشد و اثر عوامل مختلف محیطی بر رشد آن‌ها مطلع گردند. همچنین با استفاده از این اطلاعات علائم بیماری‌هایی را که ویروس‌ها در دام وطیور و مشترک در انسان ایجاد می‌کنند درک نمایند. همین طور با نحوهٔ کشت آزمایشگاهی ویروس‌ها آشنا می‌شوند.

پیام‌های اصلی

دانشی و مهارتی

هنرجو:

- با ویروس و جایگاه آن در دنیای حیات آشنا می‌شود.

- با ساختمان ویروس و اجزای آن آشنا می‌شود.
- با انواع ویروس‌های گیاهی، جانوری و باکتریوفاژها آشنا می‌شود.
- با تولید مثل و چرخهٔ زندگی ویروس‌ها آشنا می‌شود.
- با چند بیماری مهم ویروسی آشنا می‌شود.

نگرشی

هنرجو:

- با انجام دادن پروژه و کار گروهی در مورد ویروس‌ها، روحیهٔ تحقیق و همکاری را در خود تقویت می‌کند.
- با انجام دادن پروژه و کار گروهی در خصوص ویروس‌ها، نسبت به محیط پیرامون خود کنجکاو می‌شود.

دانستنی‌های مورد نیاز هنرآموز

- مطالعهٔ فصل سوم بخش راهنمای هنرآموز، او را با دانستنی‌های مورد نیاز برای ارائهٔ بهتر مطالب کتاب کمک می‌کند.
- معلم باید با علائم بیماری‌های ویروسی در دام وطیور آشنا باشد.

فعالیت‌های پیشنهادی

- هنرآموز می‌تواند با استفاده از پاورپوینت و اسلاید، تقسیم‌بندی ویروس‌ها (گیاهی، جانوری و باکتریایی) را برای هنرجویان آسان کند.
- هنرآموز می‌تواند هنر جویان را در دسته‌های مختلف گروه‌بندی کند و از آن‌ها بخواهد مراحل زندگی ویروس را به صورت پوستر تهیه کنند.
- هنرآموز می‌تواند به بازدید از مراکز ویروس شناسی و آزمایشگاه‌های ویروس شناسی اقدام نماید.

موارد ارزش‌یابی

- هنرآموز می‌تواند در خصوص ویروس‌ها (شکل و اندازهٔ ساختمان، تولید مثل و...) از انواع پرسش‌ها و امتحانات شفاهی و کتبی استفاده نماید.
- هنرآموز می‌تواند در خصوص بیماری‌های ویروسی دام و طیور پرسش نماید.

ویروس‌ها

ویروس‌ها یکی از کوچک‌ترین عوامل بیماری‌زا در جانداران‌اند. اندازه آن‌ها بین ۳۰۰ ــ ۲۰۰ نانومتر است. این اجرام از باکتری‌ها بسیار کوچک‌ترند و تنها با میکروسکوپ الکترونی قابل‌رؤیت هستند. درهیچ یک از ویروس‌ها سیستم‌های انرژی‌زا نظیر میتوکندری و ریبوزوم وجود ندارد. بنابراین آن‌ها انگل داخل سلولی هستند و این خصوصیت، مهم‌ترین تفاوت آن‌ها با بقیهٔ میکروارگانیسم‌هاست. یک ذره ویروس دارای مولکول اسید نوکلئیک (DNA یا RNA) بوده که توسط پوشش پروتئینی یا «کپسید[1]» احاطه شده است. اسید نوکلئیک ویروس برای تکثیر در درون سلول به آنزیم‌های سلول میزبان وابسته است. از تجمع اسید نوکلئیک و قطعات پروتئینی که به تازگی سنتز شده‌اند، ذرات کامل ویروسی تشکیل می‌شود که به محیط خارج سلول رها می‌شوند. تولید مثل

۱ــ Capsid

ویروس‌ها با استفاده از امکانات یاخته‌های میزبان امکان‌پذیر است. بنابراین آیا ویروس‌ها موجودات زنده محسوب می‌شوند یا نه؟ چون ویروس‌ها در خارج از بدن میزبان به حالت خنثا به‌سر می‌برند، به این مفهوم نمی‌توان آن‌ها را موجود زنده در نظر گرفت. اما هنگامی که وارد سلول میزبان می‌شوند اسیدهای نوکلئیک آن‌ها فعال می‌شود و به تکثیر ویروس می‌انجامد. از نظر بالینی ویروس‌ها را می‌توان موجودات زنده در نظر گرفت زیرا مانند باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری زا آلودگی و بیماری ایجاد می‌کنند. ویروس‌ها بسیار متنوع‌اند و از نظر ساختمان، تشکیلات ژنومی و راه‌های تکثیر و سرایت باهم تفاوت فراوان دارند. اگرچه ویروس‌ها بسیاری از جانوران و گیاهان را مبتلا می‌کنند، اما فقط برخی از آن‌ها انسان‌ها را بیمار می‌کنند. این میکروارگانیسم‌ها میزبان اختصاصی دارند، یعنی هر نوع ویروس فقط به یک نوع سلول زنده حمله می‌کند. ویروس‌ها به درجات حرارت بالا حساس‌اند و خاصیت بیماری‌زایی خود را از دست می‌دهند، اما به درجات حرارت زیرصفر (۷۰ــ تا ۱۹۶ــ درجهٔ سانتی‌گراد) مقاوم‌اند و خاصیت بیماری‌زایی خود را حفظ می‌کنند. ویروس‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها حساس نیستند.

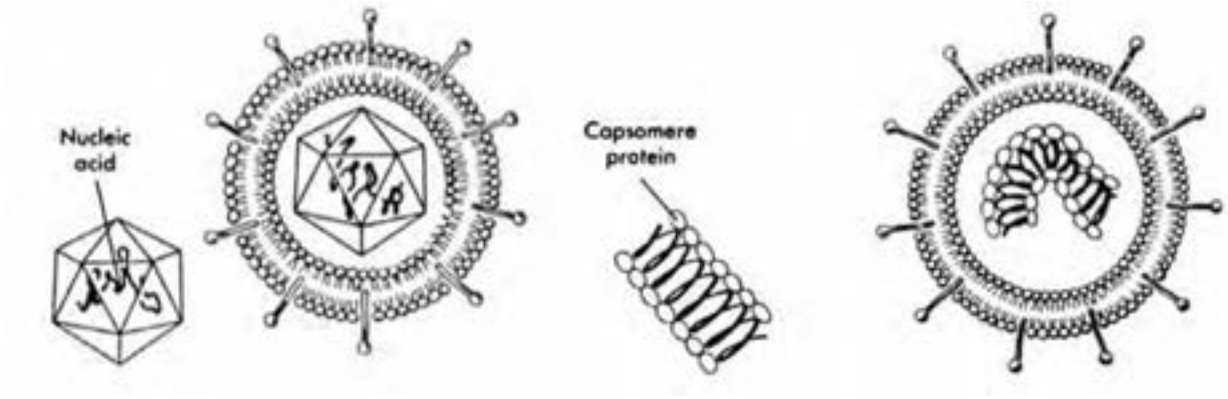
کشف ویروس‌ها

در اواخر قرن ۱۹ میلادی دانشمندان به دنبال یافتن عامل بیماری موزاییک تنباکو بودند. آنان از گیاه آلودهٔ به این بیماری عصاره‌ای تهیه کردند و آن را از صافی مخصوصی، که باکتری از آن رد نمی‌شود، عبور دادند. عصارهٔ صاف شده، گیاهان سالم را بیمار کرد. پس نتیجه گرفتند عامل بیماری از باکتری‌ها بسیار کوچک‌تر است. در سال ۱۹۳۵ زیست شناسی به نام وندل استنلی[۱] توانست ویروس موزاییک تنباکو[۲] را خالص کند.

ساختمان شیمیایی ویروس

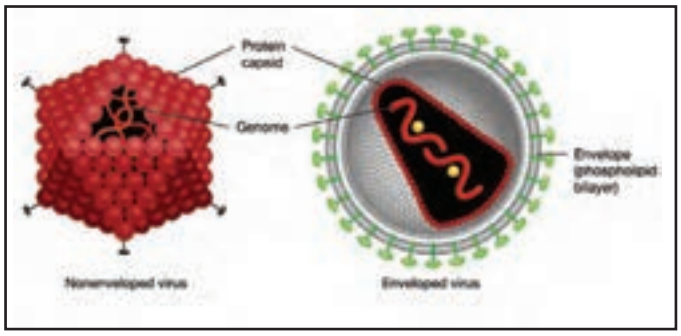
اسید نوکلئیک :یک ذرهٔ ویروسی دارای اسید نوکلئیک DNA و یا RNA است و یک مادهٔ ژنتیکی است. برخلاف سلول‌های پروکاریوتیک و یوکاریوتیک که همواره دارای DNA، یعنی مادهٔ ژنتیکی اصلی خود هستند، ویروس‌ها دارای یکی از دو نوع اسید نوکلئیک‌اند و هرگز هر دو را باهم ندارند. اسید نوکلئیک در بعضی ویروس‌ها به شکل خطی و در بعضی به شکل حلقوی است.

کپسید : اسید نوکلئیک ویروس به‌وسیلهٔ غلاف پروتئینی به‌نام کپسید احاطه شده است. هر کپسید از واحدهای کوچک پروتئینی به نام کپسومر[۳] ساخته شده است (شکل ۱ــ۳). نظم و ترتیب قرار گرفتن کپسومرها، شکل کلی و پیکر ویروس را تعیین می‌کند که برای هر ویروس خاص ثابت است.



شکل ۱ــ۳ شکل شماتیک کپسید و کپسومر در ویروس‌ها

۱ــVandal Stanly ۲ــTobacco mosaic virus ۳ــ Capsomer



شکل ۲ــ۳ شکل شماتیک ویروس، به همراه پوشش غیر پروتئینی و بدون پوشش

پوشش غیر پروتئینی[۱] : درعده‌ای از ویروس‌ها کپسید به‌وسیلهٔ پوششی، که معمولاً ترکیبی از لیپیدها، پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌هاست، پوشیده شده است (شکل ۲ــ۳).

طبقه‌بندی ویروس‌ها

ویروس‌ها فقط در درون گونه‌های خاصی تکثیر پیدا می‌کنند. از این رو برای سهولت مطالعه آن‌ها را بر حسب نوع میزبان به ویروس جانوری[۲]، ویروس باکتریایی(باکتریوفاژها[۳]) و ویروس گیاهی[۴]، تقسیم بندی می‌کنند. میزبان ویروس عبارت است از گونه‌هایی از میزبان، که ویروس قادر باشد آن‌ها را آلوده کند. در هر رده، هر نوع ویروس معمولاً یاخته‌های گونهٔ خاصی را آلوده می‌کند. میزبان خاص یک ویروس، براساس نیاز به اتصال[۵] اختصاصی ویروس به سلول میزبان و در دسترس بودن عوامل میزبان برای تکثیر ویروس تعیین می‌شود. برای ایجاد آلودگی، باید سطح خارجی ویروس با پذیرنده[۶]های اختصاصی سطح سلول میزبان واکنش نشان دهد. این نوع رده بندی اگرچه مطالعهٔ ویروس‌ها را آسان‌تر می‌کند، اما مبنای علمی ندارد. با افزایش تعداد ویروس‌های شناخته شده، رده‌بندی پیچیدگی بیشتری پیدا می‌کند. برای رده‌بندی، از ساختار و نوع اسید نوکلئیک و پوشش پروتئینی اطراف آن، اندازهٔ ویریون[۷] (ذرهٔ ویروسی که توان آلوده کنندگی دارد)، صفات ژنتیکی، داشتن حساسیت در مقابل عوامل فیزیکی و شیمیایی، و امروزه اکثراً از بررسی توالی ژنی[۸] که روشی اولیه برای شناسایی ویروس است، استفاده می‌شود. اساس این طبقه بندی‌ها به صورت زیر است :

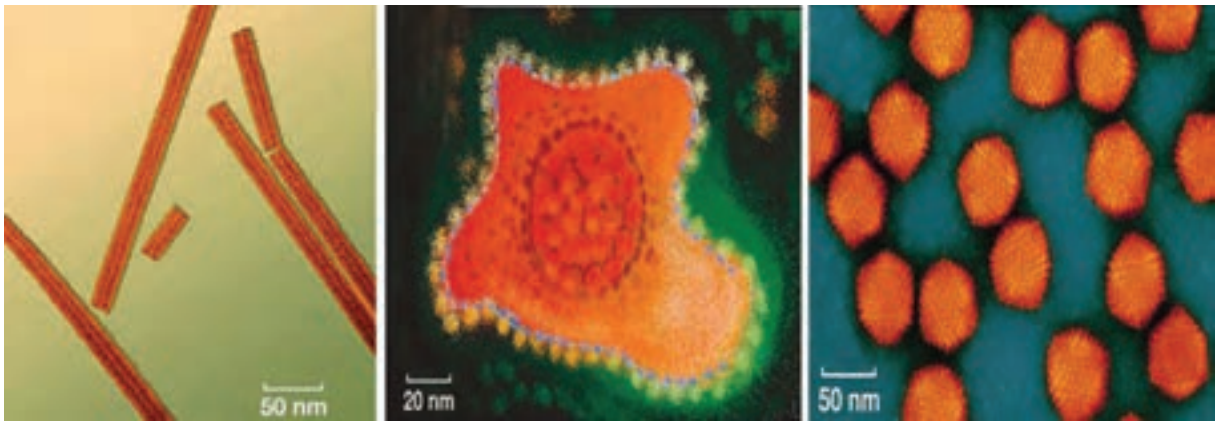
ریخت شناسی ویریون : شامل اندازه، شکل (شکل‌های ۳ــ۳ و ۴ــ۳)، نوع تقارن، و داشتن یا نداشتن پوشش است. ویروس‌ها براساس ترتیب واحدهای ریخت‌شناسی به سه گروه تقسیم می‌شوند : ویروس‌هایی که تقارن مکعبی دارند، مانند آدنو ویروس[۹]، ویروس‌هایی که تقارن مارپیچی دارند، مانند ارتومیکسو ویروس[۱۰] و ویروس‌هایی که ساختمان پیچیده دارند، مانند پاکس ویروس[۱۱].

خصوصیات ژنومی ویروس : شامل نوع اسید نوکلئیک (DNA یا RNA) ، اندازهٔ ژنوم، نوع زنجیره (تک رشته‌ای[۱۲] یا دو رشته‌ای[۱۳]) و خطی یا حلقوی بودن است.

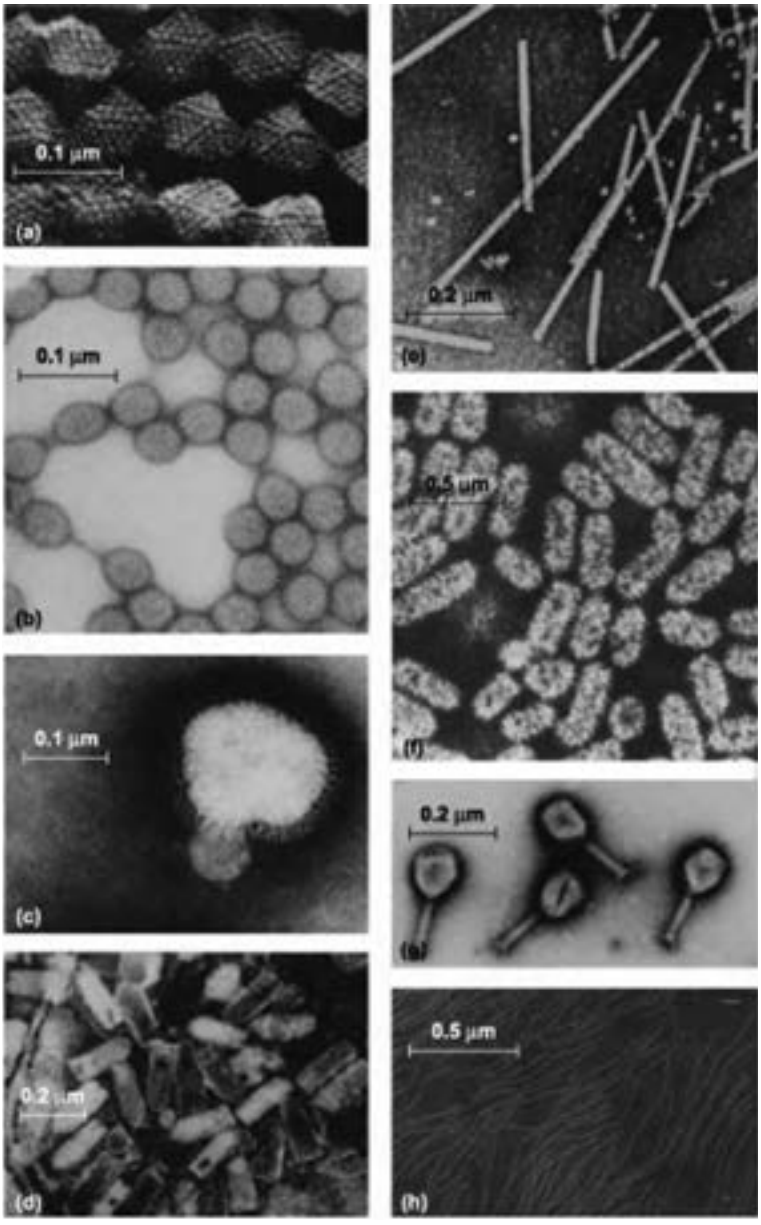
خصوصیات فیزیکی ــ شیمیایی : ویریون شامل پایداری در برابر تغییرات pH و حرارت، حساسیت به عوامل فیزیکی و شیمیایی به‌ویژه اتر و پاک کننده‌هاست.

خصوصیات پروتئینی : شامل تعداد، اندازه، عملکرد پروتئین‌های ساختمانی و غیر ساختمانی، ترتیب اسیدهای آمینه و تغییرات پس از ترجمهٔ اطلاعات ژنومی است.

۱ــEnvelope
۲ــAnimal virus
۳ــ Bacteriophage
۴ــ Plant virus
۵ــ Attachment
۶ــReceptor
۷ــVirion
۸ــ Sequencing
۹ــ Adeno virus
۱۰ــOrthomyxo virus
۱۱ــ Poxvirus
۱۲ــSingle strand (ss)
۱۳ــDouble strand (ds)



شکل ۳ــ۳ مثال‌هایی از ریخت‌شناسی ویریون‌ها



شکل ۴ــ۳ مثال‌هایی از عکس میکروسکوپ الکترونی از ریخت‌شناسی ویریون‌ها

- **طبقه‌بندی ژنی و نحوهٔ همانندسازی[1] DNA.**
- **خصوصیات آنتی ژنی ویروس.**
- **خصوصیات بیولوژیک** : شامل تعداد میزبان، راه‌های انتقال، آسیب‌زایی و بیماری‌زایی ویروس.

در سیستم جهانی طبقه‌بندی ویروس‌ها، آن‌ها را براساس ریخت‌شناسی ویریون، ساختمان ژن و نحوهٔ همانندسازی اسید نوکلئیک در گروه بزرگ «راسته»[2] تقسیم‌بندی و در انتهای نام هر راسته، از پسوند ویرال[3] استفاده می‌کنند. اعضای هر راسته در گروه خانواده[4] و سپس زیر خانواده[5] تقسیم‌بندی می‌شوند و به ترتیب در انتهای نام هر خانواده، ویروسی از پسوند ویریده[6] و برای زیرخانواده، از پسوند ویرینه[7] استفاده می‌کنند. در هر خانوادهٔ ویروس، براساس تفاوت‌های فیزیکی ــ شیمیایی، تقسیمات کوچک‌تری به نام جنس[8] و گونه[9] وجود دارد که در انتهای هریک پسوند ویروس به‌کار می‌رود. معیارهایی که برای شناسایی هر جنس به‌کار می‌رود، از خانواده‌ای به خانواده دیگر متفاوت است.

تکثیر ویروس

اسید نوکلئیک هرویریون فقط تعداد کمی از ژن‌های لازم را برای ساخت ویروس‌های جدید دارد و اکثر آنزیم‌های ویروس توسط سلول میزبان ساخته می‌شوند. برای مثال، مراحل تکثیر ویروس آنفلوانزا[10] در سلول میزبان به‌صورت زیر است (شکل ۵ــ۳و نمودار ۱ــ۳) :

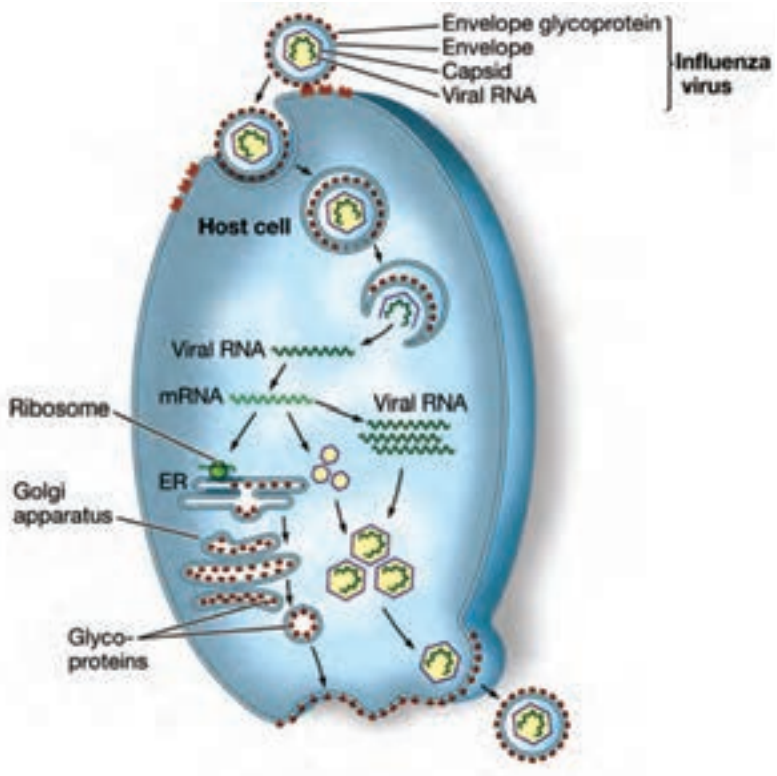
۱ــ مرحلهٔ چسبیدن[11] ویروس بر روی سلول؛

۲ــ مرحلهٔ ورود[12] و نفوذ[13] در سلول؛

۳ــ مرحلهٔ بیوسنتز و سر هم شدن[14] اجزای ویروس؛

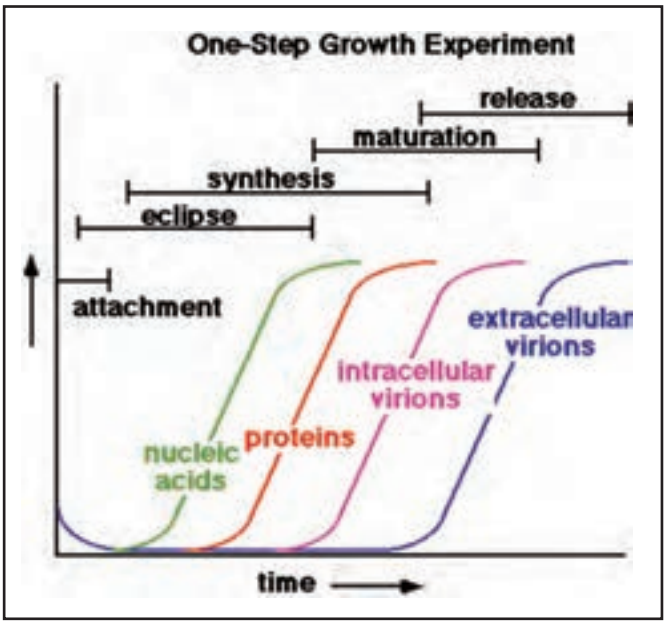
۴ــ مرحلهٔ رسیدن[15] و کامل شدن ویروس؛

۵ــ مرحلهٔ آزاد شدن[16] ویروس از سلول میزبان و نفوذ آن در سلول‌های سالم.



