

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ

## کتاب کار میکروبیولوژی

شاخه: فنی حرفه‌ای

زمینه: امور دامی

گروه تحصیلی: کشاورزی

سرشناسه: شریفان، انوشه، ۱۳۵۹-  
عنوان و نام پدیدآور: کتاب کار میکروبیولوژی رشته امور دامی / مؤلفان انوشه شریفان، سعید بدیعی اردستانی؛  
برنامه‌ریزی محتوا و نظارت بر تألیف دفتر برنامه‌ریزی و تألیف آموزش‌های فنی و حرفه‌ای و کاردانش.  
مشخصات نشر: تهران: گویش نو، ۱۳۸۹.  
مشخصات ظاهری: ۲۰۰ص، ۲۲×۲۹ س م.  
شابک: ۹۷۸-۶۰۰-۵۰۸۴-۷۲-۶-۶  
موضوع: میکروب شناسی  
موضوع: میکروب شناسی -- آزمایشگاه  
شناسه افزوده: بدیعی اردستانی، سعید.  
شناسه افزوده: سازمان پژوهش و برنامه‌ریزی آموزشی. دفتر تألیف و برنامه‌ریزی درسی آموزش‌های فنی و  
حرفه‌ای  
رده‌بندی کنگره: ۱۳۹۰ ک۲۴ش/QR ۴۱  
رده‌بندی دیویی: ۵۷۹  
شماره کتابشناسی ملی: ۲۳۴۴۲۸۴

جمهوری اسلامی ایران  
وزارت آموزش و پرورش  
سازمان پژوهش و برنامه‌ریزی آموزشی

همکاران محترم و دانش آموزان عزیز:

پیشنهادها و نظرات خود را درباره محتوای این کتاب به نشانی تهران-  
صندوق پستی شماره ۴۸۷۴/۱۵ دفتر برنامه‌ریزی و تألیف آموزش‌های  
فنی و حرفه‌ای و کاردانش، ارسال فرمایند.

پیام‌نگار (ایمیل) [tvoccd@roshd.ir](mailto:tvoccd@roshd.ir)  
وب‌گاه (وب‌سایت) [www.tvoccd.medu.ir](http://www.tvoccd.medu.ir)

برنامه‌ریزی محتوا و نظارت بر تألیف: دفتر برنامه‌ریزی و تألیف آموزش‌های فنی و حرفه‌ای و کاردانش

عنوان و کد کتاب: کتاب کار میکروبیولوژی، ۳۵۸/۷۵

مجری: انتشارات گویش نو

مؤلفان: انوشه شریفیان، سعید بدیعی اردستانی

مدیر هنری: مؤگان اصلانی

صفحه‌آرا: رامین سرافراز

طراح جلد: محمدحسن معماری

محتوای این کتاب در کمیسیون تخصصی رشته امور دام و طیور دفتر برنامه‌ریزی و تألیف آموزش‌های فنی و حرفه‌ای و کاردانش با عضویت:

سپروس اشیدری، سعید بدیعی اردستانی، جهان‌شاه ایرانپور، عزت‌الله شجاعی و شهرزاد جزء قاسمی تأیید شده است.

نوبت و سال چاپ: دوم ۱۳۹۱

ناشر: شرکت چاپ و نشر کتاب‌های درسی ایران: تهران - کیلومتر ۱۷ جاده مخصوص کرج - خیابان ۶۱ (داروپخش)

تلفن: ۵ - ۴۴۹۸۵۱۶۱، دورنگار: ۴۴۹۸۵۱۶۰، صندوق پستی: ۳۷۵۱۵-۱۳۹

نظارت بر چاپ و توزیع: اداره کل چاپ و توزیع کتاب‌های درسی، سازمان پژوهش و برنامه‌ریزی آموزشی

تهران: خیابان ایرانشهر شمالی - ساختمان شماره ۴ آموزش و پرورش (شهید موسوی)

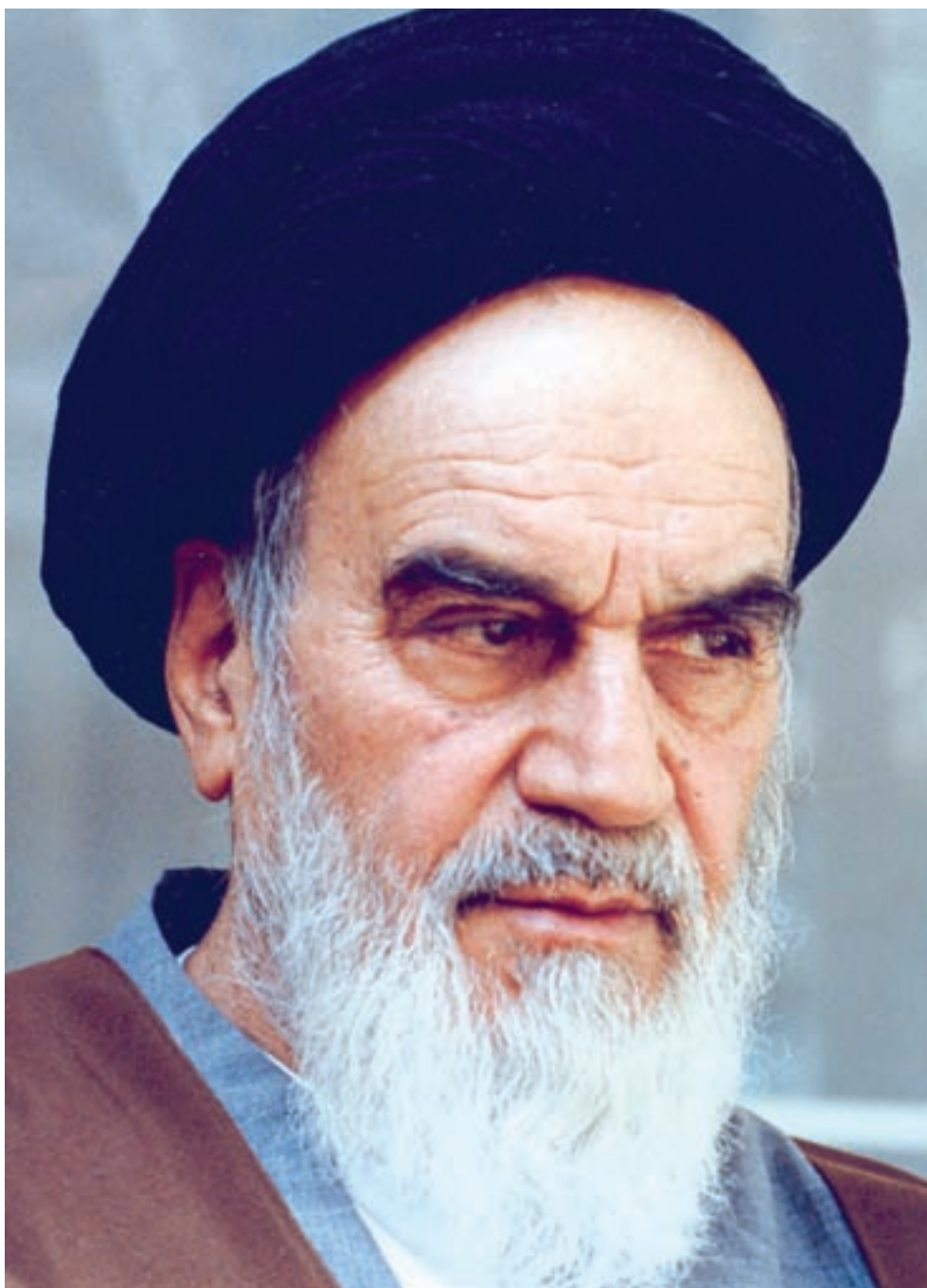
تلفن: ۹ - ۸۸۳۱۱۶۱، دورنگار: ۸۸۳۰۹۲۶۶، کدپستی: ۱۵۸۴۷۴۷۳۵۹

وب‌سایت [www.chap.sch.ir](http://www.chap.sch.ir)

حق چاپ محفوظ است.

ISBN: 978-600-5084-72-6

شابک: ۹۷۸-۶۰۰-۵۰۸۴-۷۲-۶



شما عزیزان کوشش کنید که از این وابستگی بیرون آید و احتیاجات کشور خودتان را برآورده سازید، از نیروی انسانی ایمانی خودتان غافل نباشید و از اتکای به اجانب پرهیزید.

امام خمینی (ره)



## فصل اول

|    |  |
|----|--|
| ۸  | ..... آزمایشگاه میکروبیولوژی   |
| ۹  | ..... دستورالعمل‌های ایمنی، بهداشتی و زیست محیطی در آزمایشگاه، میکروبیولوژی                |
| ۹  | ..... هشدارهای ایمنی   |
| ۱۲ | ..... هشدارهای بهداشتی   |
| ۱۳ | ..... هشدارهای زیست محیطی  |
| ۱۴ | ..... دستگاه‌ها، لوازم و تجهیزات میکروبیولوژی  |
| ۱۴ | ..... هودهای بیولوژیک  |
| ۱۴ | ..... لامپ‌های ماوراء بنفش   |
| ۱۵ | ..... اتو کلاو   |
| ۱۵ | ..... شرایط سترون کردن با اتو کلاو   |
| ۱۹ | ..... گرمخانه (اینکوباتور)   |
| ۲۱ | ..... حمام آب گرم  |
| ۲۲ | ..... یخچال  |
| ۲۳ | ..... ترازو  |
| ۲۵ | ..... تکان دهنده مکانیکی   |
| ۲۵ | ..... میکروسکوپ  |
| ۳۰ | ..... آون  |
| ۳۱ | ..... دستگاه پرگنه شمار  |
| ۳۲ | ..... معرفی برخی از ظروف آزمایشگاه میکروبیولوژی  |
| ۳۲ | ..... پیپت   |
| ۳۵ | ..... سرنگ فلزی  |
| ۳۵ | ..... ارکن تحت خلا، ارلن مایر، بالن ژوژه، استوانه مدرج، میله شیشه‌ای، سوزن کشت، لام و لامل |
| ۳۶ | ..... واژه‌های فصل اول   |

## فصل دوم

|    |                                      |
|----|--------------------------------------|
| ۳۷ | ..... باکتریها                       |
| ۳۸ | ..... شکل باکتری‌ها                  |
| ۴۰ | ..... مشاهده میکروسکوپی باکتری‌ها    |
| ۴۰ | ..... الف . روش گسترش مرطوب          |
| ۴۲ | ..... ب . روش قطره معلق              |
| ۴۴ | ..... لوله‌های آزمایش کوچک           |
| ۴۶ | ..... تنظیم PH                       |
| ۴۸ | ..... محیط‌های کشت خوابیده           |
| ۴۸ | ..... محیط‌های کشت دیگر              |
| ۴۸ | ..... نگهداری محیط‌های کشت           |
| ۴۸ | ..... طرز تهیه محیط کشت آگار خون دار |
| ۴۸ | ..... روش‌های کشت باکتری             |
| ۵۲ | ..... حرکت باکتری‌ها                 |
| ۵۴ | ..... روش‌های رنگ آمیزی باکتری‌ها    |

|    |   |
|----|---|
| ۵۴ | ..... ۱. رنگ آمیزی کریستال ویوله (ساده)               |
| ۵۶ | ..... ۲. رنگ آمیزی گرم                                |
| ۵۸ | ..... ۳. رنگ آمیزی کپسول                              |
| ۶۰ | ..... ۴. رنگ آمیزی اسپور                              |
| ۶۲ | ..... رقیق کردن و کشت دادن نمونه‌های مختلف            |
| ۶۳ | ..... بررسی میزان آلودگی نمونه شیر                    |
| ۶۵ | ..... شمارش تعداد پرگنه (کلنی) ها و دستگاه پرگنه شمار |
| ۶۶ | ..... شمارش باکتری‌ها                                 |
| ۶۹ | ..... شمارش باکتری‌ها به کمک کاغذ صافی                |
| ۷۱ | ..... شمارش باکتری‌ها به روش شمارش مستقیم             |
| ۷۲ | ..... واژه‌های فصل دوم                                |
| ۷۳ | ..... ویروس‌ها  |
| ۷۴ | ..... میزبان ویروس‌ها                                 |
| ۷۴ | ..... ساختمان شیمیایی ویروس                           |
| ۷۴ | ..... اسید نوکلئیک                                    |
| ۷۴ | ..... کپسید   |
| ۷۵ | ..... پوشش غیر پروتئینی                               |
| ۷۵ | ..... ویروس‌های ناقص                                  |
| ۷۵ | ..... ویرون   |
| ۷۵ | ..... ویروئید   |
| ۷۶ | ..... ویروس‌های گیاهی                                 |
| ۷۶ | ..... ویروس‌های جانوری                                |
| ۷۷ | ..... تکثیر ویروس‌ها                                  |
| ۷۸ | ..... واژه‌های فصل سوم                                |
| ۷۹ | ..... قارچ‌ها   |
| ۸۰ | ..... شکل ظاهری قارچ‌ها                               |
| ۸۲ | ..... کشت کپک‌ها                                      |
| ۸۴ | ..... خواص ظاهری کپک‌ها                               |
| ۸۴ | ..... میزان رشد قارچ                                  |
| ۸۴ | ..... منظره سطح کلنی                                  |
| ۸۴ | ..... رنگ کلنی  |
| ۸۴ | ..... وجود رنگدانه                                    |
| ۸۴ | ..... خواص ریزبینی یا میکروسکوپی                      |
| ۸۵ | ..... رنگ آمیزی کپک‌ها                                |
| ۸۶ | ..... انواع کپک‌ها                                    |
| ۸۸ | ..... مخمرها  |
| ۹۰ | ..... واژه‌های فصل چهارم                              |
| ۹۱ | ..... منابع   |

## فصل سوم

## فصل چهارم

## مقدمه

امروزه اهمیت و نقش میکروارگانیسم‌ها در رابطه با حیات و فعالیت‌های انسانی به خوبی شناخته شده است. اگر چه در گذشته تصور می‌شد که میکروارگانیسم‌ها تنها سبب آلودگی، فساد و ایجاد بیماری می‌باشند، اما در حال حاضر این موجودات ریز میکروسکوپی به عنوان یکی از عوامل مهم چرخه‌های مواد در طبیعت معرفی شده و حتی به دلیل قدرت آنزیمی بالای این سلول‌ها از آن‌ها برای حذف آلودگی‌های خطرناک و مواد شیمیایی سرطان‌زا، تصفیه آب و فاضلاب و نیز تولید مواد غذایی مختلف استفاده می‌شود.

در عین حال نمی‌توان اهمیت میکروارگانیسم‌های عامل فساد و بیماری را نادیده گرفت. کنترل و کاهش تعداد سلول‌های میکروبی ناخواسته در منابع مختلف، نیازمند شناخت کافی از این سلول‌ها و نیز آشنایی با روش‌های جداسازی، مشاهده و شمارش میکروبی است.

در این کتاب ابتدا هنرجو با آزمایشگاه میکروبیولوژی، ویژگی‌ها، مقررات و تجهیزات آن آشنا شده، سپس نکات ایمنی و اصول کار را در این آزمایشگاه فرا می‌گیرد. بعد از آن ضمن معرفی کلی میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها، روش‌های متداول جهت شناسایی و تعیین برخی از میکروارگانیسم‌های شاخص ارائه می‌گردد. امید آن‌که روانی و سادگی مطالب کتاب کاربرد آن را برای هنرجویان عزیز میسر سازد.

## سخنی با هنرجویان

از آنجا که یکسان نبودن شرایط آزمایش در آزمایشگاه‌های مختلف می‌تواند سبب ناهماهنگی در نتایج حاصل و پاسخ آزمایشات مشابه گردد، لذا در این کتاب سعی شده است در حد نیاز هنرجویان رشته علوم دامی، پس از آشنایی با مقررات آزمایشگاه میکروبیولوژی، هنرجویان با عمده‌ترین و کاربردی‌ترین وسایل و تجهیزات آزمایشگاهی آشنا شوند. سپس جهت آشنایی با سلول‌های میکروبی اعم از باکتری‌ها، ویروس‌ها، کپک‌ها و مخمرها ضمن ارائه تصاویر و اشکال متعدد، متداول‌ترین روش‌های کشت و تشخیص معرفی گردیده است. در این کتاب تلاش شده است به شرح روش‌هایی پرداخته شود که با استاندارد ملی کشور به عنوان مرجع اصلی نظارت و کنترل بهداشتی مواد و محصولات مختلف و همسو باشد.

کتاب حاضر در چهار فصل تهیه شده است. لازم است هنرجویان عزیز با در نظر گرفتن نکات ایمنی، زیست محیطی و بهداشتی، آزمایشات ارائه شده در هر فصل را به دقت انجام داده و در پایان هر آزمایش گزارش کار مربوط به آن را تهیه نمایند.

هدف از ارائه این کتاب داشتن الگوی انجام کار در آزمایشگاه برای هنرجویان است. به این نحو که با قرائت مطالب هر درس به انجام آزمایشات آن اقدام شود. تکمیل مطالب این کتاب در آزمایشگاه و با راهنمایی مسئول آزمایشگاه صورت می‌گیرد.

در تهیه گزارش کار نهایی توجه به نکات زیر ضروری است:

الف- ذکر نام و نام خانوادگی و عنوان آزمایش

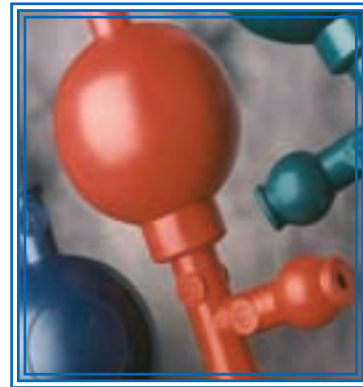
ب- مشخص کردن هدف از انجام آزمایش

ج- ثبت نتایج حاصل از آزمایش و در صورت لزوم رسم تصاویر مربوط

د- ذکر پاسخ سئوالات مطرح شده در پایان آزمایش

# فصل اول

## آزمایشگاه میکروبیولوژی





## دستورالعمل‌های ایمنی، بهداشتی و زیست محیطی در آزمایشگاه میکروبیولوژی

دنیای میکروب‌ها جهانی زنده ولی غیر قابل رویت است. به همین دلیل علم میکروب‌شناسی از سایر علوم متمایز می‌باشد. کار کردن با میکروب‌ها مستلزم رعایت نکات خاصی است تا در ضمن اینکه میکروارگانیسم‌های مورد نظر رشد و تکثیر می‌یابند از آلودگی‌های ثانویه و رشد سایر میکروب‌ها جلوگیری به عمل آید. همیشه قبل از شروع آزمایش باید تصور شود کلیه میکروارگانیسم‌هایی که مورد آزمایش قرار می‌گیرند می‌توانند بالفعل و بالقوه بیماریزا باشند. به همین جهت کلیه قوانین ایمنی و بهداشتی ضمن مراحل مختلف آزمایش باید مورد توجه قرار گیرد. بسیاری از افرادی که در آزمایشگاه میکروبیولوژی کار می‌کنند ممکن است تصور کنند که میکروارگانیسم‌هایی که با آن‌ها سرو کار دارند بیماریزا نیستند، عدم رعایت مقررات شدید ایمنی مسئله‌ای را بوجود نمی‌آورد، باید توجه داشت که در واقع مرز جدا کننده‌ای بین میکرب‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا وجود ندارد. تعدادی از باکتری‌های ظاهراً بی‌زیان می‌توانند در افراد خاص و در شرایط معین بیماری ایجاد نمایند. کارکنانی که با میکروب‌های خطرناک سرو کار دارند باید علیه آن میکروارگانیسم‌ها واکسینه شوند و کلیه افرادی که در آزمایشگاه میکروبیولوژی کار می‌کنند باید با اصول ایمنی و کار در آزمایشگاه آشنا باشند.

نکات مهمی وجود دارند که در حین کار در آزمایشگاه میکروب‌شناسی باید به آن توجه شود تا از انتشار آلودگی جلوگیری به عمل آید. این نکات به صورت هشدارهای ایمنی، بهداشتی و زیست محیطی به شرح زیر اعلام می‌گردد:

### a هشدارهای ایمنی

۱- استفاده از روپوش سفید آزمایشگاه، دستکش و در صورت لزوم عینک، ماسک و ... ضروری است. لباس‌های خود را روی جا لباسی قرار داده و از گذاشتن آن روی میز آزمایشگاه خود داری شود. (شکل‌های ۱-۱ تا ۱-۴)



شکل ۱-۲



شکل ۱-۱

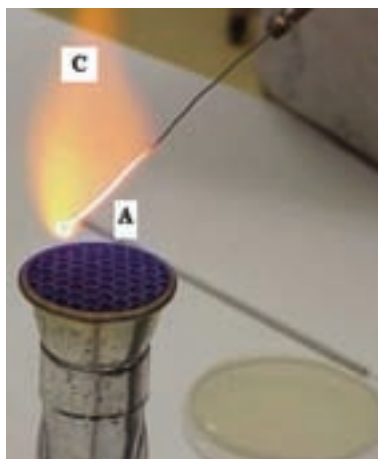


شکل ۱-۴



شکل ۱-۳

۲- هنگام سترون کردن سوزن کشت در روی شعله باید توجه داشت که ممکن است میکروارگانیسم‌ها در اثر جریان حرارت شعله، انتشار یابند، لذا با حرکت دادن تدریجی سوزن از قسمت پایین شعله (قسمت A) به قسمت گرم آن (قسمت C) از این پدیده جلوگیری می‌شود. (شکل ۱-۵)



شکل ۱-۵

۳- سرم‌ها، آنتی سرم‌ها، معرف‌ها و محلول‌های مورد استفاده ممکن است آلوده، سمی و یا سرطان‌زا باشند. باید احتیاط لازم در کاربرد آن‌ها رعایت شود. (شکل‌های ۱-۶ تا ۱-۱۱)



شکل ۱-۸



شکل ۱-۷



شکل ۱-۶



شکل ۱-۱۱



شکل ۱-۱۰



شکل ۱-۹

۴- مکیدن مایعات آلوده با پیت بوسیله دهان ممنوع است برای این منظور باید از پمپ یا سرنگ مخصوص استفاده شود.



