بسم الله الرحمن الرحیم

# کتاب کار میکروبیولوژی

## شاخهٔ : فنی و حرفه‌ای

## زمینهٔ : امور دامی

## گروه تحصیلی : کشاورزی


| | | |
|---|---|---|
| عنوان و نام پدیدآور | : | شریفان، انوشه، ۱۳۵۹<br>کتاب کار میکروبیولوژی رشتهٔ امور دامی/ مؤلفان : انوشه شریفیان، سعید بدیعی اردستانی؛ برنامه‌ریزی محتوا و نظارت بر تألیف : دفتر تألیف کتاب‌های درسی فنی و حرفه‌ای و کاردانش |
| مشخصات نشر | : | تهران : شرکت چاپ و نشر کتاب‌های درسی ایران، ۱۳۹۲ |
| مشخصات ظاهری | : | ۹۲ص :۲۲×۲۹ س م |
| شابک | : | ۵ـ۲۱۷۵ـ۵ ـ۹۶۴ـ ۹۷۸ |
| موضوع | : | ۱ـ میکروب شناسی، ۲ـ میکروب شناسی ـ آزمایشگاه |
| شناسه افزوده | : | بدیعی اردستانی، سعید ـ الف ـ سازمان پژوهش و برنامه‌ریزی آموزشی. ب ـ دفتر تألیف کتاب‌های درسی فنی و حرفه‌ای |
| | : | و کاردانش. ج ـ ادارهٔ کل نظارت بر نشر و توزیع مواد آموزشی |
| رده‌بندی کنگره | | ۱۳۹ ۲ک۴ش/۴۱ QR |
| رده‌بندی دیویی | : | ۵۷۹ |
| شمارهٔ کتاب‌شناسی ملی | : | ۲۳۴۴۲۸۴ |


۱۳۹۲

**همکاران محترم و دانش‌آموزان عزیز :**

**پیشنهادات و نظرات خود را دربارهٔ محتوای این کتاب به نشانی تهران ـ صندوق پستی شمارهٔ ۴۸۷۴/۱۵ دفتر تألیف کتاب‌های درسی فنی و حرفه‌ای و کاردانش، ارسال فرمایند.**

**پیام‌نگار (ایمیل)** **tvoccd@roshd.ir**

**وب‌گاه (وب سایت)** **www.tvoccd.medu ir**

محتوای این کتاب در کمیسیون تخصصی رشتهٔ امور دام و طیور دفتر تألیف کتاب‌های درسی فنی و حرفه‌ای و کار دانش با عضویت : سیروس اشیدری، سعید بدیعی اردستانی، جهانشاه ایرانپور، عزت اللّه شجاعی و شهرزاد جزء قاسمی تأیید شده است


**وزارت آموزش و پرورش**

**سازمان پژوهش و برنامه‌ریزی آموزشی**

برنامه‌ریزی محتوا و نظارت بر تألیف : **دفتر تألیف کتاب‌های درسی فنی و حرفه‌ای و کاردانش**

نام کتاب : **کتاب کار میکروبیولوژی ـ ۳۵۸/۷۵**

مؤلفان : **انوشه شریفیان، سعید بدیعی اردستانی**

نظارت بر چاپ و توزیع : **ادارهٔ کلّ نظارت بر نشر و توزیع مواد آموزشی**

**تهران : خیابان ایرانشهر شمالی ـ ساختمان شمارهٔ ۴ آموزش و پرورش(شهید موسوی)**

**تلفن : ۹ـ۸۸۸۳۱۱۶۱، دورنگار : ۸۸۳۰۹۲۶۶ ، کدپستی : ۱۵۸۴۷۴۷۳۵۹،**

**وب‌سایت : www.chap.sch.ir**

مدیر هنری : **مژگان اصلانی**

صفحه‌آرا : **رامین سرافراز**

طراح جلد : **محمدحسن معماری**

ناشر : **شرکت چاپ و نشر کتاب‌های درسی ایران : تهران ـ کیلومتر ۱۷ جادّهٔ مخصوص کرج ـ خیابان ۶۱ (دارو پخش)**

**تلفن : ۵ ـ ۴۴۹۸۵۱۶۱، دورنگار : ۴۴۹۸۵۱۶۰، صندوق پستی : ۱۳۹ـ ۳۷۵۱۵**

نوبت و سال چاپ : **چاپ اوّل برای سازمان ۱۳۹۲**

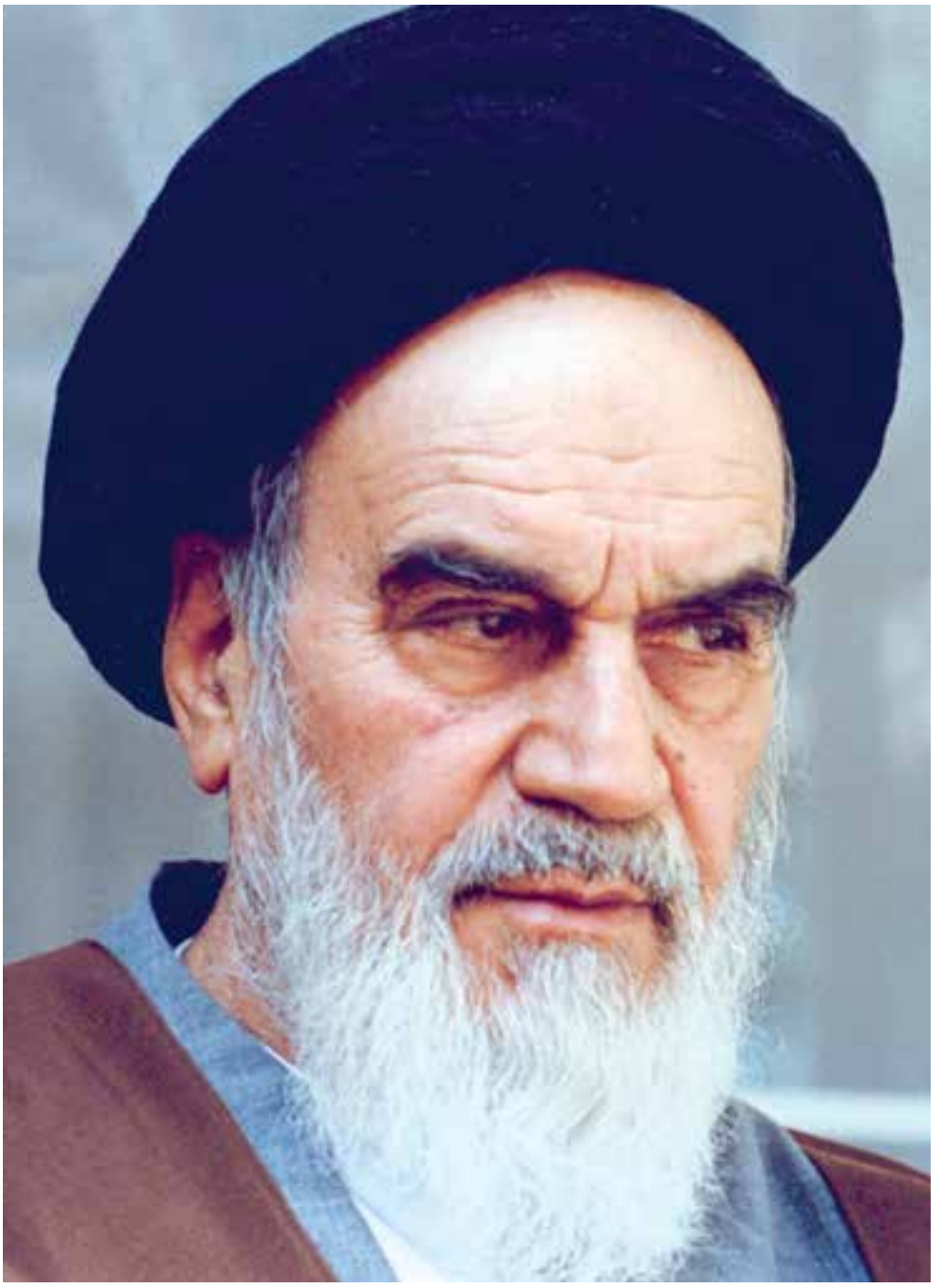
چاپخانه : **نادر**



**حقّ چاپ محفوظ است.**



**شابک ۵-۲۱۷۵-۰۵-۹۶۴-۹۷۸** **ISBN 978-964-05-2175-5**



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

**امام خمینی(ره)**

# فهـــــرست


**فصل اول**

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

**فصل دوم**

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

۱ . رنگ آمیزی کریستال ویوله (ساده) ..... ۵۴
۲ . رنگ‌آمیزی گرم ..... ۵۶
۳ . رنگ‌آمیزی کپسول ..... ۵۸
۴ . رنگ‌آمیزی اسپور ..... ۶۰
رقیق کردن و کشت دادن نمونه‌های مختلف ..... ۶۲
بررسی میزان آلودگی نمونه شیر ..... ۶۳
شمارش تعداد پرگنه (کلنی) ها و دستگاه پرگنه شمار ..... ۶۵
شمارش باکتری‌ها ..... ۶۶
شمارش باکتری‌ها به کمک کاغذ صافی ..... ۶۹
شمارش باکتری‌ها به روش شمارش مستقیم ..... ۷۱
واژه‌های فصل دوم ..... ۷۲

فصل سوم
ویروس‌ها ..... ۷۳
میزبان ویروس‌ها ..... ۷۴
ساختمان شیمیایی ویروس ..... ۷۴
اسید نوکلئیک ..... ۷۴
کپسید ..... ۷۴
پوشش غیر پروتیینی ..... ۷۵
ویروس‌های ناقص ..... ۷۵
ویریون ..... ۷۵
ویرویید ..... ۷۵
ویروسهای گیاهی ..... ۷۶
ویروسهای جانوری ..... ۷۶
تکثیر ویروس‌ها ..... ۷۷
واژه‌های فصل سوم ..... ۷۸

فصل چهارم
قارچ‌ها ..... ۷۹
شکل ظاهری قارچ‌ها ..... ۸۰
کشت کپک‌ها ..... ۸۲
خواص ظاهری کپک‌ها ..... ۸۴
میزان رشد قارچ ..... ۸۴
منظره سطح کلنی ..... ۸۴
رنگ کلنی ..... ۸۴
وجود رنگدانه ..... ۸۴
خواص ریزبینی یا میکروسکوپی ..... ۸۴
رنگ‌آمیزی کپک‌ها ..... ۸۵
انواع کپک‌ها ..... ۸۶
مخمرها ..... ۸۸
واژه‌های فصل چهارم ..... ۹۰
منابع ..... ۹۱

## مقدمه

امروزه اهمیت و نقش میکروارگانیسم‌ها در رابطه با حیات و فعالیت‌های انسانی به خوبی شناخته شده است. اگر چه در گذشته تصور می شد که میکروارگانیسم‌ها تنها سبب آلودگی ، فساد و ایجاد بیماری می‌باشند ، امادر 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 آن ها برای حذف آلودگی‌های خطرناک و مواد شیمیایی سرطان‌زا ، تصفیه آب و فاضلاب ونیز 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 می گیرد .بعدازآن ضمن معرفی کلی میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها ، روش‌های متداول جهت شناسایی و تعیین برخی از میکروارگانیسم‌های شاخص ارائه می گردد . 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 می تواند 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 ارایه 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 می گیرد.