شکل ۵ــ۳ مراحل شماتیک تکثیر ویروس آنفلوانزا در سلول میزبان

۱ــ Replication ۲ــ Order ۳ــ Virales ۴ــ Family ۵ــ Subfamily
۶ــ Viridae ۷ــ Virinae ۸ــ Genus ۹ــ Species ۱۰ــ Influenza
۱۱ــ Attachment ۱۲ــ Entry ۱۳ــ Penentration ۱۴ــ Montage ۱۵ــ Maturation ۱۶ــ Release



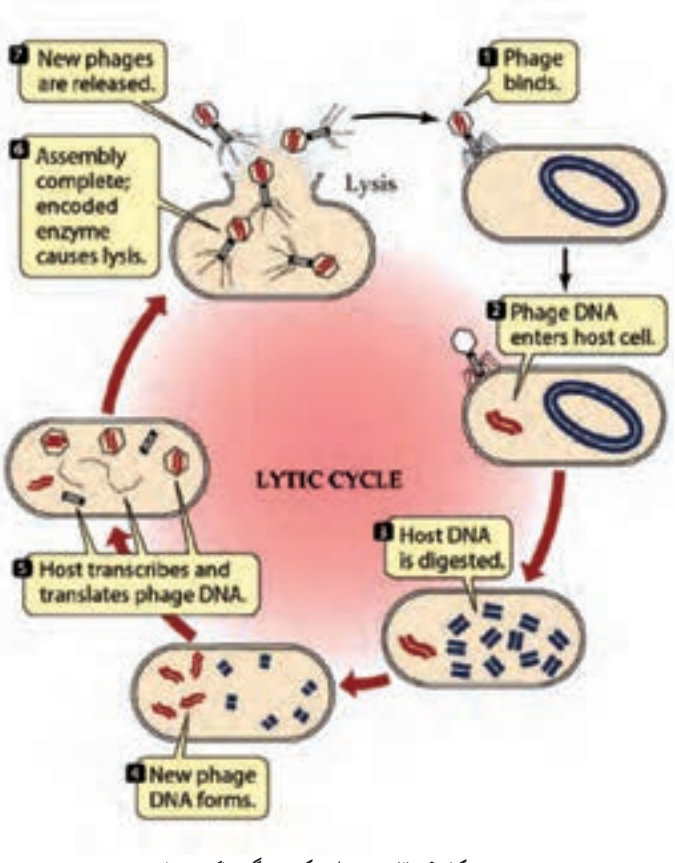
نمودار ۱ــ ۳ تفکیک مراحل تکثیر چرخهٔ زندگی ویروس در بدن میزبان

چرخهٔ زندگی ویروس‌ها

ویروس‌ها دارای دو چرخهٔ زندگی هستند و پس از آلوده کردن سلول میزبان وارد یکی از این دو چرخه می‌شوند.

۱ــ لیزوژنی[۱] : گاهی ویروس پس از آنکه سلولی را آلوده کرد تا مدتی درون آن باقی می‌ماند. ژن‌های ویروسی به جای آنکه به تولید ویروس‌های جدیدتر بپردازند خود را درون کروموزوم میزبان جای می‌دهند، که در این حالت به آن‌ها پرووِیروس[۲] گفته می‌شود. با هر بار تقسیم سلول، پرووِیروس‌ها نیز تقسیم می‌شوند. در این نوع چرخه، بی آنکه سلول میزبان تخریب شود ژنوم ویروس تکثیر می‌یابد.

۲ــ لیتیک[۳] : همانند سازی ویروس همراه با تخریب سلول میزبان، چرخهٔ لیتیک نامیده می‌شود (شکل ۶ــ۳). در این چرخه پس از آنکه ویروس ژن‌های خود را وارد سلول میزبان نماید، میزبان را به تولید ژن‌ها و پروتئین‌های خود وادار می‌کند.



شکل ۶ــ۳ چرخهٔ لیتیک زندگی باکتریوفاژ

۱ــ Lysogeny ۲ــ Provirus ۳ــ Lytic

انواع ویروس‌ها

ویروس‌های گیاهی : ویروس‌ها درجلبک‌ها، قارچ‌ها، گلسنگ‌ها، خزه‌ها، سرخس‌ها و گیاهان عالی دیده شده‌اند. ویروس‌ها به گیاهان زراعی خسارت عمده‌ای وارد می‌کنند. چون تعدادی از ویروس‌های گیاهی چندان شباهتی با ویروس‌های دیگر ندارند، بنابراین گروه مستقلی را تشکیل می‌دهند. ولی بعضی از آن‌ها خصوصیات مشترک دارند و می‌توان آن‌ها را در یک گروه قرار داد.

گروه‌های اصلی ویروس‌های گیاهی عبارت‌اند از (شکل ۷ــ۳) :

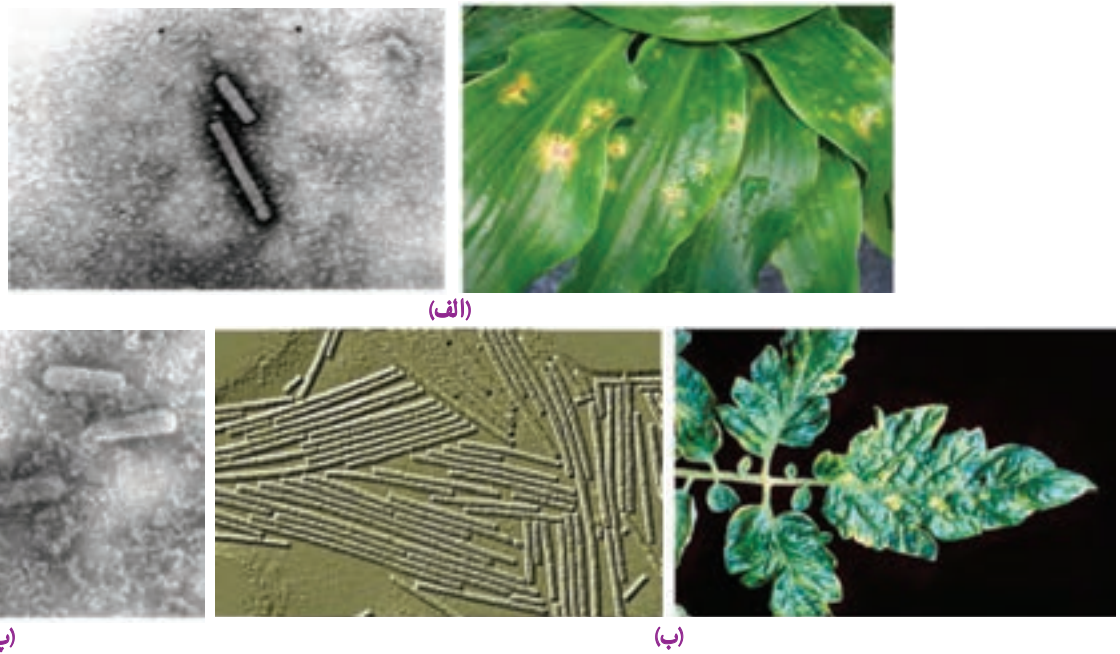
توبرا ویروس[۱] : عضو اصلی این گروه است که توسط نماتدها انتقال می‌یابد.

توبامو ویروس[۲] : ویروس موزاییک توتون عضو اصلی این گروه است. این ویروس بسیار پایدار است و در گیاه علایم موزاییکی ایجاد می‌کند.

ویروس پژمردگی گوجه فرنگی : در بسیاری از گیاهان موزاییک و نکروز تولید می‌کند و به آسانی به طریق مکانیکی (مالش) منتقل می‌شود.

رابدو ویروس[۳] : ویروس‌های این گروه در جانوران مهره‌دار، بی‌مهره و در گیاهان یافت می‌شوند. از نمونه‌های گیاهی آن ویروس کوتولگی زرد سیب‌زمینی است که توسط زنجره‌ها انتقال می‌یابد.

ویروس‌های جانوری : ویروس از انواع مختلف جانوران از تک یاختگان تا انسان جدا شده است. میزبان مهم ویروس‌ها در بی‌مهرگان، بندپایان هستند به خصوص کنه‌ها و حشرات. تعدادی از ویروس‌ها در عین حال که در حشرات تکثیر می‌یابند می‌توانند در گیاه یا در جانور مولد بیماری باشند، ولی برای خود حشرات بیماری‌زا محسوب نمی‌شوند. گروه‌های اصلی ویروس‌های جانوری



الف) برگ‌های گیاه آلوده شده با توبراویروس و عکس میکروسکوپ الکترونی از ویروس
ب) برگ‌های گیاه آلوده شده با ویروس موزاییک تنباکو و عکس میکروسکوپ الکترونی از ویروس
پ) عکس میکروسکوپ الکترونی از رابدو ویروس

شکل ۷ــ۳

۱ــTobra virus ۲ــTobama virus ۳ــ Rabdo virus

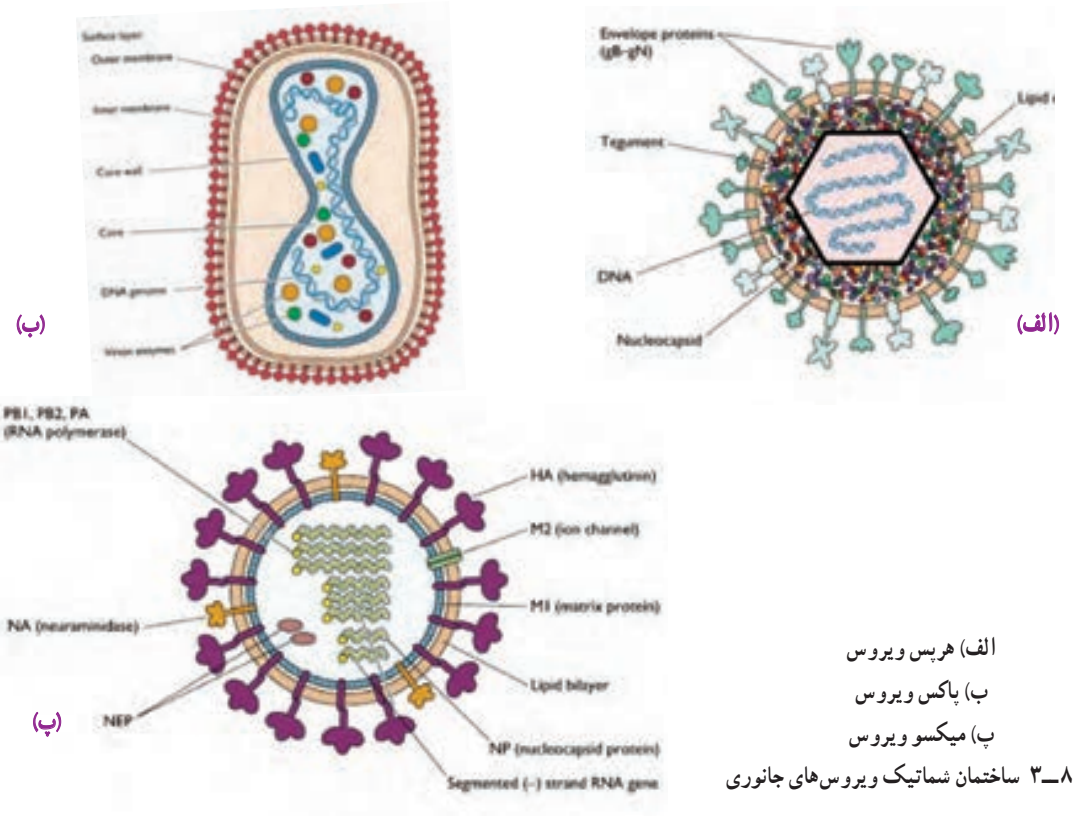
عبارت‌اند از (شکل ۸ــ۳) :

پاکس ویروس : این ویروس‌ها مولد بیماری آبله در انسان، گاو، خرگوش و پرندگان هستند.

میکسو ویروس[۱] : ویروس‌های این گروه مولد بیماری‌هایی مانند آنفلوآنزا در جانوران مختلف هستند.

پارامیکسو ویروس[۲] : مولد بیماری‌هایی مانند سرخک، اوریون، پاراآنفلوآنزا و نیوکاسل در جانوران هستند.

هرپس ویروس[۳] : ویروس‌های این گروه بیماری‌هایی مانند زونا، تبخال وآبله مرغان ایجاد می‌کنند.



الف) هرپس ویروس
ب) پاکس ویروس
پ) میکسو ویروس

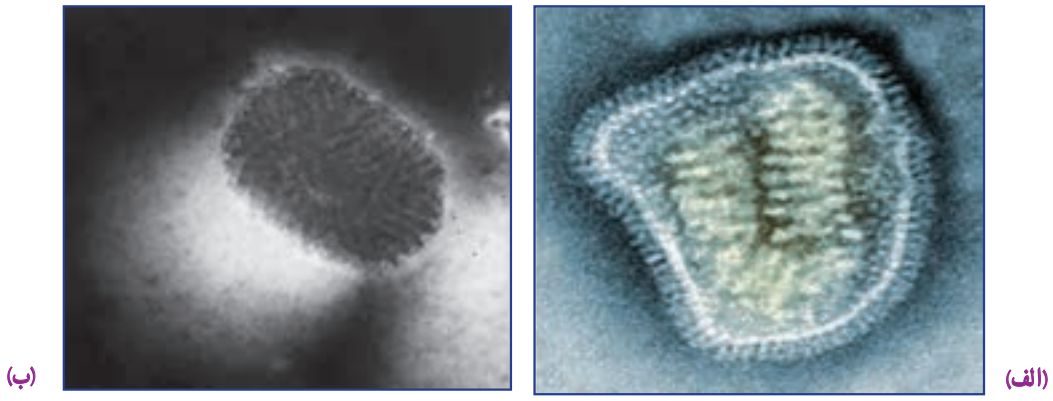
شکل ۸ــ۳ ساختمان شماتیک ویروس‌های جانوری

آدنو ویروس : این ویروس در دستگاه تنفسی جانوران بیماری‌های گوناگون ایجاد می‌کنند و در انسان عامل نوعی تومور سرطانی شناخته شده‌اند.

تمام ویروس‌های جانوری دارای تقارن مکعبی، از نوع بیست وجهی[۴] هستند که بیشترین کارآیی را در ترتیب واحدهای ساختمانی در یک پوستهٔ بسته فراهم می‌کنند (شکل۹ــ۳). بر روی سطح یک بیست وجهی دقیقاً ۶۰واحد مشابه وجود دارد. وجود مثلث‌های کوچک در سطوح مختلف یک بیست وجهی موجب می‌شود که با رعایت اصول تقارن، تعداد بیشتری از واحدهای ساختمانی در تشکیل ساختمان کپسید شرکت کنند. ظاهر اغلب ویروس‌هایی که تقارن بیست وجهی دارند کروی است. در هر دو گروه ویروس‌های دارای DNA یاRNA تقارن مکعبی مشاهده می‌شود.

شکل ۹ــ۳ تقارن بیست وجهی در آدنو ویروس

۱ــ Myxo virus ۲ــ Paramyxo virus ۳ــ Herpes virus ۴ــ Icoshdral

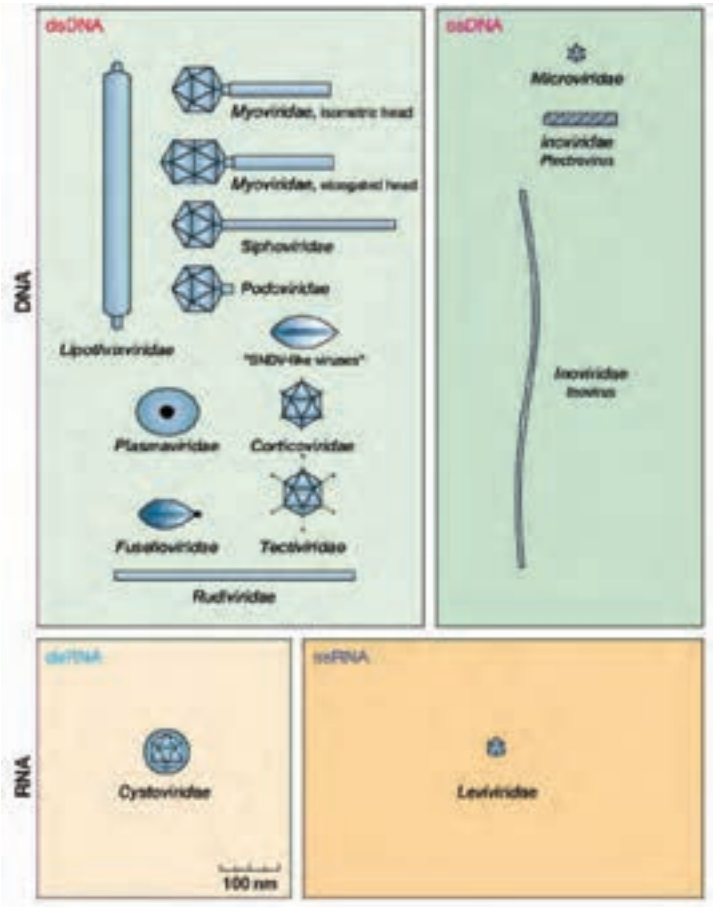


الف) تقارن مارپیچی واحدهای پروتئینی در اطراف اسید نوکلئیک ویروس آنفلوانزا
ب) ساختمان پیچیدهٔ پاکس ویروس

شکل ۱۰ــ۳

در تقارن مارپیچی، واحدهای پروتئینی به صورت مارپیچ در اطراف اسید نوکلئیک ویروس قرار می‌گیرند و به‌طور منظم به آن اتصال می‌یابند. مجموعهٔ اسید نوکلئیک رشته‌ای پروتئین ویروسی به صورت کلافه‌ای توسط یک پوشش چربی احاطه می‌شود. کپسومرها در این نوع تقارن به شکل مارپیچ گرد هم می‌آیند. ویروس‌های آنفلوآنزا و اوریون نمونه‌هایی از ویروس‌های جانوری با تقارن مارپیچی هستند. عده‌ای از ویروس‌ها، مانند ویروس‌های باکتریایی ساختمان بسیار پیچیده‌ای دارند. ویروس‌های گروه آبله، که فاقد کپسید مشخص‌اند ولی غلاف متعددی در اطراف اسید نوکلئیک دارند و برخی از باکتریوفاژها که فاقد کپسید و ساختارهای اضافی متصل به آن هستند، جزءِ این نوع ویروس‌ها محسوب می‌شوند (شکل ۱۰ــ۳). شکل کپسید باکتریوفاژ و ناحیهٔ سر چند وجهی بوده و دم آن مارپیچی است.

ویروس‌های باکتریایی: در سال‌های ۱۹۱۵ و ۱۹۱۷ میلادی، دانشمندان ضمن رشد باکتری‌های مختلف در محیط‌های کشت مایع، متوجه لیز شدن خود به خود باکتری‌ها شدند. آن‌ها پس از صاف کردن این محیط با فیلترهای باکتریولوژی، وجود باکتریوفاژ (فاژ) را ثابت کردند. هر باکتریوفاژ در یک باکتری اختصاصی و مناسب خود رشد می‌کند. باکتریوفاژها نیز نظیر سایر ویروس‌ها از یک نوع اسید نوکلئیک تشکیل شده‌اند (شکل ۱۱ــ۳).