شکل ۱-۱۴



شکل ۱-۱۳



شکل ۱-۱۲

- ۵- در استفاده صحیح از پیت ، سرنگ و سوزن کشت باید سعی و دقت شود. (شکل های ۱-۱۲ تا ۱-۱۴)
- ۶- در صورتی که کشت های میکروبی به طور تصادفی به زمین ریخته شود نباید خم شد و آن ها را جمع کرد، زیرا عوامل آلوده کننده به صورت ذرات معلق در هوا پراکنده می شوند و در اثر تنفس باعث آلودگی و بیماری می گردند. در این گونه موارد باید پس از چند دقیقه مقداری محلول ضد عفونی کننده قوی روی کشت ها ریخت تا میزان آلودگی کاهش یابد و پس از مدتی می توان محل آلوده شده را تمیز کرد.
- ۷- چنانچه انجام آزمایش به انتشار ذرات ریز معلق در هوا و یا هاگ قارچ ها در محیط منجر شود، باید در اتاق و فضای محفوظ و ایمن این آزمایش را انجام داد. لازم است درب ظروف حاوی کشت قارچ را با نوار چسب محکم ببندید تا از انتشار هاگ جلوگیری به عمل آید.
- ۸- در محل خروج هوا، بوسیله هواکش های آزمایشگاه، صافی نصب شود.
- ۹- در هنگام استفاده از سانتریفوژ و مخلوط کردن مواد نهایت دقت انجام شود.
- ۱۰- در هنگام حوادث ناگهانی مانند بریده شدن انگشتان دست، شکستن پلیت (پتری دیش) و... فوراً به مسئول آزمایشگاه اطلاع دهید.
- ۱۱- قبل از ترک آزمایشگاه دقت کنید که شیر های آب و گاز بسته باشد.

## a هشدارهای بهداشتی

۱- در آزمایشگاه از خوردن و آشامیدن خودداری نمائید.

۲- دستان خود را مرتب با آب و صابون و مواد ضد عفونی کننده شستشو دهید. قلم، کاغذ و انگشتان خود را در محل

آزمایشگاه به داخل دهان خود نبرید و برای چسباندن بر چسب‌ها از آب دهان استفاده نکنید. (شکل های ۱-۱۵ و ۱-۱۶)



شکل ۱-۱۶



شکل ۱-۱۵

۳- در تمیز نگه داشتن لوازم آزمایشگاه کوشا باشید. میزهای کار و سطوحی که بر روی آنها آزمایش صورت می‌گیرد باید مرتباً شسته شده و با مواد ضد عفونی کننده سترون شوند (الکل ۷۰ درجه، فنل ۵۰٪ و ...). (شکل های ۱-۱۷ و ۱-۱۸)

۴- نمونه‌های وارد شده به آزمایشگاه حاوی تعداد و انواع نامشخصی از میکروارگانیسم‌ها هستند که باید خطر آنها را بالقوه در نظر گرفت، لذا برای دریافت نمونه، بهتر است محل جداگانه‌ای در نظر گرفته شود. این محل می‌تواند قسمتی از اتاق آزمایشگاه باشد که به قدر کافی روشن است و نیز وسایل مورد استفاده در آن از جنس قابل شستشو و تمیز کردن باشند. در صورتی که ظروف محتوی نمونه نشت کند باید پس از سترون کردن آن‌ها را دور انداخت.



شکل ۱-۱۷

- ۵- کلیه پتری دیش ها و ظروف کشت باید قبل از آزمایش سترون شوند و ظروف حاوی کشت میکروارگانیزم ها باید به طور روشن و واضح بر چسب گذاری شود و اگر بعد از کشت دادن در پلیت ها بخار آب جمع شود ، در حمل و نقل آن ها باید کمال دقت مبذول شود زیرا یک منبع آلودگی بالقوه می باشد.
- ۶- برای حمل مواد دورانداختنی و ظروف مصرف شده ، حتماً باید از سینی مخصوص استفاده شود. ظروف و محتویات آلوده آن باید قبل از شستن سترون گردد (دقت شود درب این ظروف قبل از ورود به اتوکلاو کمی شل باشد).
- ۷- از ورود بی رویه و مکرر افراد به داخل آزمایشگاه جلوگیری شود ، افرادی که دارای آلودگی های شدید در نواحی دست و صورت هستند نباید در انجام آزمایشات میکروب شناسی شرکت کنند زیرا امکان آلودگی متقابل وجود دارد.
- ۸- بعد از اتمام کار ، لوازم مورد استفاده را در جای خود قرار داده و میز مورد استفاده خود را ضد عفونی کنید ، سپس دستهای خود را با آب و صابون و مواد ضد عفونی کننده شستشو دهید.

### a هشدارهای زیست محیطی



شکل ۱۸-۱

- ۱- هیچگاه محیط کشت حاوی میکروارگانیزم زنده را داخل دستشویی نریزید.
- ۲- از انتشار میکروب ها به خارج از آزمایشگاه جلوگیری کنید.
- ۳- کلیه مواد مصرف شده را در ظروف مخصوص بسته بندی کرده و به خارج از آزمایشگاه انتقال دهید. همچنین از برچسب حاوی اطلاعات داخل بسته ها نیز استفاده کنید.
- ۴- با دقت در انجام آزمایشات از مصرف بی رویه مواد خودداری نمایید.

### فکر کنید

۱. چرا در آزمایشگاه میکروبیولوژی رعایت قوانین و مقررات بهداشتی ، ایمنی و زیست محیطی ضروری است؟
۲. چنانچه کشت های میکروبی به صورت تصادفی به زمین ریخته شود چگونه عمل می کنید؟
۳. مواد دورریختنی و ظروف مصرف شده پس از پایان آزمایش چگونه معدوم می گردند؟ آیا می توان محیط کشت حاوی میکروارگانیزم های زنده را داخل دستشویی ریخت؟
۴. برای سترون سازی سوزن کشت چگونه عمل می کنید؟
- ۵- زمان کار آزمایشگاه تمام شده است، چه اموری را قبل از ترک آزمایشگاه باید انجام دهید؟

## دستگاه‌ها، لوازم و تجهیزات آزمایشگاه میکروبیولوژی

آزمایشگاه میکروب‌شناسی دارای تجهیزات و دستگاه‌های زیر می‌باشد:

**۱- هودهای بیولوژیک<sup>۱</sup>** (یا کابینت‌های کاملاً بسته که در آزمایشگاه وجود دارد): برای حفظ و کنترل شرایط سترون کلیه کشت‌های میکروبی و آزمایشات مربوط در زیر هودهای بیولوژیک انجام می‌شود. (شکل‌های ۱-۱۹ تا ۱-۲۱)



شکل ۱-۲۱



شکل ۱-۲۰



شکل ۱-۱۹

## ۲- لامپ‌های ماوراء بنفش<sup>۲</sup> (جهت کاهش آلودگی محیط):

از لامپ ماوراء بنفش فقط در زمانی استفاده می‌شود که کسی در محل حضور نداشته باشد. مواد شیمیایی و بیولوژیکی حساس به اشعه و کلیه نمونه‌های مورد آزمایش باید قبل از روشن شدن چراغ در جایی قرار داده شوند که تحت تأثیر تابش مستقیم قرار نگیرند. (شکل ۱-۲۲)



شکل ۱-۲۲



۱ - Biologic Hood (laminar air Flow Cabinet)  
۲ - Ultra Videt (U.V)

### ۳- اتوکلاو:

دستگاهی است که از آن جهت سترون کردن محیط های کشت و محلول های مقاوم به حرارت استفاده می شود و مانند هر دستگاه آزمایشگاهی می تواند دارای ابعاد، اندازه و ظرفیت های مختلف باشد. (شکل های ۱-۲۳ تا ۱-۲۷)



شکل ۱-۲۳

**شرایط سترون کردن با اتوکلاو:** دستگاه با فشار ۱۵ psi (پوند بر اینچ مربع یا  $10^5$  نیوتن بر هر متر مربع)، درجه حرارت  $121^{\circ}\text{C}$  و زمان ۱۵-۲۰ دقیقه، کلیه موجودات زنده را از بین می برد و جسم را سترون می کند.

**توجه کنید** 

این شرایط برای سترون کردن نمونه هایی با بار میکروبی معمولی و طبیعی است. در صورت بالا بودن بار میکروبی فشار و زمان سترون کردن افزایش می یابد.

**رعایت کنید** 

آب دستگاه کنترل شده و در صورت لزوم متناسب با ظرفیت دستگاه، آب مقطر در آن ریخته شود. حداکثر آب دستگاه باید به اندازه ای باشد که ظروف (حتی با در نظر گرفتن جوشیدن آب) خارج از آب باشند.

**هشدار** 

آب معمولی به دلیل دارا بودن املاح و ایجاد رسوب در دستگاه ضمن آسیب رساندن به دستگاه می تواند موجب انفجار گردد.



a در هنگام انتقال فلاسک‌های حاوی محیط‌های کشت میکروبی یا محلول‌های مورد نظر به داخل دستگاه، لازم است از پر کردن بیش از حد ظروف و فلاسک‌ها اجتناب شود. حد اکثر حجم اشغال شده باید یک سوم حجم ظرف باشد در غیر این صورت به دلیل جوشیدن محلول یا محیط کشت ضمن سترون شدن، محتویات سرریز خواهد شد.

a توجه شود که درب دستگاه به طور کامل بسته شده باشد.

a در این مرحله لازم است شیر خروج هوا تا انتها باز گردد تا ضمن خروج هوا از داخل مخزن بخار آب تشکیل شده جایگزین آن گردد (نفوذ حرارتی و قدرت سترون کنندگی بخار آب بیشتر از هوای گرم می‌باشد).  
a دستگاه را روشن کرده و ترموستات آن را روی حداکثر قرار دهید.

a شیر مربوط به خروج هوا را ببندید تا بخار آب در دستگاه جمع شود و فشار آن افزایش یابد. محاسبه زمان سترون کردن از لحظه‌ای است که فشار دستگاه به ۱۵ psi رسیده باشد (در صورتی که هوای مخزن کاملاً تخلیه شده باشد).

a با اتمام کار دستگاه، برای باز کردن اتوکلاو لازم است شیر خروج هوا را تا زمانی که فشار به صفر کاهش یابد، بسته نگه داشت. چنانچه موادی که سترون می‌شوند حاوی مایعات نباشند می‌توان برای کاهش دادن سریع فشار، شیر خروج هوا را باز کرد. اما اگر در مخزن اتوکلاو، مایعات وجود داشته باشند، چنین کاهش فشاری باعث جوش آمدن آن‌ها در ظروف خود شده و پنبه سر درب آن‌ها را خیس کرده و آن را به خارج پرتاب می‌کند. از این رو در مواقعی که مایعات سترون می‌شوند همیشه لازم است فشار را به تدریج کاهش دهیم.

a پس از آنکه فشار سنج نشان داد که هیچگونه فشار مربوط به بخار آب وجود ندارد می‌توان درب اتوکلاو را باز نموده و مواد و وسایل را خارج نمود سپس دستگاه را خاموش و از برق جدا می‌کنیم.





## فکر کنید

- ۱- چرا جهت سترون نمودن محیط‌های کشت میکروبی بجای هوای گرم از بخار آب گرم استفاده می شود؟
- ۲- دلیل عدم استفاده از آب معمولی در اتوکلاو را بیان کنید؟
- ۳- چنانچه موادی که در داخل اتوکلاو سترون می شوند مایع نباشند، جهت کاهش سریع فشار در خاتمه سترون سازی چگونه عمل می شود؟

## مقایسه کنید

در تصاویر زیر چند نمونه دستگاه اتوکلاو نشان داده شده است. دستگاه اتوکلاو آزمایشگاه هنرستان خود را با این نمونه ها مقایسه کنید.



شکل ۲۵-۱



شکل ۲۴-۱



شکل ۲۷-۱



شکل ۲۶-۱

## ۴- گرمخانه (اینکوباتور):

گرمخانه دستگاهی است که از آن جهت تأمین دمای لازم برای رشد میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود. (شکل‌های ۱-۲۸ تا ۱-۳۲)

انواع گرمخانه‌ها عبارتند از:

- a گرمخانه معمولی
- a گرمخانه بی‌هوایی
- a گرمخانه یخچال‌دار.

### رعایت کنید

در هنگام کار با دستگاه گرمخانه (اینکوباتور):

a ابتدا دمای مورد نظر (متناسب با نوع میکروارگانیسم و دمای لازم برای رشد آن) با استفاده از ترموستات دستگاه تنظیم می‌شود.

a دمای داخل گرمخانه نباید از حد  $\pm 1^{\circ}\text{C}$  تغییر نماید. برای تنظیم و تعادل دمای مورد نظر لازم است دو بار در روز، یکبار صبح در ابتدای شروع کار که درب دستگاه، ساعت‌ها بسته بوده است و یک مرتبه در پایان کار به کمک یک دماسنج دقیق دمای گرمخانه کنترل گردد.

a گرمخانه باید به صورتی پر شود که فاصله بین ردیف پتری دیش‌ها از یکدیگر و نیز دیواره و کف دستگاه حدود ۲/۵ سانتی‌متر باشد تا هوا به خوبی در آن جریان داشته و دمای دستگاه یکنواخت باشد.

a برای جلوگیری از تجمع رطوبت زیاد در دستگاه در پیچه مخصوص کاهش رطوبت را در حالت باز بگذارید. (میزان رطوبت داخل دستگاه باید به نحوی باشد که باعث جمع شدن قطرات آب بر روی ظروف و گسترش سریع کشت نگردد، از طرف دیگر ظروف حاوی آگار بیش از ۱۵ درصد از رطوبت خود را در مدت ۴۸ ساعت از دست ندهد).

a برای جلوگیری از تغییرات دمای دستگاه لازم است از باز کردن زیاد درب آن خودداری شود.

a برای جلوگیری از تجمع آلودگی‌ها در دستگاه، طی فاصله‌های زمانی معین با مواد ضد عفونی کننده، فضای داخل دستگاه تمیز و ضد عفونی شود.

## مقایسه کنید



در تصاویر زیر چند نمونه دستگاه گرمخانه نشان داده شده است. گرمخانه آزمایشگاه خود را با آن‌ها مقایسه کنید.



شکل ۱-۲۹



شکل ۱-۲۸



شکل ۱-۳۱



شکل ۱-۳۰



شکل ۱-۳۲

## ۵- حمام آب گرم:

حمام آب گرم دستگاهی است که از آن جهت تهیه محیط‌های کشت، ثابت نگه داشتن دمای محلول‌ها و محیط کشت و به ویژه برای مذاب نگه داشتن محیط‌های جامد استفاده می‌شود. (شکل‌های ۱-۳۳ تا ۱-۳۵)

### رعایت کنید

نکات مهم در استفاده از حمام آب گرم:

a در شروع کار از وجود آب به میزان کافی در دستگاه مطمئن شوید (اگر دستگاه خشک کار کند احتمال سوختن و آسیب دیدن آن وجود دارد). آب مصرف شده باید آب مقطر باشد تا از ایجاد رسوب در دستگاه که می‌تواند باعث خوردگی و عدم تبادل حرارتی مناسب گردد جلوگیری شود. سطح حداقل آب در اغلب دستگاه‌ها مشخص شده است.

a دمای دستگاه به کمک ترموستات تنظیم می‌شود. برای ثبات دمای دستگاه درب آن را ببندید جهت اطمینان از صحت دمای دستگاه از یک دماسنج دیگر استفاده کنید.

a در صورت عدم استفاده از دستگاه برای مدت طولانی بهتر است جهت جلوگیری از خرابی زود هنگام دستگاه آب داخل آن را تخلیه کنید.

### مقایسه کنید

در تصاویر زیر به چند نمونه دستگاه حمام آب گرم اشاره شده است. حمام آب گرم آزمایشگاه هنرستان خود را با آن‌ها مقایسه کنید.



شکل ۱-۳۵



شکل ۱-۳۴



شکل ۱-۳۳

## ۶- یخچال :

برای خنک نگه داشتن نمونه‌ها و محیط‌های کشت از دمای  $4^{\circ}\text{C}$  استفاده می‌شود. دمای یخچال باید به گونه‌ای تنظیم شود که از انجماد محیط‌های کشت، آنتی‌سرم‌ها و نمونه‌ها جلوگیری شود. (شکل‌های ۱-۳۶ تا ۱-۳۹)

### رعایت کنید

لازم است از قرار دادن چیزهای متفرقه در یخچال آزمایشگاه میکروبی‌شناسی جلوگیری شود.

### مقایسه کنید

چند نمونه یخچال آزمایشگاهی در تصاویر زیر نشان داده شده است. یخچال آزمایشگاه هنرستان خود را با آن‌ها مقایسه کنید.



شکل ۱-۳۷



شکل ۱-۳۶



شکل ۱-۳۹



شکل ۱-۳۸

## ۷- ترازو:

در آزمایشگاه از ترازوهای مختلف جهت توزین نمونه‌ها، پودر محیط‌های کشت و مواد شیمیایی تشکیل دهنده محلول‌ها و محیط‌های کشت استفاده می‌شود. در آزمایشگاه حداقل یک ترازو با ظرفیت ۲۵۰۰ گرم و حساسیت یک دهم گرم مورد نیاز است. (شکل ۱-۴۰)

### رعایت کنید

a اگر از ترازوهای دیجیتالی در آزمایشگاه استفاده می‌شود، جهت جلوگیری از کم شدن حساسیت و دقت ترازو از توزین اجسام سنگین با آن خودداری شود.

a لازم است ترازوها دور از جریان هوا و رفت و آمد و به صورت تراز قرار گیرند تا میزان خطای دستگاه کاهش یابد.



شکل ۱-۴۰

## آزمایش کنید: توزین نمونه‌های آزمایشی



### مواد و لوازم مورد نیاز:

a از طرف مسئول آزمایشگاه در اختیار هنر آموز قرار می‌گیرد.

### روش انجام آزمایش:

چند نمونه از موادی که مسئول آزمایشگاه در اختیار شما می‌گذارد، را وزن کنید. هر نمونه را چند بار وزن کنید. جرم آن‌ها را در جدول زیر یادداشت کنید. میزان حساسیت دستگاه را در نظر بگیرید و از درستی آن اطمینان حاصل نمایید. برای این منظور از جرم‌های استاندارد موجود در آزمایشگاه استفاده نمایید.

### گزارش کار



| نام جسم توزین شده |  |  |  |                    |
|-------------------|--|--|--|--------------------|
|                   |  |  |  | جرم جسم            |
|                   |  |  |  | جرم جسم<br>تکرار ۲ |
|                   |  |  |  | جرم جسم<br>تکرار ۳ |

.....

.....

.....

.....

.....

.....

### نتیجه گیری



.....

.....

.....



## ۸- تکان دهنده مکانیکی:

تکان دهنده مکانیکی برای یکنواخت کردن محتوای ظروف به کار می‌رود و کار آن شکستن مجموعه های میکروبی در لوله های آزمایش و ارلن است. برای این منظور دستگاه باید در جهت پایین و بالا حداقل به مدت ۷ ثانیه کار کند. (شکل های ۴۱-۱ و ۴۲-۱)



شکل ۴۲-۱



شکل ۴۱-۱

## ۹- میکروسکوپ:

امروزه انواع مختلفی از میکروسکوپ ها جهت شناسایی و بررسی میکروارگانیسم ها به کار می رود مانند میکروسکوپ نوری، میکروسکوپ فلورسانس، میکروسکوپ الکترونی، میکروسکوپ فاز متضاد و غیره. متداول ترین میکروسکوپی که در آزمایشگاه های میکروبیولوژی به کار می رود میکروسکوپ نوری است که در آن جسم با نور مرئی دیده می شود. (شکل ۴۳-۱)

**قسمت های مختلف میکروسکوپ:** یک میکروسکوپ به طور عمده از عدسی های چشمی<sup>۲</sup> و عدسی های شیئی<sup>۳</sup> با بزرگ نمایی های مختلف (که حاصل ضرب درشت نمایی آن ها تعیین کننده بزرگ نمایی کل می باشد) تشکیل شده است.

عدسی های چشمی بر دو نوع می باشند. عدسی چشمی معمولی<sup>۴</sup> برای استفاده با عدسی های شیئی اکروماتیک<sup>۵</sup> یا برون رنگ و عدسی های هویژنیان<sup>۶</sup> برای استفاده با عدسی های شیئی رنگی اپوکروماتیک<sup>۷</sup> یا رنگی مورد نظر می باشند. لوله ثابت کننده عدسی چشمی<sup>۸</sup> به طول معمول ۶۰ میلیمتر است که در میکروسکوپ دو چشمی از طریق یک قسمت متحرک قابل تنظیم به لوله محل قرار گرفتن عدسی های چشمی مربوط می گردد. از طریق لوله بدنه میکروسکوپ عدسی چشمی با صفحه گردان عدسی های شیئی ارتباط می یابد. عدسی های شیئی معمولاً در چهار اندازه مختلف شامل: عدسی شیئی با بزرگ نمایی کم (۳/۲×) و (۱۰×)، عدسی شیئی با



۱- Mechanical Shaker

۲- Ocular

۳- Objective

۴- Regular

۵- Achromatic

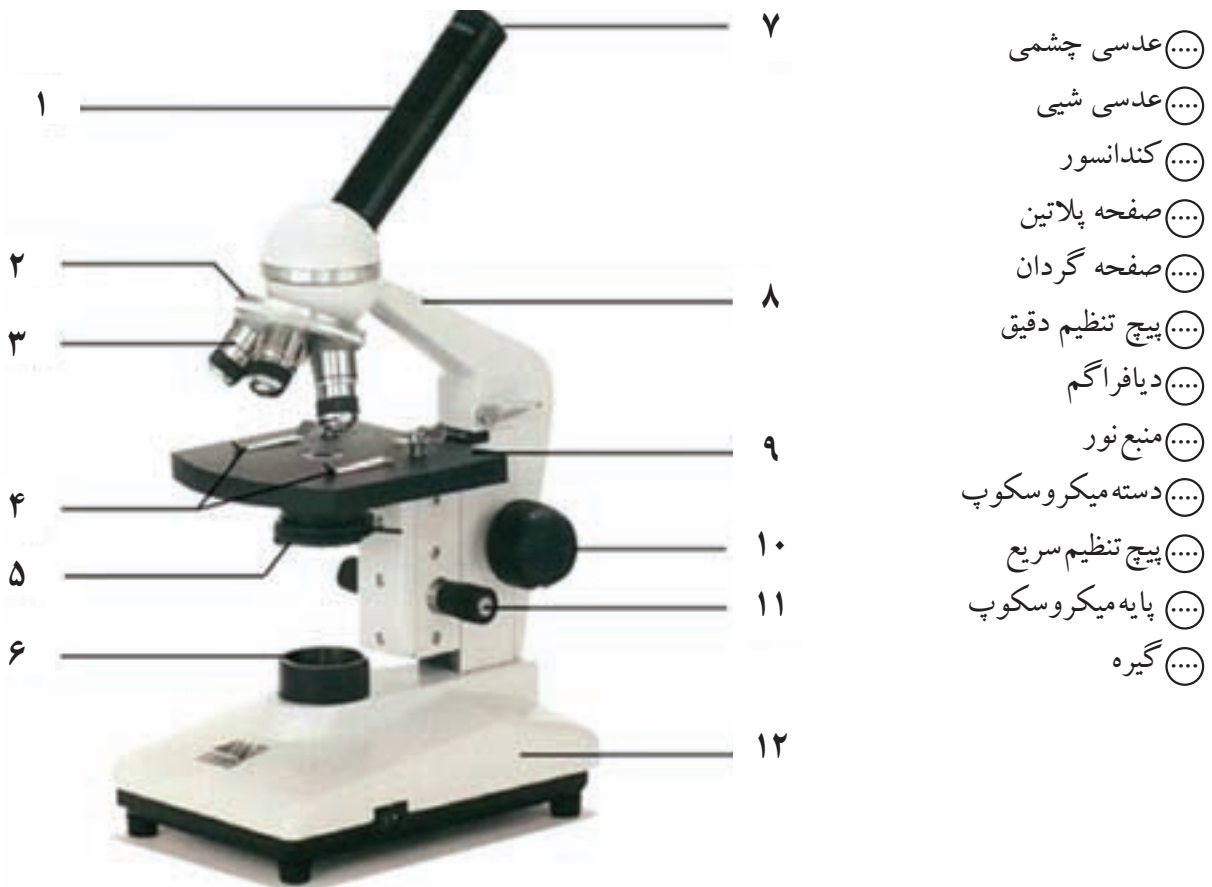
۶- Huygenian

۷- Apo achromatic

۸- fixed dry tube

بزرگ نمایی زیاد (×۴۰) و عدسی شیئی شناور در روغن<sup>۱</sup> (×۱۰۰) می باشد. در زیر صفحه گردان عدسی های شیئی، صفحه مربع شکل با گیره مخصوص برای قرار دادن لام (اسلاید) وجود دارد. این صفحه را می توان با پیچ های تنظیم مربوط در قسمت های جلو و عقب به حرکت در آورد. برای بدست آوردن تصویر از لام (اسلاید) روی صفحه میکروسکوپ و تنظیم فاصله عدسی های شیئی با اسلاید، پیچ های تنظیم بزرگ و کوچک در روی بازو (بدنه) میکروسکوپ تعبیه شده است. که با استفاده از آن ها می توان فاصله مورد نظر را در حد کم و زیاد تغییر داد. در زیر صفحه جای لام (اسلاید) به ترتیب کندانسور، دیافراگم، آئینه و لامپ میکروسکوپ قرار دارد. نور متصاعد شده از منبع نور (لامپ) و آئینه پس از گذشتن از دیافراگم و کندانسور به شیئی مورد نظر در سطح لام و سپس عدسی های شیئی و چشمی انعکاس می یابد. تمام قسمت های یک میکروسکوپ بر روی پایه مخصوص قرار دارد.