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

۱

# فصـــــل اول

## آزمایشـــــگاه میکروبیولـــــژی

## 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. کارکردن 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 به‌عمل 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 آن ها 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 سروکار 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 میکروب شناسی 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 می گردد:

### 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. (شکل های ۱–۱ تا ۱–۴)

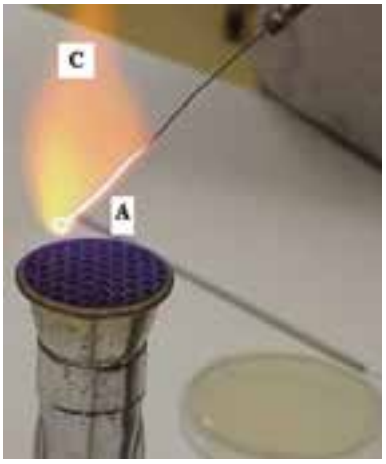
شکل ۱–۱

شکل ۲–۱

شکل ۳–۱

شکل ۴–۱

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 ۵–۱)




شکل ۵–۱

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 ۶–۱ تا ۱۱–۱)

شکل ۶–۱

شکل ۷–۱

شکل ۸–۱

شکل ۹–۱

شکل ۱۰–۱

شکل ۱۱–۱

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

شکل ۱۲–۱

شکل ۱۳–۱

شکل ۱۴–۱

۵- در استفاده صحیح از پیپت ، سرنگ و سوزن کشت باید سعی و دقت شود. (شکل‌های ۱۲–۱ تا ۱۴–۱)

۶ - در صورتی که کشت‌های 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 می‌شوند 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 کشت‌ها 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 قارچ‌ها 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- درمحل خروج هوا ، بوسیله هواکش‌های آزمایشگاه ، صافی نصب شود.

۹- در هنگام استفاده از سانتریفوژ ومخلوط 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 وآشامیدن خودداری نمائید.

۲- دستان خود را مرتب با آب و صابون و مواد ضدعفونی کننده شستشو دهید. قلم ، کاغذ و انگشتان خود را در محل آزمایشگاه به داخل دهان خود نبرید و برای چسباندن بر چسب ها از آب دهان استفاده نکنید. (شکل های ۱۵-۱ و ۱۶-۱)

شکل ۱۵-۱

شکل ۱۶-۱

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

۴- نمونه های وارد شده به آزمایشگاه حاوی تعداد و انواع نامشخصی از میکروارگانیسم ها هستند که باید خطر آن‌ها را بالقوه در نظر گرفت ، لذا برای دریافت نمونه، بهتر است محل جداگانه ای در نظر گرفته شود. این محل می تواند قسمتی از اتاق آزمایشگاه باشد که به قدر کافی روشن است ونیز 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 ۱۷-۱

۵- کلیه پتری دیش ها و ظروف کشت باید قبل از آزمایش سترون شوند و ظروف حاوی کشت میکروارگانیسم ها باید به طور روشن و واضح بر چسب گذاری شود و اگر بعد از کشت دادن در پلیت‌ها بخار آب جمع شود ، در حمل‌ونقل آن‌ها باید کمال دقت مبذول شود زیرا یک منبع آلودگی بالقوه می‌باشد.

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 بی‌رویه و مکرر افراد به داخل آزمایشگاه جلوگیری شود ، افرادی که دارای آلودگی‌های شدید در نواحی دست و صورت هستند نباید در انجام آزمایشات میکروب‌شناسی 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 میکروارگانیسم زنده را داخل دستشویی نریزید.

۲- از انتشار میکروب‌ها 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 بی‌رویه مواد خودداری نمایید.

## فکر کنید

۱. چرا در آزمایشگاه میکروبیولوژی رعایت قوانین و مقررات بهداشتی ، ایمنی و زیست محیطی ضروری است؟

۲. چنانچه کشت‌های 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 میکروارگانیسم‌های زنده را داخل دستشویی ریخت؟

۴. برای سترون‌سازی 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 دستگاه های زیر می باشد :

**۱– هودهای بیولوژیک**[۱] (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. (شکل های ۱۹–۱ تا ۲۱–۱)

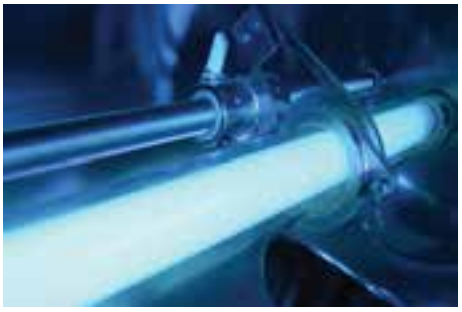
شکل ۱۹–۱

شکل ۲۰–۱

شکل ۲۱–۱

## ۲– لامپ‌های ماوراء بنفش[۲] (جهت کاهش آلودگی محیط ):

از لامپ ماوراء بنفش فقط در زمانی استفاده می‌شود که کسی در محل حضور نداشته باشد . مواد شیمیایی وبیولوژیکی 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 ۲۲–۱)



شکل ۲۲–۱

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

## ۳– اتوکلاو[1]:

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 ظرفیت‌های مختلف باشد . (شکل های ۲۳–۱ تا ۲۷–۱)

شکل ۲۳–۱

**شرایط سترون کردن با اتوکلاو :** دستگاه با فشار psi ۱۵(پوند بر اینچ مربع یا $10^5$ نیوتن بر هر متر مربع) ، درجه حرارت $^{oc}$۱۲۱ و زمان ۲۰–۱۵ دقیقه ، کلیه موجودات زنده را از بین می‌برد و جسم را سترون می کند.

### توجه کنید

این شرایط برای سترون کردن نمونه‌هایی 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 اندازه‌ای 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.

۱– Autoclave

- در هنگام انتقال فلاسک‌های حاوی محیط‌های کشت میکروبی یا محلول های 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.
- توجه شود که درب دستگاه به طور کامل بسته شده باشد.
- 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).
- دستگاه را روشن کرده و ترموستات آن را روی حداکثر قرار دهید.
- 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) .
- 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 می توان 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.
- 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 .

## آزمایش کنید : سترون کردن محیط کشت با اتوکلاو

### مواد و لوازم مورد نیاز:

- اتو کلاو
- یک نمونه محیط کشت پودری شکل
- آب مقطر
- ارلن
- فویل و پنبه
- همزن مکانیکی
- فویل و پنبه سترون

### روش انجام آزمایش:

۱– محیط‌های کشت میکروبی اکثرا به صورت پودری شکل می‌باشد؛ جهت آماده‌سازی آن‌ها قبل از فرایند سترون کردن؛ لازم است ابتدا مطابق دستورالعمل نوشته شده بر روی قوطی محیط کشت؛ مقدار مناسب از آن‌را وزن نموده و با حجم مشخص از آب مقطر مخلوط نمود.

۲– جهت حل شدن مناسب پودر در آب از تکان دهنده مکانیکی استفاده کنید.

۳– درب ارلن را با فویل و پنبه سترون کاملا مسدود نمایید.

۴– مطابق دستوالعمل گفته شده در صفحات قبل محیط کشت را در داخل اتوکلاو سترون نمایید.

## گزارش کار

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## نتیجه گیری

.....

.....

## فکر کنید

۱- چرا جهت سترون نمودن محیط های 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 اتوکلاوسترون 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 ۱-۲۴

شکل ۱-۲۵

شکل ۱-۲۶

شکل ۱-۲۷

## ۴– گرمخانه (اینکوباتور) :

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

انواع گرمخانه‌ها عبارتند از :

- گرمخانه معمولی
- گرمخانه بی‌هوازی
- گرمخانه یخچال‌دار .

### رعایت کنید

در هنگام کار با دستگاه گرمخانه (اینکوباتور):

- ابتدا دمای مورد نظر(متناسب با نوع میکروارگانیسم و دمای لازم برای رشد آن) با استفاده از ترموستات دستگاه تنظیم می‌شود.
- دمای داخل گرمخانه نباید از حد $^{oc}$ ۱± تغییر نماید . برای تنظیم و تعادل دمای مورد نظر لازم است دو بار در روز، یکبار صبح در ابتدای شروع کار که درب دستگاه، ساعت ها بسته بوده است و یک مرتبه در پایان کار به کمک یک دماسنج دقیق دمای گرمخانه کنترل گردد.
- گرمخانه باید به صورتی پرشود 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.
- برای جلوگیری از تجمع رطوبت زیاد در دستگاه دریچه 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.)
- برای جلوگیری از تغییرات دمای دستگاه لازم است از باز کردن زیاد درب آن خود داری شود.
- برای جلوگیری از تجمع آلودگی‌ها در دستگاه ، طی فاصله‌های زمانی معین با مواد ضدعفونی کننده، فضای داخل دستگاه تمیز وضد عفونی شود.

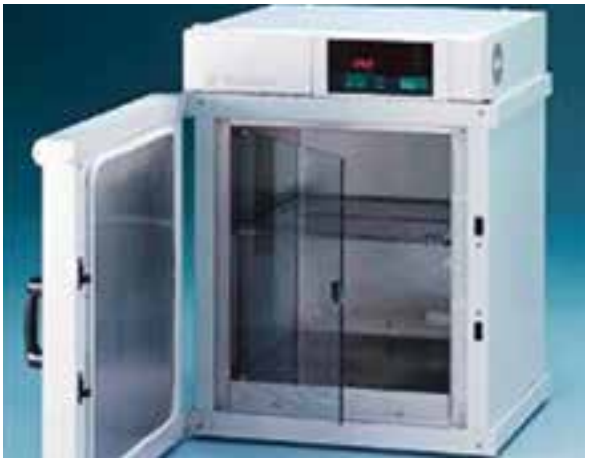
## مقایسه کنید

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

شکل ۱–۲۸

شکل ۱–۲۹

شکل ۱–۳۰



شکل ۱–۳۱

شکل ۱–۳۲

## ۵– حمام آب‌گرم[۱]:

حمام آب‌گرم 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 ۳۳–۱ تا ۳۵–۱)

### رعایت کنید

نکات مهم در استفاده از حمام آب‌گرم :

- 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 .
- 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 .
- 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 آب‌گرم اشاره شده است. حمام آب‌گرم آزمایشگاه هنرستان خود را با آن‌ها مقایسه کنید.

شکل ۳۳–۱

شکل ۳۴–۱

شکل ۳۵–۱

۱– Water Bath

## ۶– یخچال :

برای خنک نگه داشتن نمونه‌ها و محیط های کشت از دمای $^{oc}$ ۴+ استفاده می‌شود . دمای یخچال باید به گونه‌ای تنظیم شود که از انجماد محیط‌های کشت ، آنتی‌سرم ها و نمونه‌ها جلوگیری شود. (شکل‌های ۳۶–۱ تا ۳۹–۱)

### رعایت کنید

لازم است از قرار دادن چیزهای متفرقه در یخچال آزمایشگاه میکروب‌شناسی 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 ۳۶–۱

شکل ۳۷–۱

شکل ۳۸–۱

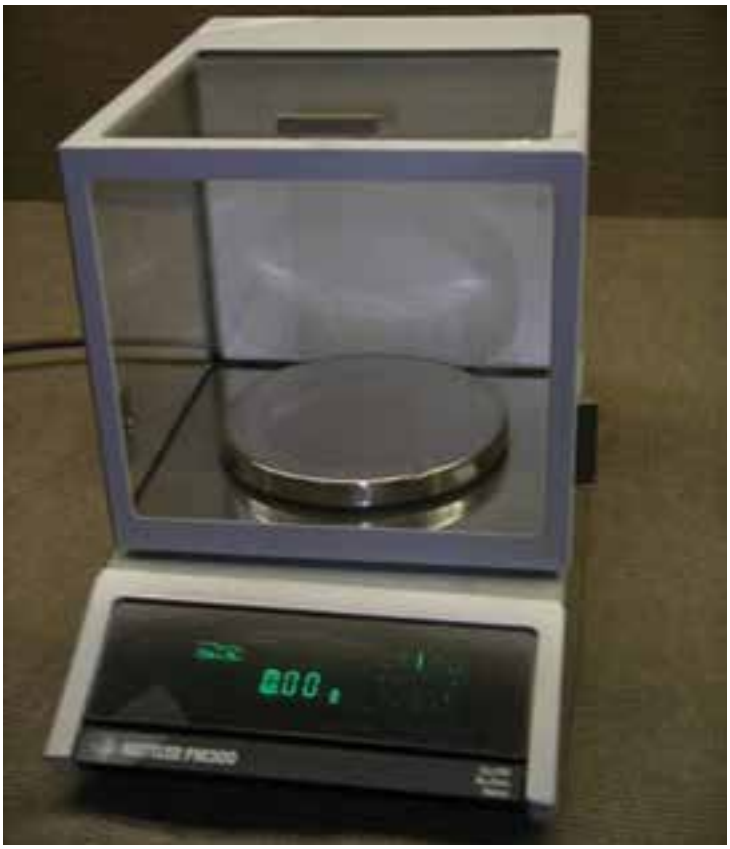
شکل ۳۹–۱

## ۷– ترازو :

در آزمایشگاه از ترازوهای مختلف جهت توزین نمونه ها، پودر محیط های 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 ۴۰–۱)

### رعایت کنید

- 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 .
- لازم است ترازوها دور از جریان هوا ورفت وآمد و به صورت تراز قرار گیرند تا میزان خطای دستگاه کاهش یابد.