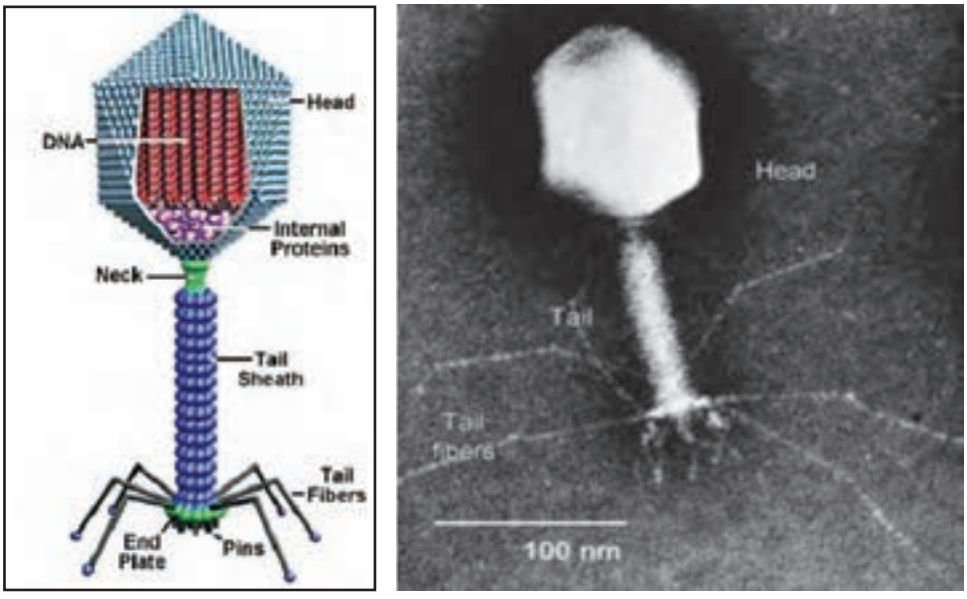


شکل ۱۱ــ۳ طبقه بندی فاژها براساس محتویات اسیدنوکلئیک آن‌ها

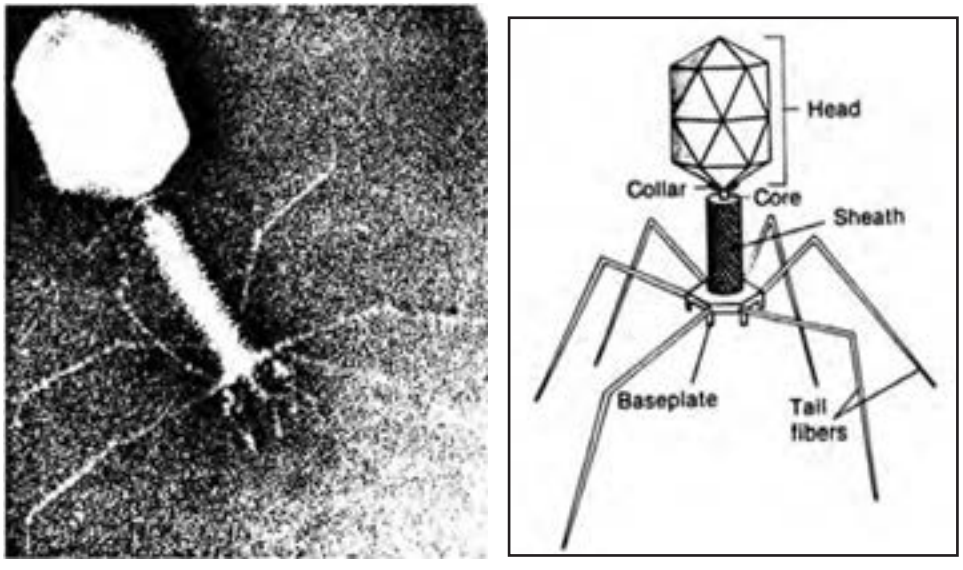
در بعضی از فاژها دم، غلاف روی دم، پایهٔ انتهایی و رشته‌های خار مانند دیده می‌شود (شکل ۱۲ــ۳).

امروزه باکتریوفاژها را برحسب نوع و شکل در شش گروه تقسیم‌بندی می‌کنند :

فاژهای دم‌دار با غلاف کوتاه شونده : این دسته از فاژها شکل تیپیک دارند و از سه قسمت کپسید (به‌عنوان سر)، دم و پایه‌ای که در انتهای دم قرار دارد تشکیل شده‌اند (شکل ۱۳ــ۳). کپسید آن‌ها هشت وجهی است. داخل کپسید اسید نوکلئیک DNA دورشته‌ای قرار دارد. مثال‌های این گروه از فاژها عبارت‌اند از فاژهای T_6 ، T_4، T_2. این دسته از فاژها در زمان حمله و نفوذ به درون باکتری مورد نظر با زواید خار مانندی که در انتهای دم خود دارند بر روی باکتری‌ها می‌چسبند، سپس غلاف روی دم آن‌ها منقبض می‌شود و مثل سرنگ عمل می‌کند. قسمت دم وارد دیوارهٔ باکتری می‌شود و DNA موجود در داخل کپسید از داخل سوراخ وسط کانال دم عبور می‌کند و به داخل سیتوپلاسم باکتری وارد می‌شود. بقیهٔ قسمت‌های ویروس در بیرون از سلول باکتری باقی می‌ماند.



شکل ۱۲ــ۳ عکس میکروسکوپ الکترونی از فاژ و شکل شماتیک و اجزای آن



شکل ۱۳ــ۳ عکس میکروسکوپ الکترونی و شکل شماتیک از فاژ T_4

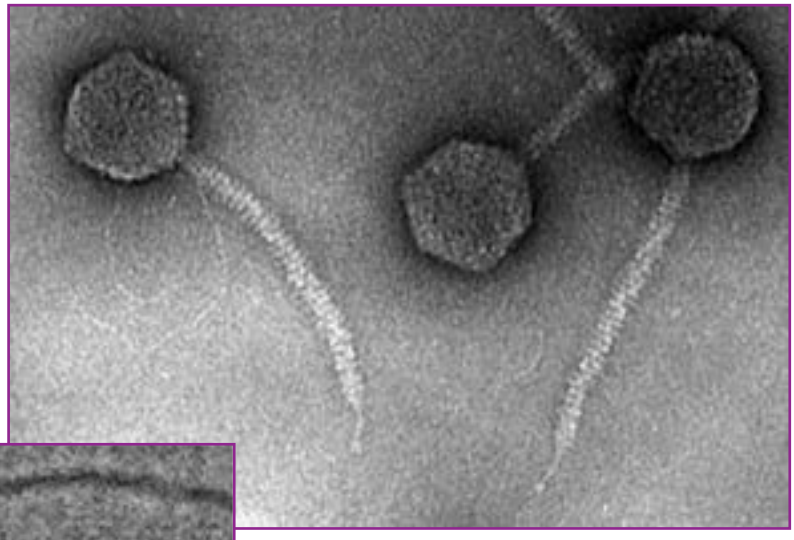
فاژهای دم‌دار با دم دراز بدون غلاف : این گروه دارای یک کپسید و یک دم دراز بدون غلاف‌اند. شکل کپسید شبیه گروه اول است (شکل ۱۴ــ۳). در داخل آن اسید نوکلئیک DNA دو رشته‌ای وجود دارد. نحوهٔ ورود اسید نوکلئیک این فاژها در زمان آلوده کردن باکتری‌ها هنوز مشخص نشده است. این گروه از فاژها در طبیعت بسیار فراوان‌اند و تقریباً برای تمامی انواع باکتری‌ها از این فاژها مشخص شده است، مانند فاژ لامبدا[۱].

فاژهای با دم کوتاه و بدون غلاف : کپسید این گروه نیز شبیه دو گروه اول بوده ولی دم آن‌ها بسیار کوتاه است. برخی از فاژهای موجود در این گروه در انتهای خود فقط یک زایدهٔ کوچک دارند، یعنی طول دم در این فاژها از طول کپسید به مراتب کوتاه‌تر است. اسید نوکلئیک آن‌ها DNA دورشته‌ای است، مانند فاژ T_7.

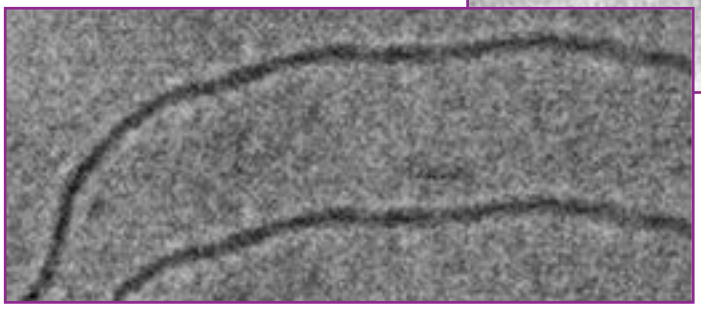
باکتریوفاژهای بی‌دم با کپسومر بزرگ : این فاژها به‌طور کلی فاقد دم و زواید آن هستند و تنها از کپسید تشکیل یافته‌اند. اسید نوکلئیک آن DNA تک‌رشته‌ای و تقریباً کوچک (۲۵ نانومتر) است مانند M_{20} و S_{13}.

باکتریوفاژهای بی‌دم با کپسومر کوچک : کپسید این فاژها هشت وجهی و کوچک است و ساختمانی بسیار ساده متشکل از ۹۲ کپسومر دارد. یکی از این کپسومرها بزرگ‌تر از بقیه است و احتمالاً در چسبیدن فاژ به باکتری نقش دارد. این گروه از فاژها دو ویژگی مهم دارند. اول این‌که اسید نوکلئیک RNA تک‌رشته‌ای است و دوم این‌که این دسته از فاژها فقط باکتری‌های نر یا دهنده را آلوده می‌کنند، مانند فاژهای FR و F_2.

فاژهای میله مانند یا رشته‌ای : برخلاف بقیهٔ فاژها این دسته از فاژها ساختمانی شبیه به کپسید ندارند و به صورت میله یا رشته دیده می‌شوند (شکل ۱۵ــ۳). در داخل ساختمان این گروه از فاژها اسید نوکلئیک DNA تک‌رشته‌ای وجود دارد. این گروه نیز فقط باکتری‌های نر را آلوده می‌کنند، مانند فاژ M_{13}.



شکل ۱۴ــ۳ عکس میکروسکوپ الکترونی از فاژ لامبدا



شکل ۱۵ــ۳ عکس میکروسکوپ الکترونی از فاژ M_{13}

۱ــ Lambda

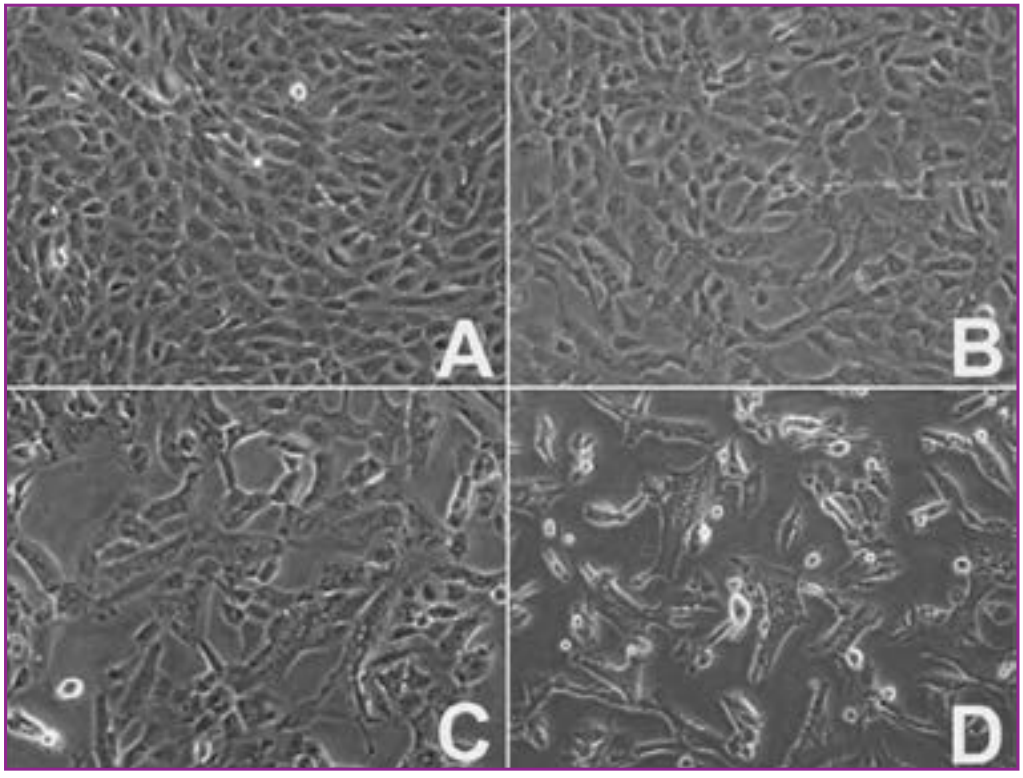
کشت ویروس‌ها در آزمایشگاه

برای تکثیر ویروس‌ها به جای محیط‌های شیمیایی ساده می‌باید یاخته‌های زنده فراهم شود. ویروس‌ها را می‌توان در شرایط کنترل شده و در یاخته‌هایی که در ظروف آزمایشگاهی خاص کشت داده می‌شوند، تکثیر نمود. مطالعهٔ ویروس‌های جانوری در کشت یاخته‌های انسان، حیوان، تخم مرغ جنین‌دار و پریمات‌ها صورت می‌گیرد. مطالعهٔ ویروس‌های گیاهی و حشرات نیز در پروتوپلاست‌های یاخته‌های گیاهی و یاخته‌های تهیه شده از پیکر حشرات انجام می‌شود. با اضافه کردن آنتی‌بیوتیک‌های مختلف به کشت یاخته می‌توان از رشد و تکثیر باکتری‌ها، میکوپلاسماها و قارچ‌ها جلوگیری کرد.

رشد و تکثیر ویروس در کشت یاخته : استفاده از روش‌های کشت یاخته موجب شده است که شناسایی ویروس‌های جدا شده جدید و تعیین خصوصیات ویروس‌های شناخته شدهٔ قبلی آسان شود. علاوه بر جداسازی ویروس، تهیهٔ واکسن و آنتی‌ژن‌های گوناگون و تحقیق در مورد فعالیت‌های بیولوژیک و بیوشیمیایی ویروس‌ها از کاربردهای کشت یاخته هستند. روش‌های تشخیص یاخته‌های آلوده به ویروس عبارت‌اند از :

۱ــ پیدایش اثر سیتوپاتیک[۱] **(CPE)** : اثر سیتوپاتیک تغییرات ریخت شناسی ناشی از تکثیر ویروس است که در یاخته‌های آلوده به ویروس رخ می‌دهد (شکل ۱۶ــ۳). متلاشی شدن یاخته، نکروز[۲] یاخته‌ای، تشکیل اجسام درون یاخته‌ای[۳]، تشکیل یاخته‌های غول پیکر[۴] و تشکیل حفرات سیتوپلاسمی نمونه‌هایی از اثرات سیتوپاتیک‌اند که توسط ویروس‌ها ایجاد می‌شوند.

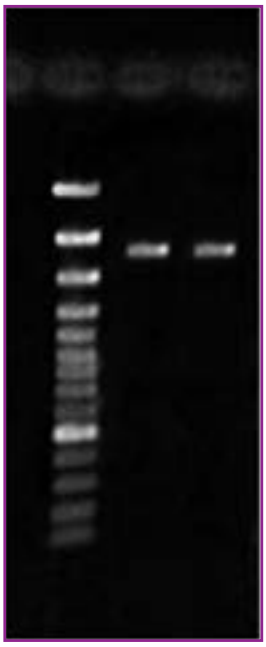
۲ــ بیان[۵] **پروتئین‌های کد شدهٔ ویروس** : از آنتی‌سرم‌های اختصاصی می‌توان برای بررسی ساخت پروتئین‌های ویروس در یاخته‌های آلوده استفاده کرد.



شکل ۱۶ــ۳ مراحل ایجاد اثر سیتوپاتیک در سلول کشت داده شده

۱ــCytopathic effect ۲ــNecrosis ۳ــInclusion body ۴ــGiant cell ۵ــ expression

۳ــ مشاهدهٔ اسیدنوکلئیک ویروس: آزمایش‌های مولکولی مانند واکنش زنجیرهٔ پلی‌مراز[۱](PCR) (شکل ۱۷ــ۳) روشی اختصاصی، حساس و سریع برای تأیید ویروس‌اند.

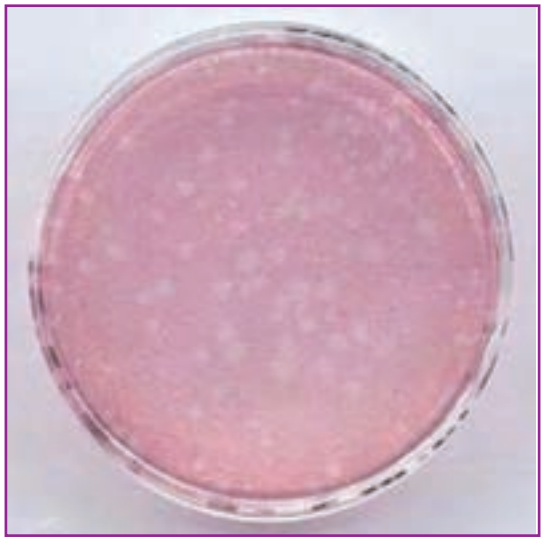


شکل ۱۷ــ۳ تک باندهای مربوط به DNA تکثیر یافتهٔ ویروس در آزمایش واکنش زنجیرهٔ پلی‌مراز که بر روی ژل آگارز الکتروفورز شده‌اند. ستون سمت چپ مارکر مولکولی است.

۴ــ نحوهٔ اندازه‌گیری مقدار ویروس‌ها:

الف) روش‌های فیزیکی: با کمک یک محلول استاندارد از ذرات لاتکس[۲]، که اندازهٔ کوچک و یک‌سانی دارند، می‌توان ذرات ویروس را زیر میکروسکوپ الکترونی شمرد. برای تعیین مقدار ویروس موجود در یک نمونه می‌توان از آزمایش‌های سرولوژی مانند رادیو ایمونواسی[۳] و الایزا[۴] استفاده کرد.

ب) روش‌های بیولوژی: نقطهٔ پایان آزمایش‌های بیولوژی به میزان مرگ و عفونت در حیوانات یا به اثرات سیتوپاتیک در کشت‌های یاخته‌ای، به غلظت‌های مختلف ویروس مورد آزمایش بستگی دارد. برای اکثر ویروس‌های عفونی از آزمایش ارزیابی پلاک[۵] استفاده می‌شود. در این روش نمونه‌ای از باکتریوفاژ را با باکتری میزبان و آگار ذوب شده مخلوط می‌کنند، سپس این مخلوط را در پلیت می‌ریزند و می‌گذارند تا به صورت یک لایه بسته شود. پس از طی دورهٔ گرم‌خانه گذاری، هر ذره ویروسی در داخل یک باکتری تکثیر می‌یابد و پس از پاره شدن دیوارهٔ باکتری، صدها ویروس تازه رها می‌شود. این ویروس‌ها به باکتری‌های دیگر حمله می‌کنند و به ترتیب، همهٔ باکتری‌ها در نواحی اطراف ویروس اولیه از بین می‌روند. در نتیجه در سطح آگار نواحی شفافی به نام پلاک به تعداد زیاد به چشم می‌خورد (شکل ۱۸ــ۳). مقدار ذرات ویروس را با شمارش پلاک‌ها اندازه‌گیری می‌کنند.

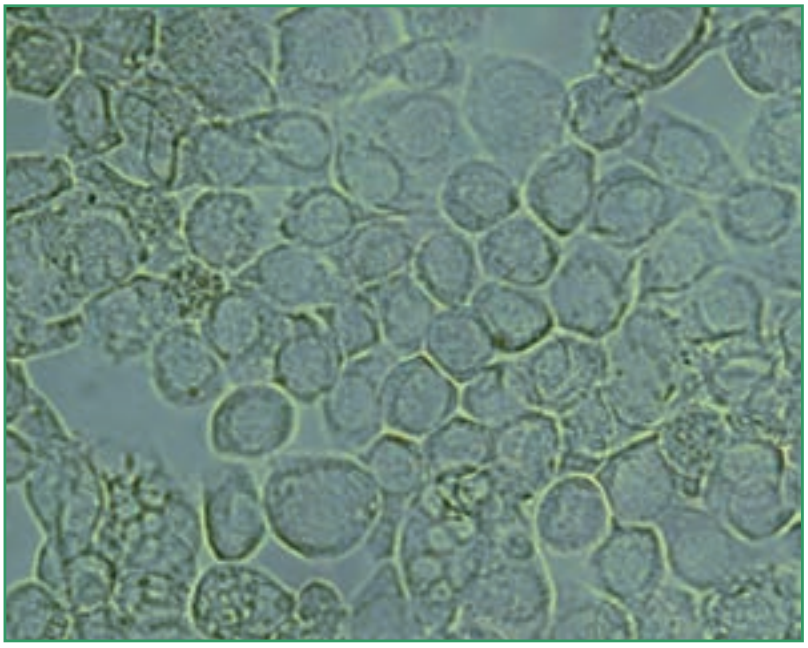


شکل ۱۸ــ۳ پلاک‌های شفاف ویروس که در آگار رنگ شده با رنگ قرمز خنثا دیده می‌شوند.

۱ــ Polymerase Chain Reaction
۲ــ Latex bead
۳ــ Radio Immuno Assay (RIA)
۴ــ Enzyme Like Immunosorbent Assay (ELISA)
۵ــ Plaque assay

انواع کشت یاخته در آزمایشگاه

کشت یاخته‌ای اولیه[1] : از نمونه‌های بافتی تازه مانند بافت پوششی دستگاه تنفس، رودهٔ کوچک، بافت عصبی، تخمدان و تیرویید تهیه می‌شود. این یاخته‌ها بعد از چند بار کشت قادر به رشد نیستند و فقط پنج تا ده بار پاساژ را تحمل می‌کنند، سپس همگی خواهند مرد. برای تهیهٔ کشت یاخته‌ای اولیه، پس از تقسیم بافت مورد نظر را به قطعات دو میلی‌متری به آن محلول حاوی یک آنزیم پروتئولیتیک[2] مانند تریپسین اضافه می‌کنند تا در حرارت آزمایشگاه عمل هضم آنزیمی قطعات صورت گیرد و یاخته‌های بافت از هم جدا شوند. به منظور ممانعت از اثر آنزیم، بافت‌ها را می‌شویند و به آن سرم گوساله اضافه می‌کنند. یاخته‌ها را به تعداد مناسب به محیط کِشتی که حاوی محلول تنظیم شده از نمک‌های فیزیولوژی، اسیدهای آمینه، سرم جنین گاو یا سرم گوساله، گلوکز، معرف رنگی فنل‌رد (برخی محیط‌های رشد فاقد معرف هستند) و آنتی‌بیوتیک‌های لازم است، در ظرف سترون اضافه می‌کنند و در دمای مناسب قرار می‌دهند. یاخته‌ها به سطح ظرف کشت می‌چسبند و در شرایط مناسب به صورت یک لایهٔ یک‌نواخت، رشد و تکثیر می‌یابند (شکل ۱۹ــ۳).