### تکمیل کنید:



- ۱- عدسی چشمی
- ۲- عدسی شیئی
- ۳- کندانسور
- ۴- صفحه پلاتین
- ۵- صفحه گردان
- ۶- پیچ تنظیم دقیق
- ۷- دیافراگم
- ۸- منبع نور
- ۹- دسته میکروسکوپ
- ۱۰- پیچ تنظیم سریع
- ۱۱- پایه میکروسکوپ
- ۱۲- گیره

شکل ۱-۴۳



۱- Oil - Immersion

## رعایت کنید

در هنگام استفاده از میکروسکوپ:

- a تهیه دقیق و مناسب نمونه، بررسی میکروسکوپی را ساده تر می کند.
- a متناسب با نوع نمونه تهیه شده و دقت مورد نظر باید لنز مناسب انتخاب شود.
- a تنظیم نور دستگاه نیز متناسب با نمونه تهیه شده انجام می شود. برای مثال در نمونه هایی که رنگ آمیزی نشده و یا کم رنگ هستند باید از نور کم استفاده شود و در نمونه های ضخیم و پررنگ باید از حداکثر شدت نور استفاده شود.
- a برای بدست آوردن تصویر مناسب از لام، عدسی های شیئی باید هر کدام در فواصل معینی قرار داشته باشند. میزان فاصله ( $\times 3/2$ ) با لام برابر با ۲۳ میلیمتر، عدسی شیئی ( $\times 10$ ) با لام معادل ۵ میلیمتر، عدسی شیئی ( $\times 40$ ) با لام برابر با  $1/2 - 1$  میلیمتر، عدسی شیئی ( $\times 100$ ) برابر با  $0/9$  میلیمتر است.
- a در استفاده از عدسی ( $\times 100$ ) حتماً لازم است برای ایجاد تصویر واضح از یک قطره روغن ایمرسیون استفاده شود.
- a جهت تنظیم میکروسکوپ ابتدا لام را روی صفحه میکروسکوپ داخل گیره آن قرار داده سپس با پیچ های حرکت دهنده لام را طوری روی صفحه میزان کنید که شعاع نور از وسط گسترش (نمونه) بگذرد. در بررسی با عدسی ( $\times 100$ ) بعد از انتخاب عدسی و تنظیم شدت نور، صفحه میکروسکوپ را به کمک پیچ تنظیم ماکرو بالا آورده و با روغن روی لام تماس دهید. سپس با پیچ تنظیم میکرو جهت ایجاد تصویر واضح کوشش کنید.

## هشدار

هرگز قبل از دیدن تصویر واضح با پیچ های حرکت دهنده لام کار نکنید زیرا ممکن است موجب آسیب دیدن عدسی و نمونه گردد.



## آزمایش کنید: کار با میکروسکوپ

هدف از انجام آزمایش زیر آشنایی با میکروسکوپ و مشاهده میکروارگانیسم‌ها از طریق میکروسکوپ جهت شناخت بیشتر میکروسکوپ و میکروارگانیسم‌ها می‌باشد.

### مواد و لوازم مورد نیاز:

a محیط کشت دارای مخمر

a لوله آزمایش

a آنس حلقوی

a میکروسکوپ

a لام (اسلاید) و لامل

a روغن سدر (روغن ایمرسیون)

### روش انجام آزمایش:

- 1- میکروسکوپ را به نحوی روی میز کارتان قرار دهید که بازوی خمیده آن در نزدیک‌ترین فاصله ممکن با شما باشد. قبل از مشاهده میکروسکوپی، تمام قسمت‌های آن را مورد بررسی قرار دهید تا از طرز کار صحیح آن مطمئن گردید و چنانچه در هر مورد سوالی داشتید با مسئول آزمایشگاه تماس بگیرید.
- 2- با اتصال دو شاخه و چرخاندن کلید، لامپ میکروسکوپ را روشن نمایید.
- 3- با استفاده از آنس، یکی از کلنی (پرگنه) های مخمر را از محیط کشت مورد نظر جدا نموده و در لوله آزمایش دارای یک میلی لیتر آب سترون قرار دهید. سپس با کمک آنس از مخمرهای داخل محلول آب برداشته و به آرامی روی لام شیشه‌ای منتقل نموده و روی آن یک لامل قرار دهید. اکنون اسلاید تهیه شده فوق را روی صفحه مربع شکل در محل مخصوص خود گذارده و مورد مشاهده میکروسکوپی قرار دهید.
- 4- شکل و اندازه سلول مخمر را با استفاده از عدسی شیئی با بزرگ نمایی (×۱۰) مورد مشاهده قرار دهید.
- 5- با چرخاندن صفحه گردان عدسی های شیئی عدسی شیئی، با بزرگ نمایی (×۴۰) را روی اسلاید مورد نظر تنظیم و مشاهده نمایید. به همین طریق بعد از افزودن یک قطره روغن سدر روی لامل و تنظیم عدسی شیئی (×۱۰۰) و مشاهده از طریق عدسی چشمی به تدریج عدسی شیئی را تا کسب تصویر مشخص به سطح لامل و لام نزدیک نمایید.
- 6- در صورتی که وقت اجازه دهد می‌توانید جهت کسب آموزش و تجربه بیشتر با استفاده از یک رشته مو و یک قطعه کاغذ صافی مطابق آنچه در مورد نمونه اسلاید مخمر انجام دادید، نمونه‌های ذکر شده را مورد مشاهده میکروسکوپی قرار دهید.



## فکر کنید

- ۱- آیا با مشاهده میکروارگانیسم‌ها در زیر میکروسکوپ می‌توان به زنده یا مرده بودن آن‌ها پی برد؟
- ۲- برای مشاهده تصویر مناسب از جسم، عدسی‌های شیی باید در فواصل معینی قرار بگیرند، دلیل این امر به نظر شما چیست؟
- ۳- نقش روغن ایمرسیون (سدر) در مشاهده تصویر با عدسی شیئی (×۱۰۰) چیست؟

## ۱۰- آون<sup>۱</sup> (فور)

آون دستگاهی است که جهت سترون نمودن وسایل، ابزارها و ظروف مقاوم در برابر حرارت استفاده می‌شود. (شکل‌های ۱-۴۴ تا ۱-۴۶)

## رعایت کنید

وسایل و ظروفی که باید سترون شوند کاملاً تمیز و خشک بوده و قبل از قرار گرفتن در دستگاه، مجاری باز آن‌ها با فویل، پنبه و ... پوشانده شود تا پس از خارج شدن از دستگاه تا لحظه استفاده با آلودگی‌های محیط اطراف در تماس نبوده و غیرسترون نگردند.

## مقایسه کنید

آون آزمایشگاه محل تحصیل خود را با نمونه‌های کتاب مقایسه کنید.



شکل ۱-۴۶



شکل ۱-۴۵



شکل ۱-۴۴



۱- Oven

## ۱۱- دستگاه پرگنه شمار

پرگنه شمار برای شمارش دقیق و آسان پرگنه‌ها به کار می‌رود. در اکثر این دستگاه‌ها یک ذره‌بین، صفحه شطرنجی، شماره‌انداز و منبع نوری جهت روشن کردن سطح پلیت برای بررسی دقیق و راحت تر پلیت‌ها تعبیه شده است. (شکل‌های ۱-۴۷ تا ۱-۵۰)

### رعایت کنید

در زمان استفاده از دستگاه :

- a مشخصات پشت پلیت‌ها پس از ثبت آن‌ها در دفتر کار باید به طور کامل پاک گردد.
  - a پلیت را در جایگاه مخصوص روی دستگاه قرار داده و توجه شود گاهی به دلیل رنگ خاص محیط کشت و نوع پرگنه‌های آن بررسی پلیت از سمت پشت پلیت راحت تر است.
  - a با استفاده از درشت‌نمایی ذره‌بین، روشنایی ایجاد شده با منبع نوری و با کمک گرفتن از خطوط صفحه شطرنجی به شمارش ردیف به ردیف پرگنه‌ها اقدام کنید.
  - a به منظور جلوگیری از گسترش آلودگی بر روی دستگاه بعد از هر بار استفاده، با مواد ضدعفونی‌کننده مناسب مانند الکل ۷۰ درجه، سطح دستگاه را تمیز و ضدعفونی کنید.
- تصاویر چند نمونه دستگاه پرگنه شمار نشان داده شده است.



شکل ۱-۴۸



شکل ۱-۴۷



شکل ۱-۵۰



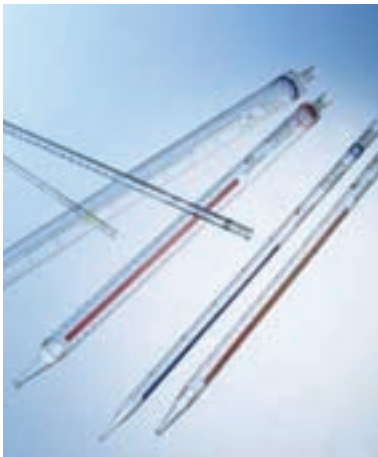
شکل ۱-۴۹

## معرفی برخی از ظروف آزمایشگاه میکروبیولوژی

### ۱- پیپت:

**الف) پیپت شیر:** این پیپت‌ها فقط به منظور آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی و برای برداشت و انتقال ۰/۰۱ میلی لیتر شیر، تنظیم و درجه بندی شده است و قطر نوک آن مشابه پیپت‌های معمولی مدرج است و با اولین خط ۴۰ تا ۶۰ میلی متر فاصله دارد. (شکل‌های ۱-۵۱ تا ۱-۵۳)

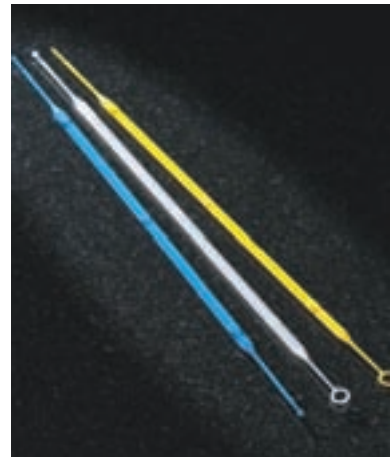
**ب) پیپت‌های شیشه‌ای و پلاستیکی:** این پیپت‌ها از مواد غیر سمی تهیه شده‌اند و دارای دیواره مستقیم و نوک گرد می‌باشند و برای استفاده در آزمایشگاه میکروب‌شناسی به کار می‌روند. حداکثر حجمی را که در مدت ۴ ثانیه خارج می‌کند مقدار یک میلی لیتر با اختلاف  $\pm 0.035$  میلی لیتر است. این در حالی است که آخرین قطره شیر رقیق نشده موجود در پیپت رامی‌توانید با دمیدن در پیپت خارج کنید.



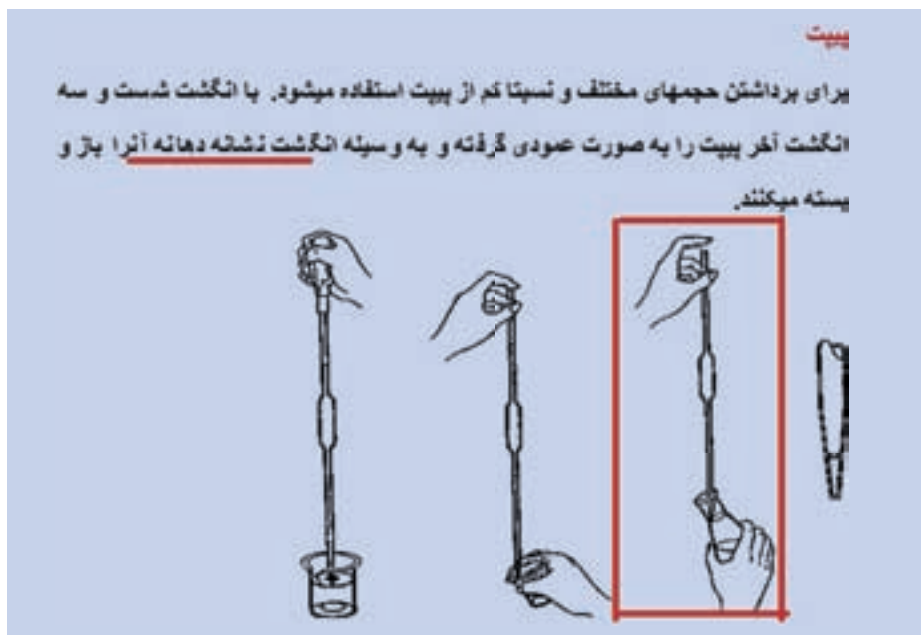
شکل ۱-۵۳



شکل ۱-۵۲



شکل ۱-۵۱





## استفاده از پیپت

موفقیت در آزمایشاتی که با پیپت انجام می‌شود، به روش صحیح آن بستگی دارد. در گذشته، محلول میکروبی را با دهان به داخل پیپت می‌کشیدند ولی به لحاظ خطر آشکار آن امروزه برای این منظور از مکندہ‌های دستی استفاده می‌شود. مسئول آزمایشگاه شما، روش استفاده از آن را به شما یاد خواهد داد.

### رعایت کنید

a وقتی می‌خواهید یک پیپت را از جا پیپت در آورید این کار را طوری انجام دهید که انگشتان شما، انتهای پیپت‌های دیگر را آلوده نکنند. با تکان دادن جا پیپتی، یک پیپت از بقیه جدا شده و می‌توان آنرا براحتی بیرون آورد.

a پس از برداشتن پیپت در پوش جا پیپتی را بگذارید تا بقیه پیپت‌ها سترون بمانند.

a بدنه پیپت را با انگشتان نگیرید و قبل و بعد از استفاده، آن را روی میز نگذارید و در طی کاربرد آن سترون نگهدارید و روی میز و یا خودتان را با آن آلوده نکنید.

a برای کشیدن محلول به پیپت، همیشه از یک مکندہ مکانیکی استفاده کنید.

a اگر سه پیپت نیاز است، آن‌ها را یکی یکی از جا پیپتی در آورید.

a وقتی کارتان با پیپت تمام شد آن را در داخل ظرف حاوی مایع ضد عفونی کننده قرار دهید. در انتهای

کار، پیپت‌های قابل شستشو را شسته، سترون کنید و پیپت‌های یک بار مصرف را دور بریزید.

## آزمایش کنید : جابه‌جایی مایعات و اندازه‌گیری آن‌ها با استفاده از پیپت



### مواد و لوازم مورد نیاز :

a ترازوی آزمایشگاه

a آب بهداشتی

a پیپت در حجم‌های مختلف

a بشر

### روش انجام آزمایش :

ظرف محتوی آب بهداشتی را در اختیار بگیرید و با انواع پیپت به برداشت حجم معینی از آب اقدام کنید. برای توزین آن از انواع بشر که قبلاً وزن آن را بدست آورده‌اید و از ترازوی آزمایشگاه بهره ببرید.



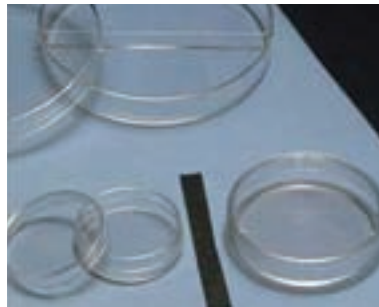
## محل نگهداری پیپت :

در مواقعی که پیپت مورد استفاده قرار نمی گیرد آن را از طرف نوک به داخل یک محلول مناسب پاک کننده‌ی بدون کف غوطه‌ور سازید و در مواقع استفاده سطح خارجی و دهانه پیپت را کاملاً با آب شستشو داده تا از ماده پاک کننده عاری شود. جهت سترون نمودن پیپت‌ها آن‌ها را در داخل ظرف استوانه‌ای شکل ویژه‌ای که از فولاد ضد زنگ یا آلومینیوم شکل تشکیل شده است قرار می‌دهند (ظرف مخصوص پیپت).

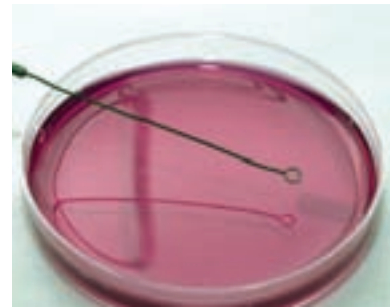
**۲- پتری دیش (پلیت) :** این ظروف از جنس شیشه‌ای و یا پلاستیک می‌باشند. دارای کف صاف بوده و قطر آنها بین ۸ تا ۱۰ سانتیمتر می‌باشند. عمق این ظروف اکثراً ۱۲ میلیمتر است. (شکل‌های ۱-۵۴ تا ۱-۵۶)



شکل ۱-۵۶



شکل ۱-۵۵



شکل ۱-۵۴

**۳- سرنگ فلزی :** به منظور انتقال حجم معینی از مایعات مورد استفاده قرار می‌گیرد. این سرنگ‌ها دارای یک میله فلزی حساس نیمه خود کار و یک پیستون مناسب از جنس فولاد ضد زنگ می‌باشند.

**۴- ارلن تحت خلاء (شکل ۱-۵۹)، ارلن مایر (شکل ۱-۵۷)، بشر (شکل ۱-۶۰)، بالن ژوژه (شکل ۱-۶۱)، استوانه مدرج (شکل ۱-۶۲)، میله شیشه‌ای، سوزن کشت (شکل ۱-۵۸)، لام و لامل از جمله وسایل مورد استفاده در آزمایشگاه میکروبیولوژی می‌باشند.**



شکل ۱-۵۹



شکل ۱-۵۸



شکل ۱-۵۷



شکل ۱-۶۲



شکل ۱-۶۱



شکل ۱-۶۰



## فکر کنید

- ۱- چرا تنظیم رطوبت داخل گرمخانه (اینکوباتور) اهمیت دارد؟ افزایش یا کاهش رطوبت داخل گرمخانه چه اثری بر رشد سلول‌های باکتری دارد؟
- ۲- در بیشتر آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی ترجیحا از پلیت پلاستیکی برای کشت استفاده می‌شود، دلیل این کار به نظر شما چیست؟

## A واژه‌های فصل اول

دستور العمل‌های بهداشتی

دستور العمل‌های ایمنی

میکروبیولوژی

هودهای بیولوژیک

اتو کلاو

گرمخانه (اینکوباتور)

حمام آب گرم

یخچال

ترازو

تکان دهنده مکانیکی

میکروسکوپ

آون (فور)

دستگاه پرگنه شمار

پیپت

پتری دیش

سرنگ فلزی

ارلن

بشر

بالن ژوژه

استوانه مدرج

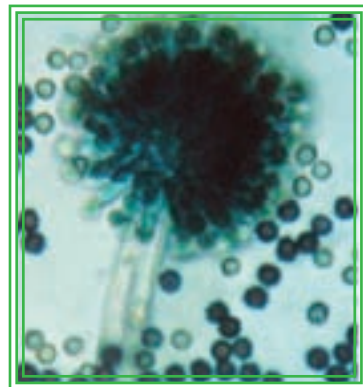
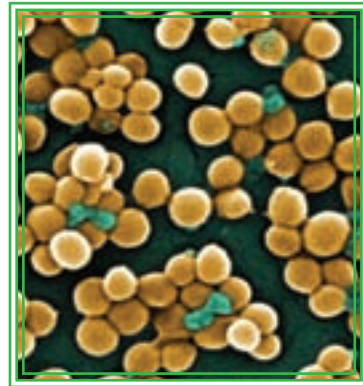
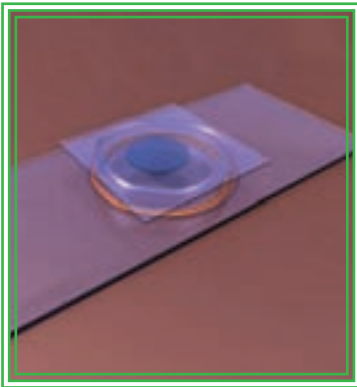
میله شیشه‌ای

لام

لامل

# فصل دوم

## باکتری‌ها



باکتری‌ها متنوع‌ترین و مهم‌ترین نوع میکروارگانیسم‌ها تلقی می‌شوند. تعدادی از آن‌ها برای انسان و حیوانات بیماریزا بوده اما به طور کلی بدون فعالیت آن‌ها حیات بر روی زمین مختل می‌گردد. دانشمندان به طور یقین اطمینان دارند موجودات زنده تکامل یافته یا یوکاریوت<sup>۱</sup>ها، از موجودات زنده باکتری مانند به وجود آمده‌اند. با توجه به اینکه باکتری‌ها ساختار ساده‌ای داشته و می‌توان به آسانی آن‌ها را در شرایط آزمایشگاهی کشت داد، لذا، میکروبی‌شناسان مطالعات وسیعی درباره شکل سلول، ساختمان آن‌ها، و نیز فرآیندهای حیاتی سلول باکتری انجام داده‌اند.