شکل ۴۰–۱

## آزمایش کنید : توزین نمونه‌های آزمایشی

### مواد و لوازم مورد نیاز:

a از طرف مسئول آزمایشگاه در اختیار هنر آموز قرار می گیرد.

### روش انجام آزمایش:

چند نمونه از موادی که مسئول آزمایشگاه در اختیار شما می گذارد ، 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 تکرار ۲ | | | | | |
| جرم جسم تکرار ۳ | | | | | |

.....

.....

.....

.....

.....

.....

### نتیجه گیری

.....

.....

.....

## ۸– تکان دهنده مکانیکی[۱]:

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. (شکل‌های ۴۱–۱ و ۴۲–۱)

شکل ۴۱–۱

شکل ۴۲–۱

## 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[۲] و عدسی های شیئی[۳] با بزرگ نمایی های مختلف (که حاصل ضرب درشت نمایی آن ها تعیین کننده بزرگ نمایی کل می باشد) تشکیل شده است .

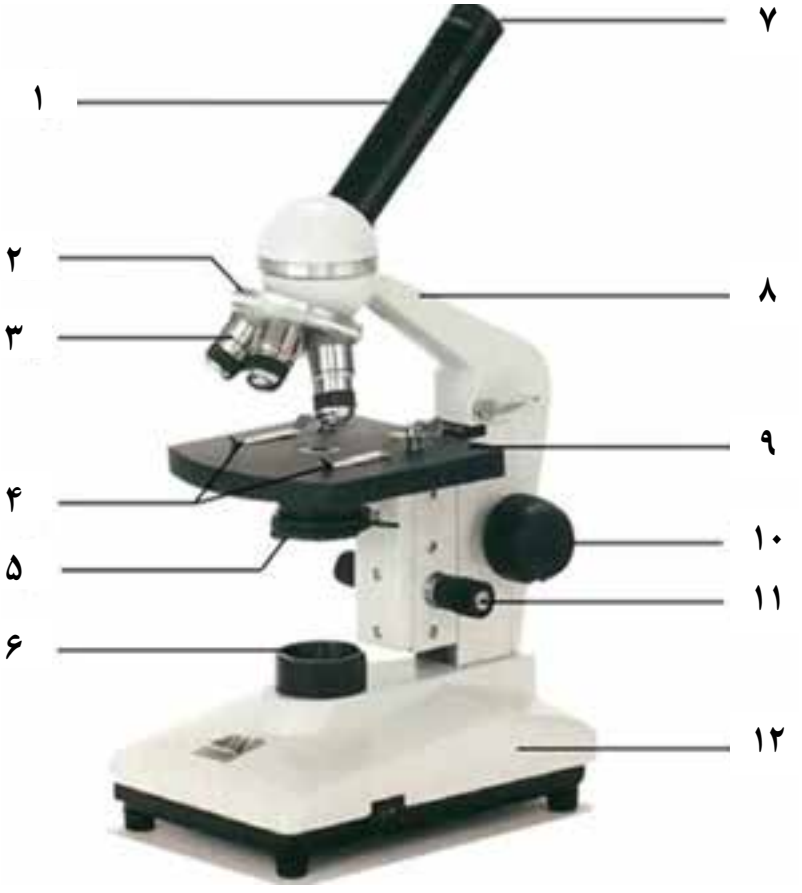
عدسی های چشمی بر دونوع می باشند . عدسی چشمی معمولی[۴] برای استفاده با عدسی های شیئی اکروماتیک[۵] یا برون رنگ و عدسی های هویژنیان[۶] برای استفاده با عدسی های شیئی رنگی اپواکروماتیک[۷] یا رنگی مورد نظر می باشند. لوله ثابت کننده عدسی چشمی[۸] به طول معمول ۶۰ میلیمتر است که در میکروسکوپ دو چشمی از طریق یک 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[1] (۱۰۰×) می باشد . در زیر صفحه گردان عدسی‌های شیئی ، صفحه مربع شکل با گیره مخصوص برای قرار دادن لام (اسلاید) وجود دارد . این صفحه را می‌توان با پیچ‌های 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 عدسی‌های شیئی با اسلاید ، پیچ‌های تنظیم بزرگ و کوچک در روی بازو (بدنه) میکروسکوپ تعبیه شده است. که با استفاده از آن‌ها می‌توان فاصله مورد نظر را در حد کم وزیاد تغییر داد. در زیر صفحه جای لام (اسلاید) به ترتیب کندانسور ، دیافراگم ، آیینه و لامپ میکروسکوپ قرار دارد . نور متصاعد شده از منبع نور (لامپ) و آیینه پس از گذشتن از دیافراگم و کندانسور به شیئ مورد نظر در سطح لام و سپس عدسی‌های شیئی و چشمی انعکاس می‌یابد . تمام قسمت‌های یک میکروسکوپ بر روی پایه مخصوص قرار دارد .

## تکمیل کنید:

۱ ..... عدسی چشمی
۲ ..... عدسی شیی
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 ۴۳–۱

۱– Oil – Immersion

## رعایت کنید

در هنگام استفاده از میکروسکوپ:

- تهیه دقیق و مناسب نمونه، بررسی میکروسکوپی را ساده‌تر می کند .
- متناسب با نوع نمونه تهیه شده و دقت مورد نظر باید لنز مناسب انتخاب شود .
- تنظیم نور دستگاه نیز متناسب با نمونه تهیه شده انجام می‌شود . برای مثال در نمونه‌هایی که رنگ‌آمیزی نشده و یا کم رنگ هستند باید از نور کم استفاده شود و در نمونه‌های ضخیم و پر رنگ باید از حداکثر شدت نور استفاده شود .
- برای بدست آوردن تصویر مناسب از لام ، عدسی‌های شیئی باید هر کدام در فواصل معینی قرار داشته باشند . میزان فاصله (۳/۲ ×) با لام برابر با ۲۳ میلیمتر ، عدسی شیئی (۱۰ ×) با لام معادل ۵ میلیمتر ، عدسی شیئی (۴۰×) با لام برابر با ۱/۲ – ۱ میلیمتر ، عدسی شیئی (۱۰۰×) برابر با ۰/۹ میلیمتر است.
- در استفاده از عدسی (۱۰۰×) حتماً لازم است برای ایجاد تصویر واضح از یک قطره روغن ایمرسیون استفاده شود .
- جهت تنظیم میکروسکوپ ابتدا لام را روی صفحه میکروسکوپ داخل گیره آن قرار داده سپس با پیچ‌های حرکت دهنده لام را طوری روی صفحه میزان کنید که شعاع نور از وسط گسترش (نمونه) بگذرد . در بررسی با عدسی (۱۰۰×) 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 .

## هـــشدار

هرگز قبل از دیدن تصویر واضح با پیچ‌های 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 می باشد .

### مواد و لوازم مورد نیاز:

- میکروسکوپ
- لام (اسلاید) و لامل
- روغن سدر(روغن ایمرسیون)
- محیط کشت دارای مخمر
- لوله آزمایش
- آنس حلقوی

### روش انجام آزمایش :

۱- 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.

۲- با اتصال دو شاخه و چرخاندن کلید ، لامپ میکروسکوپ را روشن نمائید .

۳- 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 .

۴- شکل و اندازه سلول مخمر را با استفاده از عدسی شیئی با بزرگ نمایی (۱۰×) مورد مشاهده قرار دهید.

۵- 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.

۶- در صورتی که وقت اجازه دهد می توانید 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 .

## گزارش کار

## نتیجه گیری

## فکر کنید

۱- آیا با مشاهده میکروارگانیسم‌ها در زیر میکروسکوپ می‌توان به زنده یا مرده بودن آن‌ها پی‌برد؟

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[1] ( فور)

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

## رعایت کنید

وسایل و ظروفی که باید سترون شوند کاملاً تمیز و خشک بوده وقبل 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 ۴۴-۱

شکل ۴۵-۱

شکل ۴۶-۱

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 راحت‌تر پلیت‌ها تعبیه شده است. (شکل‌های ۱–۴۷ تا ۱–۵۰)

### رعایت کنید

در زمان استفاده از دستگاه :

- مشخصات پشت پلیت‌ها پس از ثبت آن‌ها در دفتر کار باید به طور کامل پاک گردد.
- 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 راحت‌تر است.
- با استفاده از درشت نمایی ذره بین، روشنایی ایجاد شده با منبع نوری و با کمک گرفتن از خطوط صفحه شطرنجی به شمارش ردیف به ردیف پرگنه‌ها اقدام کنید.
- به منظور جلوگیری از گسترش آلودگی بر روی دستگاه بعد از هر بار استفاده، با مواد ضدعفونی کننده مناسب مانند الکل ۷۰ درجه، سطح دستگاه را تمیز و ضدعفونی کنید.

تصاویر چند نمونه دستگاه پرگنه شمار نشان داده شده است.

شکل ۱–۴۷

شکل ۱–۴۸

شکل ۱–۴۹

شکل ۱–۵۰

# معرفی برخی از ظروف آزمایشگاه میکروبیولوژی

## ۱– پیپت :

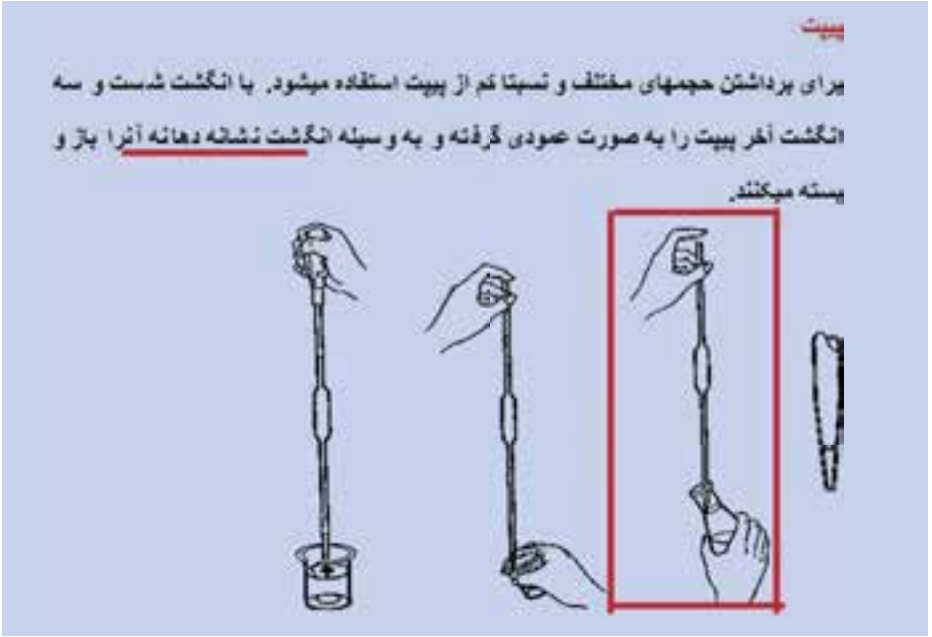
**الف ) پیپت شیر :** این پیپت‌ها فقط به منظور آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی و برای برداشت و انتقال ۰/۰۱ میلی‌لیتر شیر ، تنظیم ودرجه بندی شده است وقطر نوک آن مشابه پیپت های معمولی مدرج است و با اولین خط ۴۰ تا ۶۰ میلی‌متر فاصله دارد. (شکل‌های ۵۱–۱ تا ۵۳–۱)

**ب ) پیپت‌های شیشه‌ای وپلاستیکی :** 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 می کند مقدار یک میلی‌لیتر با اختلاف ۰/۰۳۵±میلی‌لیتر است . این در حالی است که آخرین قطره شیر رقیق نشده موجود در پیپت رامی توانید با دمیدن در پیپت خارج کنید .