شکل ۱۹ــ۳ کشت یاخته‌ای اولیهٔ ویروس روی سلول‌های لارو تخمدان حشره

کشت یاخته‌ای ثانویه یا یاخته‌های دیپلوییید : یاخته‌های دیپلوییید 2n کروموزومی‌اند و همگی از یک نوع یاخته منشأ می‌گیرند. این یاخته‌ها تا یک صد بار پاساژ را تحمل می‌کنند. نمونهٔ آن یاخته دیپلوییید جنین انسان است که از آن برای اهدافی چون جداسازی وتعیین هویت ویروس‌ها و تولید واکسن استفاده می‌شود.

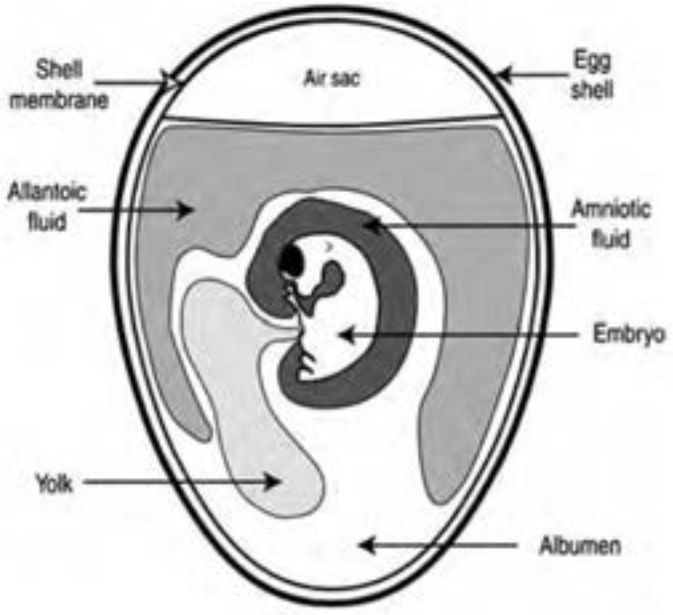
کشت یاخته‌ای مداوم یا ماندگار : یاخته‌های ماندگار، یک منشأ یاخته‌ای دارند و تا بی‌نهایت پاساژ را تحمل می‌کنند و به تعداد نامحدود رشد می‌کنند، به دفعات تکثیر می‌یابند و می‌توان آن‌ها را به صورت شناور[3] در فرمانتورهای ویژه کشت داد، مانند یاخته Hep2 که از سرطان حنجرهٔ انسان گرفته شده است.

۱ــPrimary cell culture ۲ــ Proteolytic ۳ــ Suspension

رشد و تکثیر ویروس در تخم مرغ جنین‌دار

در تخم مرغ چندین غشا وجود دارد (شکل ۲۰ــ۳) که می‌توان بر روی آن‌ها ویروس را پرورش داد و رشد ویروس را از روی مرگ جنین یا آسیب دیدن یاخته‌های جنینی مشاهده کرد. از ویروس‌های رشد و تکثیر یافته با این روش برای تولید واکسن استفاده می‌شود. برای این منظور پس از تعبیه کردن سوراخی در پوستهٔ خارجی تخم‌مرغ از آن راه مایع حاوی ویروس را در تخم مرغ تزریق می‌کنند. راه‌های وارد کردن ویروس به تخم مرغ جنین دار عبارت‌اند از : تزریق مایع حاوی ویروس بر روی پردهٔ کوریو آلانتوییک[۱]، تزریق به داخل حفرهٔ آلانتوییک[۲]، تزریق به داخل حفرهٔ آمنیوتیک[۳] و تزریق به داخل کیسه زرده.

روش تزریق در تخم مرغ جنین‌دار : ابتدا تخم مرغ را تاریک بینی[۴] می‌کنند. به این ترتیب که در یک اتاق تاریک، تخم مرغ را روی حفرهٔ داخل جعبه ای که داخل آن یک چراغ تعبیه شده است، قرار می‌دهند. نور چراغ باعث روشن شدن تخم‌مرغ می‌گردد و جنین و رگ‌های مربوط به آن مشخص می‌شوند. سپس در جایی که رگ‌های اصلی وجود ندارند، حفرهٔ هوایی را معین می‌کنند و روی پوستهٔ تخم‌مرغ علامت می‌زنند. پوسته را با محلول تنتورید سترون می‌کنند. در تزریق پردهٔ کوریو آلانتوییک و حفرهٔ آمنیوتیک پوستهٔ اطراف حفره هوایی را کاملاً جدا می‌کنند تا تزریق روی پردهٔ متصل به پوسته انجام گیرد. در تزریق حفرهٔ آلانتوییک و کیسهٔ زرده، در مرکز پوسته روی حفرهٔ هوایی یک سوراخ تعبیه می‌کنند و با استفاده از سرنگ مقدار ۰/۱ میلی لیتر از مایع حاوی ویروس را تزریق می‌کنند (شکل۲۱ــ۳). سپس سوراخ‌ها را با پارافین مایع مسدود می‌کنند و تخم‌مرغ‌ها را در گرم‌خانه قرار می‌دهند.



شکل ۲۰ــ۳ ساختمان شماتیک تخم‌مرغ جنین‌دار

شکل ۲۱ــ۳ نحوهٔ تزریق مایع حاوی ویروس به تخم‌مرغ جنین‌دار

۱ــ Choryoallantoic membrane ۲ــ Allantoic cavity ۳ــ Amniotic cavity ۴ــ Chandelling

رشد و تکثیر ویروس در حیوان‌های آزمایشگاهی

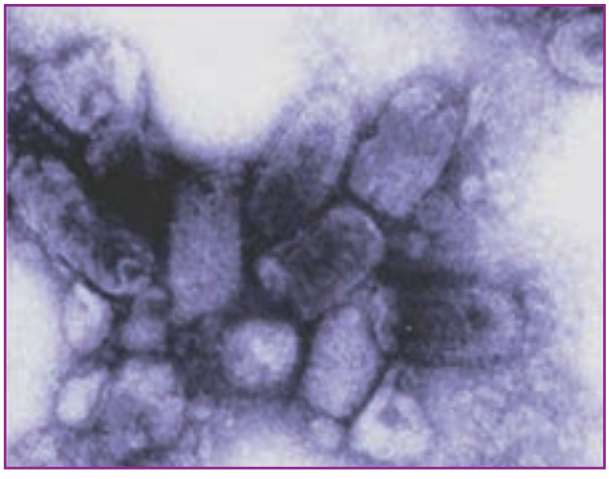
برخی ازویروس‌های جانوری را می‌توان منحصراً در بدن حیوانات زنده، نظیر موش، خرگوش و خوکچهٔ هندی پرورش داد. اکثر تجربیات مربوط به آن نیز باید در بدن حیوانات آلوده شده انجام گیرد. تلقیح حیوانات برای تشخیص ویروس‌ها در نمونه‌های بالینی و نیز مطالعهٔ واکنش‌های ایمنی نسبت به عفونت‌های ویروسی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از مدل‌های حیوانی برای تهیهٔ یاخته‌های خون، سرم‌ها، آنتی‌سرم‌ها و آنتی‌ژن‌های ویروسی استفاده می‌شود. مثلاً از مرغ برای تولید آنتی‌سرم‌های اختصاصی علیه ویروس آنفلوآنزا و ویروس‌های قابل تکثیر در تخم مرغ جنین دار، از موش‌های شیرخوار برای تکثیر و جداسازی ویروس‌ها، از خوکچه هندی برای تولید آنتی‌سرم‌ها و تکثیر برخی ویروس‌ها، از خرگوش برای تهیه آنتی‌سرم‌ها، از شمپانزه برای مطالعهٔ ویروس‌های عفونت‌زای انسان که در کشت یاخته تکثیر نمی‌شوند (عامل بیماری ایدز) استفاده می‌شود. تزریق به روش‌های داخل صفاقی، داخل مغزی، داخل عضلانی و داخل بینی صورت می‌گیرد.

رشد و تکثیر باکتریوفاژها در شرایط آزمایشگاه

تهیهٔ گیاهان و جانوران زنده برای رشد و نگه‌داری ویروس‌ها، دشوار و پرهزینه است. به علاوه ویروس‌های بیماری‌زایی که فقط در پریمات‌های عالی و در انسان رشد می‌کنند مشکلات بیشتری را نیز فراهم می‌کنند. اما باکتریوفاژها را می‌توان با رشد آن‌ها برروی باکتری‌ها به‌آسانی تهیه کرد. از این رو قسمت اعظم اطلاعات به‌دست آمده در مورد تکثیر ویروس‌ها از مطالعهٔ آن‌ها بر روی فاژها به‌دست آمده است. باکتریوفاژها را می‌توان در محیط مایع باکتری در محیط کشت جامد، پرورش داد. محیط جامد، پیدایش پلاک و شمارش ویروس‌ها را با به‌کاربردن مواد و وسایل ساده میسر می‌سازد.

بیماری‌های مهم ویروسی در میزبانان مختلف

هاری[1] : بیماری ویروسی حاد و کشندهٔ سیستم اعصاب مرکزی مخصوص گوشت‌خواران اهلی و وحشی است. کلیهٔ حیوانات خون‌گرم پستاندار اهلی و وحشی، پرندگان و خفاش‌ها نسبت به‌بیماری‌هاری حساس‌اند و انسان به‌طور تصادفی و غالباً از طریق گزش به‌آن مبتلا می‌شود (شکل‌های ۲۲ــ۳ و ۲۳ــ۳). با وجودی که بیش از یک قرن از کشف واکسن هاری توسط پاستور می‌گذرد، به‌علت تنوع میزبان‌های حساس به این بیماری هنوزهاری در بیشتر کشورها به صورت آندمیک وجود دارد. با وجود پیشرفت‌های حاصل در تکنولوژی و علوم پزشکی هنوز درمانی برای مبتلایان به‌هاری پس از ظهور علایم بالینی وجود ندارد. عامل بیماری ویروسی نوروتروپ[2] از گروه رابدوویروس‌هاست. این ویروس در حرارت ۵۰ درجهٔ سانتی گراد طی ۱۵ دقیقه و در حرارت



شکل ۲۲ــ۳ عکس میکروسکوپ الکترونی از ویروس‌هاری

۱ــ Rabies ۲ــ Nerotropic

۱۰۰ درجه سانتی گراد طی چند ثانیه ازبین می‌رود. بنابراین برای ضد عفونی کردن وسایل آلوده کافی است چند دقیقه آن‌ها را بجوشانند. فنل، الکل و فرمل به سرعت ویروس را از بین می‌برند.

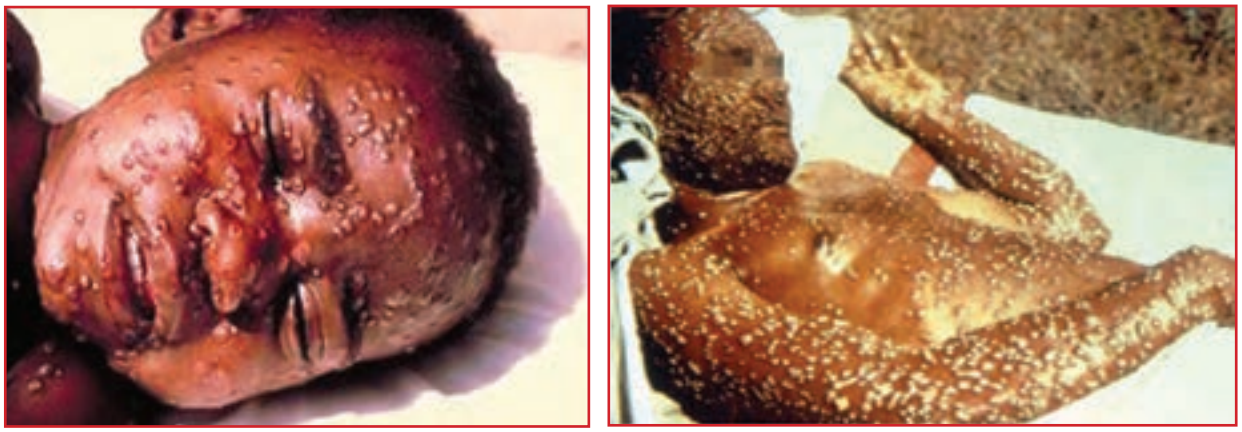
شکل ۲۳ــ۳ علایم بالینی بیماری هاری در سگ و گاو شامل تغییر رفتار و ریزش کف از دهان

بیماری تب برفکی :تب برفکی[۱] بیماری بسیار واگیری است که تقریباً همهٔ زوج‌سمان، از جمله نشخوارکنندگان اهلی را مبتلا می‌کند و باعث خسارات اقتصادی قابل توجهی می‌شود. میزان مرگ و میر در دام‌های بالغ، کم است. اما به‌دلیل ایجاد میوکاردیت، میزان مرگ و میر در دام‌های جوان زیاد است. مقاومت ویروس در طبیعت و عفونت‌زایی شدید آن، تغییرات آنتی‌ژنی ویروس و پیدایش تحت تیپ‌های جدید آن و مهم‌تر از همه توان بیماری‌زایی در انواع نشخوارکنندگان اهلی و وحشی و وجود دام‌های ناقل و حامل ویروس تب برفکی در بقای عفونت و بیماری در یک جمعیت و منطقه تأثیر دارند و کنترل این بیماری را بسیار مشکل و همراه با هزینه‌های زیاد می‌کند. عامل بیماری تب برفکی ویروسی از خانوادهٔ پیکورناویریده[۲] و از جنس آفتوویروس[۳] است که سروتیپ‌های متعددی دارد. ویروس عامل بیماری تب برفکی از جمله مقاوم‌ترین ویروس‌های شناخته شده در طبیعت است. این ویروس نسبت به یدوفورها، ترکیبات چهارتایی آمونیوم، هیپوکلریت و فنل، به‌ویژه در حضور مواد آلی، مقاوم است. مواد ضدعفونی‌کننده، از جمله هیدروکسید سدیم ۲٪، کربنات سدیم ۴٪ و اسید سیتریک ۰/۲٪ این ویروس را غیرفعال می‌کنند (شکل ۲۴ــ۳).

۱ــ Foot and Mouth Disease (FMD) ۲ــ Picornaviridae ۳ــ Afto virus

شکل ۲۴ــ۳ ریزش بزاق کش‌دار و تاول‌های پاره شدهٔ روی زبان در گاو مبتلا به بیماری تب برفکی

بیماری آبله[1] : یک بیماری ویروسی حاد خطرناک با قابلیت سرایت فوق العاده شدید است. عامل آن ویروسی از دستهٔ پاکس است که با اندازه ۳۰۰ــ۲۰۰ میکرون درشت‌ترین نوع ویروس‌هایند و با میکروسکوپ نوری نیز قابل رؤیت‌اند. این ویروس‌ها در گاو، شتر، گوسفند و پرنده هم بیماری ایجاد می‌کنند. در انسان بیماری آبله با علایمی شبیه به آنفلوآنزا شروع می‌شود و با بثورات وزیکولی ادامه پیدا می‌کند. چون ویروس تمایل بیشتری به پوست و مخاط دارد قادر است نکروز نسجی ایجاد کند و محل بثورات به صورت اسکار[2] یا داغ باقی می‌ماند که به آن مُهر آبله گفته می‌شود. این بیماری در اعصار کهن در کشورهای آسیایی، به‌خصوص در هندوستان و چین و در کشورهای آفریقایی وجود داشته است. در قرن ششم، اولین اپیدمی در عربستان گزارش شده که به‌وسیلهٔ سربازان حبشی به این منطقه وارد شده است. ابوبکر محمد زکریای رازی اولین پزشکی بود که شرح کامل این بیماری را در قرن دهم به رشتهٔ تحریر در آورده است. این بیماری در قرن شانزدهم به کشورهای اروپایی رسید و در قرون ۱۷ و ۱۸ تلفات شدیدی در انگلستان ایجاد کرد. در سال ۱۷۹۶ میلادی، جنر[3] واکسن آبله را کشف کرد. این ویروس در دمای اتاق و در پوسته‌های آبله تا مدت یک تا سه سال زنده می‌ماند. در حرارت بالای ۵۵ درجه، بیشتر از نیم ساعت مقاومت نمی‌کند. داروهای ضدعفونی‌کننده اثری برروی ویروس ندارند(شکل۲۵ــ۳).



شکل ۲۵ــ۳ بثورات جلدی بیماری آبله

۱ــVariola ۲ــ Scar ۳ــ Jener

بیماری نیوکاسل[1] : مخصوص پرندگان اهلی و وحشی و پرندگان زینتی است ولی در پستانداران مانند انسان نیز نوعی از آن گزارش شده است. بیماری نیوکاسل برای اولین بار در سال ۱۹۲۶ در جاوهٔ اندونزی و در شهر نیوکاسل انگلستان گزارش شد. در سال‌های اخیر به دلیل رشد روز افزون صنعت مرغداری اهمیت این بیماری بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. عامل بیماری نیوکاسل پارامیکسوویروس تیپ یک از خانواده پارامیکسوویریده، دارای RNA و غشای لیپوپروتئینی است. این ویروس به خوبی در جنین تخم‌مرغ رشد و تکثیر می‌یابد. ویروس نیوکاسل نسبت به گرما فوق العاده حساس است.

براساس حِدّت سه دسته ویروس نیوکاسل وجود دارد :

۱ــ سویه ولوژن[2] : سویهٔ بسیار حاد و بیماری‌زا، مانند هرتس[3]

۲ــ سویه مزوژن[4] : سویهٔ نسبتاً حاد با بیماری زایی متوسط

۳ــ سویه لنتوژن[5] : سویهٔ کم حدّت با بیماری‌زایی خفیف، مانند لاسوتا[6].

بیشتر سویه‌های بومی‌لنتوژن یا مزوژن هستند. مقاومت ویروس نیوکاسل نسبتاً زیاد است و در بستر آلوده تا دو ماه و در لاشه آلوده تا دوازده ماه ویروس باقی می‌ماند(شکل ۲۶ــ۳).

شکل ۲۶ــ۳ علایم بالینی و کالبدگشایی در طیور مبتلا به بیماری نیوکاسل

۱ــ Newcastle ۲ــ Velogenic ۳ــ Herts ۴ــ Mesogenic ۵ــ Lenthogenic ۶ــ Lasota

طاعون گاوی[1] : بیماری ویروسی واگیردار گاو، گاو میش اهلی و بعضی حیوانات وحشی است. این بیماری با تب، زخم‌های دهانی، اسهال، نکروز غدد لنفاوی و مرگ ومیر زیاد مشخص می‌شود. ویروس عامل طاعون گاوی تنها ویروس دارای RNA تک‌رشته‌ای از خانواده بارامیکسوویریده و از جنس موربیلوویروس‌هاست. ویروس طاعون گاوی در مقابل نورآفتاب، رطوبت بالا و خشکی به سرعت غیرفعال می‌شود. گاو و گاومیش اهلی حساسیت شدیدی به این ویروس دارند. گوسفند و بز تا مدتی ویروس را در بدن خود نگه می‌دارند اما بیماری در آن‌ها مشاهده نمی‌شود و فقط با آزمایش‌های سرولوژی می‌توان وجود ویروس را در گله مشخص کرد(شکل ۲۷ــ۳).

شکل ۲۷ــ۳ علایم بالینی و کالبدگشایی در دام مبتلا به بیماری طاعون گاوی

۱ــ Rinderpest

آنفلوانزای طیور : آنفلوانزا بیماری ویروسی تنفسی واگیردار انسان و حیوان است که سایر دستگاه‌های بدن را به درجات مختلف درگیر می‌کند. ویروس عامل آنفلوانزا برای نخستین بار در سال ۱۹۰۲ از طیور مبتلا و در سال ۱۹۳۳ از انسان جدا شد. این بیماری توسط RNA ویروسی از خانوادهٔ ارتومیکسوویریده[۱] ایجاد می‌شود. ویروس‌های آنفلوانزا براساس تفاوت آنتی‌ژنی در نوکلئوپروتئین[۲](NP) و پروتئین ماتریکس[۳](M) به تیپ‌های A، B و C طبقه‌بندی می‌شوند. ویروس‌های گروه B و C از موارد بیماری انسان جدا می‌شوند و ویروس‌های تیپ A موجب بروز بیماری در پرندگان،انسان و پستانداران دیگر می‌شوند. تحت تیپ‌های ویروس‌های تیپ A براساس خاصیت آنتی‌ژنیسیته دو گلیکوپروتئین سطحی، هماگلوتینین[۴](HA) و نورآمینیداز[۵](NA) تعیین می‌شوند. تاکنون ۱۶ زیرواحد HA و ۹ زیرواحد NA در ویروس‌های A شناسایی شده‌اند که گونه‌های مختلف طیور اهلی و وحشی شامل ماکیان، بوقلمون، اردک، غاز اهلی، بلدرچین، قرقاول، کبک، طوطی، مرغ دریایی، مرغ مینا، مرغ عشق، مرغ گینه‌ای، مرغ نوروزی و شترمرغ استرالیایی را آلوده می‌کنند، اما تحت تیپ‌های آنتی‌ژنی H۵، H۷ و H۹ بیماری قابل انتقال به انسان ایجاد می‌کنند. ویروس آنفلوانزا می‌تواند مدت زیادی خارج از بدن مخزن، در مواد دفعی تا چند ماه در ۱۷C° و به مدت بیشتر در ۴C°، فعال زنده بماند. ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان با در نظر گرفتن شاخص آسیب‌زایی[۶] داخل وریدی به ماکیان و بوقلمون به انواع فوق حاد (HPAI[۷]ــ عامل بیماری شدید یا طاعون طیور[۸]) و تحت حاد (LPAI[۹]ــ عامل بیماری خفیف یا بدون علامت) طبقه‌بندی می‌شوند(شکل ۲۸ــ۳).

شکل ۲۸ــ۳ علایم بیماری آنفلوانزای طیور شامل تورم و سیاه شدن تاج و ریش، درگیری عصبی و فلج شدن پاها، تورم سر و صورت

۱ــ Orthomyxoviridae ۲ــ Neucleoprotein ۳ــ Matrix ۴ــ Hemagglutinin ۵ــ Neuraminidase
۶ــ Intravenous pathogenicity index ۷ــ Highly pathogenic avian influenza ۸ــ Fowl pluge ۹ــ Low pathogenic avian influenza

۱ـ طبقه بندی ویروس‌ها چگونه انجام می‌شود ؟

ویروس‌ها را براساس گروه اصلی میزبان به ویروس‌های باکتریایی (باکتریوفاژها)، جانوری و گیاهی طبقه بندی می‌کنند.