## شکل باکتری‌ها<sup>۱</sup>

باکتری‌ها از نظر شکل ظاهری به سه گروه تقسیم می‌شوند:

### ۱ باسیلی یا استوانه‌ای شکل<sup>۲</sup> (شکل‌های ۱-۲ و ۲-۲)



شکل ۲-۲



شکل ۲-۱

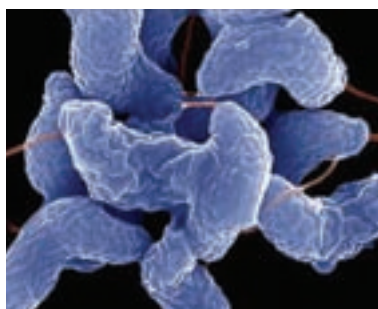
این باکتری‌ها میله‌ای شکل بوده و بسته به نوع آنها بسیار مختلف و در اندازه‌های گوناگون می‌باشند.

۱-۱ باسیلی با انتهای گرد. مانند: اشرشیا کلی<sup>۴</sup>، ائروباکتر اروجنس<sup>۵</sup>

۱-۲ باسیلی با انتهای صاف. مانند: باسیلوس مگاتریوم<sup>۶</sup>

۱-۳ برخی از باکتری‌های باسیل مانند، به صورت خمیده می‌باشند (شکل ۲-۳)، به این باکتری‌ها ویبریون<sup>۷</sup>

می‌گویند. مانند: ویبریو کوما<sup>۸</sup>



شکل ۲-۳



- ۱- Eukaryote
- ۲- Shape of Bacteria
- ۳- Cylindrical
- ۴- Escherchia coli
- ۵- Aerobacter orogenes
- ۶- Bacillus megaterium
- ۷- Vibriion
- ۸- Vibrio

## ۲ مارپیچی<sup>۱</sup>:

a این باکتری‌ها مارپیچی شکل می‌باشند و اندازه آن‌ها متفاوت است. مانند: تریپونما پالیدوم<sup>۲</sup> (شکل ۲-۴)



شکل ۲-۴

## ۳ کوکسی یا کروی شکل<sup>۳</sup>:

a این باکتری‌ها کاملاً گرد یا بیضی شکل هستند و به طور متوسط اندازه آن‌ها ۰/۵ تا ۱ میکرون است. مانند: میکروکوکوس<sup>۴</sup> (شکل‌های ۲-۵ تا ۲-۹)



شکل ۲-۵

اکثر باکتری‌ها با تقسیم دو تایی و تشکیل دو سلول جدا از هم که فیزیولوژی مستقل دارند، تولید مثل می‌کنند، ولی گاهی این سلول‌ها پس از تقسیم از هم جدا نمی‌شوند و بدین نحو با مجتمع شدن، آرایش ویژه‌ای می‌یابند. باکتری‌هایی که در یک سطح تقسیم می‌شوند تشکیل زنجیره‌های کوتاه یا بلند می‌دهند چنانچه تقسیم سلولی در جهات مختلف انجام شود اشکال خوشه‌ای شکل، مکعبی شکل و... بدست می‌آید به عنوان مثال می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

### a استافیلوکوک<sup>۵</sup>

این باکتری‌ها به صورت خوشه‌ای (تجمعی) در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند مانند استافیلوکوکوس اورئوس<sup>۶</sup> (شکل ۲-۶)



شکل ۲-۶

### a استرپتوکوک

این باکتری‌ها به صورت زنجیره‌ای شکل در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند مانند: استرپتوکوکوس فکالیس<sup>۸</sup> (شکل ۲-۷)



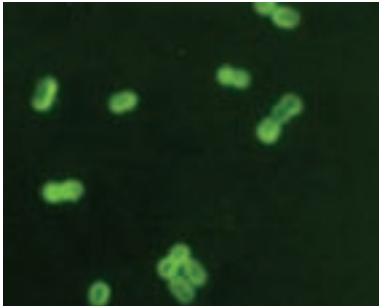
شکل ۲-۷



- ۱- Spirillum
- ۲- Treponema pallidum
- ۳- Coccus
- ۴- Micrococcus
- ۵- Staphylococcus
- ۶- Staphylococcus aureus
- ۷- Streptococci
- ۸- Streptococcus faecalis

### a دیپلوکوک<sup>۱</sup>

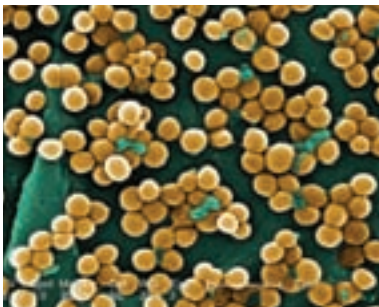
این باکتری‌ها به طور عمده به شکل دوتایی در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند، مانند: دیپلوکوک نمونیا<sup>۲</sup> (شکل ۸-۲)



شکل ۸-۲

### a سارسینا<sup>۳</sup>

این باکتری‌ها به صورت ۸ تایی و حتی بیشتر از این تعداد مشاهده می‌شوند مانند سارسینا لوت<sup>۴</sup> (شکل ۹-۲)



شکل ۹-۲

### a گسترش<sup>۵</sup>:

برای تهیه گسترش یا تهیه لام ابتدا با لوپ استریل یک قطره آب مقطر یا سرم فیزیولوژی را روی لام قرار می‌دهیم. سپس لوپ را به کمک شعله استریل کرده و صبر می‌کنیم تا سرد شود. بعداً به کمک آن یک کلنی از میکروارگانیسم را برداشته و روی لام پهن می‌کنیم. باید توجه داشت که گسترش یا اسمیر نباید خیلی متراکم یا بسیار نازک باشد. کلیه این اعمال را در مجاورت شعله انجام می‌دهیم.

### مشاهده میکروسکوپی باکتری‌ها

بررسی میکروسکوپی باکتری‌ها به حالت زنده از دو نظر حائز اهمیت است:

۱) فعالیت‌هایی از قبیل حرکت باکتری‌ها و تقسیم دوتایی را نشان می‌دهد.

۲) اندازه و شکل سلول باکتری در حالت طبیعی بررسی می‌گردد.

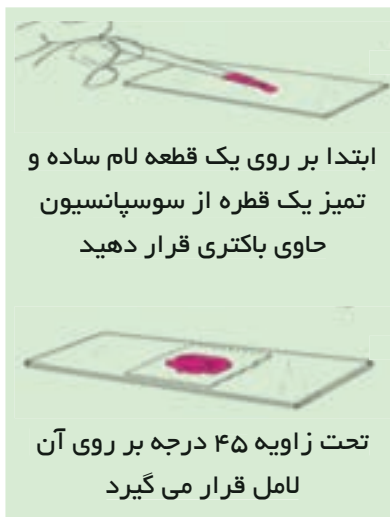
a مشاهده میکروسکوپی باکتری‌ها به صورت زنده یا رنگ

آمیزی نشده که به دو صورت انجام می‌گردد:

### الف - روش گسترش مرطوب<sup>۶</sup>

در این روش ابتدا بر روی یک قطعه لام ساده و تمیز یک قطره از سوسپانسیون حاوی باکتری قرار داده و تحت زاویه ۴۵ درجه بر

روی آن لامل قرار می‌گیرد. سپس گسترش را در زیر میکروسکوپ با عدسی ۱۰× و سپس ۴۰× مشاهده می‌کنند. (شکل ۱۰-۲)



شکل ۱۰-۲



- ۱- Diplococci
- ۲- Diplococ nemonia
- ۳- Sarcinae
- ۴- Sarcinae lotea
- ۵- Smear
- ۶- Wet Mount





## آزمایش کنید: تهیه گسترش مرطوب

### مواد و لوازم مورد نیاز:

- a میکروسکوپ
- a سوسپانسیون حاوی باکتری
- a قطره چکان

- a پنس
- a لام و لامل

### روش انجام آزمایش:

با کمک قطره چکان یک قطره از سوسپانسیون حاوی باکتری را روی لام قرار داده و سپس تحت زاویه ۴۵ درجه یک لامل روی آن قرار دهید. اکنون گسترش را با عدسی های شیئی ۱۰× و ۴۰× مشاهده کنید و از مشاهدات خود گزارش تهیه کرده و شکل بکشید.

### گزارش کار

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

### نتیجه گیری

.....

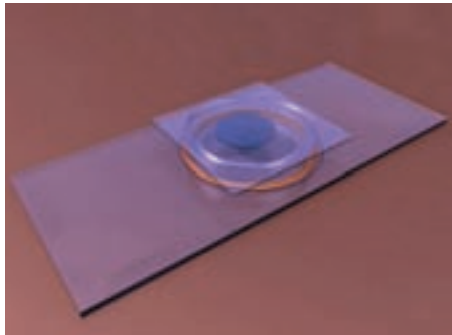
.....

.....

## ب - روش قطره معلق<sup>۱</sup>

در این روش از لام تو گود استفاده می‌شود. ابتدا مقداری وازلین در اطراف حفره وسط لام قرار می‌دهند، سپس یک قطره کوچک از سوسپانسیون حاوی باکتری را روی محل مورد نظر (روی لامل) قرار داده و لامل را به صورت معکوس روی لام می‌گذارند. در زیر میکروسکوپ ابتدا با عدسی  $\times 10$  و سپس با عدسی  $\times 40$  نمونه را بررسی می‌نمایند. (شکل ۲-۱۱)

با این روش می‌توان حرکت باکتری‌ها (مربوط به اندام حرکتی تاژک) را مشاهده کرد.



شکل ۲-۱۱

### رعایت کنید

در مشاهده باکتری‌ها به صورت زنده:

<sup>a</sup> بر روی سوسپانسیون باکتری‌ها حتماً لامل قرار دهید.

<sup>a</sup> گسترش باکتری را فقط تا عدسی  $\times 10$  و  $\times 40$  میکروسکوپ بررسی کنید و ترجیحاً از عدسی  $\times 100$  استفاده نکنید.

<sup>a</sup> چون در این روش باکتری‌ها رنگ آمیزی نشده‌اند و ضریب شکستی معادل شیشه دارند برای رؤیت آن‌ها باید نور میکروسکوپ را کم کرد (با بستن دیافراگم و پایین کشیدن کندانسور).

<sup>a</sup> چون در این روش نمونه مورد مطالعه محدود می‌باشد قبل از خشک شدن نمونه باید آن را بررسی کرد.





## تعریف کشت

هنگامی که باکتری‌ها در شرایط مناسب قرار گیرند، قادر به رشد و تکثیر می‌باشند. در این صورت اصطلاحاً گفته می‌شود که باکتری کشت داده شده است.

### لوله‌های آزمایش کوچک (با قطر ۱۶ میلی متر)

این لوله‌های آزمایش برای محیط‌های کشت مایع و برای محیط‌های کشتی که در آن‌ها کشت عمقی داده می‌شود و برای محیط‌های کشت خوابیده، به کار می‌روند. اگر لوله‌های آزمایش، تمیز و بدون گرد و غبار باشند نیازی به شستن ندارند. با این همه، در صورت نیاز، آن‌ها را در داخل آب گرم و دترجنت<sup>۱</sup> غوطه‌ور نموده، با برس شست و شوی لوله آزمایش، داخل آن‌ها را تمیز کنید. سپس دوباره آب کشتی کنید. بار اول با آب معمولی و بار دوم، با آب مقطر در حالت غوطه‌ور تا بقایای دترجنت از آن‌ها زدوده شود. سپس لوله‌ها را در جا لوله‌ای یا سبد توری به طور سر و ته قرار دهید تا خشک شوند و هرگز آن‌ها را با حوله خشک نکنید.

### آزمایش کنید: تهیه محیط کشت در لوله‌های آزمایش کوچک (با قطر ۱۶ میلی متر)



#### مواد و لوازم مورد نیاز:

- a محیط‌های کشت پودری
- a شعله‌گاز یا هیتر
- a آب مقطر سترون
- a لوله آزمایش

a ترازو

a بشر

a هم زن شیشه‌ای یا میله‌ای

#### روش انجام آزمایش:

۱- آب مورد نیاز را تهیه کنید. حجم مورد نیاز برای هر لوله آزمایش، بر اساس مقادیر زیر در نظر گرفته شود:

- |                                      |               |
|--------------------------------------|---------------|
| الف- محیط‌های کشت ذخیره              | ۱۲ میلی لیتر  |
| ب- محیط‌های کشت عمقی                 | ۶ میلی لیتر   |
| ج- محیط‌های کشت خوابیده <sup>۲</sup> | ۴ میلی لیتر   |
| د- محیط‌های کشت آب گوشت <sup>۳</sup> | ۵ میلی لیتر   |
| و- محیط‌های کشت برای تخمیر           | ۵-۷ میلی لیتر |

۲- از روی برچسب بسته محیط کشت، مقدار پودر مورد نیاز برای ۱۰۰۰ میلی لیتر آب را مشخص کرده و سپس، مقدار مورد نیاز خود را محاسبه کنید، آن‌گاه، آن را وزن کرده داخل آب بشر بریزید. اگر محیط کشت حاوی آگار نباشد، نیازی به حرارت ندارد.



۱ - detergent

۲ - slants

۳ - Nutrient broth





- ۱- دلیل افزودن آب به محیط کشت حاوی آگار بعد از حرارت چیست؟
- ۲- در صورت باقی ماندن دترجنت در لوله آزمایش، چه آسیبی به محیط‌های کشت وارد می‌سازد؟

## تنظیم pH

گرچه محیط‌های کشت پودری شکل شامل مواد بافری هستند و pH را در یک محدوده مورد نظر ثابت نگه می‌دارد ولی ممکن است pH هر سری تولید شده با آنچه در برچسب نوشته شده است فرق داشته باشد. قبل از اینکه محیط کشت به داخل لوله آزمایش ریخته شود، pH آن اندازه‌گیری و در صورت لزوم تنظیم می‌شود. اگر pH متری در اختیار دارید که قبلاً استاندارد شده است برای تنظیم pH به کار برید و در صورت نیاز به تنظیم pH، از اسید هیدروکلریک (HCL) و هیدروکسید سدیم (NaOH) استفاده کنید.

## آزمایش کنید: تنظیم pH در محیط کشت



### مواد و لوازم مورد نیاز:

a بشر حاوی محیط کشت

a اسید و باز (شیشه‌های دارای قطره چکان و حاوی اسید و باز یک نرمال و یک دهم نرمال، HCL

(NaOH)

a هم زن شیشه‌ای میله‌ای

a کاغذ pH متر یا دستگاه pH متر

### روش انجام آزمایش:

- ۱- کاغذ pH متر را در داخل محیط کشت فرو ببرید.
- ۲- اگر pH خیلی بالا باشد با افزودن یک یا دو قطره HCL می‌توان آن را پایین آورد. برای تغییرات بالا، از HCL یک نرمال استفاده کنید. اگر به تغییر pH اندکی نیاز است، از HCL ۰/۱ نرمال استفاده کنید. با یک میله به هم زن شیشه‌ای، قطرات اضافه شده به محیط را مخلوط کنید.
- ۳- اگر pH خیلی پایین باشد یک قطره NaOH اضافه کنید تا pH افزایش یابد برای تغییر اندک pH از NaOH یک دهم نرمال و برای تغییرات وسیع از NaOH یک نرمال بهره بگیرید.
- ۴- سپس محیط کشت را در لوله‌های مناسب تقسیم کرده، سر لوله‌های درپیچ دار را با درب مخصوص ببندید و اگر لوله‌ها در پیچ دار نباشند با گذاشتن پنبه در آنها را ببندید و بعد سترون کنید.
- ۵- لوله‌های آزمایش حاوی محیط‌های کشت که آماده شده‌اند را با دستگاه اتوکلاو سترون نمایید. رعایت نکات ایمنی و ضروری کار با دستگاه در استفاده از اتوکلاو بسیار مهم است.



## محیط‌های کشت خوابیده

سپس خون را به آن اضافه کرده و به هم می‌زنند، اگر دمای محیط کشت بیشتر باشد خون لیز می‌شود و رنگ محیط کشت کدر و نامناسب می‌گردد. پس از افزودن خون به محیط کشت پایه، بلافاصله باید آن را در پلیت‌های سترون تقسیم بندی کرده تا به طور یکنواخت سفت شود و سپس آن‌ها را وارونه در یخچال قرار می‌دهند.



علت وارانه قرار دادن پلیت‌ها درون یخچال چیست؟

## روش‌های کشت باکتری

برای به دست آوردن کلونی باکتری‌ها به صورت تک و ایزوله باید آنها را بر روی محیط کشت، کشت نماییم. برای انجام این کار روش‌های مختلفی وجود دارد که متداول‌ترین آن کشت باکتری به روش خطی است.

برای درست کردن این فرم، باید پس از خارج نمودن لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت از اتوکلاو، آن‌ها را به طور مایل بخوابانید.

## محیط‌های کشت دیگر

لوله‌های آزمایش حاوی آبگوشت، آگار عمقی، ژلاتین و غیره را باید پس از اتوکلاو کردن در وضعیت ایستاده قرار دهید تا در دمای اتاق خنک شوند.

## نگهداری محیط‌های کشت

اگر محیط‌های کشت بلافاصله به کار نمی‌روند، باید در یک مکان خنک نگهداری شوند. این محیط‌ها چنانچه برای مدت طولانی در دمای اتاق بمانند آب خود را از دست داده، خشک می‌شوند. آن‌ها را می‌توان در دمای ۴ درجه یخچال، ماه‌ها سالم نگه داشت.

## طرز تهیه محیط کشت آگار خون دار:

محیط کشت آگار خون دار، محیط کشتی است که در آزمایشگاه‌ها کاربرد فراوان دارد زیرا علاوه بر دارا بودن مواد معمول لازم، حاوی خون است و اکثر باکتری‌ها قادرند در آن رشد کنند. برای تهیه آن، خون گوسفند ضد انعقادار به میزان ۳٪ تا ۵٪ به محیط کشت پایه (نوترینت آگار<sup>۱</sup>، بلادآگار بیس<sup>۲</sup>، تریپتون سوی آگار<sup>۳</sup>، بروسلا آگار<sup>۴</sup>) اضافه می‌شود. برای افزودن خون به محیط کشت پایه، (پس از اتمام اتوکلاو محیط کشت پایه) آن را تا حدود ۴۲ درجه سانتی‌گراد خنک نمایند.



- ۱- Nutrient agar
- ۲- Blood agar base
- ۳- Tryptone soy agar
- ۴- Brucella agar





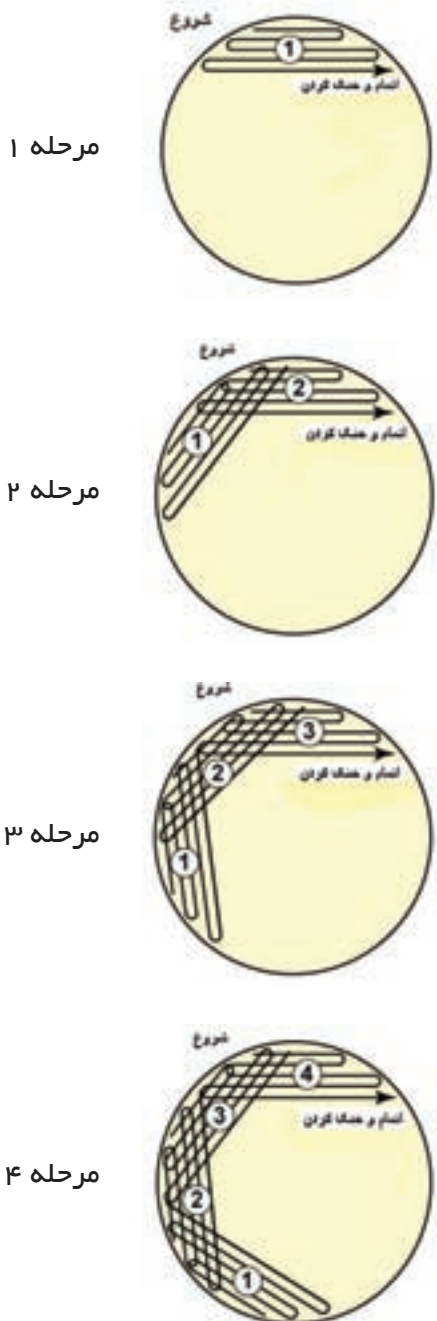
## آزمایش کنید: کشت باکتری به روش خطی (شکل ۱۲-۲)

### مواد و لوازم مورد نیاز:

- a چراغ الکی یا گازی
- a آنس حلقوی

- a محیط کشت نوترینت آگار
- a محیط کشت حاوی کشت باکتری

### روش انجام آزمایش:



مرحله ۱

مرحله ۲

مرحله ۳

مرحله ۴

۱- روی شعله چراغ الکی یا گازی آنس حلقوی را سترون کنید.

۲- سپس مقداری از نمونه باکتری مورد نظر را با آنس حلقوی بردارید، آنس حلقوی را در قسمت بالای محیط کشت که قبلاً آماده کردید، بکشید. باید دقت کرد که محیط کشت خراشیده نشود (مرحله ۱).

۳- دوباره روی شعله چراغ الکی یا گازی آنس حلقوی را سترون کنید، بعد از خنک کردن آنس حلقوی، از خطوط انتهایی مرحله ۱، خطوطی تقریباً عمودی بر آن بکشید (مرحله ۲).

۴- دوباره روی شعله چراغ الکی یا گازی آنس حلقوی را سترون کنید، بعد از خنک کردن آنس حلقوی، از خطوط انتهایی مرحله ۲، خطوطی تقریباً عمودی بر آن بکشید (مرحله ۳).

۵- دوباره روی شعله چراغ الکی یا گازی آنس حلقوی را سترون کنید، بعد از خنک کردن آنس حلقوی، از خطوط انتهایی مرحله ۳، خطوطی تقریباً عمودی بر آن بکشید (مرحله ۴).

۶- دوباره روی شعله چراغ الکی یا گازی آنس حلقوی را سترون کنید، بعد از خنک کردن آنس حلقوی، از خطوط انتهایی مرحله ۴، خطوطی عمودی بر آن بکشید (مرحله ۵).