شکل ۵۱–۱

شکل ۵۲–۱

شکل ۵۳–۱



## استفاده از پیپت

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

## رعایت کنید

- وقتی می خواهید یک پیپت را از جا پیپت درآورید 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 می توان آنرا براحتی بیرون آورد.
- پس از برداشتن پیپت در پوش جا پیپتی را بگذارید تا بقیه پیپت‌ها سترون بمانند .
- بدنه پیپت را با انگشتتان نگیرید وقبل 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 .
- برای کشیدن محلول به پیپت ، همیشه از یک مکنده مکانیکی استفاده کنید .
- اگر سه پیپت نیاز است ، آن ها را یکی‌یکی از جا پیپتی در آورید .
- وقتی کارتان با پیپت تمام شد آن را در داخل ظرف حاوی مایع ضدعفونی کننده قرار دهید . در انتهای کار ، پیپت‌های قابل شستشو را شسته، سترون کنید وپیپت های یک بار مصرف را دور بریزید .

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

### مواد و لوازم مورد نیاز :

- پیپت در حجم‌های مختلف
- بشر
- ترازوی آزمایشگاه
- آب بهداشتی

### 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 قبلا وزن آن را بدست آورده‌اید و از ترازوی آزمایشگاه بهره ببرید.

## گزارش کار

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## نتیجه گیری

.....

.....

.....

## توجه کنید

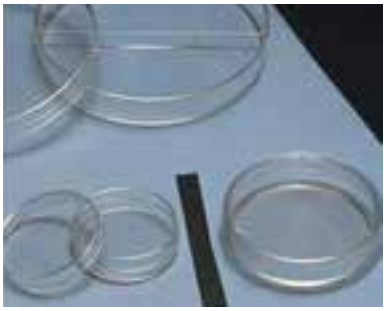
در انتهای بالایی پیپت‌ها یک یا دو خط دایره‌ای دیده می‌شود که مفهوم آن این است که در صورتی که یک خط وجود داشته باشد می‌بایست با دمیدن داخل پیپت باقی مانده مایع را خارج ساخت و مورد محاسبه قرار داد و در صورتی که دو خط وجود داشته باشد، باقی مانده مایع داخل پیپت مورد محاسبه قرار نمی گیرد.

## 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 استوانه ای شکل ویژه‌ای که از فولاد ضد زنگ یا آلومینیوم شکل تشکیل شده است قرار می‌دهند (ظرف مخصوص پیپت).

**۲– پتری‌دیش (پلیت[1]) :** 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 ۵۴–۱ تا ۵۶–۱)

شکل ۵۴–۱



شکل ۵۵–۱

شکل ۵۶–۱

**۳– سرنگ فلزی :** به منظور انتقال حجم معینی از مایعات مورد استفاده قرار می گیرد . این سرنگ‌ها دارای یک میله فلزی حساس نیمه خودکار و یک پیستون مناسب از جنس فولاد ضد زنگ می‌باشند.

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

شکل ۵۷–۱

شکل ۵۸–۱

شکل ۵۹–۱

شکل ۶۰–۱

شکل ۶۱–۱

شکل ۶۲–۱

۱– Petri – Dished «Plate»

## 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 ؟

## واژه های فصل اول

دستور العمل های بهداشتی

دستورالعمل های ایمنی

میکروبیولوژی

هودهای بیولوژیک

اتوکلاو

گرمخانه(اینکوباتور)

حمام آب گرم

یخچال

ترازو

تکان دهنده مکانیکی

میکروسکوپ

آون (فور)

دستگاه پرگنه شمار

پیپت

پتری‌دیش

سرنگ فلزی

ارلن

بشر

بالن ژوژه

استوانه مدرج

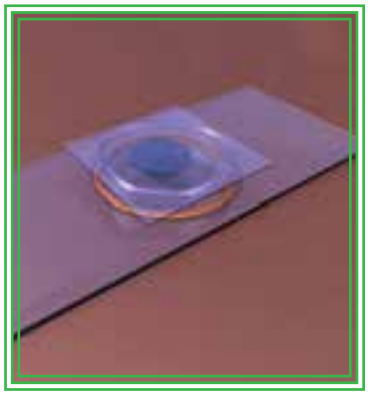
میله شیشه‌ای

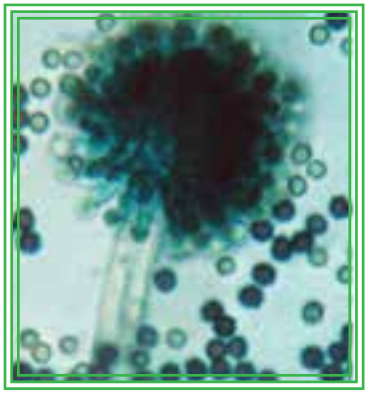
لام

لامل

# فصل دوم

## باکتری‌ها



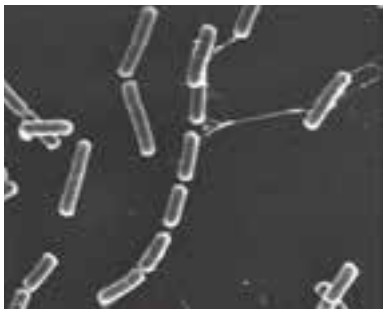


باکتری‌ها متنوع‌ترین و مهم‌ترین نوع میکروارگانیسم‌ها تلقی می‌شوند . تعدادی از آن‌ها برای انسان و حیوانات بیماریزا بوده اما به طور کلی بدون فعالیت آن‌ها حیات بر روی زمین مختل می گردد . دانشمندان به طور یقین اطمینان دارند موجودات زنده تکامل یافته یا یوکاریوت[1]ها ، از موجودات زنده باکتری مانند به وجود آمده اند . با توجه به اینکه باکتری‌ها ساختار ساده‌ای داشته و می توان به آسانی آن‌ها را در شرایط آزمایشگاهی کشت داد ، لذا ، میکروب‌شناسان مطالعات وسیعی درباره شکل سلول ، ساختمان آن‌ها ، و نیز فرآیندهای حیاتی سلول باکتری انجام داده‌اند .

## شکل باکتری‌ها[2]

باکتری‌ها از نظر شکل ظاهری به سه گروه تقسیم می‌شوند :

**۱ باسیلی یا استوانه‌ای شکل**[3] (شکل‌های ۱-۲ و ۲-۲)



شکل ۱-۲

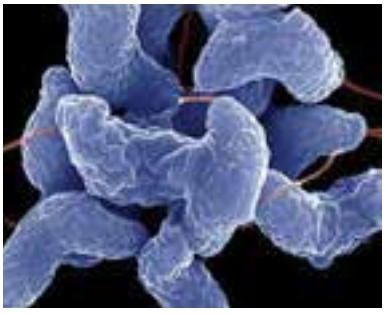
شکل ۲-۲

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

**۱-۱** باسیلی با انتهای گرد. مانند : اشرشیاکلی[4] ، ائروباکتر اروجنس[5]

**۱-۲** باسیلی با انتهای صاف. مانند : باسیلوس مگاتریوم[6]

**۱-۳** برخی از باکتری‌های باسیل مانند، به صورت خمیده می‌باشند (شکل ۳-۲)، به این باکتری‌ها ویبریون[7] می گویند . مانند : ویبریو کوما[8]



شکل ۳-۲

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

## ۲ مارپیچی[۱] :

a این باکتری‌ها مارپیچی شکل می‌باشند و اندازه آن‌ها متفاوت است. مانند: تریپونما پالیدوم[۲](شکل ۴-۲)

شکل ۴-۲

## ۳ کوکسی یا کروی شکل[۳] :

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

شکل ۵-۲

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 ویژه ای می یابند . باکتری‌هایی که در یک سطح تقسیم می‌شوند تشکیل زنجیره های 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[۵]

این باکتری‌ها به صورت خوشه‌ای (تجمعی) در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند مانند استافیلوکوکوس اورئوس[۶](شکل ۶-۲)

شکل ۶-۲

### a استرپتوکوک

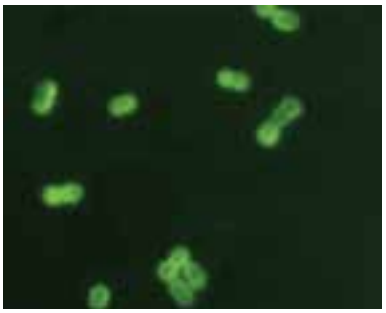
این باکتری‌ها به صورت زنجیره‌ای شکل در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند مانند : استرپتوکوکوس فکالیس[۸](شکل ۷-۲)

شکل ۷-۲

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

### a دیپلوکوک[1]

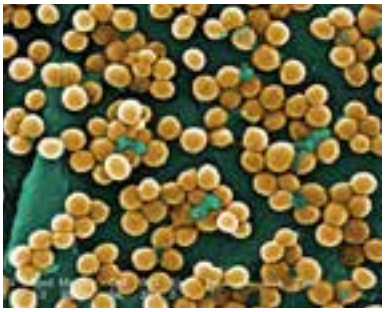
این باکتری‌ها به طور عمده به شکل دوتایی در کنار یکدیگر قرارمی گیرند ، مانند : دیپلوکوک نمونیا[2] (شکل ۸-۲)



شکل ۸-۲

### a سارسینا[3]

این باکتری‌ها به صورت ۸ تایی و حتی بیشتر از این تعداد مشاهده می‌شوند مانند سارسینا لوته آ[4] (شکل ۹-۲)



شکل ۹-۲

### a گسترش[5]:

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 می کنیم تا سرد شود. بعداً به کمک آن یک کلنی از میکروارگانیسم را برداشته و روی لام پهن می کنیم. 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 وشکل سلول باکتری در حالت طبیعی بررسی می گردد .

a مشاهده میکروسکوپی باکتری‌ها به صورت زنده یا رنگ آمیزی نشده که به دو صورت انجام می گردد :

### الف – روش گسترش مرطوب[6]

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 می گیرد . سپس گسترش را در زیر میکروسکوپ با عدسی ۱۰× وسپس ۴۰× مشاهده می کنند . (شکل ۱۰-۲)

ابتدا بر روی یک قطعه لام ساده و تمیز یک قطره از سوسپانسیون حاوی باکتری قرار دهید

تحت زاویه ۴۵ درجه بر روی آن لامل قرار می گیرد

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 پنس
- a لام و لامل
- a میکروسکوپ
- a سوسپانسیون حاوی باکتری
- a قطره چکان

### روش انجام آزمایش :

با کمک قطره چکان یک قطره از سوسپانسیون حاوی باکتری را رو ی لام قرار داده و سپس تحت زاویه ۴۵درجه 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

.....