۲ـ مرحلهٔ لیزوژنی را در ویروس‌ها توضیح دهید.

در پایان چرخهٔ لیتیک تمام یافته‌های آلوده، متلاشی می‌شوند و فاژهای جدیدی را آزاد می‌کنند. برخی از فاژها قادرند اسید نوکلئیک خود را در اسید نوکلئیک یاختهٔ میزبان ادغام کنند و به نسل بعد منتقل شوند. چون پروتئین ویروس ساخته نمی‌شود، اکثر ژن‌های فاژ به حالت غیر فعال باقی می‌ماند. به این مرحله لیزوژنی گفته می‌شود.

۳ـ اسیدهای نوکلئیک ویروس را توضیح دهید.

یک ذرهٔ ویروسی دارای اسید نوکلئیک DNA یا RNA به عنوان ماده ژنتیکی است. برخلاف سلول‌های پروکاریوتیک و یوکاریوتیک که همواره دارای DNA به عنوان ماده ژنتیکی اصلی خود هستند. ویروس‌ها دارای یکی از دو نوع اسید نوکلئیک اند و هرگز هر دو را باهم ندارند. اسید نوکلئیک در بعضی ویروس‌ها به شکل خطی و در بعضی به شکل حلقوی است.

۴ـ آثار ویروس برروی سلول به چند طریق است؟ توضیح دهید.

اثر ویروس برسلول میزبان به یکی از دو طریق زیر است:

۱ – تغییر شکل و مرگ ناگهانی سلول میزبان؛

۲ – اثری که شبیه به حالت اول است ولی کندتر و دیرتر ظاهر می‌شود. علت تأخیر در ظهور علائم اصلی از سوی ویروس‌های گروه دوم، به طولانی بودن دورهٔ زندگی ویروس مربوط است.

۵ـ چرا ویروس‌ها به سادگی قابل کشت نیستند؟

زیرا ویروس‌ها برای کشت احتیاج به سلول‌های زنده دارند.

۶ـ روش انتقال ویروس‌هاری چگونه است ؟

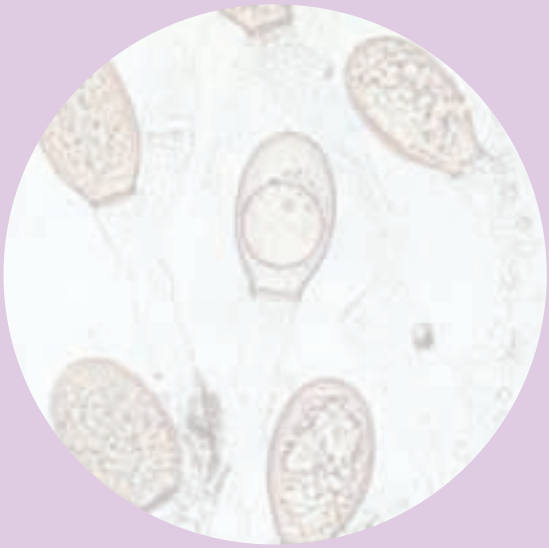
ویروس در بزاق فرد آلوده وجود دارد و با گاز گرفتن و از طریق بزاق به بدن فرد دیگر وارد می‌شود. بزاق آلوده می‌تواند ویروس‌ها را از زخم‌ها و خراش‌های سطحی نیز وارد بدن کند.

۷ـ علایم بیماری طاعون گاوی را نام ببرید.

تب، التهاب مخاط بینی، ترشحات مایعات مخاط از بینی و چشم، اسهال، ضعف و خستگی زیاد.

فصل ۴

قارچ‌ها



اهداف آموزشی

هدف کلی

شناخت قارچ‌ها و بیماری‌های ایجاد شده توسط آن‌ها در دام‌ها و طیور.

هدف‌های جزئی

۱ــ شناخت قارچ‌ها

۲ــ شناخت طبقه‌بندی قارچ‌ها

۳ــ شناخت انواع کلنی قارچ‌ها

۴ــ شناخت کشت قارچ‌ها در آزمایشگاه

۵ــ شناخت بیماری‌هایی که توسط قارچ‌ها در دام و طیور ایجاد می‌شود.

واژه‌ها و اصطلاحات مهم

- قارچ‌ها
- کلروفیل
- کیتین
- سلولز
- کیتیوزان
- منان
- ریسه
- پروتوپلاسم
- تلومورف
- اسپورانژیوسپور
- کنیدیوفور
- ماکروکنیدی
- ماستیگومایکوتینا
- زیگومایکوتینا
- هتروتروف
- انگل
- گلوکان
- تمایز سلولی
- گلوکان
- آمفوتریسین B
- هیف
- آنامورف
- اسپورانژیوفور
- کنیدیا
- میکروکنیدی
- آسپور
- زیگوسپور
- گامتوفیت
- هتروتال
- آسکوسپور
- آسکومایکوتینا
- آسکومیست
- کلیستوتشیوم
- آپوتشیوم
- بازیدیومایکوتینا
- آگونیوم
- موکور
- اسپورانژیوم
- دیپلوویید
- آرکگونیوم
- مخمر آبجو
- پنی‌سیلیوم
- هموتال
- آسک
- آسکوکارپ
- ژیمنوتشیوم
- پری تشیوم
- بازیدیوسپور
- کریپتوکوکوس نئوفورمانس
- آنتریدیوم
- رایزوپوس
- تخم
- هاپلوویید
- آسکوسپور
- آسپرژیلوس
- فیالاید

وزیکل
بازیدیوم
دترومایکوتینا
فوزاریوم
اسلاید
انکوباسیون
پتانسیل اکسیداسیون و احیا
درماتوفیت

ساکارومیسس
ماشروم
ترایکوفایتون
میسلیوم راکتی
سابرودکستروز آگار
لاکتوفنل ـ کاتن بلو
کلرامفینکل
رشته‌های کاذب

آسپرژیلوس فومیگاتوس
مایکوتوکسین
آسپرژیلوس فلاووس
اکراتوکسی کوز
آسپرژیلوس اکراسئوس
کانایدیازیس
مونیلیازیس
تاج سفید

مایکوتوکسیکوز
افلاتوکسین
آسپرژیلوس پارازیتیکوس
اکراتوکسین
آسپرژیلوس ویریدیکاتوم
برفک
مایکوزیس
تریکوفیتون مگنینی

رویکردهای آموزشی

با توجه به محتوای این فصل که در خصوص قارچ‌هاست، هنرجویان می‌توانند با موجوداتی به نام قارچ‌ها آشنا شوند. با ساختار، تولید مثل، نحوهٔ رشد و انواع کلنی، طبقه‌بندی و طرز کشت آزمایشگاه آن‌ها آشنا شوند ، همچنین با استفاده از این اطلاعات علائم بیماری‌هایی را که قارچ‌ها در دام وطیور ایجاد می‌کنند درک نمایند.

پیام‌های اصلی

دانشی و مهارتی

هنرجو:

- با قارچ و جایگاه آن آشنا می‌شود.
- با ساختمان قارچ و اجزای آن آشنا می‌شود.
- با تولید مثل و چرخهٔ زندگی قارچ‌ها آشنا می‌شود.
- با چند بیماری مهم قارچی آشنا می‌شود.

نگرشی

هنرجو:

- با انجام دادن پروژه و کار گروهی، درمورد قارچ‌ها روحیهٔ تحقیق و همکاری را درخود تقویت می‌کند.
- با انجام دادن پروژه و کار گروهی، درخصوص قارچ‌ها نسبت به محیط پیرامون خود کنجکاو می‌شود.

دانستنی‌های مورد نیاز هنرآموز

- مطالعهٔ فصل چهارم،بخش راهنمای هنرآموز، او رابا دانستنی‌های مورد نیاز برای ارائهٔ بهتر مطالب کتاب کمک می‌کند.
- هنرآموز باید به علائم بیماری‌های قارچی در دام وطیور آشنا باشد.

فعالیت‌های پیشنهادی

- هنرآموز می‌تواند با استفاده از اسلاید و پاورپوینت، هنرجویان را با علائم بیماری‌های قارچی در دام و طیور آشنا کند.
- هنرآموز می‌تواند با کمک به هنرجویان آن‌ها را به جمع‌آوری کپک نان یا کپک روی میوه جات تشویق کند و از این کپک‌ها لام تهیه نمایند یا آن‌ها را کشت بدهند.

موارد ارزش‌یابی

- هنرآموز می‌تواند در مورد ساختمان، ترکیب شیمیایی، طبقه‌بندی و انواع تولید مثل قارچ‌ها سؤالات کتبی و شفاهی طرح کند.
- هنرآموز می‌تواند از نحوهٔ کشت قارچ‌ها و رنگ‌آمیزی قارچ‌ها آزمون عملی بگیرد.
- هنرآموز می‌تواند انواع بیماری‌های قارچ‌ها را از دانش‌آموزان سؤال نماید.

قارچ‌ها

قارچ‌ها موجوداتی هتروتروف فاقد ریشه، ساقه و برگ‌اند و دستهٔ جداگانه‌ای از یوکاریوت‌ها را تشکیل می‌دهند. این دسته از میکروارگانیسم‌ها برای رشد و تکثیر، به ترکیبات آلیِ از پیش ساخته‌ای به‌نام منبع کربن نیازمندند. آن‌ها به علت فقدان کلروفیل قادر به سنتز مواد آلی نیستند، در نتیجه ناگزیرند به صورت ساپروفیت بر روی مواد آلی مردهٔ گیاهی و جانوری به سر ببرند و بقایای آن‌ها را تجزیه کنند و یا به صورت انگل بر روی یاخته‌های زنده و یا داخل آن‌ها زندگی کنند. قارچ‌ها به دلیل تفاوت‌های زیر از گیاهان و جانوران و باکتری‌ها متمایز می‌شوند :

سلول‌های قارچی دارای دیوارهٔ سلولی از جنس کیتین و گلوکان‌اند. در حالی‌که سلول‌های حیوانی فاقد دیوارهٔ سلولی هستند و دیوارهٔ سلولی گیاهان عمدتاً از سلولز ساخته شده است.

قارچ‌ها برخلاف گیاهان هتروتروف‌اند و قادر به فتوسنتز نیستند. مواد مورد نیاز قارچ‌ها با ترشح آنزیم‌های خارج سلولی هضم و سپس جذب سلول می‌شود.

قارچ‌ها از نظر ساختاری ساده تر از گیاهان وجانوران‌اند. تمایز سلولی، تشکیل بافت و اندام در این ارگانیسم‌ها وجود ندارد و سلول‌های رشته‌ای یا مخمری منفرد واحد ساختمانی قارچ‌ها را تشکیل می‌دهند.

هستهٔ قارچ‌ها دارای چندین کروموزوم و یک هستک است. دیوارهٔ سلولی قارچ‌ها حاوی پلیمرهای پلی ساکاریدی کیتین، کیتوزان، گلوکان، منان و درموارد خاص سلولز است. قارچ‌ها از باکتری‌های رشته‌ای به‌دلیل اندازهٔ بزرگ‌تر و مقاومت نسبت به عوامل ضد قارچی مانند آمفوتریسین B[1] به آسانی قابل تشخیص‌اند. علاوه بر این قارچ‌ها، برخلاف باکتری‌ها، مورد تهاجم باکتریوفاژها قرار نمی‌گیرند.

ساختار قارچ

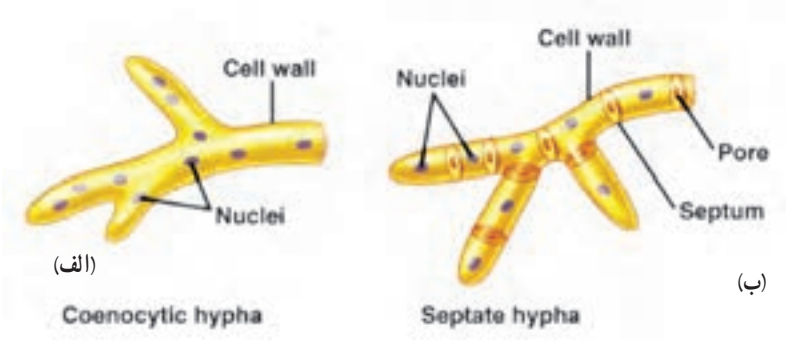
ساختار قارچ‌های پر سلولی از رشته‌ها یا ریسه‌های نخی شکل به نام ریسه یا هیف[2] تشکیل شده است. انشعاب هیف‌ها شبکهٔ میسیلیوم[3] را به‌وجود می‌آورند. شبکهٔ میسیلیوم را می‌توان به صورت کپک بر روی مواد آلی مختلف مشاهده کرد. سلول‌های رشته‌ای دیوارهٔ سلولی محکمی دارند و رشد آن‌ها به‌صورت طولی و از انتهای رشته‌های منفرد یا همان هیف انجام می‌گیرد. قارچ‌ها

۱ــ Amphotrisin B ۲ــ Hyphae ۳ــ Mycelium

میسلیوم‌های حقیقی ایجاد می‌کنند و ممکن است به دو شکل زیر دیده شوند :

الف) میسلیوم بدون دیوارهٔ عرضی[1] : در طول این میسلیوم‌ها هیچ‌گونه دیوارهٔ عرضی وجود ندارد و پروتوپلاسم دردرون میسلیوم در حرکت است (شکل ۱ــ۴ــ الف).

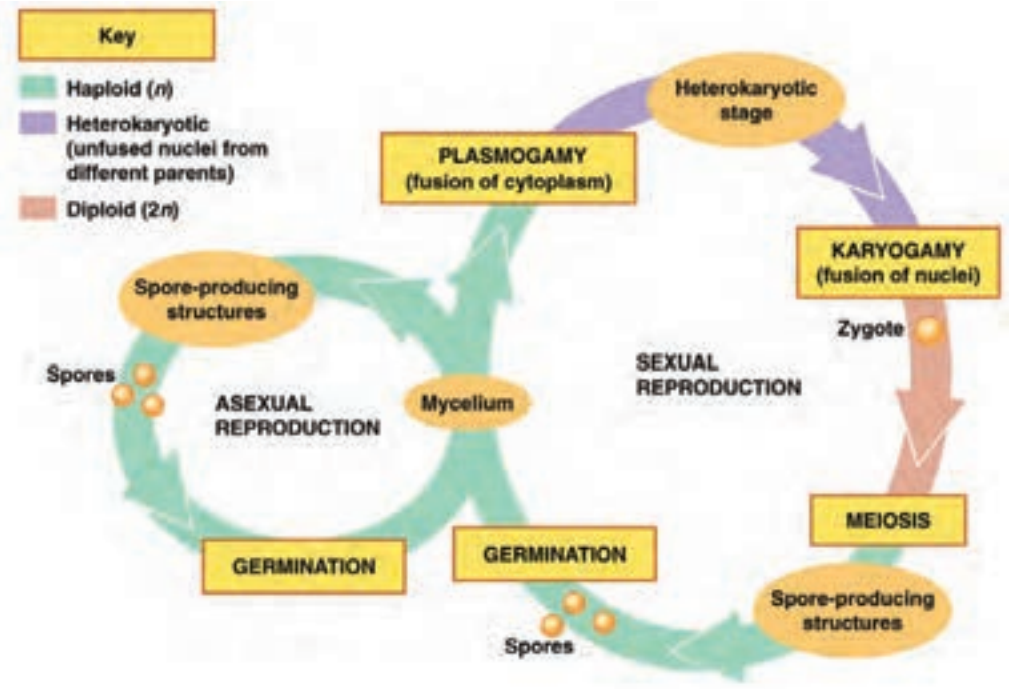
ب) میسلیوم با دیوارهٔ عرضی[2] : این دیواره اغلب حاوی منافذی است که جریان سیتوپلاسمی را بین سلول‌ها در امتداد میسلیوم برقرار می‌سازد و اجازه می‌دهد تا سیتوپلاسم و گاهی حتی هسته‌ها به سلول‌های مجاور منتقل شوند (شکل ۱ــ۴ــ ب).



الف) میسلیوم بدون دیوارهٔ عرضی
ب) میسلیوم با دیوارهٔ عرضی
شکل ۱ــ۴

تولید مثل در قارچ‌ها

تولید مثل در قارچ‌ها به دو روش غیر جنسی (آنامورف) و جنسی (تلومورف) انجام می‌گیرد (شکل ۲ــ۴).



شکل ۲ــ۴ شکل شماتیک از چرخهٔ عمومی زندگی در قارچ‌ها

۱ــ Non septate ۲ــ Septate

تولید مثل غیرجنسی

تولید مثل غیرجنسی توسط اسپورهای غیرجنسی انجام می‌شود. در تعدادی از قارچ‌ها اسپور غیرجنسی درون اسپورانژیوم ایجاد می‌شود. این قارچ‌ها واجد هیف‌های بدون جدار عرضی و بدون انشعاب به نام اسپورانژیوفور[۱] هستند که به یک کیسه به نام اسپورانژیوم[۲] که عمل حفاظت از اسپورها را به عهده دارد، منتهی می‌شود. پروتوپلاسم درون اسپورانژیوم با روش قطعه قطعه شدن تقسیم می‌شود. در مراحل بعد تعدادی اسپوانژیوسپور[۳] تک هسته ای تشکیل می‌گردد که در واقع اسپورهای غیرجنسی هستند و با پاره شدن دیوارهٔ اسپورانژیوم به خارج می ریزند.

در سایر قارچ‌ها، اسپورهای غیرجنسی درون اسپورانژیوم نیستند و درنتیجهٔ قطعه قطعه شدن هیف، جوانه زدن هیف‌یا از طریق دیوارهٔ هیف‌ها به‌وجود می‌آیند. هر یک از این واحدها کنیدیا[۴] و هیف به‌وجود آورندهٔ آن‌ها کنیدیوفور[۵] نامیده می‌شوند. به کنیدی‌های کوچک و تک سلولی میکروکنیدی و به کنیدی های بزرگ‌تر که دارای بیش از یک سلول هستند، ماکروکنیدی گفته می‌شود. ساختارهای مختلف کنیدیوفور و کنیدی ها در مطالعهٔ خصوصیات کلنی قارچ، و در تشخیص جنس و گونه قارچ اهمیت دارند.

تولید مثل جنسی

تولیدمثل جنسی پدیده‌ای است که در آن سلول جنسی نر با سلول جنسی ماده ترکیب می‌شود. سپس هسته‌ها با یکدیگر درمی‌آمیزند و تقسیم میوز انجام می‌شود. در این نوع تولیدمثل، چهار نوع اسپور جنسی شناخته شده‌اند و طبقه بندی قارچ‌ها براساس آن‌ها صورت گرفته است.

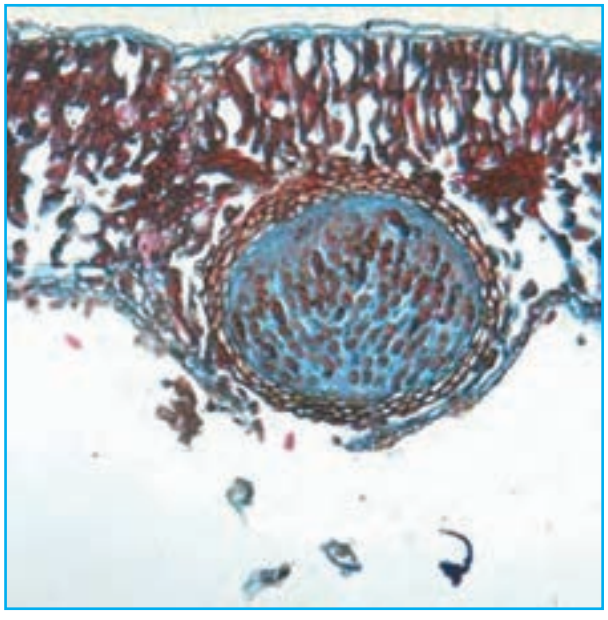
۱) اُاُسپور[۶] : اُاُسپور جنسی قارچ‌های زیر شاخهٔ ماستیگومایکوتینا[۷] است.

۲) زیگوسپور[۸] : در قارچ‌های زیر شاخهٔ زیگومایکوتینا[۹] ایجاد می‌شود. مرحلهٔ جنسی با آمیزش دو هیف گامتوفیت[۱۰] صورت می‌گیرد. اگر دو هیف مختلف در عمل ترکیب جنس‌ها شرکت کند ارگانیسم هتروتال[۱۱] و اگر قسمتی از هیف با انشعابی از همان رشته ترکیب شود، هموتال[۱۲] خواهد بود.

۳) آسکوسپور[۱۳] : آسک[۱۴] و آسکوسپور در قارچ‌های زیرشاخه آسکومایکوتینا[۱۵] تولید می‌شوند. کیسه‌های آسک اغلب توسط پوششی به نام آسکوکارپ[۱۶] احاطه می‌شوند (شکل ۳ــ۴).

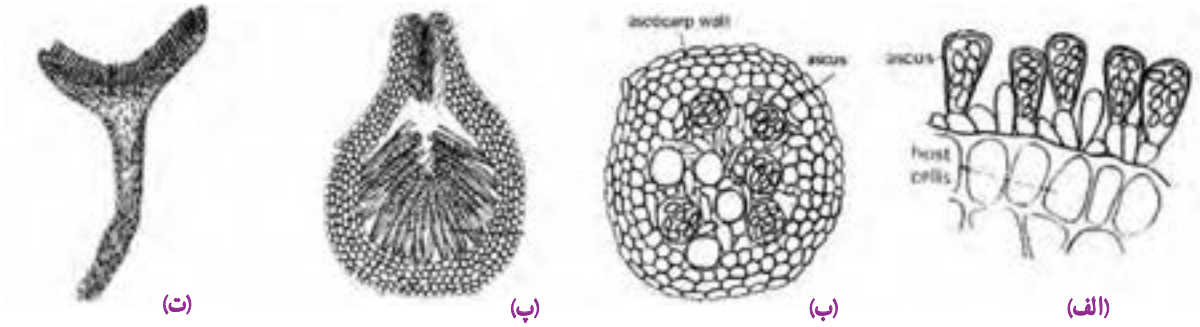
آسکوکارپ در قارچ‌های مختلف آسکومیست ممکن است به اشکال زیر مشاهده شود (شکل ۴ــ۴) :

ژیمنوتشیوم : پوشش آسک‌ها به صورت بافت مشبک و سستی است که اسپورها می‌توانند از بین منافذ آن خارج شوند. آسک‌ها فاقد پوشش و یا برهنه هستند.