۷- در این مرحله احتیاج به سترون کردن آنس حلقوی نیست، فقط از خطوط انتهایی مرحله ۵، خطوطی عمود بر آن و به سمت مرکز پلیت بکشید (مرحله ۶).

شکل ۱۲-۲

## توجه کنید

خطوط مرحله آخر با مرحله ۱ بر خورد نکند و همچنین خطوط هر مرحله با مرحله بعدی در تماس باشد.  
۸- پلیت فوق را به مدت ۲۴ ساعت در گرم خانه در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  قرار دهید، تا باکتری بر روی آن رشد نماید.

## گزارش کار

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## نتیجه گیری

.....

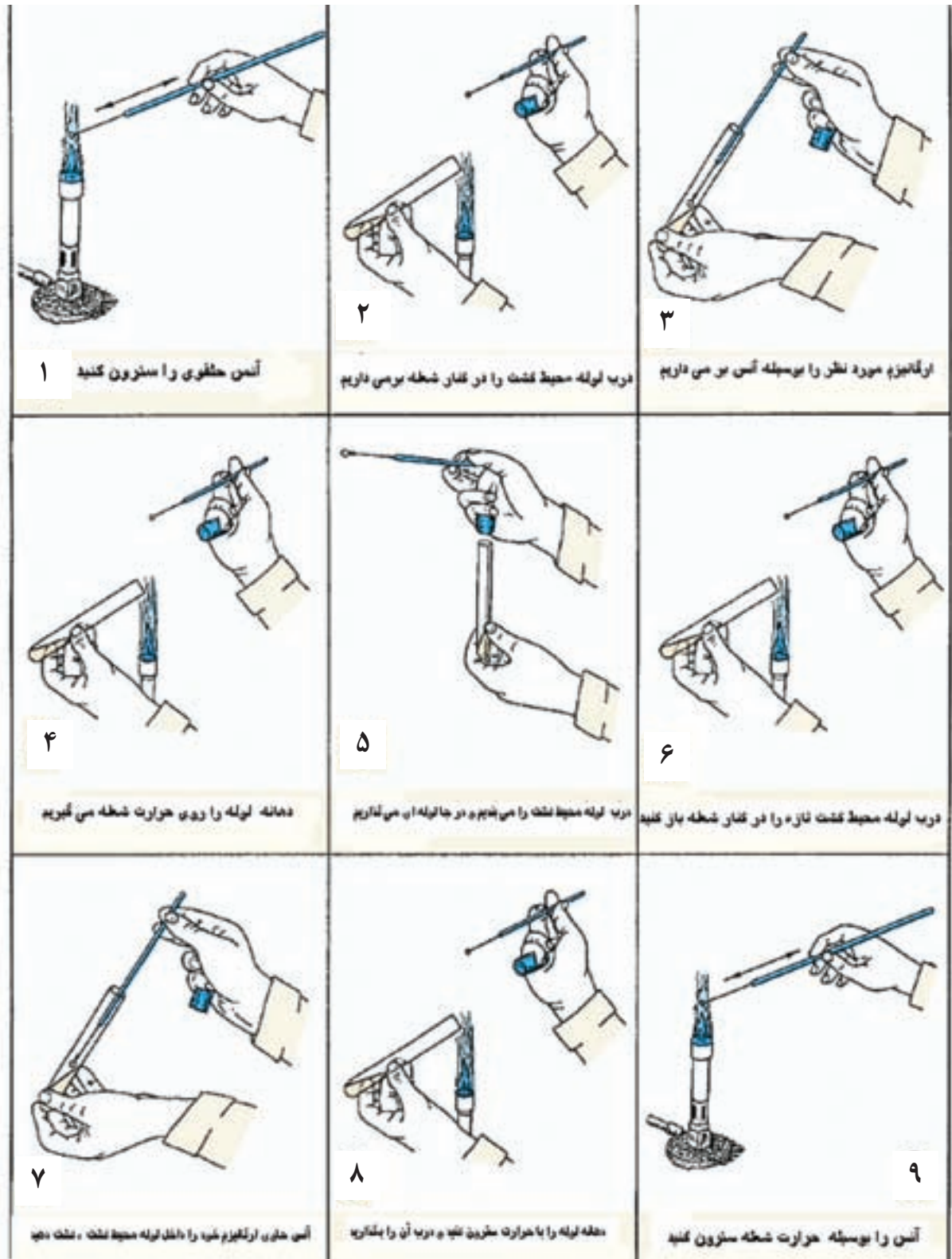
.....

.....

## فکر کنید

- ۱- علت سترون نمودن آنس پس از پایان هر مرحله چیست ؟
- ۲- چرا در مرحله انتهایی آنس را سترون نمی کنند؟
- ۳- دلیل تماس خطوط هر مرحله با مرحله بعدی چیست ؟

شکل های زیر به ترتیب ، طرز کشت در لوله را نمایش می دهد. (شکل ۱۳-۲)



شکل ۱۳-۲

## حرکت باکتریها<sup>۱</sup>



شکل ۱۴-۲

به طور کلی اعتقاد بر این است که باکتری ها دارای دو نوع حرکت می باشند :

a حرکت براونی<sup>۲</sup>

a حرکت حیاتی<sup>۳</sup>

حرکت براونی : عبارت از به جلو و عقب کشیده شدن سلول باکتری در یک محلول می باشد این حرکت در اثر به تحریک در آوردن ذرات مولکولی بسیار ریز معلق در محلول حاصل می گردد.

حرکت حیاتی : حرکت حیاتی با اندام حرکتی مخصوص به نام تاژک<sup>۴</sup> (شکل ۱۴-۲) در باکتری ها انجام می گیرد. برای مشخص نمودن وجود تاژک در اندام باکتری از محیط کشت های ویژه حرکت که در لوله آزمایش به طریق بدون شیب<sup>۵</sup> تهیه می شود استفاده می گردد. باکتری های تاژک دار به علت حرکت توسط تاژک هایشان ، در محیط کشت تغییراتی بوجود آورده و سبب غیر یکنواخت شدن محیط می گردند در صورتی که سایر باکتری ها قادر به انجام چنین عملی نبوده و در یک خط در سطح محیط رشد می کنند .

**آزمایش کنید: مشاهده حرکت باکتری در زیر میکروسکوپ**



**مواد و لوازم مورد نیاز :**

a محیط کشت نوترینت آگار دارای کشت ۲۴ ساعته باسیلوس سابتیلیس در لوله ( بدون شیب )

a محیط کشت نوترینت آگار دارای کشت ۲۴ ساعته استافیلوکوکوس اورئوس ( بدون شیب )

a حداقل دولوله دارای محیط کشت های ویژه حرکت


a محیط های کشت ویژه حرکت باکتری ها: ( محیط های کشت تست حرکت<sup>۶</sup> و ژلاتین<sup>۷</sup> )



- ۱- The Motility of Bacteria
- ۲- Brownian Move-ment
- ۳- Vital Move-ment
- ۴- Flagella
- ۵- Stab
- ۶- Motility test Medium
- ۷- Gelatin

## روش انجام آزمایش:

- ۱- توسط آنس سترون مقداری از پرگنه باسیلوس سابتیلیس را از محیط کشت نوترینت آگار برداشته و در یک لوله دارای محیط کشت ویژه حرکت باکتری ها (ژلاتین و یا محیط کشت تست حرکت) به طور عمقی کشت دهید. به همین صورت پرگنه استافیلوکوکوس اورئوس را کشت داده و سپس لوله های دارای محیط کشت داده شده را برای مدت ۴۸ ساعت در اینکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  قرار دهید.
- ۲- پس از گذشت مدت فوق لوله های کشت داده شده را مورد بررسی قرار دهید. در محیطی که حرکت صورت گرفته باشد، در طول مسیر کشت شده تغییرات قابل توجهی حاصل گردیده و محیط از حالت یکنواخت خارج می شود. در موردی که تنها رشد باکتری و بدون حرکت آن باشد، فقط در مسیر خط کشت داده شده، پرگنه های باکتری مشاهده می شود.

گزارش کار 

.....

.....

.....

.....

.....


.....

.....

.....

.....

.....

نتیجه گیری 

نتایج بدست آمده را در جدول زیر ثبت کنید.

| میکروارگانیسم        | حرکت براونی | حرکت حیاتی |
|----------------------|-------------|------------|
| باسیلوس سابتیلیس     |             |            |
| استافیلوکوکوس اورئوس |             |            |

## فکر کنید

- ۱- آیا از شکل باکتری می توان فهمید که متحرک (تاژکدار) یا غیر متحرک است ؟
- ۲- آیا سرعت حرکت باکتری به تعداد تاژک های آن بستگی دارد ؟
- ۳- آیا روش ذکر شده در بالا را می توان به عنوان مهم ترین روش تعیین وجود یا عدم وجود تاژک به حساب آورد ؟

## روش های رنگ آمیزی باکتری ها

مشاهده بسیاری از ارگانسیم ها به وسیله میکروسکوپ نوری مشکل است ، زیرا ، آن ها نور را به مقدار زیاد جذب ، منعکس یا منکسر نمی کنند . به همین علت ، رنگ های محلول در آب یا الکل اغلب به منظور رنگ آمیزی میکروارگانسیم ها یا زمینه آن ها مورد استفاده قرار می گیرد. رنگ ها از یک بخش رنگی باردار به نام کروموفور و یک بخش مکملی آنیون یا کاتیون تشکیل شده اند. رنگ های قلیایی دارای کروموفورهای بار مثبت بوده ، در صورتی که ، رنگ های اسیدی ، کروموفورهای بار منفی دارند. قبل از اینکه باکتری ها ، رنگ آمیزی شوند ، آن ها را معمولاً تثبیت کرده یا به سطح لام می چسبانند. رنگ آمیزی یک اسمیر ممکن است شکل ، اندازه و ترتیب قرار گرفتن سلول ها را نشان دهد. در هر حال ، اطلاعات دیگری را می توان در مورد مورفولوژی و ترکیب شیمیایی باکتری ها با استفاده از روش های رنگ آمیزی افتراقی بدست آورد.

## ۱- رنگ آمیزی کریستال ویوله ( رنگ آمیزی ساده)

در این روش ، رنگ کریستال ویوله برای رنگ آمیزی سلول های باکتری به کار می رود. این روش ، اطلاعاتی را در مورد مورفولوژی ارگانسیم های رنگ آمیزی شده آشکار می سازد. افزودن کریستال ویوله به اسمیر باکتری موجب شده که دیواره سلول باکتری رنگ گیرد. سپس رنگ اضافی با آب شسته شده و بعد لام را می توان در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده کرد.

## آزمایش کنید: رنگ آمیزی ساده

### مواد و لوازم مورد نیاز :

- a میکروسکوپ نوری
- a معرف کریستال ویوله

a لام و لامل

a محیط کشت باکتری کشت شده جامد



## روش انجام آزمایش :

- ۱- یک قطره از محلول دارای باکتری را روی لام قرار دهید.
- ۲- یک لام دیگر را با زاویه ۴۵ درجه در مجاورت قطره قرار داده و آنرا در جهت طول لام اول حرکت دهید تا قطره حاوی باکتری در سطح آن پخش شود.
- ۳- سپس لام حاوی قطره پخش شده را چند بار از روی چراغ الکلی یا بنزنی عبور دهید تا عمل فیکس شدن انجام شود.
- ۴- اکنون چند قطره محلول کریستال ویوله را روی محیط فیکس شده بریزید و یک دقیقه صبر کنید.
- ۵- لام را به مدت ۵ ثانیه زیر شیر آب بگیرید و سپس آنرا در هوا خشک کنید.
- ۶- پس از خشک شدن لام، روی آن لامل قرار داده و با کمک روغن سدر و با عدسی شیئی  $\times 100$  آنرا مشاهده کنید.

## گزارش کار

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## نتیجه گیری

.....

.....

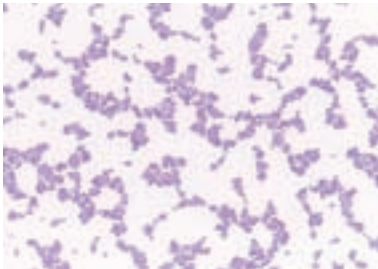
.....

## فکر کنید

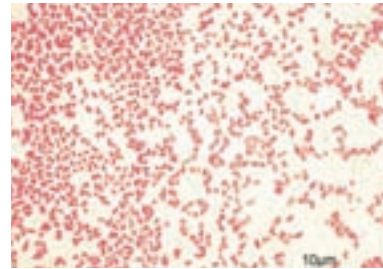
- ۱- نقش کریستال ویوله در این رنگ آمیزی چیست ؟
- ۲- امکان جایگزینی کریستال ویوله با معرف دیگری به نظر شما از لحاظ تئوری و آزمایشگاهی وجود دارد؟

## ۲- رنگ آمیزی گرم

در این روش، تقریباً تمام میکروارگانیسم‌ها به دو گروه متمایز، گرم مثبت و گرم منفی، تقسیم می‌شوند. این نوع تقسیم بندی بر اساس تفاوت در دیواره سلولی باکتری‌هاست. در این روش، رنگ اصلی یعنی رنگ پایه کریستال ویوله با گروه‌های بار منفی موجود در دیواره سلولی واکنش می‌کند. بعد از آن که، رنگ اضافی آن با آب شسته می‌شود، سلول‌ها در معرض محلول پتاسیم ید (به نام ید گرم) قرار می‌گیرند. ید با کریستال ویوله تشکیل کمپلکس غیر محلول ویوله-ید را می‌دهد که کریستال ویوله به شدت به دیواره سلولی باکتری‌ها اتصال می‌یابد. سپس، سلول‌ها را با الکل شسته تا کمپلکس ویوله-ید از سلول خارج گردد. سلول‌های گرم منفی به سرعت به علت افزودن الکل، رنگ خود را از دست می‌دهند، در صورتی که، سلول‌های گرم مثبت به بی‌رنگ شدن مقاوم هستند. بعد، رنگ اضافی با شستن آب خارج می‌گردد. سپس سلول‌ها را با رنگ دیگری به نام سافرانین<sup>۲</sup> که فقط سلول‌های گرم منفی رنگ می‌گیرند، رنگ آمیزی می‌کنند. در این روش رنگ آمیزی، سلول‌های گرم مثبت به رنگ آبی - بنفش (شکل ۲-۱۶) و سلول‌های گرم منفی به رنگ صورتی - قرمز (۲-۱۵) مشاهده می‌شوند. (شکل‌های ۱۵-۲ تا ۱۷-۲)



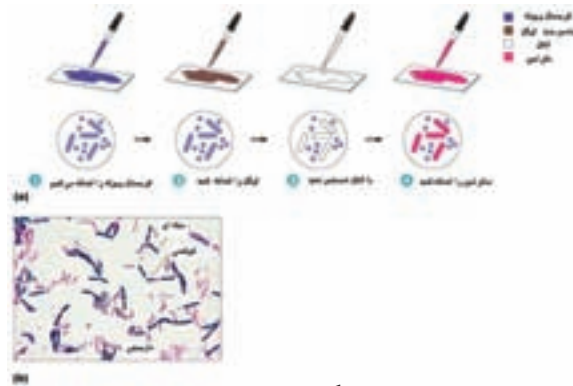
شکل ۲-۱۶ گرم مثبت



شکل ۲-۱۵ گرم منفی

### توجه کنید

چنانچه الکل به مدت طولانی بر روی سلول‌های گرم مثبت ریخته شود بی‌رنگ خواهند شد و به همین دلیل دقت زیادی باید در مورد زمان‌های به کار گرفته شده در این روش انجام شود.



شکل ۲-۱۷



۱ - Gram Staining

۲ - Saffranin





## آزمایش کنید: رنگ آمیزی گرم

### مواد و لوازم مورد نیاز:

a میکروسکوپ نوری

a معرف کریستال ویوله

a معرف پتاسیم ید (لوگل)

a معرف سافرانین

a لام و لامل

a محیط کشت باکتری های کشت شده جامد (

نوع گرام منفی و مثبت)

a الکل اتیلیک

### روش انجام آزمایش:

۱- اسمیر نازکی از کشت باکتری های مورد نظر تهیه کنید و معرف ها را به صورت زیر اضافه کنید.

۲- محلول کریستال ویوله را روی اسمیر بریزید و یک دقیقه صبر کنید.

۳- لام را به مدت ۵ ثانیه با آب شستشو دهید.

۴- پتاسیم ید را روی اسمیر ریخته و یک دقیقه صبر کنید.

۵- لام را به مدت ۵ ثانیه با آب شستشو دهید.

۶- الکل اتیلیک را به مدت ۵ ثانیه به آرامی روی آن بریزید.

۷- لام را به مدت ۵ ثانیه با آب شستشو دهید.


۸- سافرانین را روی لام بریزید و ۳۰ ثانیه صبر کنید.

۹- لام را به مدت ۵ ثانیه با آب شستشو دهید.

۱۰- صبر کنید تا لام در هوا خشک شود.

۱۱- سپس بر روی آن لامل قرار داده و با کمک روغن سدر با عدسی  $\times 100$  آن را در زیر میکروسکوپ

نوری مشاهده کنید.

گزارش کار 

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## نتیجه گیری



.....

.....

.....

.....

فکر کنید 

- ۱- نقش معرف پتاسیم ید در رنگ آمیزی گرم چیست؟ در صورتی که از رنگ آمیزی حذف شود، در نتیجه رنگ آمیزی چه اثری می گذارد؟
- ۲- نقش الکل در رنگ آمیزی گرم چیست؟
- ۳- امتیاز رنگ آمیزی گرم به رنگ آمیزی ساده چیست؟

## ۳- رنگ آمیزی کپسول

این روش، مشاهده کپسول باکتری‌ها را مقدور می‌سازد. دیواره سلولی برخی از باکتری‌ها به وسیله لایه‌ای مرکب از پلی ساکاریدها، گلیکو پروتئین‌ها یا اشتراکی از پلی ساکاریدها و پلی پتیدها تشکیل شده‌اند. این لایه را همچنین گلیکو کالیکس<sup>۲</sup> هم می‌نامند. وجود کپسول را می‌توان با استفاده از روش رنگ آمیزی که کپسول بی‌رنگ باقی می‌ماند، اثبات نمود. در این روش از حرارت استفاده نمی‌شود و اسمیر به وسیله تکنیکی بر خلاف رنگ آمیزی گرم و اسپور آماده می‌شود. در این روش، رنگ قرمز کنگو<sup>۳</sup> به کار می‌رود. این رنگ موجب رنگ آمیزی زمینه شده و کپسول یا سلول بی‌رنگ باقی می‌ماند. این امر بدان علت است که رنگ قرمز کنگو دارای بار منفی بوده و به وسیله بار منفی ساختمان سلول دفع می‌شود.

سلول رویشی با به کار بردن معرف Maneval، رنگ آمیزی می‌شود. این معرف حاوی متانول بوده که در اتصال سلول‌های باکتری به لام کمک می‌کند. رنگ فوشین نیز اجزای سلولی را رنگ می‌کند. کپسول فاقد بار است و بنابراین، این رنگ را به خود نمی‌گیرد و در نتیجه، کپسول شفاف باقی می‌ماند. به علاوه، اشتراک رنگ Maneval با قرمز کنگو موجب می‌شود که زمینه به رنگ آبی - خاکستری کمرنگ درآید. بنابراین بعد از، رنگ آمیزی، باکتری‌ها به رنگ قرمز در زمینه خاکستری - آبی کمرنگ ظاهر می‌شوند. چنانچه کپسول وجود داشته باشد به صورت مناطقی شفاف در اطراف باکتری ظاهر می‌گردد.



- ۱- Capsul  
۲- Glycocalyx  
۳- congo



## آزمایش کنید: رنگ آمیزی کپسول باکتری

### مواد و لوازم مورد نیاز:

- a میکروسکوپ نوری
- a رنگ قرمز کنگو
- a معرف Maneval

a لام و لامل

a محیط کشت باکتری کشت شده جامد (کلبسیلا

پنومونیه)

### روش انجام آزمایش:

۱- مقدار کمی از کشت باکتری را توسط لوپ در ۱٪ قرمز کنگو محلول در آب در یک انتهای لام (تمیز شده با الکل) مخلوط کنید.



### توجه کنید

هنگامی که کلبسیلا پنومونیه را با این روش، رنگ آمیزی می کنید، مواظب باشید که مقدار کافی از باکتری را بر دارید.

- ۲- با استفاده از لام دیگری که در زاویه  $45^\circ$  با لام اولی قرار دارد، مخلوط را در طول لام پخش کنید (بکشید)
- ۳- صبر کنید تا نمونه در هوا خشک شود.
- ۴- سپس، رنگ Maneval را به مدت ۳ دقیقه روی لام بریزید تا نمونه رنگ آمیزی شود.
- ۵- رنگ اضافی را خالی کنید و صبر کنید تا لام در هوا خشک شود. با دستمال کاغذی خشک نکنید.
- ۶- روغن سدر را روی لام بریزید و در زیر میکروسکوپ با عدسی  $\times 100$  مشاهده کنید.

### گزارش کار



.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....



## نتیجه گیری



.....

.....

.....

.....

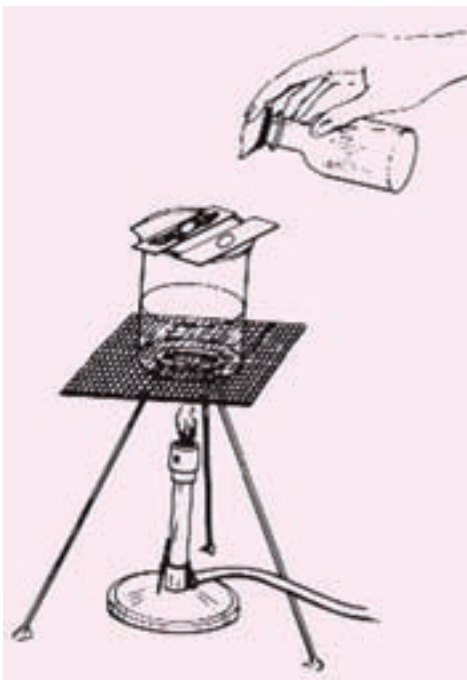
.....

## فکر کنید



۱- نقش قرمز کنگو در این رنگ آمیزی را بیان کنید.