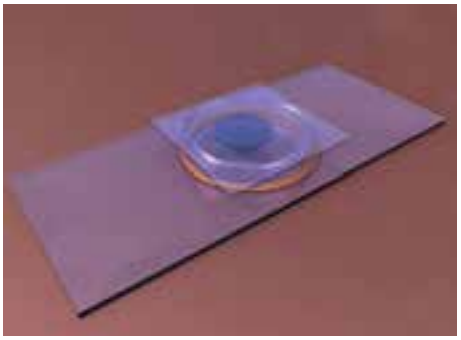
.....

.....

## ب – روش قطره معلق[1]

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 لامل‌را به صورت معکوس‌روی‌لام‌می‌گذارند. در زیر میکروسکوپ ابتدا با عدسی ۱۰× و سپس با عدسی ۴۰× نمونه را بررسی می‌نمایند . (شکل ۱۱–۲)

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



شکل ۱۱–۲

### رعایت کنید

در مشاهده باکتری‌ها به صورت زنده :

- بر روی سوسپانسیون باکتری ها حتماً لامل قرار دهید .
- گسترش باکتری را فقط تا عدسی ۱۰× و ۴۰× میکروسکوپ بررسی کنید و ترجیحا از عدسی ۱۰۰× استفاده نکنید.
- چون در این روش باکتری‌ها رنگ آمیزی نشده اند و ضریب شکستی معادل شیشه دارند برای رؤیت آن‌ها باید نور میکروسکوپ را کم کرد ( با بستن دیافراگم و پایین کشیدن کندانسور).
- چون در این روش نمونه مورد مطالعه محدود می‌باشد قبل از خشک شدن نمونه باید آن را بررسی کرد.

۱– Hanging Drop

## آزمایش کنید: تهیه روش قطره معلق

### مواد و لوازم مورد نیاز:

- a لام توگود و لامل
- a میکروسکوپ
- a سوسپانسیون حاوی باکتری
- a وازلین
- a قطره چکان

### روش انجام آزمایش :

به کمک قطره چکان یک قطره از سوسپانسیون حاوی باکتری را روی لامل قرار داده و بصورت برعکس روی لامل تو گود قرار دهید. قبلاً اطراف محل گودی لامل را وازلین بزنید. با عدسیهای شیئی ۱۰× و ۴۰× به مشاهده باکتری ها بپردازید. از مشاهدات خود شکل بکشید . گزارش کار و نتیجه گیری را تکمیل کنید.

### گزارش کار

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

### نتیجه گیری

.....

.....

.....

## 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 وبرای 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[1] غوطه‌ور نموده ، با برس شست و شوی لوله آزمایش ، داخل آن‌ها را تمیز کنید. سپس دوباره آب کشی 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 کشت‌در لوله‌های آزمایش کوچک (با قطر ۱۶ میلی متر)

### مواد و لوازم مورد نیاز :

- a ترازو
- a بشر
- a هم زن شیشه ای یا میله ای
- a محیط های کشت پودری
- a شعله گاز یا هیتر
- a آب مقطر سترون
- a لوله آزمایش

### 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– محیط های کشت ذخیره | ۱۲ میلی لیتر |
| ب– محیط های کشت عمقی | ۶میلی لیتر |
| ج– محیط های کشت خوابیده[2] | ۴ میلی لیتر |
| د– محیط های کشت آب گوشت[3] | ۵میلی لیتر |
| و– محیط های کشت برای تخمیر | ۷–۵میلی لیتر |

۲– از روی بر چسب بسته محیط کشت ، مقدار پودر مورد نیاز برای ۱۰۰۰ میلی لیتر آب را مشخص کرده و سپس ، مقدار مورد نیاز خود را محاسبه کنید ، آن گاه ،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

۳- اگر محیط کشت حاوی آگار باشد آن را بر روی شعله گاز یا هیتر حرارت دهید تا به جوش آید ، برای این که مطمئن شوید در اثر حرارت آب تبخیر وکم نشده ، قبل از حرارت ، سطح آب را در بشر علامت گذاری کنید . قبل از اینکه در اثر جوشیدن سر ریز شود هیتر را خاموش کنید.

### توجه کنید

در حین گرما دادن با هم زن شیشه‌ای ، محیط کشت را به هم بزنید تا ته نگیرد .

۴- میزان حجم محیط کشت را در ظرف بررسی کرده ، در صورت کاهش ، با افزودن آب ، آن را به سطح علامت گذاری شده برسانید . دمای محیط کشت را در حدود ۶۰ درجه نگه دارید تا سفت نشود . چون در دمای حدود ۴۰ درجه سفت می‌شود .

### گزارش کار

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

### نتیجه گیری

.....

.....

.....

## فکر کنید

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 محیط های کشت وارد می سازد؟

### تنظیم pH

گرچه محیط های 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 بر چسب نوشته شده است فرق داشته باشد . قبل از اینکه محیط کشت به داخل لوله آزمایش ریخته شود ، pHآن اندازه گیری و در صورت لزوم تنظیم می شود .

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 هیدروکلریدریک (HCL) و هیدروکسید سدیم (NaOH) استفاده کنید.

## آزمایش کنید: تنظیم pHدر محیط کشت

### مواد و لوازم مورد نیاز :

- بشر حاوی محیط کشت
- اسید و باز (شیشه‌های دارای قطره چکان و حاوی اسید و باز یک نرمال و یک دهم نرمال , HCL NaOH)
- هم زن شیشه‌ای میله‌ای
- 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 می توان 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 پیچ‌دار نباشند با گذاشتن پنبه در آن‌ها را ببندید و بعد سترون کنید .

۵- لوله‌های آزمایش حاوی محیط های کشت که آماده شده‌اند را با دستگاه اتوکلاوسترون نمایید. رعایت نکات ایمنی و ضروری کار با دستگاه در استفاده از اتوکلاو بسیار مهم است .

## گزارش کار

## نتیجه گیری

## فکر کنید

۱-دلیل تنظیم pH در محیط کشت باکتری چیست ؟

۲-در صورت عدم تنظیم pH مناسب در محیط کشت ، به نظر شما چه مشکلاتی در زمان کشت برای میکروارگانیسم به وجود می آید، بیان کنید.

## محیط‌های کشت خوابیده

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 انعقاددار به میزان ۳٪ تا ۵٪ به محیط کشت پایه (نوترینت آگار[1] ،بلادآگاربیس[2] ، تریپتون سوی آگار[3] ، بروسلا آگار[4]) اضافه می‌شود . برای افزودن خون به محیط کشت پایه، (پس از اتمام اتوکلاو محیط کشت پایه) آن را تا حدود ۴۲ درجه سانتی گراد خنک نمایید. سپس خون را به آن اضافه کرده و به هم می‌زنند، اگر دمای محیط کشت بیشتر باشد خون لیز می‌شود ورنگ 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 وسپس آن‌ها را وارونه در یخچال قرار می‌دهند.

### فکر کنید

علت وارانه قرار دادن پلیت‌ها درون یخچال چیست ؟

## روش‌های کشت باکتری

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

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 :

- چراغ الکلی یا گازی
- آنس حلقوی
- محیط کشت نوترینت آگار
- محیط کشت حاوی کشت باکتری

### روش انجام آزمایش:

۱- روی شعله چراغ الکلی 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 قبلا آماده کردید ، بکشید. باید دقت کرد که محیط کشت خراشیده نشود( مرحله ۱).

۳- دوباره روی شعله چراغ الکلی 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) .

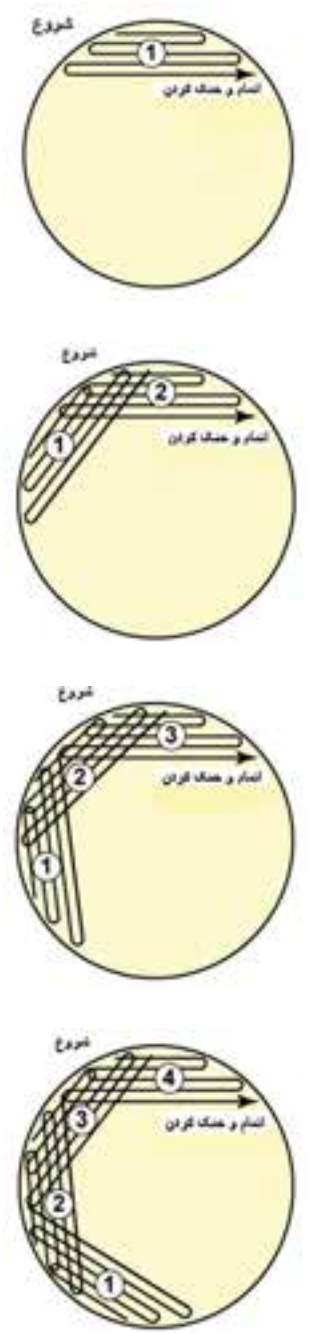
۴- دوباره روی شعله چراغ الکلی یا گازی آنس حلقوی را سترون کنید، بعد از خنک کردن آنس حلقوی ، از خطوط انتهایی مرحله ۲ ، خطوطی تقریباً عمودی بر آن بکشید ( مرحله ۳) .

۵- دوباره روی شعله چراغ الکلی 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 الکلی 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 $^{\circ}C$ ۳۷ قرار دهید، تا باکتری بر روی آن رشد نماید.

## گزارش کار

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## نتیجه گیری

.....

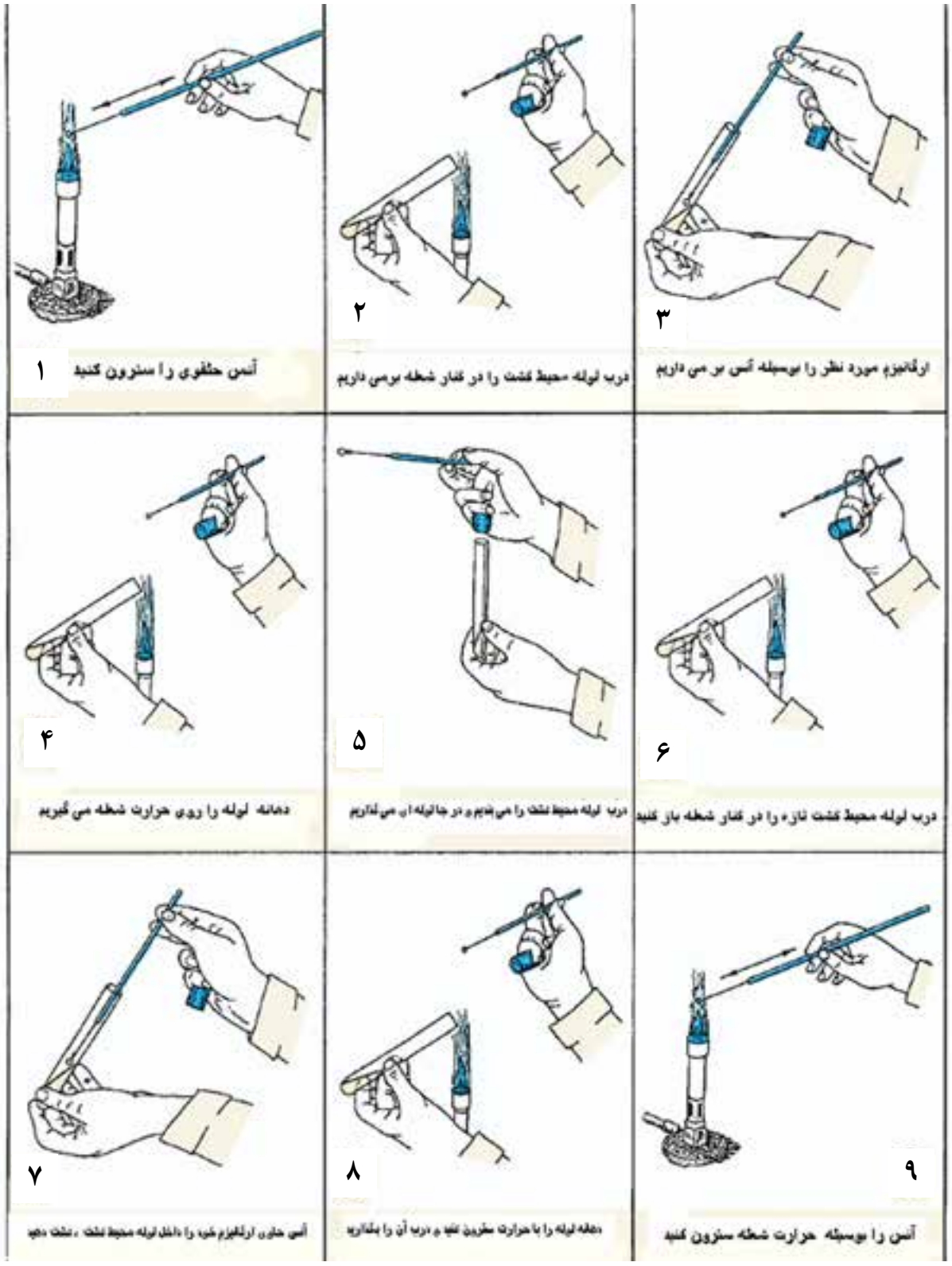
.....