شکل ۳ــ۴ آسکوکارپ بسته (کلیستوتشیوم) که آسک را دربرگرفته است.

۱ــ Sporangiophor ۲ــ Sporangium ۳ــ Sporangiospore ۴ــ Conidia ۵ــ Conidiophore
۶ــ Oospore ۷ــ Mastigomycotina ۸ــ Zygospore ۹ــ Zygomycotina ۱۰ــ Gametophyte
۱۱ــ Heterothal ۱۲ــ Homothal ۱۳ــ Ascospore ۱۴ــ Ascus ۱۵ــ Ascomycotina ۱۶ــ Ascucarp



الف) ژیمنوتشیوم ب) کلیستوتشیوم پ) پری تشیوم ت) آپوتشیوم

شکل ۴ــ۴ رده بندی آسکومایکوتینا بر اساس نوع آسکوکارپ

کلیستوتشیوم: آسکوکارپ کاملاً مسدود است و با شکستن دیوارهٔ آن، آسکوسپورها خارج می شوند.

پری تشیوم: در مرحلهٔ کامل برخی قارچ‌ها، آسکوکارپ واجد دهانه است که از این طریق آسکسپورهای بالغ خارج می‌شوند.

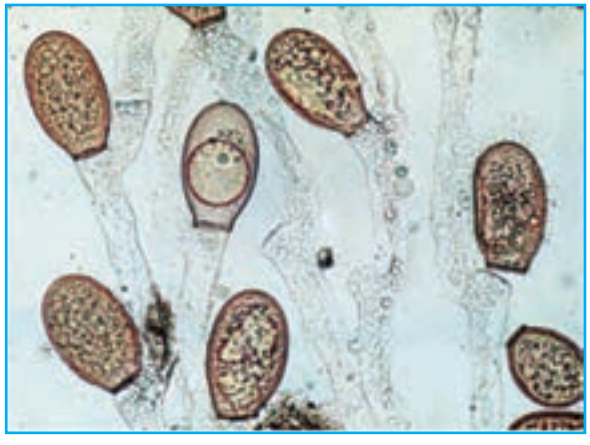
آپوتشیوم: آسکوکارپ کاملاً باز است و به اصطلاح فرم فنجانی دارد.

۴) بازیدیوسپور[۱] : بازیدیوسپوردرقارچ‌های زیرشاخه بازیدیومایکوتینا[۲] ایجاد می‌شود. تا به حال تعداد کمی از بیماری‌های انسان به علت قارچ‌های این گروه گزارش شده است. مرحله جنسی در قارچ مخمری کریپتوکوکوس نئوفورمانس[۳] بیماریزا، با ایجاد بازیدیوسپور صورت می گیرد.

رده بندی قارچ‌ها

سلسلهٔ قارچ‌ها را به دو شاخه قارچ‌های حقیقی و قارچ‌های کاذب تقسیم کرده‌اند. قارچ‌های حقیقی به پنج زیر شاخه تقسیم می‌شوند که عبارت‌اند از :

ماستیگومایکوتینا : این گروه از قارچ‌ها به‌صورت ساپروفیت بر روی بقایای مواد آلی یا به‌صورت انگل داخلی و خارجی بر روی یاختهٔ میزبان زندگی می‌کنند. قارچ‌های این زیرشاخه از نظر نوع ساختار و تولید مثل جزو پست‌ترین قارچ‌ها به شمار می‌آیند. اشکال ابتدایی این قارچ‌ها فاقد هیف‌اند و ساختار تک‌یاخته‌ای دارند که بخش رویشی و نیز زایشی قارچ به‌شمار می‌آید (شکل ۵ــ۴). سپس ساختار آن‌ها اندکی پیشرفت می‌کنند و بخش‌های رویشی و زایشی آن‌ها از یکدیگر مجزا می‌شوند. این قارچ‌ها، هاگ‌های دارای تاژک تولید می‌کنند. نوع تاژک و محل قرار گرفتن آن در این قارچ‌ها از نظر رده‌بندی مهم است. در قارچ‌های تکامل یافته‌تر این گروه، هیف به‌وجود می‌آید که فاقد دیوارهٔ عرضی است. در تولیدمثل جنسی



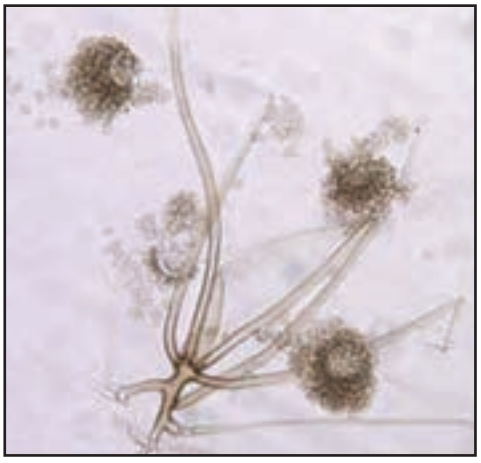
شکل ۵ــ۴ هیف بدون دیوارهٔ عرضی و هاگ‌ها در قارچ‌های زیرشاخه ماستیگومایکوتینا

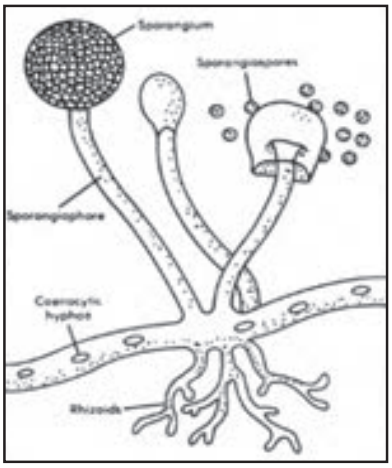
۱ــ Basidiospor ۲ــ Basidiomycotina ۳ــ Cryptococcus neoformans

سلول جنسی ماده (اُاُگونیوم[1]) با سلول جنسی نر (آنتریدیوم[2]) ترکیب می‌شوند و درون اُاُگونیوم، اُاُسپورها به‌وجود می‌آیند.

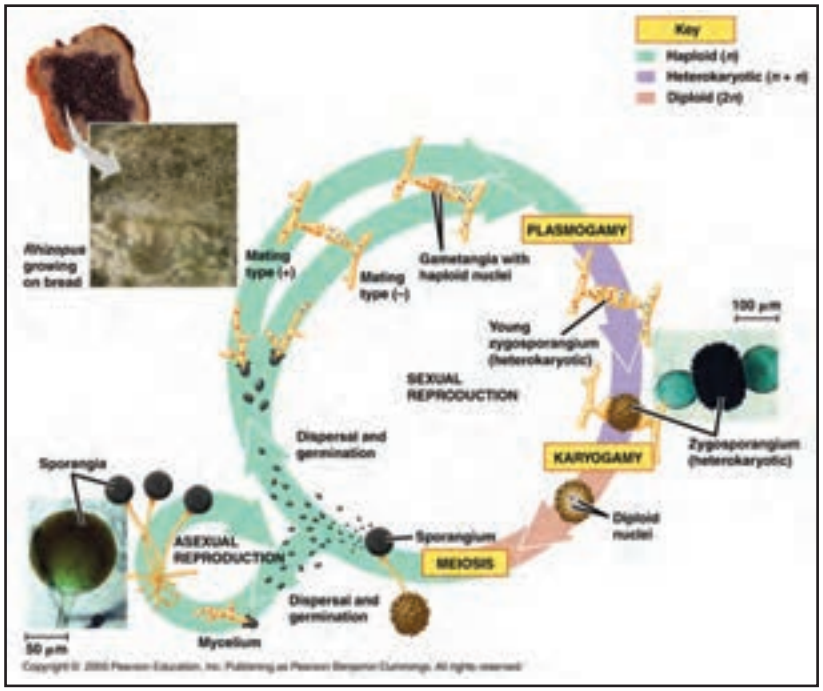
زیگومایکوتینا : قارچ‌های این گروه نیز جزو قارچ‌های پست به‌شمار می‌آیند و هیف آن‌ها فاقد دیوارهٔ عرضی است. این قارچ‌ها اغلب خاکزی هستند اما بر روی مواد قندی از جمله نان نیز زندگی می‌کنند، مانند گونه‌های موکور[3] و رایزوپوس[4]. تولید مثل غیر جنسی توسط اسپورهای غیر متحرکی انجام می‌شود که معمولاً در کیسه‌ای به نام اسپورانژیوم به‌وجود می‌آیند (شکل۶ــ۴).

تولید مثل جنسی با آمیزش دو هیف گامتوفیت صورت می‌گیرد (شکل ۷ــ۴). بعد از تماس هر قسمت متورم، تیغهٔ میانی تشکیل می‌شود و سیتوپلاسم و هستهٔ انتهای متورم را از بقیه قسمت‌های هیف جدا می‌کند. سپس دیوارهٔ بین دو هیف از بین می‌رود و سیتوپلاسم دو سلول با جفت شدن هسته ها با هم مخلوط می‌شوند. سلول جدید یا تخم[5] دارای هستهٔ دیپلوئید شکل می‌گیرد و بزرگ می‌شود. به تدریج دیوارهٔ آن ضخیم و رنگی می‌شود که به آن زیگوسپور می‌گویند. بر روی زیگوسپور، اسپورانژیوم ایجاد می‌شود که پس از گذراندن یک دورهٔ غیرفعال دیوارهٔ آن می‌شکند و با تقسیم میوز، هستهٔ هاپلوئید تولید می‌شود.





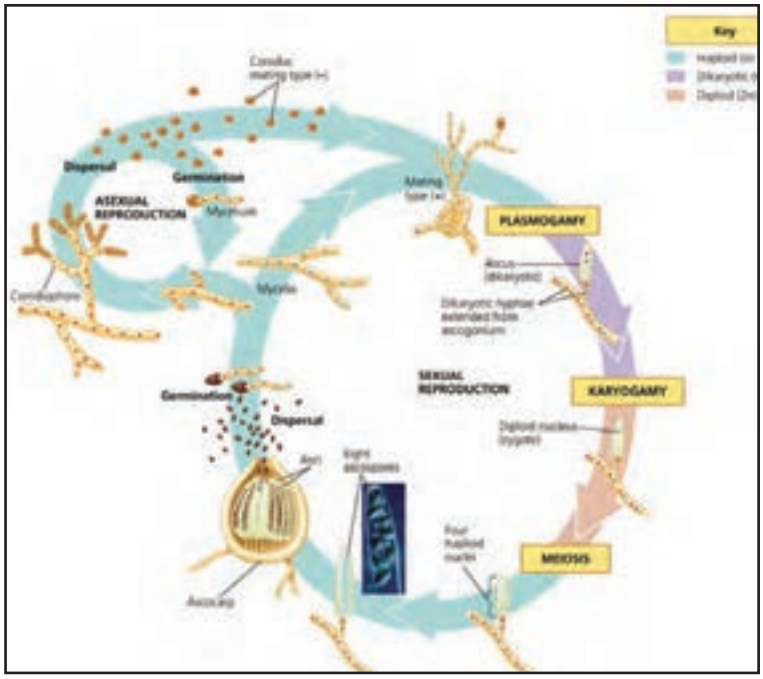
شکل ۶ــ۴ هیف فاقد دیوارهٔ عرضی، اسپورانژیوم و اسپورهای آزاد شده در کپک نان از زیر شاخهٔ زیگومایکوتینا



شکل ۷ــ۴ تولید مثل جنسی و غیر جنسی در قارچ‌های زیگومایکوتینا. دو گامتوفیت تک هسته‌ای در پی عمل پلاسموگامی به هم متصل می‌شوند و در نتیجهٔ کاریوگامی، تخم دو هسته ای شکل می‌گیرد. اسپورانژیوم بر روی زیگوسپور تشکیل می‌شود و تعداد زیادی اسپور در نتیجهٔ تقسیم های متوالی میوز درون اسپورانژیوم به‌وجود می‌آیند. با رویش اسپورها، گامتوفیت ها حاصل می‌شوند.

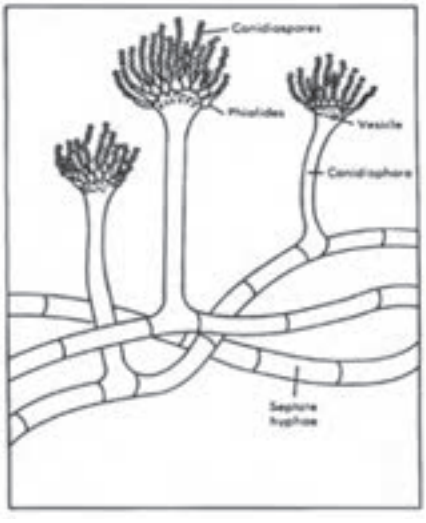
۱ــ Oogonium ۲ــ Antridium ۳ــ Mucor ۴ــ Rhizopus ۵ــ Zygot

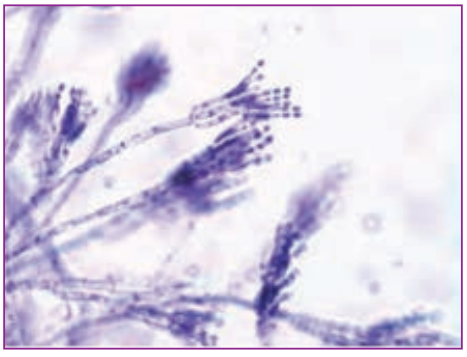
آسکومایکوتینا : این گروه به دلیل داشتن هیف با دیواره‌های عرضی جزو قارچ‌های عالی به شمار می‌آیند. در نتیجهٔ تولیدمثل جنسی، هاگ‌هایی را به‌نام آسکوسپور درون کیسه‌هایی به نام آسک تولید می‌کنند. دستگاه جنسی نر (آنتریدیوم) در اطراف دستگاه جنسی ماده (آرکگونیوم[1]) پیچ می خورد(شکل ۸ــ۴). هستهٔ نر به درون آرکگونیوم مهاجرت می‌کند و هستهٔ دیپلوییید تولید می‌شود. سلول حاصل به یک آسک تبدیل می‌شود و با تقسیم میوز آسکوسپورها را ایجاد می‌کند. سلول حاصله طویل می‌شود و تمام مراحل فوق مجدداً تکرار می‌گردد. این عمل تا زمانی ادامه می یابد که میسلیوم مجاور توسعه یابد و شبکهٔ گسترده‌ای (آسکوکارپ) در اطراف سلول‌های تولیدکننده آسک به‌وجود آورد. در برخی از آسکومیست‌ها مثل مخمّر آبجو آسکوکارپ تولید نمی‌شود. رده‌بندی این گروه براساس نوع آسکوکارپ صورت می‌گیرد. گونه‌های آسپرژیلوس[2] و پنی‌سیلیوم[3] در این زیر شاخه قرار می‌گیرند.



شکل ۸ــ۴ چرخهٔ عمومی زندگی اسکومایکوتینا

در این قارچ‌ها تولید مثل غیر جنسی اغلب توسط اسپورهایی به نام کنیدی انجام می‌شود که بر روی فیالاید[4] تشکیل می‌شوند. فیالایدها با واسطه وزیکل[5] بر روی هیف کنیدیوفور قرار می‌گیرند (شکل ۹ــ۴). مخمرها مانند گونه‌های ساکارومیسس[6] فاقد آسکوکارپ‌اند و به روش تقسیم دوتایی و یا جوانه زدن تولیدمثل غیرجنسی انجام می‌دهند.

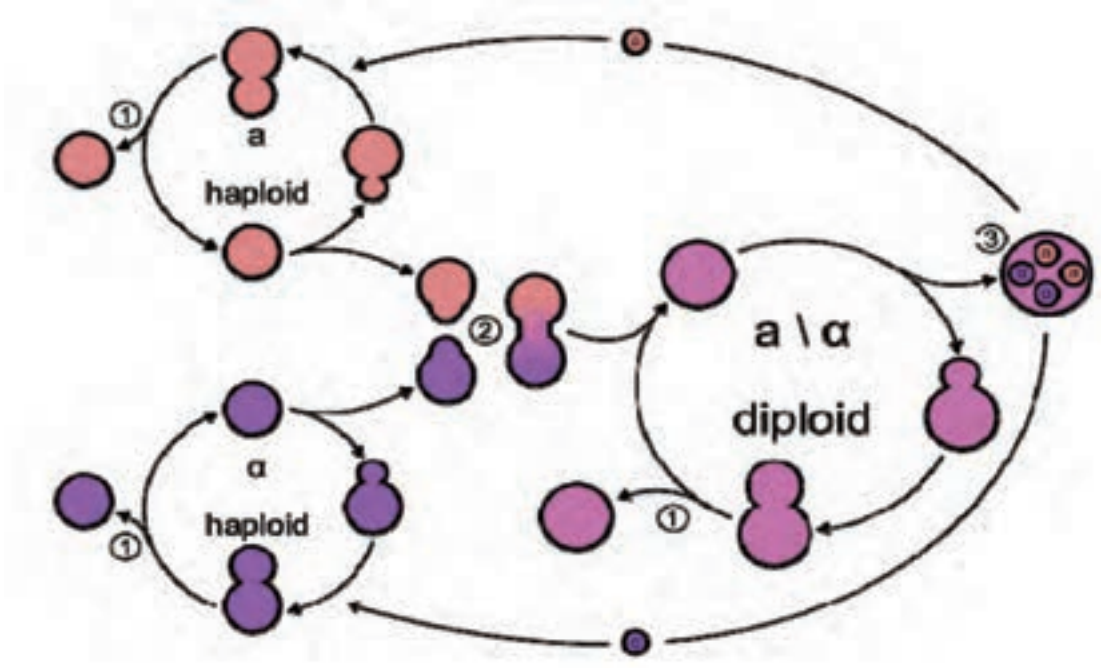




شکل ۹ــ۴ هیف دارای دیواره‌های عرضی، کنیدیوفور و ضمایم آن در زیر شاخهٔ آسکومایکوتینا

۱ــ Arcegonium ۲ــ Aspergillus ۳ــ Penicillium ۴ــ Phialide ۵ــ Vesicle ۶ــ Saccharmyces

چرخهٔ زندگی مخمر ساکارومیسس سرویسه به این صورت است (شکل ۱۰ــ۴)، در چرخهٔ زندگی این مخمر دو مرحلهٔ هاپلوئید به‌طور مساوی گسترده و مهم است. دو نوع سلول رویشی، هاپلوئید و دیپلوئید، به‌وسیلهٔ جوانه زدن تکثیر می‌شوند و درنهایت به نوع دیگر تغییر شکل می‌یابند. از ترکیب سلول‌های هاپلوئید تیپ‌های جنسی سازگار، پس از پلاسموگامی و کاریوگامی، سلول‌های دیپلوئید تشکیل می شوند و بنابراین مرحلهٔ دیپلوئید آغاز می‌گردد. در پایان مرحلهٔ دیپلوئیدی هستهٔ دیپلوئید متحمل تقسیم میوز می‌شود و چهار هستهٔ هاپلوئید تشکیل می‌شود، که سپس به چهار آسکوسپور توسعه می یابند. آسکوسپورها، پس از آزاد شدن، جوانه می‌زنند و چند نسل رویشی هاپلوئید ایجاد می‌کنند. سرانجام تعدادی از این آسکوسپورها تحت‌عنوان گامت عمل می‌کنند ترکیب می‌شوند و چرخه دوباره آغاز می‌شود.