### ۴- رنگ آمیزی اسپور



شکل ۱۸-۲

این روش ، مشاهده اجزایی به نام اندوسپور را مقدور می سازد. اسپور، ساختمان خاصی است که توسط برخی از باکتری ها تولید می شود. اسپور با استفاده از مالاشیت سبز<sup>۲</sup> و سیتوپلاسم سلول با به کار بردن سافرانین رنگ آمیزی می شود. مالاشیت سبز به سهولت به درون اسپور نفوذ نمی کند ، در صورتی که ، سلول های رویشی به سهولت رنگ آمیزی می گردند. حرارت برای افزایش قابلیت نفوذ پوشش اسپور ضروری است. سلول رویشی و قسمت های درونی اسپور با وجود پوشش ، هنگامی که در معرض مالاشیت سبز قرار می گیرند رنگ سبز را به خود می گیرند. افزودن آب موجب شده که سلول رویشی ، مالاشیت سبز را از دست داده و این رنگ وابستگی قوی به اجرای سلول رویشی دارد. در هر حال ، زمانی که اسپور رنگ آمیزی شد ، رنگ درون اسپور باقی خواهد ماند. برای مشاهده سلول رویشی ، سافرانین به آن اضافه می شود. این امر موجب شده که اسپور به رنگ سبز و سلول رویشی به رنگ قرمز درآید ( شکل ۱۸-۲ نمایشی از مراحل رنگ آمیزی اسپور را نشان می دهد).



- ۱- Staining
- ۲- malashit green



## آزمایش کنید: رنگ آمیزی اسپور باکتری

### مواد و لوازم مورد نیاز:

- a میکروسکوپ نوری
- a مالاشیت سبز

- a معرف سافرانین
- a لام و لامل

### روش انجام آزمایش:

- ۱- اسمیری از کشت مورد نظر تهیه کنید. (اسمیر را در معرض معرف ها به صورت زیر قرار دهید).
- ۲- مالاشیت سبز را به نمونه باکتری اضافه کنید و با چراغ الکلی از زیر، لام را به مدت ۵ دقیقه حرارت دهید. (لام را به صورت حرکات رفت و برگشت و با فاصله از روی شعله عبور دهید)
- ۳- ۵ دقیقه صبر کنید تا لام سرد شود.
- ۴- لام را به مدت ۵ ثانیه با آب بشوئید.
- ۵- سافرانین را روی لام بریزید و یک دقیقه صبر کنید.
- ۶- لام را به مدت ۵ ثانیه با آب شستشو دهید.
- ۷- صبر کنید تا لام در هوا خشک شود و سپس در زیر میکروسکوپ نوری با عدسی ۱۰۰× مشاهده کنید.

### گزارش کار



.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

### نتیجه گیری



.....

.....

.....

.....

.....

## فکر کنید

- ۱- محل قرارگیری اسپور در سلول باکتری را مشخص کنید (انتها، مرکز، ابتدا).
- ۲- چرا باید از رنگ آمیزی اختصاص برای نشان دادن اسپور، کپسول و تاژک استفاده کرد؟
- ۳- چرا تعیین محل قرارگیری اسپور در سلول باکتری مهم می باشد؟

### رقیق کردن و کشت دادن نمونه های مختلف:

نمونه های گوناگونی که جهت بررسی آلودگی های میکروبی به آزمایشگاه میکروبیولوژی معرفی می گردند از نظر خصوصیات فیزیکی بر دو نوع می باشند یا مایع هستند مانند آب و شیر و غیره و یا جامدند مانند : خاک ، گوشت و غیره.

چون اولین آزمایش میکروبی لازم بر روی تقریباً همه نمونه های تحویلی به آزمایشگاه تعیین تعداد کلی میکروارگانیسم ها<sup>۱</sup> است ، در نمونه های مایع این تعداد در هر میلی لیتر و در نمونه های جامد در هر گرم تعیین و محاسبه می گردد .

میزان آلودگی در نمونه مورد نظر در حد بالائی قرار دارد، به این منظور لازم است که قبل از کشت دادن نمونه در محیط کشت، آن را توسط محلول های سترون به نسبت معین رقیق نمود تا بتوان به راحتی و با دقت بیشتر آلودگی موجود در نمونه را تعیین کرد . این عمل در اساس به خاطر این است که معمولاً بر طبق استاندارد بین المللی بعد از کشت نمونه ها در محیط کشت و قرار گرفتن محیط ها به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت در اینکوباتور با حرارت معین ، تعداد پرگنه (کلنی) های ناشی از تغذیه ، رشد و تکثیر میکروارگانیسم های موجود در نمونه می بایست در حد ۳۰ تا ۳۰۰ قرار داشته باشند .

محلول های رقیق کننده ای که معمولاً متداول می باشند ، عبارتند از: آب مقطر سترون ، سرم فیزیولوژی ، محلول سالین<sup>۲</sup> و محلول های رینگر . تمام محلول های فوق علاوه بر خاصیت رقیق کنندگی نمونه مورد آزمایش دو نقش اساسی دیگر نیز دارا می باشند :

- ۱- تفکیک میکروارگانیسم های موجود در نمونه از یکدیگر و هدایت آن ها به داخل محلول سترون.
- ۲- تفکیک و پراکنده نمودن میکروارگانیسم ها از همدیگر در محلول سترون .

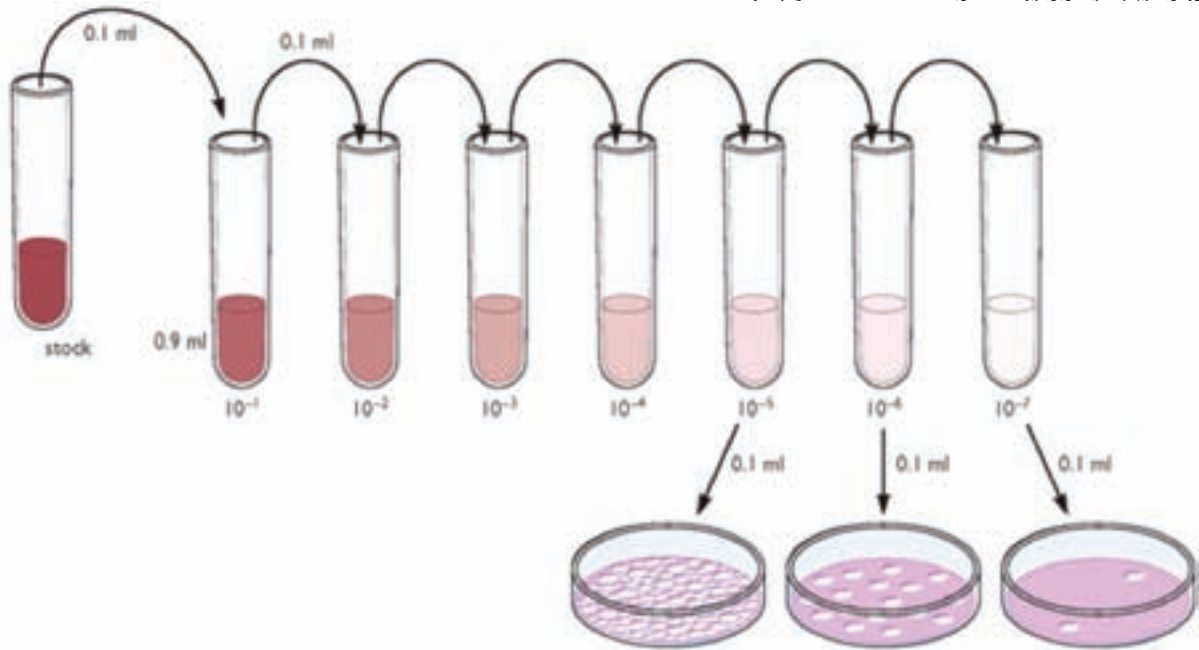
به این ترتیب هنگامی که با استفاده از محلول های رقیق کننده ، عمل کشت دادن در محیط های جامد (در پتری دیش) صورت می گیرد ، میکروارگانیسم های موجود در نمونه با وضعیت مناسب و شرایط آماده تری شروع به تغذیه رشد و تکثیر می نمایند .



۱ - Total Count  
۲ - Saline

## بررسی میزان آلودگی نمونه شیر

فرض کنید یک نمونه شیر خام جهت تعیین آلودگی کلی به آزمایشگاه میکروبیولوژی تحویل داده می‌شود. مطابق شکل زیر ابتدا نمونه را توسط محلول سیلین رقیق نموده و سپس در محیط کشت M.P.H.A (میلک پر و تئین، هیدرولیز آگار) کشت داده می‌شود.



شکل ۱۹-۲

بر اساس استاندارد بین‌المللی محیط کشت دارای ۳۸ پرگنه (کلنی) انتخاب شده و مطابق شرح زیر تعداد کلی میکروارگانیسم‌ها در نمونه شیر محاسبه می‌گردد.

$$\text{تعداد کل میکروارگانیسم‌ها در هر میلی‌لیتر نمونه شیر} = 38 \times 10^4 = 38 \times 10^4$$

معمولاً تعداد کل میکروارگانیسم‌ها در هر نمونه با اعداد یک رقمی و توان عددی مشخص ذکر می‌گردد.

### آزمایش کنید: بررسی میزان آلودگی نمونه شیر



a محیط کشت M.P.H.A (میلک پروتئین

هیدرولیز آگار)

a محیط کشت جامد

مواد و لوازم مورد نیاز:

a نمونه آلوده شیر

a لوله آزمایش

a محلول سالین

روش انجام آزمایش:

۱- یک میلی‌لیتر از نمونه شیر مورد نظر را با استفاده از محلول‌های سالین تا رقت ۱:۱۰۰۰۰ (۱۰<sup>-۴</sup>) رقیق نموده

و در هر مرحله رقت، سعی کنید شیر و محلول سالین کاملاً آمیخته شوند. برای این کار مطابق شکل فوق چند لوله

حاوی محلول سالین به میزان ۰/۹ میلی لیتر را در اختیار می گیریم. سپس ۰/۱ میلی لیتر از شیر را به لوله اول اضافه کرده و خوب تکان می دهیم. در مرحله بعد ۰/۱ میلی لیتر از لوله اول را به لوله دوم اضافه می کنیم و الی آخر. در این حالت رقت های  $\frac{1}{10^1}$ ،  $\frac{1}{10^2}$ ،  $\frac{1}{10^3}$ ،  $\frac{1}{10^4}$ ،  $\frac{1}{10^5}$  و ... بدست می آید. (شکل ۱۹-۲)

۲- از هر مرحله رقت ۱ میلی لیتر بداخل یک پتری دیش سترون انتقال داده و بدنبال آن با حرکت دادن پلیت به شکل ( $\infty$ ) زیگزاگ موجب مخلوط شدن محیط کشت و نمونه مورد آزمایش شوید.

۳- پس از اتمام کار جهت طی دوره رشد و تکثیر محیطها را برای مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت در اینکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  قرار دهید.

۴- در همین جلسه از مخلوط شیر و محلول سالین با درجات رقت مختلف لام تهیه نموده و بعد از ثابت نمودن گسترش لامها، شکل، نوع و تعداد میکروارگانیسمهای مشاهده شده توسط میکروسکوپ را در نمونه شیر مورد آزمایش بررسی نمائید.

۵- در جلسه بعد، ابتدا توسط دستگاه کلنی کانتور، پرگنه (کلنی) های موجود در محیطها را شمارش نموده و همچنین شکل ظاهری و اندازه پرگنهها را بررسی نمائید. سپس با در نظر گرفتن درجه رقت مطابق آنچه در صفحات گذشته شرح داده شد، تعداد کل میکروارگانیسمها را در یک میلی لیتر شیر مورد آزمایش محاسبه نمائید.

۶- از پرگنههای مختلف موجود در محیط کشت لام تهیه نموده و بعد از انجام رنگ آمیزی گرم و مشاهده میکروسکوپی، میکروارگانیسمهای مورد مشاهده را از نظر نوع و شکل با میکروارگانیسم مشاهده شده در جلسه قبل مقایسه نمائید.

## گزارش کار

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## نتیجه گیری

.....

.....

.....

.....



## فکر کنید

- ۱- دلیل رقیق نمودن نمونه شیر یا آب برای پی بردن به میزان آلودگی چیست؟
- ۲- تحقیق کنید شاخص آلودگی آب آشامیدنی چه باکتری می باشد.

### شمارش تعداد پرگنه (کلنی) ها و دستگاه پرگنه شمار

در مرحله بعد از کشت و طی دوره رشد و تکثیر<sup>۱</sup> پرگنه (کلنی) های حاصل شده در محیط کشت نشان دهنده تقریبی میزان آلودگی در مقدار کشت داده شده از نمونه می باشد. به این صورت که هر یک پرگنه (کلنی) کوچک یا بزرگ، نمایانگر حداقل یک میکروارگانیسم فعال اولیه در نمونه به شمار می آید و تعداد کل میکروارگانیسم ها بر اساس تعداد پرگنه (کلنی) ها بر مبنای درجه رقت نمونه، تعیین و محاسبه می گردد. جهت شمارش تعداد پرگنه (کلنی) ها در محیط کشت معمولاً از دستگاهی به نام کلنی کانتر<sup>۲</sup> استفاده می شود که در فصل اول کتاب نیز به آن اشاره شده است.

### آزمایش کنید: شمارش پرگنه به کمک دستگاه پرگنه شمار

#### مواد و لوازم مورد نیاز:

- a پلیت حاوی پرگنه باکتری ها
- a دستگاه کلنی کانتر

#### روش انجام آزمایش:

- ۱- پلیت دارای پرگنه را روی صفحه مدور قرار دهید.
- ۲- چراغ روشن کننده صفحه را روشن کنید.
- ۳- با فشار انگشت روی دکمه نمراتور موجب ثبت تعداد پرگنه (کلنی) ها روی قسمت نمراتور گردید.

### گزارش کار

.....

.....

.....

.....

.....

۱- Incubation Peroid  
۲- Colony Counter



## نتیجه گیری



.....

.....

.....

.....

.....

.....

## توجه کنید



در برخی دستگاه‌ها، وجود اشکال مربع شکل بر روی صفحه دستگاه موجب دقت بیشتر و جلوگیری از خطا در شمردن پرگنه (کلنی)ها می‌گردد.

شمارش باکتری‌ها<sup>۱</sup>

در بیشتر مطالعات باکتری‌شناسی، لازم است تعداد میکروب‌های موجود در واحد حجم شمارش شوند. روش‌های زیادی برای شمارش آن‌ها وجود دارند. یکی از روش‌های پر کاربرد، تهیه رقت از میکروب‌ها و مشاهده آن‌ها با میکروسکوپ در روی لام است. آزمایش مستقیم نمونه‌های شیر با این روش، بسیار سریع انجام می‌شود و نتایج آن کاملاً مورد اطمینان است. روش مشابه دیگر، روش پتروف<sup>۲</sup> است که در آن، از یک شمارشگر مکانیکی استفاده می‌شود. باکتری‌های تولیدکننده گاز را می‌توان به تعدادی از لوله‌های آزمایش حاوی لاکتوز برات تلقیح نمود و از روی جداول آماری خاصی، تعداد باکتری‌های موجود در آن را مشخص کرد. این روش، برای شمارش کلی فرم‌ها در نمونه‌های آب انجام می‌شود، ضمن اینکه بسیار ساده است، اما محدود به آزمایش آب، شیر و مواد غذایی است.

در این تمرین از پلیت‌های کمی (پلیت‌های شمارش استاندارد) یا SPC<sup>۳</sup> و اندازه‌گیری کدورت تعداد باکتری‌ها را مشخص خواهیم کرد. گرچه نتایج دو روش فوق، موازی هم‌اند ولی تفاوت‌های واضحی نیز دارند. SPC تنها اطلاعات مربوط را به میکروب‌های زنده را آشکار می‌کند، یعنی پرگنه‌ها بعد از گرم‌خانه‌گذاری نشانگر میکروب‌های زنده هستند. از طرف دیگر نتایج کدورت سنجی وجود کلی میکروارگانیسم‌ها، اعم از زنده و مرده در محیط کشت را مشخص می‌کند.



۱ - Bacterial population counts  
 ۲ - Petrof Hauser  
 ۳ - Standard Plate Count (SPC)



## آزمایش کنید: روش پلیت کمی ( شمارش با پلیت استاندارد)

### مواد و لوازم مورد نیاز :

- a چهار عدد پلیت  
 a یک عدد شیشه (۴۰ میلی لیتری) محیط کشت  
 a پیت های ۱/۱ میلی لیتری  
 a برات اشرشیاکلی  
 a سه شیشه شستشو شده ۹۹ میلی لیتری  
 a یک عدد شیشه (۸۰ میلی لیتری) نوترینت آگار  
 a ظرف مناسب برای پیت های دور انداختنی

### روش انجام آزمایش :

- ۱- نوترینت آگار موجود در یک شیشه را ذوب کنید . سه شیشه سترون ۹۹ میلی لیتری بردارید و روی آن‌ها را با حروف A ، B و C علامتگذاری نمایید . هم چنین پشت چهار عدد پلیت به ترتیب ۱:۱۰۰۰۰۰ ، ۱:۱۰۰۰۰۰ و ۱:۱۰۰۰۰۰۰۰ بنویسید . به علاوه ، میزان حجم سوسپانسیون باکتری را که در پلیت ریخته می شود در پشت پلیت یادداشت کنید . (۱/۱ میلی لیتر و یا ۱ میلی لیتر)
- ۲- محیط کشت اشرشیاکلی را به هم بزنید و با یک پیت ۱/۱ میلی لیتری ، یک میلی لیتر از آن را به شیشه A منتقل کنید . سپس پیت استفاده شده را در ظرف حاوی ماده ضد عفونی کننده قرار دهید .
- ۳- شیشه A را در عرض ۷ ثانیه ۲۵ بار به هم بزنید . به هم زدن شدید نه تنها کدورت خوبی تولید می کند بلکه باعث باز شدن توده های باکتری می شود .
- ۴- با یک پیت ۱/۱ میلی لیتری ، یک میلی لیتر از محتویات شیشه A را به شیشه B منتقل کنید .
- ۵- محتویات شیشه B را ۲۵ بار به هم بزنید .
- ۶- با یک پیت سترون دیگر ، ۰/۱ میلی لیتر از محتویات شیشه B را به پلیت ۱:۱۰۰۰۰۰ منتقل کنید و ۱ میلی لیتر به پلیت ۱:۱۰۰۰۰۰ بریزید . با همان پیت ۱ میلی لیتر نیز به شیشه C بریزید .
- ۷- شیشه C را ۲۵ بار به هم بزنید .
- ۸- با یک پیت سترون دیگر ، از محتویات شیشه C ، ۰/۱ میلی لیتر برداشته ، به پلیت ۱:۱۰۰۰۰۰۰ و ۱ میلی لیتر به پلیت ۱:۱۰۰۰۰۰۰ بریزید .
- ۹- پس از آن که شیشه حاوی نوترینت آگار برای مدت ۸ دقیقه جوشانده شد ، آن را در داخل یک بن ماری ۵۰ درجه ، حداقل ۱۰ دقیقه سرد کنید .
- ۱۰- نوترینت آگار (۲۰ میلی لیتر) را به هر پلیت بریزید و به آرامی محتویات پلیت ها را به هم بزنید . این مرحله ، مرحله حساسی ست زیرا به هم زدن کم ، مانع از پخش کامل میکروب ها می شود و به هم زدن زیاد ، موجب می گردد محیط کشت از لبه های پلیت بیرون بریزد .
- ۱۱- پس از آنکه محیط کشت کاملاً سرد شد ، آن را به مدت ۴۸ ساعت به طور وارونه در ۳۵ درجه سانتیگراد در گرم خانه نگهداری کنید .

## گزارش کار

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## نتیجه گیری

.....

.....

.....

.....

.....

.....

### محاسبه کنید

مواد و لوازم مورد نیاز

۴ عدد پلیت

شمارشگر پرگنه یا شمارشگر دستی

### روش انجام آزمایش:

۱- پلیت‌ها را به ترتیب رقت روی میز بگذارید و با هم مقایسه کنید. پلیت‌هایی که تعداد پرگنه‌های آنها بین ۳۰ تا ۳۰۰ عدد است برای شمارش انتخاب کنید. پلیت‌هایی که تعداد پرگنه‌های آنها بیش از ۳۰۰ عدد و یا کمتر از ۳۰ است از نظر آماری مناسب نیستند.

۲- پلیت را روی صفحه شمارش گر زیر ذره بین قرار دهید. شمارش را از بالای پلیت شروع کنید، با یک شمارش گر مکانیکی دستی، هر پرگنه را بدون توجه به بزرگی و کوچکی آن شمارش کنید و برای این که پرگنه‌ای دو بار شمارش نشود از پرگنه‌های روی خطوط راست یا چپ صرف نظر کنید. نتیجه کار را در گزارش کار خود بنویسید.

۳- با استفاده از اطلاعات بدست آمده ، تعداد باکتری‌ها را در میلی لیتر محیط کشت رقیق نشده محاسبه کنید ، برای این کار ، تعداد پرگنه‌های شمارش شده را به ضریب رقت ضرب کنید .  
 مثال : اگر تعداد پرگنه‌های شمارش شده در پلیت حاوی یک میلی لیتر از رقت  $1:1000000$  برابر  $220$  عدد باشد ، تعداد باکتری‌ها در هر میلی لیتر برابر خواهد بود با  $220 \times 10^6 = 220 \times 1000000 = 220000000$  اگر  $220$  عدد پرگنه در پلیتی که  $0/1$  میلی لیتر از رقت  $1:1000000$  شمرده شود ، نتیجه به دست آمده از محاسبه بالا ، باید در  $10$  نیز ضرب شود تا تعداد باکتری در  $0/1$  میلی‌یتر به  $1$  میلی لیتر تبدیل شود ( $220 \times 10^9$ ) .  
 اگر تعداد باکتری در هر میلی لیتر  $227/000/000$  عدد باشد آن را  $230/000/000$  عدد و یا  $2/3 \times 10^8$  عدد ثبت کنید .

### شمارش باکتری‌ها به کمک کاغذ صافی :

کاغذهای صافی مخصوص میکروب‌شناسی در صنعت ساخته شده‌اند به دلیل داشتن منافذ بسیار ریز ، میکروب‌ها را در خود نگه می‌دارند . از این کاغذ صافی‌ها برای سترون کردن مایعات و محلول‌های مختلف حساس به حرارت استفاده می‌شود . برخی از کارخانه‌های سازنده وسایل آزمایشگاهی ، نوعی از این کاغذها با کیف‌های مخصوصی که در برابر حرارت مقاوم‌اند و قابل سترون شدن هستند را برای شمارش و جستجوی باکتری‌ها در آب و سایر فرآورده‌های دارویی ساخته‌اند و حتی بعضی از سازندگان ، ظروف پتری مخصوصی را که قطر آن متناسب با کاغذهای صافی است و محیط کشت آماده در آمپول‌های کوچک برای یک بار کشت و حتی گرم‌خانه‌های کوچک که با برق اتومبیل و یا باتری کار می‌کنند برای عملیات صحرائی تهیه و عرضه کرده‌اند از این صافی‌ها برای جستجو و شمارش میکروب‌ها در آب آشامیدنی و دیگر آشامیدنی‌هایی که تعداد باکتری آن‌ها کم است و لازم است که حجم زیادی از نمونه برای شمارش و جستجوی باکتری به کار رود استفاده می‌شود .