.....

## فکر کنید

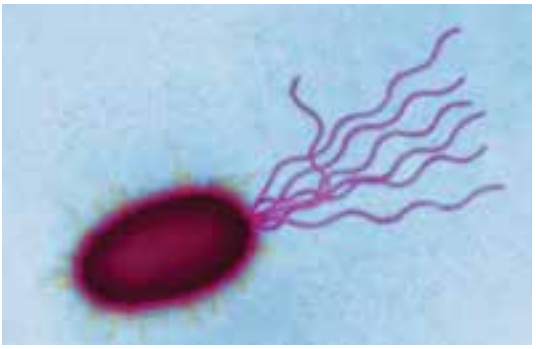
۱- علت سترون نمودن آنس پس از پایان هر مرحله چیست ؟
۲- چرا در مرحله انتهایی آنس را سترون نمی کنند؟
۳- دلیل تماس خطوط هر مرحله با مرحله بعدی چیست ؟

شکل‌های زیر به ترتیب ، طرز کشت در لوله را نمایش می‌دهد.(شکل ۱۳-۲)




شکل ۱۳ – ۲

## حرکت باکتریها[1]



شکل ۱۴–۲

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

- حرکت براونی[2]
- حرکت حیاتی[3]

حرکت براونی : عبارت از به جلو و عقب کشیده شدن سلول باکتری در یک محلول می‌باشد 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[4](شکل ۱۴–۲) در باکتری ها انجام می گیرد.

برای مشخص نمودن وجود تاژک در اندام باکتری از محیط کشت‌های ویژه حرکت که در لوله آزمایش به طریق بدون شیب[5] تهیه می‌شود استفاده می گردد . باکتری‌های تاژک دار به علت حرکت توسط تاژک‌هایشان ، در محیط کشت تغییراتی بوجود آورده و سبب غیر یکنواخت شدن محیط می گردند در صورتی که سایر باکتری‌ها قادر به انجام چنین عملی نبوده ودر یک خط در سطح محیط رشد می کنند .

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

### مواد و لوازم مورد نیاز :

- محیط کشت نوترینت آگار دارای کشت ۲۴ ساعته باسیلوس سابتیلس در لوله ( بدون شیب )
- محیط کشت نوترینت آگار دارای کشت ۲۴ ساعته استافیلوکوکوس اورئوس (بدون شیب)
- حداقل دولوله دارای محیط کشت‌های ویژه حرکت
- محیط های کشت ویژه حرکت باکتری‌ها:(محیط های کشت تست حرکت[6] و ژلاتین[7])

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 سابتیلس را از محیط کشت نوترینت آگار برداشته و در یک لوله دارای محیط کشت ویژه حرکت باکتری‌ها (ژلاتین و یا محیط کشت تست حرکت) به طور عمقی کشت دهید . به همین صورت پرگنه استافیلوکوکوس اورئوس را کشت داده و سپس لوله‌های دارای محیط کشت داده شده را برای مدت ۴۸ ساعت در اینکوباتور $^{\circ}C$ ۳۷ قرار دهید.

۲- پس از گذشت مدت فوق لوله‌های 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 ومحیط از حالت یکنواخت خارج می‌شود. در موردی که تنها رشد باکتری و بدون حرکت آن باشد ، فقط در مسیر خط کشت داده شده ، پرگنه‌های باکتری مشاهده می‌شود .

## گزارش کار

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## نتیجه گیری

نتایج بدست آمده را در جدول زیر ثبت کنید .

| میکروارگانیسم | حرکت براونی | حرکت حیاتی |
|---|---|---|
| باسیلوس سابتیلس | | |
| 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 تاژک‌های آن بستگی دارد ؟
۳- آیا روش ذکر شده در بالا را می توان به عنوان مهم‌ترین روش تعیین وجود یا عدم وجود تاژک به حساب آورد ؟

## روش‌های رنگ آمیزی باکتری‌ها

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

## ۱– رنگ آمیزی کریستال ویوله[1] ( رنگ آمیزی ساده)

در این روش ، رنگ کریستال‌ویوله برای رنگ‌آمیزی سلول‌های باکتری به کار می‌رود. این روش ، اطلاعاتی را در مورد مورفولوژی ارگانیسم‌های 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

۱– crystal violet

## 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 جاوی 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- پس‌از خشک‌شدن لام،روی آن لامل قرار داده و با کمک روغن‌سدر و با عدسی شیئی ۱۰۰× آنرا مشاهده‌کنید.

## گزارش کار

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## نتیجه گیری

.....

.....

.....

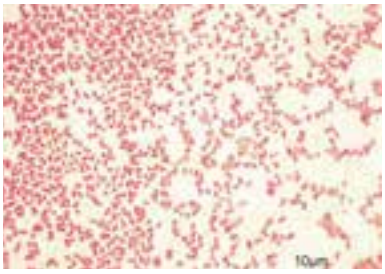
## فکر کنید

۱- نقش کریستال ویوله در این رنگ‌آمیزی چیست ؟

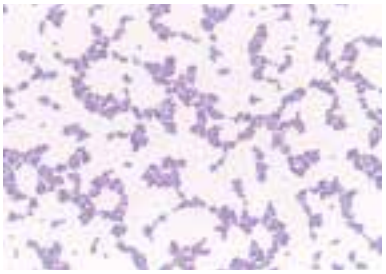
۲- امکان جایگزینی کریستال ویوله با معرف دیگری به نظر شما از لحاظ تئوری و آزمایشگاهی وجود دارد؟

## ۲– رنگ آمیزی گرم[۱]

در این روش ، تقریبا 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 گروه های بار منفی موجود در دیواره سلولی واکنش می کند. بعد از آن که ، رنگ اضافی آن با آب شسته می شود، سلول‌ها در معرض محلول پتاسیم ید ( به نام ید گرم) قرار می گیرند. 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 می دهند ، در صورتی که ، سلول های گرم مثبت به بی رنگ شدن مقاوم هستند. بعد ، رنگ اضافی با شستن آب خارج می گردد. سپس سلول‌ها را با رنگ دیگری به نام سافرانین[۲] که فقط سلول‌های گرم منفی رنگ می گیرند ، رنگ آمیزی می کنند. 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. ( شکل های ۲–۱۵ تا ۲–۱۷)



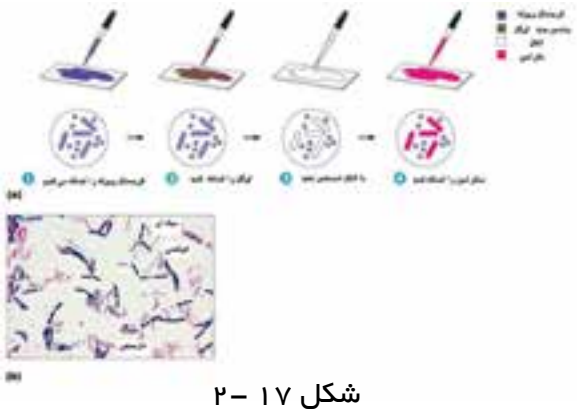
شکل ۲–۱۵ گرم منفی



شکل ۲–۱۶ گرم مثبت

### توجه کنید

چنانچه الکل به مدت طولانی بر روی سلول‌های گرام مثبت ریخته شود بی رنگ 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 :

- میکروسکوپ نوری
- معرف کریستال ویوله
- معرف پتاسیم ید ( لوگل)
- معرف سافرانین
- لام و لامل
- محیط کشت باکتری‌های کشت شده جامد ( نوع گرام منفی و مثبت )
- الکل اتیلیک

### روش انجام آزمایش :

۱–اسمیر نازکی از کشت باکتری‌های مورد نظر تهیه کنید و معرف‌ها را به صورت زیر اضافه کنید.

۲– محلول کریستال‌ویوله 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 ۱۰۰× آن را در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده کنید.

## گزارش کار

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## نتیجه گیری

.....

.....

.....

.....

## فکر کنید

۱- نقش معرف پتاسیم ید در رنگ‌آمیزی گرم چیست ؟ در صورتی که از رنگ‌آمیزی حذف شود، در نتجه رنگ آمیزی چه اثری می گذارد؟

۲- نقش الکل در رنگ‌آمیزی گرم چیست ؟

۳- امتیاز رنگ آمیزی گرم به رنگ آمیزی ساده چیست ؟

## ۳- رنگ آمیزی کپسول[۱]

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 پپتیدها تشکیل شده‌اند. این لایه را همچنین گلیکوکالیکس[۲] هم می‌نامند. وجود کپسول را می توان 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 می شود. در این روش ، رنگ قرمز کنگو[۳] به کار می رود. این رنگ موجب رنگ آمیزی زمینه شده و کپسول یا سلول بی رنگ 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، رنگ‌آمیزی می‌شود. این معرف حاوی متانول بوده که در اتصال سلول‌های باکتری به لام کمک می کند. رنگ فوشین نیز اجزای سلولی را رنگ می کند. کپسول فاقد بار است و بنابراین ، این رنگ را به خود نمی گیردو 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 ، رنگ‌آمیزی ، باکتری ها به رنگ قرمز در زمینه خاکستری – آبی کمرنگ ظاهر می‌شوند. چنانچه کپسول وجود داشته باشد به صورت مناطقی شفاف در اطراف باکتری ظاهر می گردد.

۱ – Capsul
۲ – Glycocalyx
۳– congo

## آزمایش کنید: رنگ‌آمیزی کپسول باکتری

### مواد و لوازم مورد نیاز :

- میکروسکوپ نوری
- رنگ قرمز کنگو
- معرف Maneval
- لام و لامل
- محیط کشت باکتری کشت شده جامد ( کلبسیلا پنومونیه[1])

### 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 ، رنگ‌آمیزی می‌کنید ، مواظب باشید که مقدار کافی از باکتری را بر دارید.

۲- با استفاده از لام دیگری که در زاویه ۴۵° 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 رنگ‌آمیزی 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 ۱۰۰× مشاهده کنید.