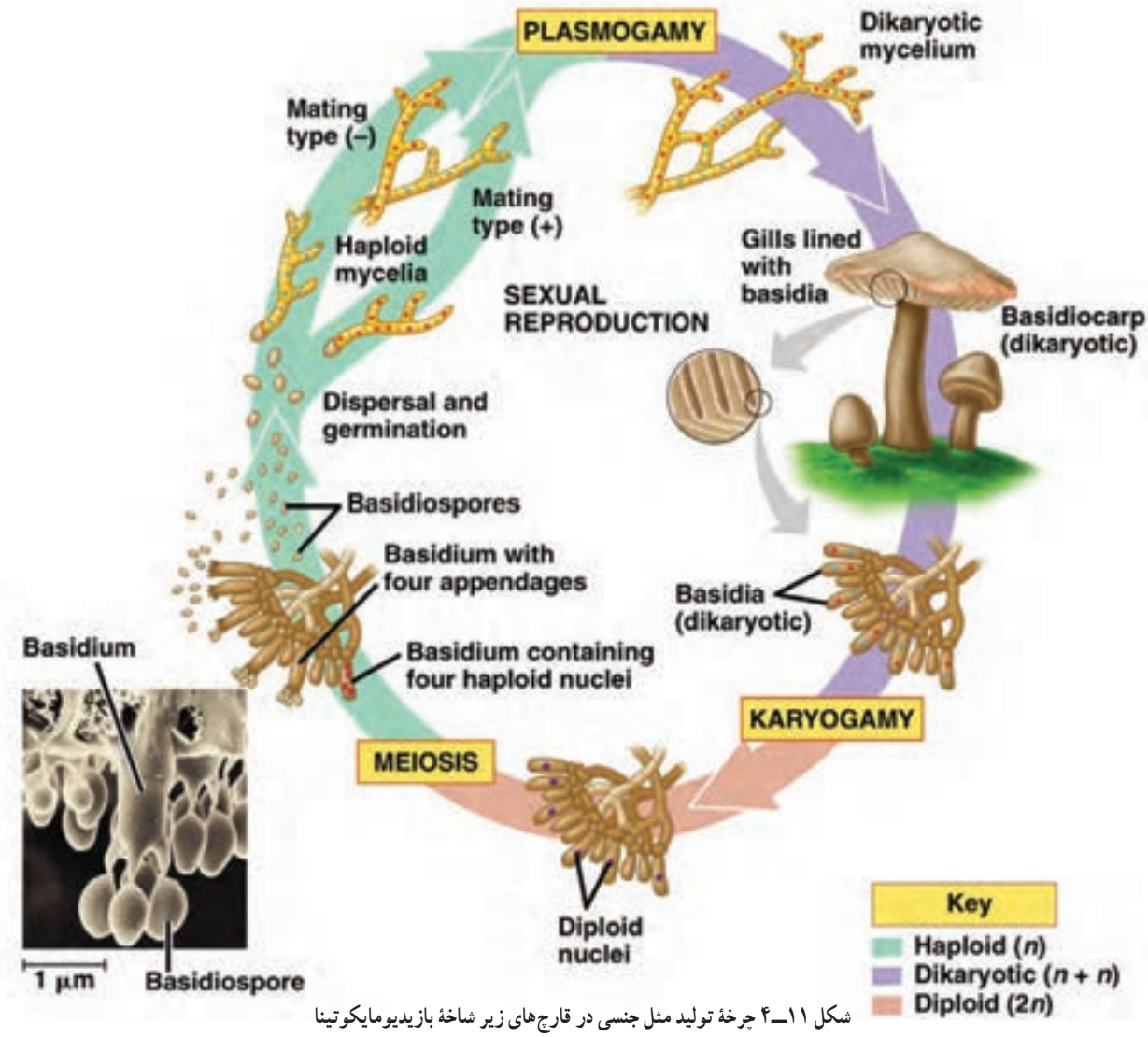


شکل ۱۰ــ۴ چرخهٔ زندگی ساکارومیسس سرویسیه

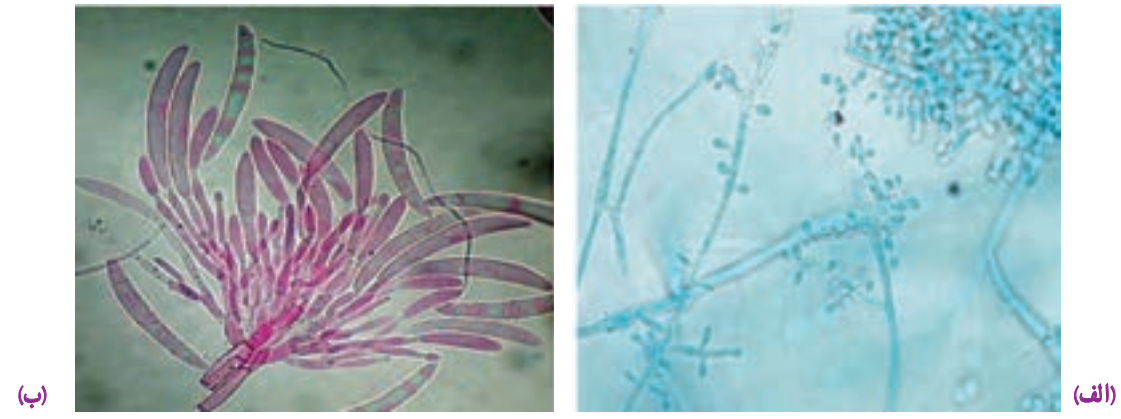
بازیدیومایکوتینا :تکامل یافته‌ترین قارچ‌ها در این شاخه قرار می‌گیرند. هیف دارای دیوارهٔ عرضی واجد یک یا دو هسته است. تولید مثل جنسی به صورت رویشی انجام می‌شود و نتیجهٔ آن تولید اسپورهایی به نام بازیدیوسپور است که بر روی بازیدیوم[۱] قرار می‌گیرند، مانند انواع ماشروم[۲] (شکل۱۱ــ۴). هنگام رویش بازیدیوسپور، هیف تک هسته‌ای حاصل می‌شود و از ترکیب دو هیف تک‌هسته‌ای مخالف، هیف دو هسته‌ای به‌وجود می‌آید. با تقسیم میوز، چهار هستهٔ هاپلوئید و در نتیجه چهار بازیدیوسپور به‌وجود می‌آید.

دترومایکوتینا[۳] : این گروه به قارچ‌های ناقص نیز معروف‌اند، زیرا در چرخهٔ زندگی آن‌ها تولید مثل جنسی وجود ندارد و تنها روش تکثیر آن‌ها، تولید مثل غیرجنسی است. این قارچ‌ها برحسب اندازه، شکل و رنگ کنیدی‌ها شناسایی و طبقه بندی می‌شوند مانند گونه‌های ترایکوفایتون[۴] و فوزاریوم[۵] (شکل ۱۲ــ۴). این قارچ‌ها در طبیعت پراکندگی فراوان دارند و در حیوانات و گیاهان بیماری ایجاد می‌کنند.

۱ــ Basidium ۲ــ Mushroom ۳ــ Deuteromycotina ۴ــ Trichophyton ۵ــ Fusarium



شکل ۱۱ــ۴ چرخهٔ تولید مثل جنسی در قارچ‌های زیر شاخهٔ بازیدیومایکوتینا



الف) ترایکوفایتون تونسورانس[۱] ب) فوزاریوم سونلانی[۲]

شکل۱۲ــ۴ انواع کنیدی در قارچ‌های زیر شاخهٔ دترومایکوتینا

۱ــ T. tonsuranse ۲ــ F. sonlani

کلنی قارچ‌ها

در کلنی قارچ‌ها دو نوع میسلیوم قابل مشاهده است. دسته‌ای که به طرف مادهٔ غذایی رشد و آن‌ها را جذب می‌کنند. این میسلیوم ها به نام میسلیوم رویشی خوانده می‌شوند. میسلیوم‌های رویشی در انواع قارچ‌ها ممکن است به اشکال زیر مشاهده شوند :

اجسام گره‌ای : فرم پیچیده میسلیوم‌هاست که از تداخل هیف‌ها به‌وجود می‌آید و ظاهری شبیه به گره دارد.

هیف فنری یا مارپیچ : رشته‌های فنری شکل مشابه آنچه در اکتینومیست‌ها دیده می‌شود.

میسلیوم راکتی : در این‌گونه میسلیوم‌ها، انتهای سلول‌های میسلیوم متورم می‌شود و ادامه این حالت رشته‌هایی به شکل راکت تنیس به‌وجود می‌آورد.

اجسام شانه‌ای : در برخی موارد برآمدگی‌های کوتاه و بلند و یک‌طرفه در میسلیوم ایجاد می‌شود که حالتی شبیه به شانهٔ شکسته دارد.

فرم قندیلی یا شاخ گوزنی : این ساختار خاص در نتیجهٔ تورم در انتهای انشعابات میسلیوم ایجاد می‌شود.

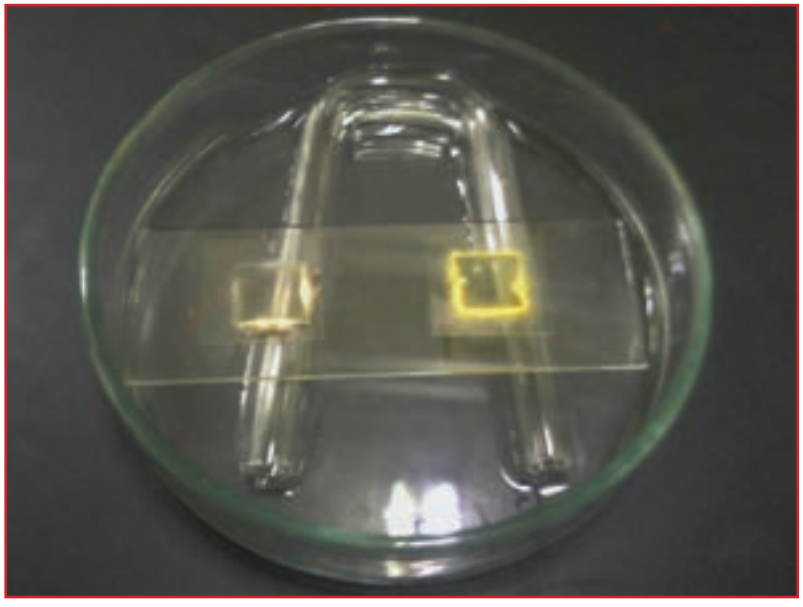
دسته دوم شامل میسلیوم‌هایی است که در سطح ماده غذایی رشد می‌کنند و برخی از آن‌ها اشکال مختلف کنیدی و یا سایر اندام‌های زایشی را ایجاد می‌کنند، که به آن‌ها میسلیوم زایشی می‌گویند. مجموعهٔ میسلیوم‌های رویشی و زایشی کلنی قارچ را تشکیل می‌دهند. قطعات هر دو نوع میسلیوم در صورت انتقال به محیط کشت جدید قادر به رشد و تولیدمثل‌اند.

بررسی و مطالعهٔ میسلیوم قارچ در آزمایشگاه

برای مطالعه و بررسی میسلیوم‌های یک قارچ به روش کشت اسلاید[1](شکل ۱۳ــ۴) به ترتیب زیر عمل کنید :

۱ــ در یک پلیت خالی سترون مقداری محیط سابرودکستروز آگار[2] بریزید و صبر کنید تا بسته شود.

۲ــ با استفاده از اسکالپر سترون مقداری از محیط به ابعاد یک سانتی‌متر مربع ببرید و در شرایط سترون محیط بریده شده را در مرکز یک لام سترون قرار دهید.



شکل۱۳ــ۴ کشت قارچ به روش اسلاید

۱ــ Slide culture ۲ــ Sabourodextrose agar

۳ــ لام را روی لولهٔ U شکل، که درون یک پلیت شیشه‌ای بزرگ سترون قرار دارد، بگذارید (قبلاً لوله را درون پلیت بگذارید و با هم سترون کنید). با استفاده از آنس سترون، قارچ را در چهار نقطه از محیط روی لام تلقیح کنید.

۴ــ یک لامل استریل را با پنس بگیرید و روی قطعهٔ آگار تلقیح شده قراردهید.

۵ــ برای جلوگیری از خشک شدن قطعات آگار در طول مدت انکوباسیون حدود ۱۰ سی‌سی آب مقطر سترون را در داخل پلیت بریزید و مواظب باشید تا آب روی قطعهٔ آگار یا لام و لامل نریزد و درِ پلیت را ببندید.

۶ــ پلیت را مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار دهید. در صورت تبخیر آب داخل پلیت می‌توانید مقداری آب اضافه کنید.

۷ــ بعد از اتمام زمان گرم‌خانه‌گذاری، یک یا دو قطره لاکتوفنل ــ کاتن بلو را روی لام تمیز بریزید. لامل را با قارچی که به آن چسبیده است روی این لام قرار دهید و ساختمان میسلیوم‌ها را بررسی کنید.

با مشاهدهٔ میکروسکوپی قارچ و بر اساس ساختمان آن می توان نوع قارچ را تعیین کرد. برای رنگ‌آمیزی از لاکتو فنل ــ کاتن بلو استفاده می‌شود. به این ترتیب که بر روی یک لام تمیز یک قطره محلول لاکتوفنل ــ کاتن بلو بریزید. با نوک آنس سترون شده مقداری از پرگنهٔ قارچ را بردارید و به آرامی در محلول رنگی بگذارید. از هم زدن و تکان دادن آن خودداری کنید، زیرا این کار باعث متلاشی شدن ساختمان قارچ می‌شود. سپس یک لامل را به آرامی روی آن قرار دهید به‌گونه‌ای که حباب‌های هوا از زیر آن خارج شوند. لام را با بزرگ‌نمایی ۱۰ و ۴۰ میکروسکوپ مشاهده کنید. برای بررسی با بزرگ‌نمایی ۱۰۰، یک قطره روغن سدر روی لامل بریزید و لام را زیر میکروسکوپ مشاهده کنید (شکل۱۴ــ۴).

می‌توان گستره ای از قارچ روی لام را تهیه کرد و آن را بدون رنگ‌آمیزی زیر میکروسکوپ مشاهده نمود. رنگ‌آمیزی فقط برای ایجاد شفافیت و بهتر دیدن ساختمان قارچ است.

شکل۱۴ــ۴ منظرهٔ میکروسکوپی قارچ رایزوپوس کشت شده به روش اسلاید و رنگ آمیزی شده با لاکتو فنل ــ کاتن بلو

عوامل مؤثر در رشد قارچ‌ها

قارچ‌ها شامل قارچ‌های رشته‌ای (کپک) و مخمّرها برای رشد به شرایط خاصی نیاز دارند که عبارت‌اند از :

دما : میزان حرارت برای رشد قارچ‌های رشته‌ای ۲۵ درجه و برای مخمّرها ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد است. تعدادی از قارچ‌ها گرمادوست، و تعدادی از آن‌ها سرما دوست هستند و در دمای ۵– تا ۱۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌خوبی رشد می کنند (مانند واریته هایی از آسپرژیلوس ها).

رطوبت : برای رشد هر میکروارگانیسم مقداری رطوبت لازم است.

موادغذایی : قارچ‌ها از منابع انرژی مختلف مانند قندها، الکل ها، اسیدهای آلی، پروتئین ها و مواد معدنی استفاده می‌کنند. قارچ‌های رشته‌ای می‌توانند مقداری از مواد مورد نیاز خود را بسازند و نسبت به مخمرها کمتر به مواد معدنی نیاز دارند.

pH : هر میکروارگانیسم برای رشد به pH خاص خود نیاز دارد. میدان فعالیت قارچ‌ها بسیار زیاد است. مثلاً کپک‌ها در pH =۱/۵ــ۱۱ و مخمّرها در pH =۲/۵ــ۸/۵ به خوبی رشد می‌کنند. به همین دلیل میوه‌ها بیشتر کپک می‌زنند و باکتری روی آن‌ها رشد نمی‌کند.

پتانسیل اکسیداسیون و احیا : اکثر قارچ‌ها هوازی هستند و برای رشد به اکسیژن نیاز دارند. فقط تعداد کمی بی‌هوازی اختیاری‌اند. مخمّرها هم بیشتر هوازی هستند اما در شرایط بی هوازی هم می‌توانند رشد کنند (فرآیند تخمیر قند).

محیط پایه برای کشت قارچ‌ها سابرودکستروز آگار حاوی مقداری کلرامفنیکل است. این آنتی بیوتیک از رشد باکتری‌ها در این محیط جلوگیری می‌کند. قارچ‌ها معمولاً در دمای محیط آزمایشگاه (۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد) به‌خوبی رشد می‌کنند. معمولاً درماتوفیت‌ها و تمام ساپروفیت ها از این دسته‌اند، ولی قارچ‌هایی که باعث بیماری‌های احشایی می‌شوند نیاز به دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد دارند. مخمرها طی ۲۴ تا ۴۸ ساعت، ساپروفیت‌ها طی ۴ــ۲ روز و درماتوفیت ها طی ۱۵ــ۶ روز گرم‌خانه‌گذاری، رشد می‌کنند.

کشت قارچ‌ها در آزمایشگاه

برای کشت قارچ‌ها در آزمایشگاه به این صورت عمل کنید :

۱ــ از سابرودکستروز آگار، محیط پیش ریخته در پلیت ها یا لوله تهیه کنید.

۲ــ با نوک آنس و در شرایط سترون در کنار شعله مقداری از پرگنه را بردارید و در محیط کشت قرار دهید. در مورد کپک‌ها می‌توانید به‌صورت نقطه‌ای در مرکز پلیت یا در ۶ تا ۸ نقطهٔ کپک را کشت دهید. در مورد مخمرها می‌توانید از مادهٔ غذایی حاوی مخمر یا محیطی که مایع است رقیق تهیه کنید و به صورت سطحی کشت دهید. در مورد مخمرها از روش کشت خطی هم می‌توانید استفاده کنید.

۳ــ پلیت یا لوله‌ها را در گرم‌خانه قرار دهید.

۴ــ ظاهر پرگنه‌ها و منظرهٔ میکروسکوپی آن‌ها را بررسی کنید.

مطالعه و بررسی ریخت شناسی کلنی قارچ‌ها

برای مطالعهٔ کلنی‌های رشد یافته، موارد زیر را باید بررسی کرد :

میزان رشد قارچ : حالت و شکل کلنی ممکن است مسطح، برجسته، منظم یا غیر منظم باشد.

منظرهٔ سطح کلنی : ممکن است به‌صورت پودری، شبه مخمری، دانه‌ای، پنبه‌ای، پشمی، پرزی و مویی باشد.

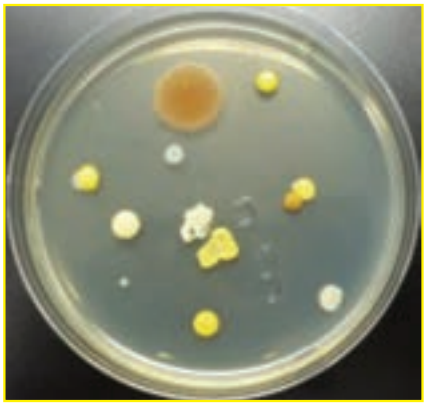
رنگ کلنی : ممکن است در مورد یک قارچ رنگ‌های مختلفی دیده شود. بنابراین شناخت قارچ‌ها از روی پرگنهٔ آن‌ها بسیار مشکل است. در قارچ‌های بیماری‌زا تنوع رنگ کمتر است و معمولاً سفیدند. تنوع رنگ کلنی مربوط به قارچ‌های ساپروفیت است.

وجود رنگدانه : رنگ پشت کلنی به علت نوع رنگدانهٔ تولید شده توسط قارچ‌هاست.

قارچ‌ها را از نظر منظرهٔ ظاهری پرگنه و اَشکال ریز بینی مورد بررسی قرار می‌دهند.

منظرهٔ ظاهری کلنی قارچی: کلنی قارچ‌ها بر روی محیط کشت جامد به دو صورت دیده می‌شود.

۱ــ کلنی‌های لوور[۱] یا مخمّری[۲] : شبیه کلنی باکتری‌ها هستند و پس از کشت نقطه‌ای یا خطی بر روی محیط جامد، به‌صورت کم و بیش برجسته با سطح مات یا درخشان و به رنگ‌های سفید یا زرد و قرمز آجری با قوام خامه‌ای ظاهر می‌شوند (شکل ۱۵ــ۴). مخمرها در سطح محیط مایع پرده تشکیل می‌دهند و یا در ته لوله رسوب می‌کنند. رشد مخمرها سریع است و طی دو تا چهار روز صورت می‌گیرد.



شکل۱۵ــ۴ انواع کلنی مخمر با قوام خامه‌ای بر روی محیط کشت جامد

۲ــ کلنی‌های رشته‌ای[۳] : در محیط جامد دارای محور رشدِ گریز از مرکزند و دارای رشته‌های هوایی یا هیف هستند. این رشته‌ها، ضمن نفوذ در محیط کشت، از مواد غذایی آن استفاده می‌کنند. رنگ و شکل کلنی‌های رشته‌ای، بسته به نوع قارچ و برای یک نوع قارچ، بسته به نوع کشت، متفاوت است. رنگ کلنی‌ها سفید، آبی، سبز، خاکستری، کرم، بنفش و... و به اشکال صاف، چین‌دار، پوستی، پودری، کرکی ــ پنبه‌ای، پشمی و مخملی مشاهده می‌شوند (شکل ۱۶ــ۴). رشد و نمو کلنی‌های رشته‌ای ساپروفیت در عرض ۲۴ تا ۴۸ ساعت صورت می‌گیرد در حالی که کلنی قارچ‌های بیماری‌زا پس از گذشت چند روز و گاهی چند هفته رشد می‌کنند. کلنی قارچ‌های رشته‌ای در محیط مایع به صورت یک گلوله از رشته‌های منشعب و شعاعی و معمولاً بی‌رنگ دیده می‌شوند.

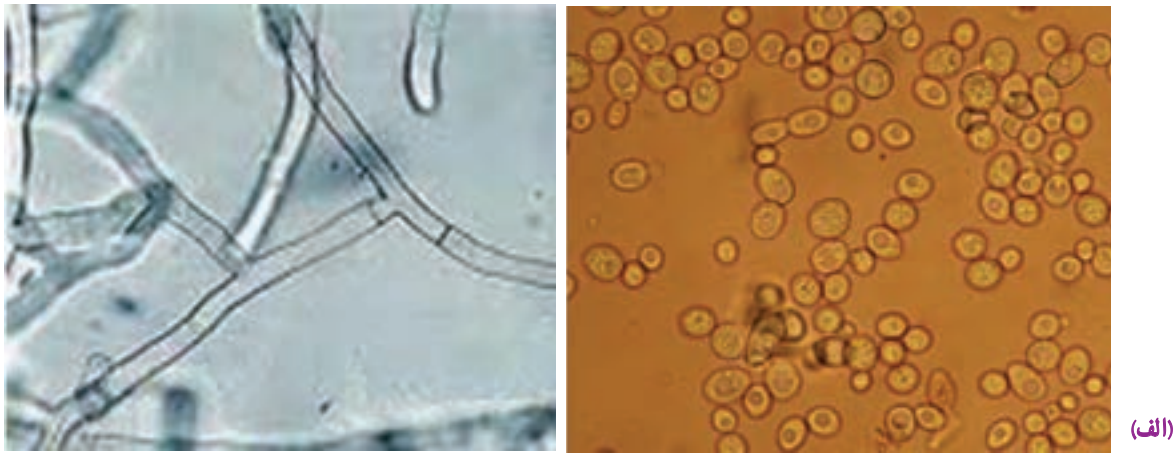
شکل۱۶ــ۴ اشکال مختلف کلنی قارچ‌های رشته‌ای بر روی محیط کشت جامد

۱ــ Levure ۲ــ Yeast ۳ــ Filament

اشکال ریزبینی قارچ‌ها

دو شکل ریزبینی در قارچ‌ها دیده می‌شوند.

۱ــ شکل مخمّری : مخمرها به اشکال تک‌سلولی گرد یا بیضی، کم و بیش کشیده و دارای غشای نازک و یا ضخیم (شکل۱۷ــ۴ــ الف) هستند که با روش جوانه زدن تکثیر می‌شوند. هر یک از دو سلول جدا شده می‌توانند دوباره جوانه بزنند و زیاد شوند. در بعضی از مخمرها سلول جوانه از سلول اصلی جدا نمی‌شود و با اتصال سست به آن می‌چسبد. ممکن است جوانه‌ها دنبال یکدیگر قرار بگیرند و شاخه‌های جانبی ایجاد کنند این حالت را رشته‌های کاذب[۱] می‌نامند. هیف کاذب در برخی از قارچ‌های مخمری تحت شرایط خاص، نظیر کاهش اکسیژن محیط، کاهش قند یا در حضور پروتئین‌های مخصوص، ایجاد می‌شود.