### آزمایش کنید: شمارش باکتری به کمک صافی



#### مواد و لوازم مورد نیاز :

- a گرم خانه
- a دستگاه پرگنه شمار
- a نمونه مورد نظر ( آب یا مایع دیگر)
- a کاغذ صافی
- a محیط کشت جامد مناسب

## روش انجام آزمایش :

- ۱- مقدار کافی مثلاً یک لیتر آب و یا نمونه مایع ، از صافی عبور داده تا کلیه باکتری‌های موجود در آن حجم در منافذ کاغذ به دام بیفتند .
- ۲- سپس کاغذ صافی را روی محیط کشت جامد قرار دهید، در صورت لزوم روی آن را نیز می‌توانید با یک لایه نازک از محیط کشت مذاب که حرارت آن کمتر از ۴۵ درجه سانتی گراد است پوشانید.
- ۳- سپس این محیط کشت را ، در گرم‌خانه بگذارید ، پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تعداد پرگنه‌های مورد نظر را بشمارید .

## گزارش کار



.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## نتیجه گیری



.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

اگر منظور فقط جستجوی یک نوع میکروب ، مثلاً سالمونلا در ماده آشامیدنی مانند آب یا شربت دیگر باشد میتوان حجم مناسبی از نمونه را از کاغذ صافی گذرانده ، سپس کاغذ صافی را در محیط کشت مایع قرار داده و پس از گرمخانه گذاری ، از آن محیط برای جستجو و تشخیص میکروب مورد نظر استفاده نمود . از این روش در کارخانه‌های دارو سازی برای کنترل سترونی محلول‌های دارویی مانند محلول‌های تزریقی استفاده می‌شود . هم چنین این روش ، در بهداشت محیط و کنترل آب و فاضلاب و بررسی‌های همه گیرشناسی ، بسیار ارزشمند می‌باشد .

**شمارش باکتری با روش شمارش مستقیم :**

از این روش به دلیل سرعت زیاد می توان در موارد فوری مانند تحویل گرفتن شیر و یا موارد فوری دیگر استفاده نمود . البته دقت این روش به مراتب از روش قبلی کمتر است . در روش شمارش مستقیم ، می توان از لام های مخصوص نئوبار و یا لام توما که معمولاً برای شمارش گلبولهای خون به کار می رود استفاده نمود .

**آزمایش کنید: شمارش باکتری به روش مستقیم****مواد و لوازم مورد نیاز :**

a میکروسکوپ  
a مواد رنگی مانند آبی متیلن و یا ویوله ژانینی

a آب مقطر یا سرم فیزیولوژی  
a لام توما یا نئوبار

**روش انجام آزمایش :**

- ۱- نمونه مورد آزمایش را به نسبت های معینی با آب مقطر و یا سرم فیزیولوژی و یا هر رقیق کننده مناسب دیگر رقیق کنید ( برای بهتر دیدن میکروارگانیسم ها ، مواد رنگی مانند آبی متیلن و یا ویوله ژانینی و یا رنگ دیگری به مایع رقیق کننده بیافزایید).
- ۲- از محلول تهیه شده ، روی لام توما بریزید و یک لامل سنگینی روی آن قرار دهید.
- ۳- پس از چند دقیقه با عدسی ۴۰ میکروسکوپ میکروارگانیسم ها را شمارش کنید.

**گزارش کار**

.....

.....

.....

.....

.....

.....

**نتیجه گیری**

.....

.....

.....

.....

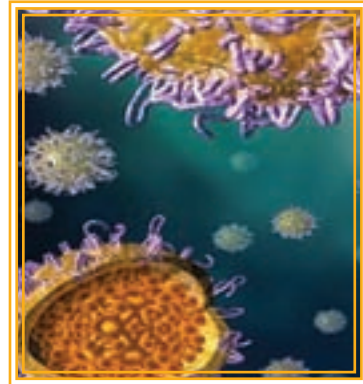
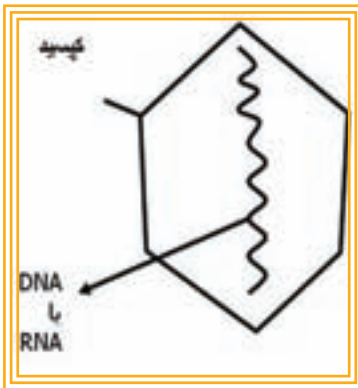
## A واژه‌های فصل دوم

|                    |                      |                            |
|--------------------|----------------------|----------------------------|
| مواد بافری         | کوکسی سیلین          | باکتری                     |
| اسید هیدروکلریدریک | میکروکوکوس           | سارسینا لوت‌آ              |
| هیدروکسید سدیم     | پیپت                 | میکروارگانیزم              |
| نوترینت آگار       | استافیلوکوک          | سوسپانسیون                 |
| روش پور پلیت       | پتری دیش             | بیماریزا                   |
| کریستال ویوله      | استافیلوکوکوس اورئوس | لام و لامل                 |
| کورینه باکتریوم    | زیگزاگ               | یوکاریوت‌ها                |
| کبسیلا پنومونیه    | استرپتوکوک           | روش گسترش مرطوب            |
| سافرین             | حرکت برائونی         | میکروب شناسان              |
| روغن سدر           | استرپتوکوکوس فکالیس  | روش قطره معلق              |
| کاغذ صافی          | حرکت حیاتی           | فرایندهای حیاتی            |
| سترون              | دیپلوکوک             | استاندارد بین‌المللی       |
| لام نئو بار        | محیط کشت تست حرکت    | باسیلی یا استوانه‌ای       |
| لام توما           | دیپلوکوک نمونیا      | اینکوباتور                 |
| آبی متیلن          | ژلاتین               | اشرشیا کلی                 |
| ویوله ژانینی       | سارسینا              | پرگنه (کلنی)               |
|                    | باسیلوس سابتیلیس     | ائروباکتراروجنس            |
|                    | پروتئوس ولگاریکوس    | میلک پروتئین هیدرولیز آگار |
|                    | لیسفون               | باسیلوس مگاتریوم           |
|                    | رنگ متیلن بلو        | نمراتور                    |
|                    | پروتوپلاسم           | ویبریون                    |
|                    | مواد کلونیدی         | هاگ                        |
|                    | دترجنت               | ویبریوکوما                 |
|                    | محیط کشت ذخیره       | کپک                        |
|                    | محیط کشت عمقی        | باکتری‌های مارپیچی         |
|                    | محیط کشت خوابیده     | مخمر                       |
|                    | محیط کشت برای تخمیر  | تریپونما پالیدوم           |
|                    | آگار                 | ازتوباکتر                  |



# فصل سوم

## ویروس‌ها



قبل از تعریف ویروس‌ها<sup>۱</sup> باید بدانیم آیا ویروس‌ها موجود زنده محسوب می‌شوند یا خیر؟ از آن‌جا که ویروس‌ها خارج از سلول‌های میزبان غیر فعال می‌باشند، نمی‌توان آن‌ها را موجود زنده به حساب آورد اما هنگامی که ویروس‌ها به درون سلول میزبان انتقال می‌یابند توانایی فعالیت و تکثیر می‌یابند و موجود زنده محسوب می‌شوند.

ویروس‌ها یکی از کوچکترین عوامل بیماری‌زا در جانداران هستند که ابعاد آنها بین ۱۰ تا ۳۰۰ نانومتر است. برخی از تفاوت‌های ویروس‌ها با سایر میکروارگانیسم‌ها را می‌توان چنین خلاصه کرد:

۱- ویروس‌ها قادر نیستند به تنهایی تکثیر شوند و برای تکثیر به یک میزبان یا سلول زنده نیاز دارند.  
 ۲- ویروس‌ها با میکروسکوپ‌های معمولی قابل رؤیت نیستند و باید از میکروسکوپ الکترونی برای دیدن آن‌ها استفاده کرد.

۳- به دلیل اندازه کوچک از صافی‌ها به سادگی عبور می‌کنند.

۴- ویروس‌ها را نمی‌توان با سانتریفوژهای معمولی از محیط جدا کرد و نیاز به اولترا سانتریفوژ می‌باشد.

## میزبان ویروس‌ها

میزبان ویروس عبارتست از گونه‌ای از سلول زنده که ویروس بتواند آن را آلوده کند. ویروس‌ها فقط درون سلول‌های خاصی تکثیر می‌یابند و بر این اساس آن‌ها را طبقه‌بندی می‌کنند. مانند ویروس‌های حیوانی، ویروس‌های باکتریایی (باکتریوفاژ) و ویروس‌های گیاهی.

## ساختمان شیمیایی ویروس

### اسید نوکلئیک

ویروس دارای یک هسته مرکزی اسید نوکلئیک DNA یا RNA به عنوان ماده ژنتیکی می‌باشد. نسبت اسید نوکلئیک به پروتئین غلاف ویروس، از یک درصد در ویروس آنفلوانزا تا ۵۰ درصد در برخی از باکتریوفاژها متغیر است. برخلاف سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی که همواره دارای DNA به عنوان ماده ژنتیکی اصلی خود هستند، ویروس‌ها دارای یکی از دو نوع اسید نوکلئیک (DNA, RNA) بوده و هرگز هر دو را باهم ندارد. در مورد ویروس DNA دار ماده ژنتیکی ممکن است به صورت خطی یا حلقوی، یک رشته‌ای یا دورشته‌ای باشد ولی در ویروس‌های RNA دار، ژنوم همواره به صورت خطی است.

### کپسید<sup>۲</sup>

اسید نوکلئیک ویروس بوسیله غلاف پروتئینی به نام کپسید احاطه شده است. کپسید بخش عمده ویروس را به ویژه ویروس‌های کوچک را شامل می‌شود. هر کپسید از واحدهای کوچک پروتئینی به نام کپسومر<sup>۳</sup> ساخته شده است. نظم و ترتیب قرار گرفتن کپسومرها، شکل کلی و پیکر ویروس را تعیین می‌کند که برای هر ویروس خاص، ثابت است.



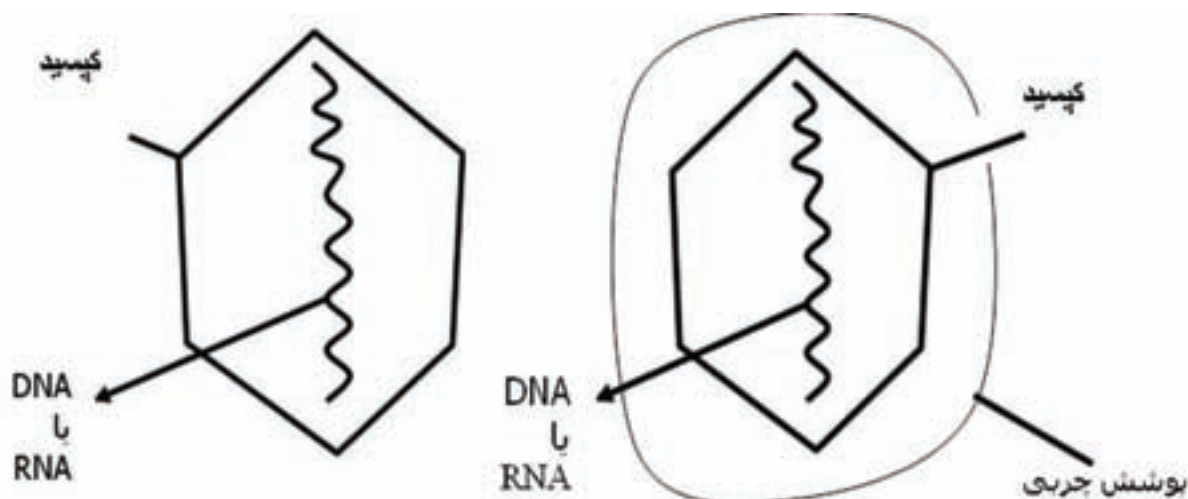
۱- Virus

۲- Capsid

۳- Capsomer

## پوشش غیر پروتئینی

در برخی از ویروس‌ها کپسید بوسیله پوششی که معمولاً ترکیبی از لیپیدها، پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها است، پوشیده شده است. (شکل ۱-۳)



شکل ۱-۳

## ویروس‌های ناقص

ویروس‌های ناقص یا نارس از نظر عملکرد، ویروس‌هایی هستند که از اسید نوکلئیک و پروتئین تشکیل شده‌اند، ولی بدون ویروس کمکی<sup>۱</sup>، توان تکثیر ندارند. ویروس‌های ناقص در ساختمان ژنتیکی خود نقصی دارند و در خلال تکثیر در داخل سلول بوجود می‌آیند. این ویروس‌ها می‌توانند تکثیر ویروس‌های معمولی را مختل کنند و با تکثیر زیاد خود از تکثیر ویروس‌های معمولی جلوگیری می‌کنند، بنابراین در بهبود بیماری نقش دارند.

## ویریون

به یک ذره ویروسی کامل که توان آلوده کردن سلول را دارد ویریون گفته می‌شود. به ورود ویروس به داخل سلول عفونت یا آلودگی سلول گفته می‌شود که می‌تواند همراه علائم بالینی باشد و یا علائم بالینی نداشته باشد.

## ویروئید<sup>۲</sup>

عامل بیماریزایی است که از ویروس کوچکتر بوده و تنها دارای یک RNA تک رشته‌ای، کوچک و حلقوی می‌باشد.



۱- Helper virus

۲- viroid

## ویروس‌های گیاهی

ویروس‌ها در جلبک‌ها، قارچ‌ها، گل‌سنگ‌ها، خزها، سرخس‌ها و گیاهان عالی دیده شده‌اند. ولی در گیاهان عالی بیش از گیاهان پست مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. ویروس‌ها به گیاهان زراعی خسارت عمده‌ای وارد می‌سازند. چون پاره‌ای از ویروس‌های گیاهی چندان شباهتی با ویروس‌های دیگر ندارند، بنابراین گروه مستقلی را تشکیل می‌دهند. ولی برخی از آن‌ها دارای خصوصیات مشترک بوده و می‌توان آن‌ها را در یک گروه قرار داد. این گروه‌ها به شرح زیر هستند.

a ویروس‌های میله‌ای یا رشته‌ای

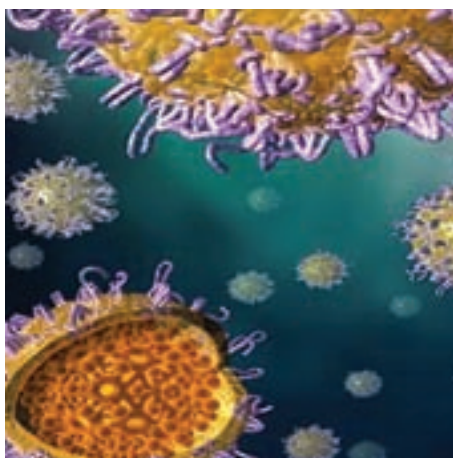
a ویروس‌های ایزو دیامتریک

a ویروس‌های باسیلی شکل

a ویروئیدها

## ویروس‌های جانوری

ویروس‌ها از انواع مختلف جانوران از تک یاختگان تا انسان‌ها جدا شده‌اند. میزبان مهم ویروس‌ها در بی‌مهرگان، بندپایان هستند خصوصاً کنه‌ها و حشرات. برخی از ویروس‌ها در عین حال که در حشرات تکثیر می‌یابند، می‌توانند در گیاه یا در جانور مولد بیماری باشند، ولی برای خود حشرات بیماری ایجاد نمی‌کنند. ویروس‌ها در اکثر مهره‌داران فعالیت دارند و در ماهی‌ها، دوزیستان، پرندگان و پستانداران بیماری‌هایی تولید می‌کنند که گاهی علائم آن‌ها به صورت تومور نمایان می‌شود. ویروس‌ها در انسان نیز بیماری‌های گوناگونی مانند اوریون، سرخک، تب زرد، آبله، آنفلوآنزا و غیره ایجاد می‌کنند. (شکل ۲-۳)



شکل ۲-۳

## تکثیر ویروسها

مراحل پنج گانه تکثیر ویروس در سلول میزبان به صورت زیر است:

a مرحله اتصال یا جذب سطحی ویروس ها بر روی سلول

a مرحله ورود و نفوذ در سلول

a مرحله سنتز اجزای ویروسی

a مرحله رسیدن و کامل شدن ویروس

a مرحله آزاد شدن ویروس از سلول میزبان و نفوذ آن در سلول های سالم

رده بندی ویروسها از روی محل تاثیر آن بر روی اندام های مختلف انسانی

| اندام تحت تاثیر ویروس   | نوع بیماری   |
|---|--|
| بیماریهای عمومی (بیماریهایی که در آن ویروسها از طریق خون و لنف به همه جای بدن منتقل می شوند). | آبله انسانی، آبله گاوی، سرخک، سرخچه، آبله مرغان و تب زرد |
| سیستم عصبی  | آنسفالیت ، هاری و منتزیت                                 |
| سیستم تنفسی   | آنفلوانزا ، ذات الریه و برونشیت                          |
| پوست و غشاهای مخاطی   | تبخال ، زگیل و زونا                                      |
| چشم   | انواع گوناگون ورم ملتحمه چشم                             |
| کبد   | هپاتیت و تب زرد  |
| دستگاه گوارش  | ویروس A گاسترو آنتریت و ویروس B گاسترو آنتریت            |



- ۱- محیط مناسب جهت بقا ویروس خارج از میزبان دارای چه ویژگی می باشد.
- ۲- نکات بهداشتی و ایمنی وزیست محیطی در آزمایشگاه ، شامل چه مواردی می شود ، بیان کنید.

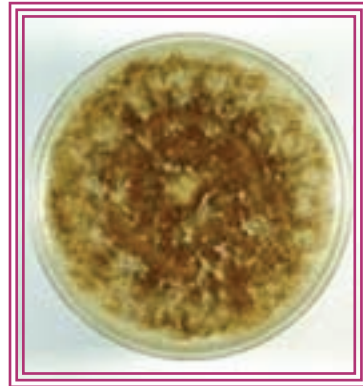
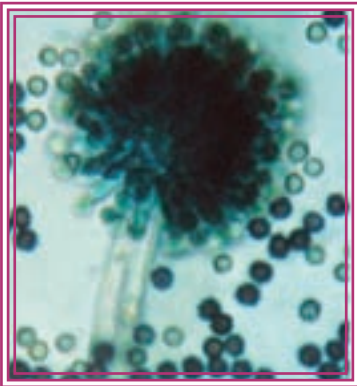
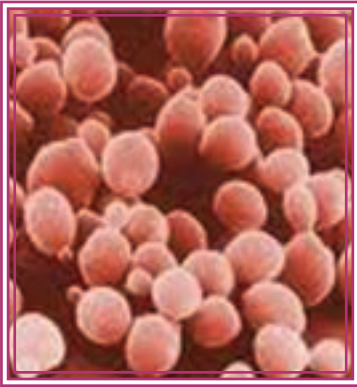
## A واژه‌های فصل سوم

زونا  
ملتحمه چشم  
هیپاتیت  
گاسترونیت

ویروس  
میزبان  
میکروسکوپ الکترونی  
اولتراسانتریفوژ  
باکتریوفاز  
ویروس‌های حیوانی  
ویروس‌های گیاهی  
اسید نوکلئیک  
کپسید  
کپسومر  
ویروس کمکی  
ویریون  
آبله انسانی  
آبله گاوی  
سرخک  
سرخجه  
آبله مرغان  
تب زرد  
آنسفالیت  
هاری  
مننژیت  
آنفلوانزا  
ذات الریه  
برونشیت  
تبخال  
زگیل

# فصل چہارم

## قارچھا



در حالت کلی قارچها را به دو دسته عمده تقسیم می کنند: کپک ها (شکل ۱-۴) و مخمرها هر دو دسته برای رشد به شرایط خاصی نیاز دارند که عبارتند از:

۱- pH: هر میکروارگانیسم نیازمند pH خاص خود می باشد مثلا اکثر باکتری ها در pH خنثی و یا قلیایی رشد می کنند ولی میدان فعالیت قارچها بسیار زیاد است، مثلا کپک ها در  $pH=11-1/5$  و مخمرها در  $2/5-8/5 = pH$  به خوبی رشد می کنند. به همین علت میوه جات بیشتر کپک می زنند و باکتری روی آن ها رشد نمی کند.

۲- رطوبت: برای رشد هر میکروارگانیسم رطوبت لازم می باشد. اما بسیاری از کپک ها و برخی از مخمرها قادر به رشد در محیط هایی با رطوبت پایین می باشند.

۳- نیاز به اکسیژن: اکثر قارچها هوازی هستند. مخمرها هم بیشتر هوازی هستند اما از طریق بی هوازی هم می توانند رشد کنند (فرایند تخمیر قند)

۴- دما: قارچها از نظر درجه حرارت برای رشد معمولا مزوفیل<sup>۳</sup> ( $35^{\circ}C$  تا  $25^{\circ}C$ ) هستند و بعضی هم سرما دوست هستند و در دمای  $5^{\circ}C$  تا  $10^{\circ}C$  - درجه به خوبی رشد می کنند. مانند نمونه هایی از اسپرژیلوس ها

۵- مواد غذایی: شامل آب، منابع انرژی شامل قندها، الکل ها، اسیدهای آلی، منابع پروتئنی و مواد معدنی. کپکها نسبت به مخمرها نیاز کمتری به مواد معدنی دارند یعنی می توانند مقداری از مواد مورد نیاز خود را بسازند.

### شکل ظاهری قارچها:

در شناسایی قارچها ظاهر اندامهای بارز و اسپوره های غیر جنسی که بر روی آن ها تشکیل می گردد کمک بزرگی می کند. برای مثال در قارچهایی که اسپورانژیوم<sup>۴</sup> تشکیل می شود بررسی شکل اسپورانژیوفور<sup>۵</sup>ها که به صورت ساده یا منشعب هستند و نیز شکل، اندازه و رنگ آنها به شناسایی و تفکیک آن ها کمک میکند. در قارچهایی که به وسیله کنیدی تکثیر غیر جنسی انجام می شود، کنیدیوفور<sup>۶</sup>ها ممکن است حامل یک کنیدی و یا شامل تعداد زیادی کنیدی باشند، که در محل های مختلف و با اشکال مختلف استقرار یافته اند. در برخی از قارچها کنیدیها از زائده ای به نام استریگما که خود بر روی برآمدگی حبابی شکل به نام ویزیکول قرار گرفته است، به وجود می آید. از جمله مهم ترین جنس های کپکها می توان به کپکهای آلترناریا، پنی سیلیوم، اسپرژیلوس، موکور و رایزوپوس اشاره کرد.