### گزارش کار

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

۱ – klebsilla pneumoniae

## نتیجه گیری

.....

.....

.....

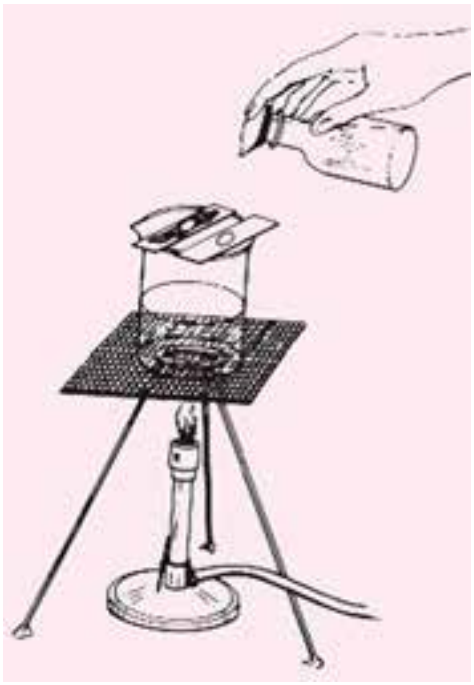
.....

.....

## فکر کنید

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

## ۴– رنگ آمیزی اسپور[1]



شکل ۱۸–۲

این روش ، مشاهده اجزایی به نام اندوسپور را مقدور می سازد. اسپور، ساختمان خاصی است که توسط برخی از باکتری‌ها تولید می‌شود. اسپور با استفاده از مالاشیت سبز[2] و سیتوپلاسم سلول با به کار بردن سافرانین رنگ آمیزی می‌شود. مالاشیت سبز به سهولت به درون اسپور نفوذ نمی کند ، در صورتی که ، سلول‌های رویشی به سهولت رنگ آمیزی می گردند. حرارت برای افزایش قابلیت نفوذ پوشش اسپور ضروری است. سلول رویشی و قسمت‌های 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 می‌شود. 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 می‌دهد).

۱– Staining
۲– malashit green

## آزمایش کنید: رنگ آمیزی اسپور باکتری

### مواد و لوازم مورد نیاز :

- میکروسکوپ نوری
- مالاشیت سبز
- معرف سافرانین
- لام و لامل

### روش انجام آزمایش :

۱- اسمیری از کشت مورد نظر تهیه کنید .(اسمیر را در معرض معرف‌ها 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 قرار گیری 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 قرار گیری اسپور در سلول باکتری مهم می‌باشد؟

## رقیق کردن و کشت دادن نمونه‌های مختلف:

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

چون اولین آزمایش میکروبی لازم بر روی تقریبا همه نمونه های تحویلی به آزمایشگاه تعیین تعداد کلی میکروارگانیسم‌ها[1] است ، در نمونه های مایع این تعداد در هر میلی لیتر و در نمونه‌های 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 محلول‌های 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 بین‌المللی بعد از کشت نمونه‌ها در محیط کشت و قرار گرفتن محیط‌ها 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 .

محلول‌های رقیق کننده ای که معمولاً متداول می‌باشند ، عبارتند از: آب مقطر سترون ، سرم فیزیولوژی ، محلول سالین[2] و محلول های رینگر . تمام محلول‌های فوق علاوه بر خاصیت رقیق کنندگی نمونه مورد آزمایش دو نقش اساسی دیگر نیز دارا می‌باشند :

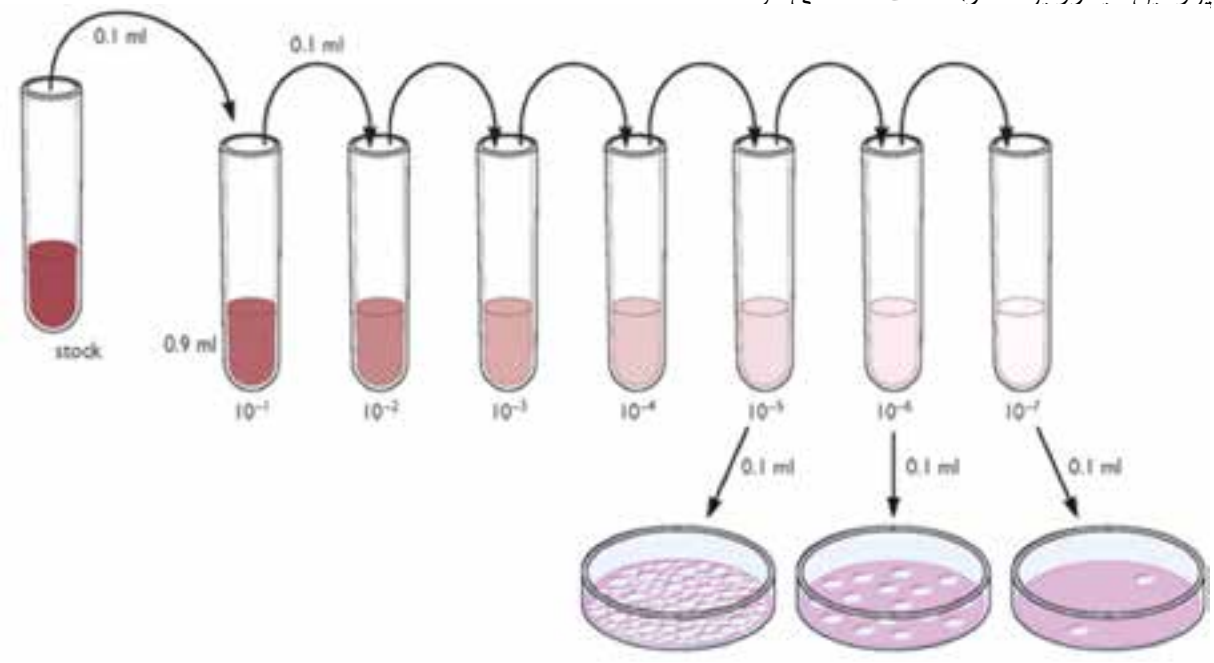
۱- تفکیک میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه از یکدیگر و هدایت آن‌ها به داخل محلول سترون.
۲- تفکیک و پراکنده نمودن میکروارگانیسم‌ها از همدیگر در محلول سترون .

به این ترتیب هنگامی که با استفاده از محلول‌های رقیق‌کننده ، عمل کشت دادن در محیط‌های جامد (در پتری دیش) صورت می گیرد ، میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه با وضعیت مناسب و شرایط آماده تری شروع به تغذیه رشد و تکثیر می‌نمایند .

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 پروتئین 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 می گردد .

تعداد کل میکروارگانیسم‌ها در هر میلی‌لیتر نمونه شیر $۳۸\times۱۰^{۴}=۳/۸\times۱۰^{۵}$ $۳۸\div ۱۰^{-۴}$

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

## آزمایش کنید: بررسی میزان آلودگی نمونه شیر

### مواد و لوازم مورد نیاز :

- نمونه آلوده شیر
- لوله آزمایش
- محلول سالین
- محیط کشت M.P.H.A (میلک پروتئین هیدرولیز آگار)
- محیط کشت جامد

### روش انجام آزمایش :

۱– یک میلی‌لیتر از نمونه شیر مورد نظر را با استفاده از محلول‌های سالین تا رقت ۱۰۰۰۰ :۱ ($۱۰^{-۴}$)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 می‌دهیم. در مرحله بعد ۰/۱ میلی لیتر از لوله اول را به لوله دوم اضافه می کنیم و الی آخر. در این حالت رقت‌های $\frac{۱}{۱۰}$ ($۱۰^{-۱}$)، $\frac{۱}{۱۰۰}$ ($۱۰^{-۲}$)، $\frac{۱}{۱۰۰۰}$ ($۱۰^{-۳}$)، $\frac{۱}{۱۰۰۰۰}$ ($۱۰^{-۴}$) 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 (∞) 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 $۳۷^{\circ}C$ 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 کانتر ، پرگنه (کلنی) های موجود در محیط ها را شمارش نموده و همچنین شکل ظاهری و اندازه پرگنه ها را بررسی نمائید . سپس با در نظر گرفتن درجه رقت مطابق آنچه در صفحات گذشته شرح داده شد، تعداد کل میکروارگانیسم‌ها را در یک میلی‌لیتر شیر مورد آزمایش محاسبه نمائید.

۶-از پرگنه های 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 می‌باشد.

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

در مرحله بعد از کشت و طی دوره رشد و تکثیر[۱] پرگنه (کلنی)های حاصل شده در محیط کشت نشان دهنده تقریبی میزان آلودگی در مقدار کشت داده شده از نمونه می‌باشد . به این صورت که هر یک پرگنه (کلنی) کوچک یا بزرگ ، نمایانگر حداقل یک میکروارگانیسم فعال اولیه در نمونه به شمار می‌آید و تعداد کل میکروارگانیسم‌ها بر اساس تعداد پرگنه (کلنی) ها بر مبنای درجه رقت نمونه،تعیین و محاسبه می‌گردد . جهت شمارش تعداد پرگنه (کلنی‌ها در محیط کشت معمولاً از دستگاهی به نام کلنی کانتر[۲] استفاده می‌شود 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 :

- پلیت حاوی پرگنه باکتری‌ها
- دستگاه کلنی کانتر

### روش انجام آزمایش :

۱- پلیت دارای پرگنه راروی 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 می گردد .

## شمارش باکتری ها[1]

در بیشتر مطالعات باکتری شناسی ، 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 هازر[2] است که در آن ، از یک شمارشگر مکانیکی استفاده می شود .باکتری‌های تولید کننده گاز را می توان به تعدادی از لوله‌های آزمایش حاوی لاکتوز براث تلقیح نمود و از روی جداول آماری خاصی، تعداد باکتری‌های موجود در آن را مشخص کرد . این روش ، برای شمارش کلی فرم‌ها در نمونه های 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[3] و اندازه گیری 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 میکروب های زنده را آشکار می کند ، 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 می کند .

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 :

- یک عدد شیشه (۴۰ میلی‌لیتری) محیط کشت براث اشرشیاکلی
- یک عدد شیشه (۸۰ میلی‌لیتری) نوترینت آگار
- چهار عدد پلیت
- پیپت های ۱/۱ میلی‌لیتری
- سه شیشه شستشو شده ۹۹ میلی‌لیتری
- ظرف مناسب برای پیپت‌های دور انداختنی

### روش انجام آزمایش :

۱- نوترینت آگار موجود در یک شیشه را ذوب کنید . سه شیشه سترون ۹۹ میلی‌لیتری بردارید و روی آن‌ها را با حروف A ، B و C علامتگذاری نمایید . هم چنین پشت چهار عدد پلیت به ترتیب ۱:۱۰۰۰۰، ۱:۱۰۰۰۰۰ ، ۱:۱۰۰۰۰۰۰ و ۱:۱۰۰۰۰۰۰۰ بنویسید . به علاوه ، میزان حجم سوسپانسیون باکتری را که در پلیت ریخته می‌شود در پشت پلیت یادداشت کنید .(۰/۱ میلی لیتر و یا ۱ میلی لیتر)

۲- محیط کشت اشرشیاکلی را به هم بزنید و با یک پیپت ۱/۱ میلی لیتری ، یک میلی‌لیتر از آن را به شیشه A منتقل کنید . سپس پیپت استفاده شده را در ظرف حاوی ماده ضد عفونی‌کننده قرار دهید .

۳- شیشه A را در عرض ۷ ثانیه ۲۵ بار به هم بزنید . به هم زدن شدید نه تنها کدورت خوبی تولید می‌کند بلکه باعث باز شدن توده های باکتری می‌شود .

۴- با یک پیپت ۱/۱ میلی لیتری ، یک میلی‌لیتر از محتویات شیشه A را به شیشه B منتقل کنید .