الف) سلول‌های گرد یا بیضی در شکل مخمری ب) لوله‌های منشعب در شکل رشته‌ای

شکل۱۷ــ۴ اشکال ریزبینی قارچ‌ها

۲ــ شکل رشته‌ای : رشته ها از لوله‌های پیچ در پیچ و منشعب با غشای محدود، دارای پروتوپلاسم و هسته تشکیل شده اند (شکل ۱۷ــ۴ــ ب). این رشته‌ها از رویش اسپورهایی که درمحیط مناسب از نظر مواد غذایی و رطوبت قرار می‌گیرند تشکیل می‌شوند.

برخی قارچ‌های بیماری‌زای انسان، در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و در بدن میزبان به شکل مخمر و در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و در محیط کشت به شکل رشته‌ای دیده می‌شوند. این قارچ‌ها، قارچ‌های دو شکلی[۲] نامیده می‌شوند.

بیماری‌های قارچی طیور

آسپرژیلوزیس : آسپرژیلوزیس[۳] یکی از بیماری‌های دستگاه تنفس پرندگان است. حساسیت جوجهٔ ماکیان و بوقلمون به آلودگی با این قارچ، بیشتر از بالغین آن‌هاست. آب وهوای گرم و مرطوب باعث افزایش درصد مبتلایان می‌شود. مهم‌ترین قارچ عامل این بیماری *آسپرژیلوس فومیگاتوس*[۴] است. بیماری آسپرژیلوزیس از طریق بستر و مواد غذایی کپک زده، گرد و غبار و ماشین‌های جوجه‌کشی کثیف منتقل می‌شود. تنفس تعداد زیاد هاگ قارچ، عمده ترین راه انتقال است .عوامل محیطی مانند تغییرات ناگهانی دمایی، محرومیت‌های غذایی، وجود آمونیاک زیاد و عفونت‌های باکتریایی و ویروسی احتمال بروز این بیماری را افزایش می‌دهند. آسپرژیلوس از طریق تخم‌مرغ نیز انتقال می‌یابد. در این حالت قارچ از طریق پوست آسیب دیده تخم‌مرغ به داخل آن نفوذ (شکل ۱۸ــ۴)

۱ــ Pesoudohyphae ۲ــ Dimorphic fungus ۳ــ Aspergilosis ۴ــ Aspergillus fumigatus

و جنین را آلوده می‌کند. شکسته شدن تخم‌مرغ‌های آلوده در دستگاه جوجه‌کشی باعث سرایت آلودگی به سایر تخم‌مرغ‌ها می‌شود (شکل‌های ۱۹ــ۴، ۲۰ــ۴، ۲۱ــ۴ ، ۲۲ــ۴)

شکل۱۸ــ۴ آلودگی تخم‌مرغ با قارچ آسپرژیلوس

(الف)

(ب)

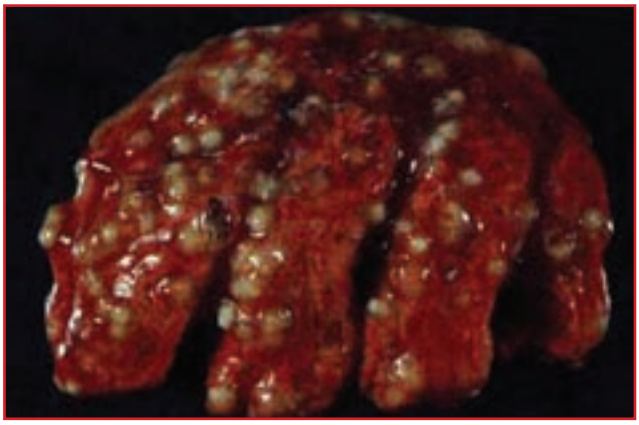
(پ)

(ت)

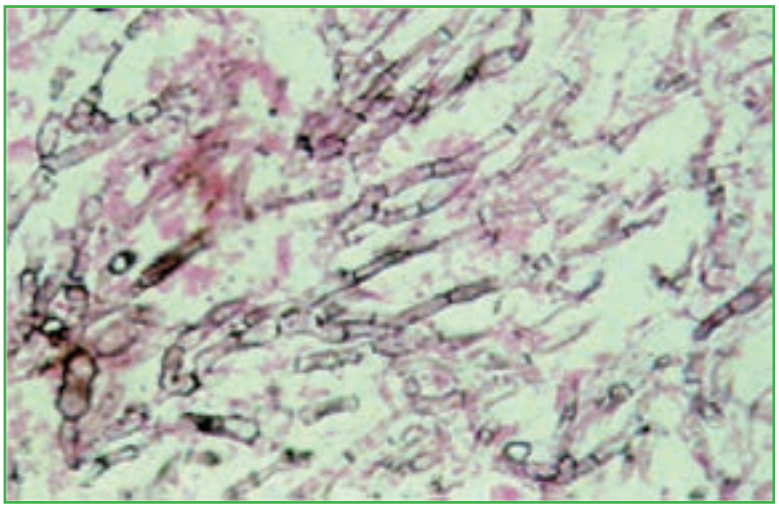
(ث)

الف) تورم کاسهٔ چشم و خاکستری رنگ شدن آن ب) آرتریت پ) تورم کیسه‌های هوایی
ت) آنسفالیت مغزی ث) ظهور اسپورهای قارچ بر روی اندام‌های داخلی

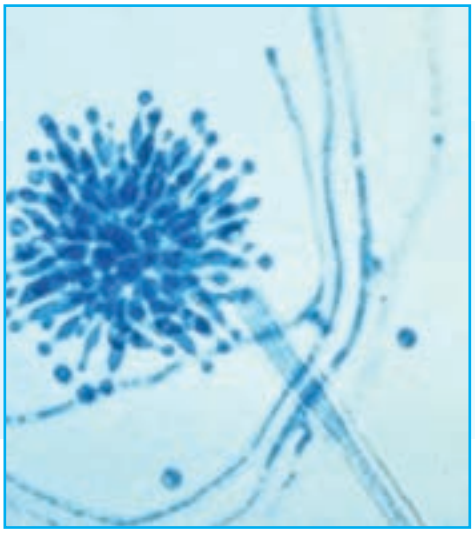
شکل ۱۹ــ۴ علایم آسپرژیلوزیس طیور



شکل ۲۰ــ۴ پنومونی آسپرژیلوسی، ندول‌ها و پلاک‌های پنیری خاکستری رنگ بر روی ریهٔ جوجهٔ مبتلا مشاهده می‌شوند.



شکل۲۱ــ۴ میسلیوم های دوشاخهٔ آسپرژیلوس در مقطع بافت ریه



شکل۲۲ــ۴ منظرهٔ ریزبینی قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس

مایکوتوکسیکوز : بیماری مایکوتوکسیکوز[1] در اثر خوردن مواد غذایی آلوده به سموم حاصل از قارچ‌ها ایجاد می‌شود. مایکوتوکسین‌ها دردانهٔ غلات، مانند ذرت، سورگوم، جو، گندم، کنجالهٔ پنبه و بادام زمینی و علوفه، قبل و هنگام برداشت در شرایط رطوبت زیاد تولید می‌شوند. اثر مایکوتوکسین‌ها از طریق چهار مکانیسم در دام وطیور اعمال می‌شود :

۱ــ کاهش میزان جیرهٔ مصرفی؛

۲ــ کاهش جذب مواد مغذی و متابولیسم ضعیف؛

۳ــ تغییر در سیستم‌های درون ریز و برون ریز؛

۴ــ سرکوب سیستم ایمنی.

انواع مایکوتوکسین ها

آفلاتوکسین: آفلاتوکسین[2]ها مهم‌ترین ترکیبات سمی تولید شده توسط قارچ‌ها هستند. چهار آفلاتوکسین تولید شده در

۱ــ Mycotoxicose ۲ــ Aflatoxin

مواد خوراکی B۱، B۲، G۱، و G۲ هستند که قوی‌ترین و متداول‌ترین آن‌ها B۱ است. دو گونهٔ مهم آسپرژیلوس که در مواد خوراکی آفلاتوکسین تولید می‌کنند *آسپرژیلوس فلاووس*[۱] و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس*[۲] هستند. در حیوانات، آفلاتوکسین سبب آسیب کبدی، کاهش باروری، کاهش تولید شیر یا تخم مرغ، مرگ جنینی، تومور و سرکوب سیستم ایمنی می‌شود. آفلاتوکسین تمام گونه‌های ماکیان را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد. سطوح بالای آفلاتوکسین سبب مرگ و میر، و سطوح پایین آن در صورت تداوم زیان آور است. ماکیان جوان خصوصاً بوقلمون و مرغابی نسبت به آفلاتوکسین بسیار حساس‌اند (شکل‌های ۲۳ــ۴، ۲۴ــ۴ و ۲۵ــ۴).

شکل ۲۳ــ۴ مقایسهٔ اختلال رشد در جوجهٔ مبتلا به آفلاتوکسیکوز (سمت راست) با جوجهٔ سالم (سمت چپ)

شکل۲۴ــ۴ مقایسهٔ کبد جوجهٔ مبتلا به آفلاتوکسیکوز (سمت راست) و کبد جوجهٔ سالم (سمت چپ)

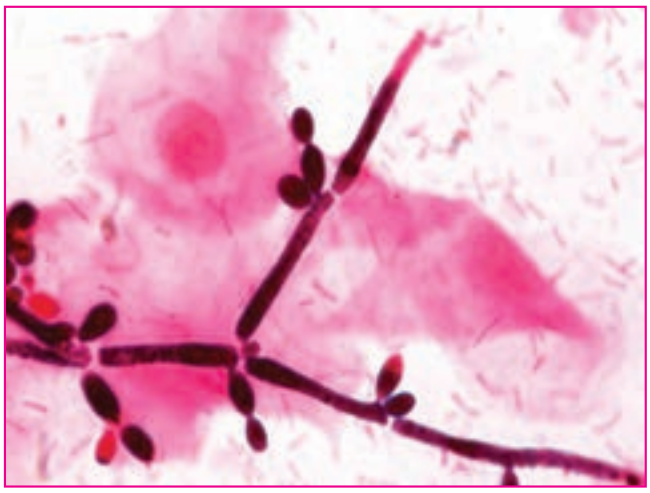
شکل۲۵ــ۴ افزایش حجم و رنگ پریدگی کبد جوجهٔ مبتلا به آفلاتوکسیکوز

***اکراتوکسی‌کوز*[۳]:** اکراتوکسین[۴] دارای چهار نوع A، B، C و D است که اغلب نوع A آن باعث مسمومیت می‌شود. اکراتوکسین‌ها عمدتاً به بافت کلیه آسیب می‌رسانند و در کبد نیز باعث تغییراتی می‌شوند. عمده‌ترین قارچ‌های مولد این بیماری، *آسپرژیلوس اکراسئوس*[۵] و *پنی‌سیلیوم ویریدیکاتوم*[۶] هستند که در شرایط مناسب از نظر گرما و رطوبت باعث آلوده شدن غلات و دان‌های آماده می شوند.

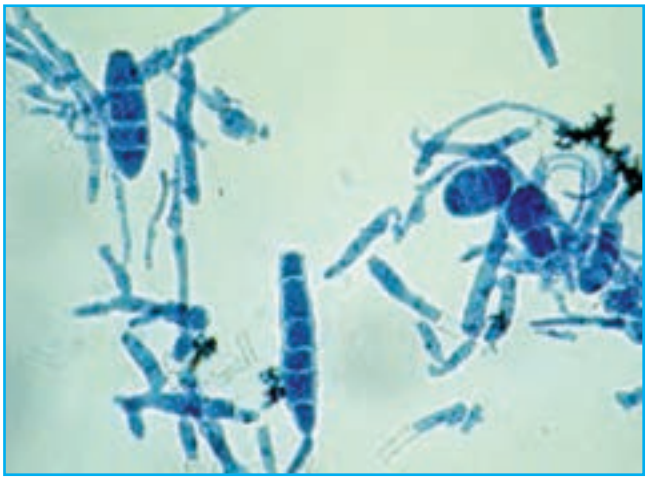
کاندیدیازیس: بیماری کاندیدیازیس[۷] با اسامی برفک، مونیلیازیس[۸] و مایکوزیس دستگاه گوارشی نیز شناخته می‌شود. این بیماری در قسمت فوقانی دستگاه گوارشی (مری و چینه دان) ماکیان و بوقلمون ایجاد می‌شود و گاهی به دهان نیز سرایت می کند. عامل این بیماری قارچ *کاندیدا آلبیکنس*[۹] است. این مخمّر میزبان عادی اکثر پرندگان است و در اثر عوامل مختلفی مانند بستر کثیف، نارسایی غذایی و استرس در انواع پرندگان بیماری ایجاد می کند(شکل‌های ۲۶ــ۴، ۲۷ــ۴).

۱ــ A. flavus
۲ــ A. parasticus
۳ــ Ochratoxicosis
۴ــ Ochratoxin
۵ــ A. ochraceus
۶ــ P. viridicatum
۷ــ Candidiasis
۸ــ Moniliasis
۹ــ Candida albicans

شکل۲۶ــ۴ لکه های سفید مایل به خاکستری در تاج جوجهٔ مبتلا به کاندیدیازیس



شکل۲۷ــ۴ منظرهٔ ریزبینی قارچ کاندیدا آلبیکنس در ترشحات مخاطی



شکل ۲۸ــ۴ منظرهٔ ریزبینی قارچ تریکوفیتون مگنینی

کچلی: عامل بیماری کچلی یا بیماری تاج سفید[1]، قارچ *تریکوفیتون مگنینی*[2] است (شکل ۲۸ــ۴). بیماری با پیدایش لکه‌های سفید مایل به خاکستری در تاج شروع می‌شود. این لکه‌ها به‌تدریج بزرگ می‌شوند و دانه‌های خاکستری رنگ چین‌خورده‌ای تولید می‌کنند که تا صورت و ریش هم گسترش می‌یابند (شکل۲۹ــ۴). در اَشکال پیشرفته بیماری، این جراحات تا گردن هم منتشر می‌شوند. پرها می‌ریزند، پوست ضخیم و پوشیده از دلمه می‌شود.

شکل۲۹ــ۴ دانه‌های خاکستری رنگ در تاج جوجهٔ مبتلا به کچلی

۱ــ White comb

۲ــ Trichophyton megnini

۱ـ اساس طبقه بندی قارچ ها چیست ؟

بر اساس شکل و مشخصات دستگاه های رویشی و زایشی آن ها

۲ـ ردهٔ بازیدیومیست ها را شرح دهید.

تکامل یافته‌ترین قارچ‌ها در این شاخه قرار می‌گیرند . هیف دارای دیوارهٔ عرضی واجد یک یا دو هسته است . تولید مثل جنسی به صورت رویشی انجام می‌شود و نتیجهٔ آن تولید اسپورهایی به نام بازیدیوسپور است که بر روی بازیدیوم قرار می‌گیرند، مانند انواع ماشروم (قارچ خوراکی). هنگام رویش بازیدیوسپور، هیف تک هسته‌ای حاصل می‌شود و از ترکیب دو هیف تک هسته‌ای مخالف، هیف دو هسته‌ای به‌وجود می‌آید. با تقسیم میوز ، چهار هستهٔ هاپلوئید و در نتیجه چهار بازیدیوسپور بوجود می‌آید.

۳ـ دلایل تشکیل اسپور در قارچ ها چیست ؟

در شرایط نامناسب برای رشد و تکثیر مثل سرما، گرما، نور ماوراء‌بنفش و خشکی و... قارچ‌ها تولید اسپور می‌نمایند.

۴ـ روش‌های تولید مثل در کپک‌ها را نام ببرید.

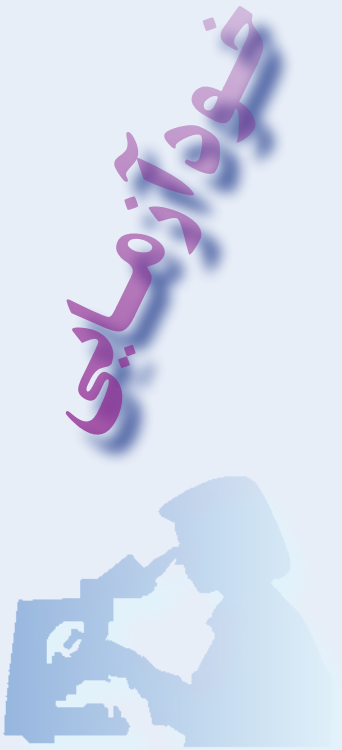
تولید مثل غیر جنسی شامل قطعه قطعه کردن هیف، جوانه زدن و تولیدمثل جنسی است.

۵ـ جوانه زدن در مخمر ها را شرح دهید.

جوانه بر سطح خارجی سلول مادر به وجود می‌آید و با دراز شدن آن هسته سلول مادر تقسیم می‌شود و یکی از هسته‌های حاصل بر روی جوانه مهاجرت می‌کند. آن گاه مواد دیوارهٔ سلولی بین جوانه و سلول مادر به وجود می‌آید و سرانجام، جوانه از سلول مادر جدا می‌شود.

۶ـ بکرزایی را توضیح دهید.

ایجاد ارگانیسم از سلول غیر بارور است و در واقع ، یک شکل تغییر یافتهٔ تولیدمثل است و نباید با روش غیر جنسی اشتباه شود. در برخی مخمرها تولید مثل جنسی مشاهده نشده است. در این قارچ، سلول‌های تشکیل‌دهندهٔ آسک زوائدی به طرف‌های مختلف تولید می‌کنند که سعی در آمیختن با یکدیگر و ایجاد آمیزش دارند. به هر حال آمیزش اتفاق می‌افتد و سلول‌ها تنها یک قسمت از خصوصیات مرحلهٔ جنسی را حفظ می‌کنند.



منابع

۱ــ **میکروب شناسی پزشکی جاوتز**، مترجمان : دکتر محمد کریم رحیمی، دکتر عمید اطهری، سال نشر : ۱۳۸۲، انتشارات آییژ

۲ــ **میکروبیولوژی عمومی**، نویسندگان : دکتر فریدون ملک‌زاده، دکتر منوچهر شهامت، سال نشر :۱۳۸۰، انتشارات عقیق

۳ــ **ویروس شناسی عمومی**، نویسندگان : دکتر محمد مهدی آل محمد، دکتر نورالدین هابیلی، سال نشر :۱۳۶۷، انتشارات مرکز نشر دانشگاهی تهران

۴ــ **ویروش شناسی پزشکی**، نویسنده : دکتر پرویز مالک‌نژاد، سال نشر : ۱۳۷۶، انتشارات دانش‌پژوه

۵ــ **میکروب شناسی دام پزشکی و بیماری‌های میکروبی(بیمارهای باکتریایی)**، نویسندگان : پی.جی.کوئین، لئونارد، مارکی، کارتر، مترجمان : جلال شایق، تقی زهرایی صالحی، سال نشر : ۱۳۸۸، انتشارات مرکز نشر دانشگاهی تهران

۶ــ **اصول ایمنی در آزمایشگاه**، پدید آورندگان : پیام بهزادی، الهام بهزادی، سال نشر : ۱۳۸۷، ناشر نیکتاب

۷ــ **اصول ایمنی و حفاظت در آزمایشگاه بالینی**، پدیدآورنده :مسعود صادقی، سال نشر : ۱۳۸۸، ناشر : آبنوس، صبورا

Manual of Methods for General Bectriology. Eds: P Gerhardt, RGE Murray, RN Costilow , EW Nester, WA Wood, NR Keirg and GB Phillips. American Society for Microbiology.1981.

Microbiology laboratory manual. Eds: James G. Cappuccino, Natalie Sherman. Benjamin/ Cummings Press. 2007.

Microbiology laboratory manual: principles and applications. Eds: Stephen A. Norrell, Karen E. Messley. Prenticc Hall.2003.

Virology: A laboratory manual: Eds: Florence G. Burleson, Thomas M. Chambers, Danny L. Wiedbrsuk. Academic Press.1992.

Lab Manual of Veterinary Microbiology (Part IV): Virology. Ed: Malik B.S. CBS Delhi.2006.

Vetetinary mycology laboratory manual. Eds: Laura L. Hungerford, Charles Lee Campbell, Arnold R. Smith. Iowa State University Press. 1998.

Microbiology: Laboratory Theory and Application. Ed: Michael J. Leboffe. Morton Publishing Company. 2008.

Laboratory safety: principles and practices. Ed: Diane O. Fleming. American Society for Microbilolgy, ASM Press. 1995.

Diseases of Poultry. Eds: Y.M.Saif, H. J.Barnes, J.R.Glisson A. M. Fadly, L. R. McDougald,

David E. Swayne. Wiley– Blackwell. 2003.

Poultry Diseases. Eds: Mark Pattison, Paull McMullin, Janet M. Bradbury, Dennis J Alexander. Saunders Ltd. 2007.

Avian Influenza and Newcastle Disease: A Field and Laboratory Manual. Eds: Illaria Capua,

Dennis J. Alexander. Springer. 2009.

Mycotoxin Contamination and Control. Ed: Henty Njapau. Author House. 2008.

Mycological Research. The British Mycological Society. 2004.

Introduction to Fungi. Eds: John Webster, Roland Weber. Cambridge University Press. 2007.

Virology. Eds: Jay A. Levy, Heinz Fraenkel–Conrat, Oliver S. Owens. Benjamin Cummings. 1994.

Basic Virology. Eds: Martinez J. Hewlett, David C. Bloom, David Camerini. Wiley–Blackwell. 2007.

The Emergence of Zoonotic Diseases: Understanding the Impact on Animal and Human Health. Eds: Tom Burroughs, Stacey Knobler, Joshua Lederberg. National Academise Pess. 2002.

Fundamental Principles of Bacterilolgy. Ed: A.J. Salle. Envins Press. 2007.

Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology (**Essentials of Veterinary Microbiology**) Eds: Gordon R. Carter, Darla J. Wise. Wiley–Blackwell. 2003

Koneman´s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology (**Color Atlas & Textbook of Diagnostic Microbiology**). Ed: Elmer W. Koneman. Lippicott Williams & Wilkins. 2005.