کپکها را به دلیل چند سلولی بودن و گستردگی زیاد بسیار مشکل می توان از محیط کشت انتقال داد و به همین جهت لازم است در هنگام انتقال دقت بسیار زیادی به کار برده شود.



۱- Mold

۲- Yeast

۳- mesophilic

۴- یک ساختار کیسه مانند که در داخل آن هاگ های قارچی تشکیل می شوند، هاگ ها با تخریب دیواره ماگدان آزاد می شوند sporangium

۵- یک هیف اختصاص یافته که یک هاگدان را تولید می کند. sporangiophore

۶- یک هیف اختصاص یافته که بر روی آن یک یا چند کنیدی تولید می شوند. conidiophore



## توجه کنید

در تهیه لام از کپک نباید از آب استفاده شود زیرا آب به سرعت تبخیر شده و موجب چروکیده شدن هیف‌ها بر اثر فشار اسمزی می‌گردد، همچنین موجب چسبیده شدن توده کپکی به سطح لام شده و لام تهیه شده برای مشاهده میکروسکپی نا مناسب خواهد بود. بهترین محلول برای تهیه لام از کپک لاکتوفنل می‌باشد. این ترکیب نه تبخیر شده و نه باعث چروکیده شدن هیف می‌شود.

## آزمایش کنید: مشاهده میکروسکپی کپک‌ها

مواد و لوازم مورد نیاز :  
 a لام و لامل  
 a محلول لاکتوفنل  
 a آنس و سوزن مخصوص انتقال کپک  
 a میوه جات یا نان کپک زده و یا محیط کشت  
 دارای کپک

### روش انجام آزمایش :

- ۱- مقدار ۲-۳ قطره از محلول لاکتوفنل را توسط آنس سترون در مرکز لام قرار دهید.
- ۲- بوسیله آنس سترون مقداری از کپک تهیه شده را روی لام در محلول لاکتوفنل قرار دهید.
- ۳- با استفاده از یک جفت سوزن و با احتیاط سعی کنید قسمت‌های مختلف کپک را در داخل محلول لاکتوفنل روی لام به طور کامل پخش و از یکدیگر جدا نمایید.
- ۴- یک لامل تمیز روی لام قرار داده و لام تهیه شده را مورد مشاهده میکروسکپی قرار دهید.

## گزارش کار

- چگونگی موارد زیر را در گزارش کار آزمایشگاه خود ذکر نمایید.
- الف- وضعیت کلی میسیلیوم  
 شکل میسیلیوم، شاخه دار یا بی شاخه بودن آن و ساختمان داخلی میسیلیوم
- ب- وجود استریگما
- ج- وجود اسپورانژیوسپور و اسپورانژیوم
- د- وجود کنیدیوم (کنیدیا) و کنیدیوفور
- ه- وجود بازیدیواسپور و بازیدیوم

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

نتیجه گیری ✓

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

### کشت کپک‌ها:

به طور کلی کشت این دسته از میکروارگانیسم‌ها آسان است. فقط کشت برخی از گونه‌ها مشکل می‌باشد. محیط پایه برای کشت قارچ‌ها اغلب سابرود کستروز آگار می‌باشد که حاوی مقداری کلرامفنیکل است. کار این آنتی بیوتیک جلوگیری از رشد باکتری‌ها در این محیط می‌باشد. در مواردی نیز جهت انتخابی کردن محیط از ترکیبات اسیدی استفاده می‌شود. قارچ‌ها معمولا در دمای محیط آزمایشگاه (25 °C) بخوبی رشد می‌کنند.

**آزمایش کنید: کشت کپک‌ها بر روی محیط کشت** 

مواد و لوازم مورد نیاز:

- a محیط کشت سابرود کستروز آگار
- a آنس
- a چراغ الکی یا گازی

## روش انجام آزمایش :

- ۱- محیط سابرود کستروز آگار را تهیه کرده و در داخل پلیت های آزمایش آماده کنید.
  - ۲- با نوک آنس با رعایت موازین سترون در کنار شعله مقداری از پرگنه را برداشته و در محیط کشت قرار دهید در مورد کپک ها می توانید بصورت نقطه ای در مرکز پلیت کشت دهید یا اینکه در ۸-۶ نقطه کپک را کشت دهید . در مورد مخمرها می توانید از ماده غذایی حاوی مخمر یا محیطی که مایع می باشد رقت تهیه کرده بعد بصورت سطحی آنرا کشت دهید . کشت خطی هم روش دیگر می باشد که در مورد مخمرها می توانید انجام دهید. خصوصیتی که کشت قارچ ها دارد ، می توانید در طول روز ، روند رشد را مشاهده و بررسی کنید.
- بعد از کشت نوبت به مطالعه قارچهای رشد یافته روی محیط کشت می رسد که یک بررسی ظاهری پرگنه ها و بررسی میکروسکوپی آنها مورد نظرتان باشد.

## گزارش کار

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## نتیجه گیری

.....

.....

.....

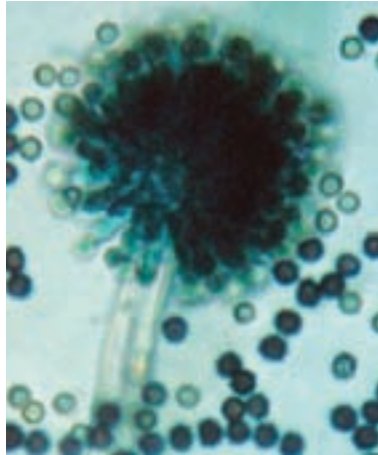
.....

.....

## فکر کنید

- ۱- علت کشت نقطه ای در روش کشت کپک ها چیست ؟
- ۲- به نظر شما چه خصوصیتی کشت قارچ ها دارا می باشد ، که روند رشد آن ها را در محیط کشت می توان مشاهده کرد ؟

## خواص ظاهری کپک‌ها



شکل ۱-۴

جهت مطالعه کلنی‌های رشد یافته می‌توان فاکتورهای زیر را مد نظر قرار داد:

### میزان رشد قارچ

حالت و شکل کلنی ممکن است مسطح و یا برجسته، منظم یا غیر منظم باشد.

### منظره سطح کلنی

ممکن است بصورت پودری یا بصورت 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 پرگنه آنها بسیار مشکل

است. در قارچ‌های بیماریزا تنوع رنگ کمتر است و معمولا سفیدند. تنوع رنگ مربوط به ساپروفیت‌ها است.

### وجود رنگدانه

رنگ پشت کلنی مربوط به رنگدانه‌هاست. بر اساس نوع رنگدانه تولیدی توسط قارچ، رنگ کلونی متفاوت

است.

### خواص ریزینی یا میکروسکوپی

با مشاهده میکروسکوپی قارچ‌ها، بر اساس ساختمان قارچ می‌توانید نوع قارچ را تعیین کنید. مثلا وجود

میسلیوم یا عدم وجود آن و اینکه میسلیوم دیواره عرضی دارد یا نه؟

قارچ‌ها در ساختمان خود اندام‌هایی دارند که بصورت رشته‌های درهم پیچیده می‌باشند به این اندام‌ها

میسلیوم گفته می‌شوند که این میسلیوم‌ها در دیواره خود یا دیواره عرضی دارند یا ندارند که به جنس قارچ

بستگی دارد.

هاگ قارچ‌ها نسبت به شرایط نامطلوب محیطی مقاوم بوده اما در مقایسه با هاگ باکتری‌ها، معمولا از

استحکام کمتری در برابر حرارت برخوردارند. هاگ قارچ‌ها اغلب در دمای پاستوریزاسیون غیر فعال می‌شوند.



## رنگ آمیزی کپک‌ها

### آزمایش کنید: رنگ آمیزی کپک‌ها



#### مواد و لوازم مورد نیاز:

- a لام و لامل
- a آنس

- a محلول لاکتوفنل - کاتن بلو
- a میکروسکوپ نوری
- a محیط کشت دارای کپک

#### روش انجام کار:

- برای رنگ آمیزی کپک‌ها از لاکتوفنل - کاتن بلو استفاده می‌شود.
- ۱- یک لام تمیز برداشته سپس یک قطره از محلول لاکتوفنل - کاتن بلو را روی آن بریزید.
- ۲- با نوک آنس سترون شده مقداری از پرگنه کپک را برداشته و در محلول رنگی بگذارید.
- ۳- یک عدد لامل روی آن قرار داده و چند ضربه آهسته به آن بزنید تا حباب‌های هوا از زیر آن خارج شوند.
- ۴- آن را با بزرگنمایی  $\times 10$  و  $\times 40$  میکروسکوپ مشاهده کنید و برای بررسی آن با بزرگنمایی  $\times 100$ ، یک قطره روغن سدر (ایمرسیون) روی لامل بریزید و لام را مشاهده کنید.

#### توجه کنید



در این روش نوک آنس که آغشته به پرگنه است را به آرامی در محلول رنگی قرار دهید و از هم زدن و تکان دادن آن خودداری کنید چون با این کار باعث متلاشی شدن ساختمان کپک می‌شوید. شما می‌توانید از کشت‌های کپک یک گستره روی لام تهیه کرده و آن را مستقیماً و بدون رنگ آمیزی هم زیر میکروسکوپ مشاهده کنید و رنگ آمیزی فقط بخاطر شفافیت و بهتر دیدن ساختمان کپک است.

#### گزارش کار



.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## نتیجه گیری ✓

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

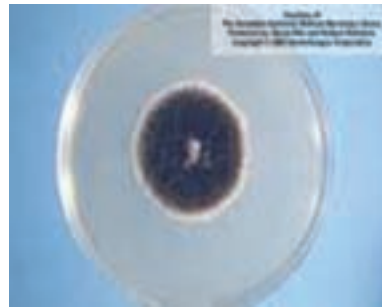
## فکر کنید

- ۱- رنگ آمیزی باکتری و کپک را مقایسه کنید و تفاوت های آن را بیان کنید.
- ۲- نقش لاکتو فنل - کاتن بلو در این رنگ آمیزی چیست؟

## انواع کپک ها کپک آلترناریا



شکل ۳-۴



شکل ۲-۴

این کپک واجد کلنی های چند سلولی و گلابی شکل می باشد که متصل به یک کنیدیوفور می باشند میسلیوم آن دارای دیواره عرضی است. در سطح محیط کشت کلنی ها، به رنگ خاکستری مایل به قهوه ای می باشند. به سرعت در سطح محیط کشت رشد می کنند و میسلیوم های هوایی آن به رنگ خاکستری بوده و خیلی متراکم نیستند. (شکل های ۲-۴ و ۳-۴)

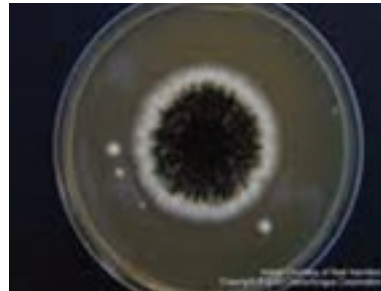


۱- Alternaria

## کپک آسپرژیلوس<sup>۱</sup>



شکل ۴-۵



شکل ۴-۴

این کپک دارای کنیدی های تک سلولی است که به صورت زنجیره ای از انتهای استریگما خارج شده است. میسیلیوم آن دارای دیواره عرضی است. ابتدا کلنی های آن به رنگ سفید تشکیل می شوند و به تدریج تغییر رنگ داده و تیره می گردند. (شکل های ۴-۴ و ۴-۵)

## کپک پنی سیلیوم<sup>۲</sup>



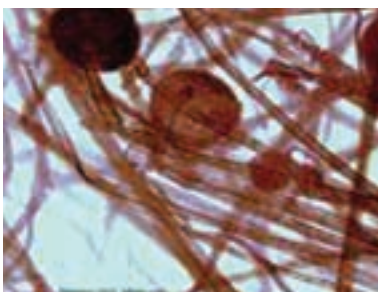
شکل ۴-۷



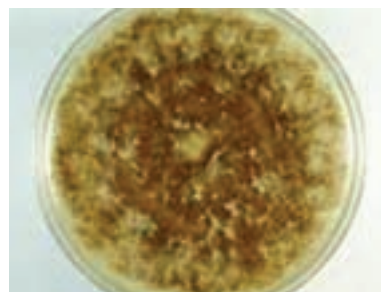
شکل ۴-۶

این کپک دارای کنیدی های تک سلولی است که به صورت زنجیره ای از انتهای استریگما خارج شده است . میسیلیوم آن دارای دیواره عرضی و کلنی های آن خاکستری تیره می باشند. (شکل های ۴-۶ و ۴-۷)

## کپک رایزوپوس<sup>۳</sup>



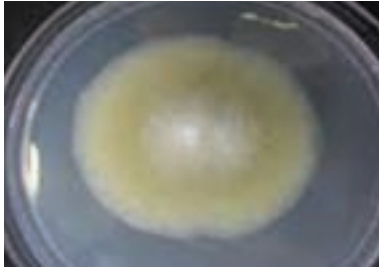
شکل ۴-۹



شکل ۴-۸



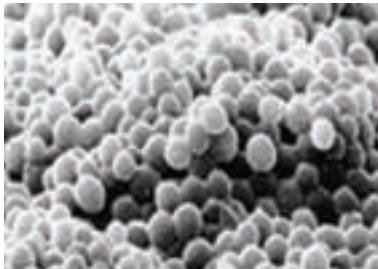
- ۱- Aspergillus
- ۲- Penicillium
- ۳- Rhizopus



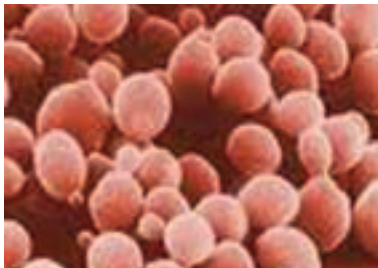
شکل ۱۰-۴



شکل ۱۱-۴



شکل ۱۲-۴



شکل ۱۳-۴



شکل ۱۴-۴

اسپوره‌های این کپک تخم مرغی شکل می باشد. میسلیوم دارای دیواره عرضی است و اسپورانژیوسپوره‌های کپک در اسپورانژیوم به صورت کیسه سیاه رنگ به نظر می رسند. این کپک در سطح محیط کشت رشد سریعی دارد، ابتدا به صورت توده سفید رنگ با حالت خزش در سطح محیط کشت رشد می کند و به سرعت تمام سطح محیط را می پوشاند به تدریج میسلیوم های هوایی آن تیره می شوند. کلنی های آن پنبه ای و کرک مانند است. (شکل های ۴-۸ و ۴-۹)

### کپک موکور<sup>۱</sup>

اسپور های تخم مرغی شکل و میسلیوم های بدون دیواره عرضی، دارای اسپورانژیوفور که به یک اسپورانژیوم کروی منتها می شوند. مانند کپک ریزوپوس ابتدا به صورت توده ای سفید رنگ ظاهر می شود. (شکل های ۴-۱۰ و ۴-۱۱)

### مخمرها

این میکروارگانیسم ها به دو دسته کلی تقسیم می شوند. (شکل های ۴-۱۲ و ۴-۱۳)

الف: مخمرهای حقیقی که به عنوان مثال می توان به جنس ساکارومایسس اشاره کرد.

ب: مخمرهای کاذب که از مهم ترین جنسهای آن جنس کاندیدا<sup>۲</sup> می باشد.

شکل زیر سلول رویشی در حال جوانه زدن یک مخمر رانشان می دهد. (شکل ۴-۱۴)



۱- Mucur  
۲- candida





## آزمایش کنید: مشاهده مخمر ساکارومایسس سرویزه آ'

### مواد و لوازم مورد نیاز:

a لام و لامل تمیز  
a آنس و پیپت پاستور سترون

a کشت ۲۴ ساعته مخمر ساکارومایسس سرویزه آ

در محیط کشت مناسب مانند گلوکز براث

### روش انجام آزمایش:

- ۱- مقدار ۲-۳ قطره از محلول گلوکز براث دارای مخمر ساکارومایسس را توسط آنس سترون و یا پیپت پاستور سترون روی سطح لام منتقل نموده و یک لامل روی آن قرار دهید.
- ۲- ابتدا با عدسی شیئی (×۱۰) و سپس با عدسی های (×۴۰) و (×۱۰۰) سلول مخمر را مورد مشاهده میکروسکوپی قرار دهید.
- ۳- سلول مخمر را با دقت از نظر وجود قسمتهایی نظیر هسته، واکوئل، گرانول، دیواره سلولی، جوانه و غیره مورد بررسی قرار دهید. مشاهدات خود را در محل مشخص شده در گزارش کار ترسیم کنید.

### گزارش کار



.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

### نتیجه گیری



.....

.....

.....

.....

.....



## A واژه های فصل چهارم

|                      |                 |
|----------------------|-----------------|
| گلوکز براث           | کپک             |
| پنی سیلیوم           | مخمر            |
| شبه مخمری            | بی هوازی        |
| پنبه‌ای              | هوازی           |
| رایزوپوس             | تخمیر قند       |
| لاکتو فنل - کاتن بلو | مزوفیل          |
| کلرامفنیکل           | سرما دوست       |
| موکور                | آسپرژیلوس       |
| هیف                  | قند ها          |
| سابرود کستروز آگار   | الکل ها         |
|                      | اسیدهای آلی     |
|                      | ساپروفیت ها     |
|                      | اسپور غیر جنسی  |
|                      | میسیلیوم        |
|                      | اسپورانژیوم     |
|                      | پاستوریزاسیون   |
|                      | اسپورانژیوفورها |
|                      | کپک الترناریا   |
|                      | کنیدی           |
|                      | کپک پنی سیلیوم  |
|                      | کنیدیوفورها     |
|                      | جنس ساکارومایسس |
|                      | استریگما        |
|                      | جنس کانایدا     |
|                      | ویزیکول         |
|                      | مخمر های کاذب   |
|                      | الترناریا       |

- ۱- عسگری، غلامحسین. ۱۳۷۶. مقایسه انواع سروتایپهای سالمونلاهای جدا شده از گوشت مرغ؛ گوساله و گوسفند مصرفی شهر تهران و بررسی الگوی مقاومت دارویی آنها، پایان نامه دکتر رشته میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس.
  - ۲- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۸۱. میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش جستجوی سالمونلا در مواد غذایی. شماره ۱۸۱۰، تجدید نظر سوم، چاپ دوم
  - ۳- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۸۳. میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- شناسایی نوکلئاز مقاوم به حرارت حاصل از استافیلوکوکوس اوریوس کوآگولار مثبت - روش آزمون. شماره ۷۶۱۲، چاپ اول.
  - ۴- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۸۳. میکروبیولوژی مواد غذایی - جستجو و شناسایی سالمونلا با استفاده از روش امپدانس. شماره ۷۷۲۷، چاپ اول.
  - ۵- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۸۴. میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- شمارش استافیلوکوکوس اوریوس کوآگولار مثبت (استافیلوکوکوس اوریوس و سایر گونه ها) - روش آزمون، قسمت اول: روش استفاده از محیط کشت برد - پارکر آگار. شماره ۱-۶۸۰۶، چاپ اول.
  - ۶- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۸۴. میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش جستجو و شمارش اشریشیا کلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی. شماره ۲۹۴۶، تجدید نظر دوم.
  - ۷- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۸۸. میکروبیولوژی مواد غذایی - ردیابی سالمونلا به روش واکنش زنجیرهای پلیمرز (PCR). شماره ۱۲۶۳۸، چاپ اول.
- 8- Amin, M., Kalantar E., Mohammad-Saeid, N., Ashan, B., 2010. Antibacterial effect and physicochemical properties of essential oil of *Zataria multiflora Boiss* Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 439-442.
- 9- Bryan, F.L., Doyle, M.P., 1995. Health risks and consequences of Salmonella and Campylobacter jejuni in raw poultry. J. Food Prot. 58, 326-344.
- 10- Burt, S., Reinders, R., 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against Escherichia coli O157:H7. J. Applied microbiology. 36, 162-167.
- 11- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. a review. International Journal of Food Microbiology, 94, 223-253.
- 12- Fazeli, M.R., Amin, A., Attari, M.M., Ashtiani, H., Jamalifar, H., Samadi, N., 2007. Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria, J. Food Control (18): 646-649.
- 13- Harborn, J.B. 1988. Introduction to ecological biochemistry. 3<sup>rd</sup> edition, London Academic Press.
- 14- Holley, R. A., & Patel, D. (2005). Review. Improvement in shelf-life and safety of

perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *J. Food Microbiology*, 22, 273-292.

15- Mahboubi, M., Ghazian Bidgoli F., 2010, Antistaphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin, *J. Phytomedicine* (17) 548 -550.

16- Moosavy, M.H., Akhondzadeh Basti, A., Misaghi, A., Zahraei Salehi, T., Abbasifar, R., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., Alopour, M., Razavi, N.E., Gandomi, H., 2008. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membranes. *J. Food Research International* 41, 1050-1057.

17- Nejad Ebrahimi, S., Hadian, J., Mirjalali M.H., Sonboli, A., Yousefzadi, M., 2008. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages, *J. Food Chemistry* 110, 927-931.

18- Ntzimani, G.A., Gitrakou, I.V., Savvaidis, N.I., 2010. Combined natural antimicrobial treatments (EDTA, lysozyme, rosemary and oregano oil) on semi cooked coated chicken meat stored in vacuum packages at 4°C: Microbiological and sensory evaluation, *J. Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11, 187-196.

19- Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., Decadteli, L., Mioni, R., Scuota, S., Bolzoni, G., Giannatale, E.D., Salinetti, A. P., La Salandra, G., Bartoli, M., Zuccon, F., Pirino, T., Sias, S., Parisi, A., Quaglia N. C., Celano' G. V., 2005. Coagulase positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy, *International Journal of Food Microbiology*, 98, 73-79.

20- Oussalah, M., Caileet, S., Saucier L. and Lacroix, M., 2005. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli O157: H7*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Control* 18(5): 414-420.

21- Piggot, P.J., 2009. *Bacillus Stbtilis*, Temple University School of Medicine, Philadelphia, PA, USA.

22- Saei-Dehkordi, S.S., Tajik, H., Moradi, M., Khalighi-Sigaroodi, F., 2010. Chemical composition of essential oils in *Zataria multiflora* Boiss. from different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity, *J. Food and Chemical Toxicology* 48, 1562-1567.

23- Sharififar, F., Moshafi, M.H., Mansouri, S.H., Khodashenas, M., Khoshnoodi, M., 2007. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control* 18, 800-805.

24- Solmakos, N., Govaris, A., Koidis, P., Botsoglou, N., 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *J. Food Microbiol.* 25(1), 120-127.