۵- محتویات شیشه B را ۲۵ بار به هم بزنید .

۶- با یک پیپت سترون دیگر ، ۰/۱ میلی لیتر از محتویات شیشه B را به پلیت ۱:۱۰۰۰۰۰ منتقل کنید و ۱ میلی لیتر به پلیت ۱:۱۰۰۰۰ بریزید . با همان پیپت ۱ میلی لیتر نیز به شیشه C بریزید.

۷- شیشه C را ۲۵ بار به هم بزنید .

۸- با یک پیپت سترون دیگر ، از محتویات شیشه C ، ۰/۱ میلی لیتر برداشته ، به پلیت ۱:۱۰۰۰۰۰۰۰ 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- $\frac{1}{4}$ نوترینت آگار (۲۰ میلی لیتر) را به هر پلیت بریزید و به آرامی محتویات پلیت‌ها را به هم بزنید . این مرحله ، مرحله حساسی‌ست زیرا به هم زدن کم ، مانع از پخش کامل میکروب ها می‌شود و به هم زدن زیاد ، موجب می‌گردد محیط کشت از لبه‌های 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 گرم‌خانه 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 وبا 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 میلی‌لیتر از رقت ۱:۱۰۰۰۰۰۰ برابر ۲۲۰ عدد باشد ، تعداد باکتری‌ها در هر میلی لیتر برابر خواهد بود با $۲/۲\times۱۰^{۸}$=۱/۰۰۰/۰۰۰×۲۲۰ اگر ۲۲۰ عدد پرگنه در پلیتی که ۰/۱ میلی لیتر از رقت ۱:۱۰۰۰۰۰۰ شمرده شود ، نتیجه به دست آمده از محاسبه بالا ، باید در ۱۰ نیز ضرب شود تا تعداد باکتری در ۰/۱ میلی‌یتر به ۱ میلی لیتر تبدیل شود ($۲/۲\times۱۰^{۹}$) . اگر تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر ۲۲۷/۰۰۰/۰۰۰ عدد باشد آن را ۲۳۰/۰۰۰/۰۰۰ عدد و یا $۲/۳\times۱۰^{۸}$ 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 ومحلول‌های مختلف حساس به حرارت استفاده می‌شود . برخی از کارخانه‌های سازنده وسایل آزمایشگاهی، نوعی از این کاغذها با قیف‌های مخصوصی که در برابر حرارت مقاوم اند و قابل سترون شدن هستند را برای شمارش وجستجوی باکتری‌ها در آب وسایر 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 می کنند برای عملیات صحرایی 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 ولوازم مورد نیاز :

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

## 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 بیفتد .

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 از۴۵ درجه سانتی گراد است بپوشانید.

۳- سپس این محیط کشت‌را ، در گرم خانه 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 شربتی 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 گرمخانه‌گذاری ، 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 محلول های تزریقی استفاده می‌شود . هم چنین این روش ، در بهداشت محیط وکنترل آب و فاضلاب و بررسی‌های همه گیرشناسی ، بسیار ارزشمند می‌باشد .

## شمارش باکتری با روش شمارش مستقیم :

از این روش به دلیل سرعت زیاد می‌توان 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 لام‌های مخصوص نئوبار و یا لام توما که معمولاً برای شمارش گلبولهای خون به کار می‌رود استفاده نمود.

### آزمایش کنید: شمارش باکتری به روش مستقیم

#### مواد ولوازم مورد نیاز :

- آب مقطر یا سرم فیزیولوژی
- لام توما یا نئوبار
- میکروسکوپ
- مواد رنگی مانند آبی متیلن و یا ویوله ژانینی

#### روش انجام آزمایش :

۱- نمونه مورد آزمایش را به نسبت های معینی با آب مقطر ویا سرم فیزیولوژی و یا هر رقیق کننده مناسب دیگر رقیق کنید ( برای بهتر دیدن میکروارگانیسم‌ها ، 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 ویک لامل سنگینی روی آن قرار دهید.

۳- پس از چند دقیقه با عدسی ۴۰ میکروسکوپ میکروارگانیسم‌ها را شمارش کنید.

### گزارش کار

.....

.....

.....

.....

.....

.....

### نتیجه گیری

.....

.....

.....

.....

## A واژه‌های فصل دوم

باکتری
سارسینا لوته آ
میکروارگانیسم
سوسپانسیون
بیماریزا
لام و لامل
یوکاریوت‌ها
روش گسترش مرطوب
میکروب شناسان
روش قطره معلق
فرایندهای حیاتی
استاندارد بین‌المللی
باسیلی یا استوانه‌ای
اینکوباتور
اشرشیا کلی
پر گنه (کلنی)
ائروباکتر اروجنس
میلک پروتئین هیدرولیز آگار
باسیلوس مگاتریوم
نمراتور
ویبریون
هاگ
ویبریوکوما
کپک
باکتری‌های مارپیچی
مخمر
تریپونما پالیدوم
ازتوباکتر

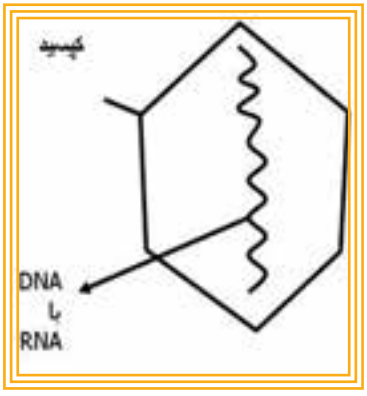
کوکسی سیلین
میکروکوکوس
پیپت
استافیلوکوک
پتری دیش
استافیلوکوکوس اورئوس
زیگزاگ
استرپتوکوک
حرکت برائونی
استرپتوکوکوس فکالیس
حرکت حیاتی
دیپلو کوک
محیط کشت تست حرکت
دیپلوکوک نمونیا
ژلاتین
سارسینا
باسیلوس سابتیلیس
پروتئوس ولگاریکوس
لیسفون
رنگ متیلن بلو
پروتوپلاسم
مواد کلوئیدی
دترجنت
محیط کشت ذخیره
محیط کشت عمقی
محیط کشت خوابیده
محیط کشت برای تخمیر
آگار

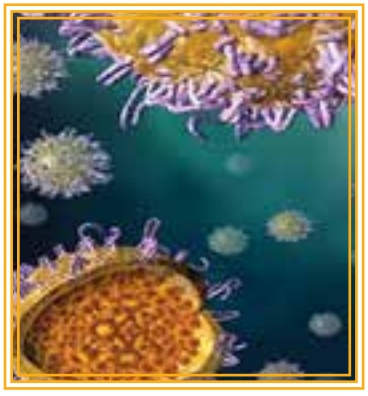
مواد بافری
اسید هیدروکلریدریک
هیدروکسید سدیم
نوترینت آگار
روش پور پلیت
کریستال ویوله
کورینه باکتریوم
کبسیلا پنومونیه
سافرانین
روغن سدر
کاغذ صافی
سترون
لام نئو بار
لام توما
آبی متیلن
ویوله ژانینی

۳

# فصـــــل سوم

## ویـــــروس‌ها



قبل از تعریف ویروس‌ها[1] 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 می توان 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 می کنند.

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

## میزبان ویروس‌ها

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

## ساختمان شیمیایی ویروس

### اسید نوکلئیک

ویروس دارای یک هسته مرکزی اسید نوکلئیکی 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 سلول های 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 ژ نتیکی ممکن است به صورت خطی یا حلقوی ، یک رشته‌ای یا دورشته‌ای باشد ولی در ویروس‌های RNA دار ، ژنوم همواره به صورت خطی است.

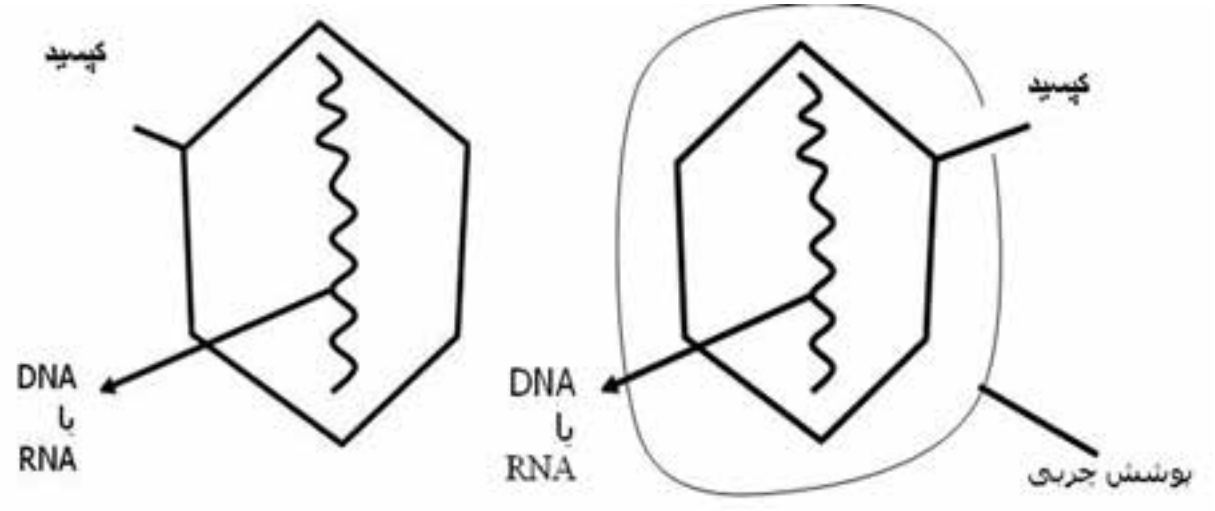
### کپسید[2]

اسید نوکلئیک ویروس بوسیله غلاف پروتئینی به نام کپسید احاطه شده است. کپسید بخش عمده ویروس را به ویژه ویروس های کوچک را شامل می‌شود. هر کپسید از واحدهای کوچک پروتئینی به نام کپسومر[3] ساخته شده است .نظم و ترتیب قرار گرفتن کپسومرها ، شکل کلی و پیکر ویروس را تعیین می کند که برای هر ویروس خاص، ثابت است.

۱ – Virus
۲ – Capsid
۳– Capsumer

## پوشش غیر پروتئینی

در برخی از ویروس‌ها کپسید بوسیله پوششی که معمولا ترکیبی از لیپیدها ، پروتئین ها 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[1] ، توان تکثیر ندارند. ویروس‌های ناقص در ساختمان ژنتیکی خود نقصی دارند و در خلال تکثیر در داخل سلول بوجود می‌آیند .این ویروس ها می‌توانند تکثیر ویروس های 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[2]

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

۱ – Helper virus
۲ – viroid

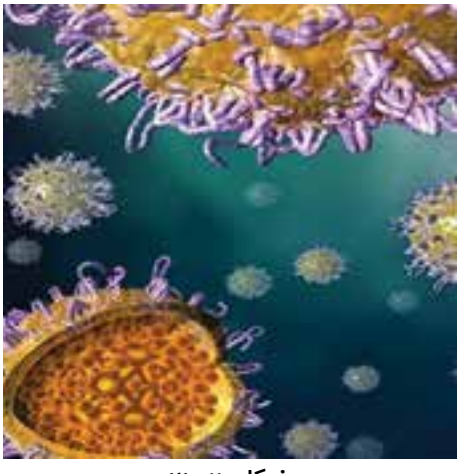
## ویروس‌های گیاهی

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

- ویروس‌های میله‌ای یا رشته‌ای
- ویروس‌های ایزو دیامتریک
- ویروس‌های باسیلی شکل
- ویروئیدها

## ویروس‌های جانوری

ویروس‌ها از انواع مختلف جانوران از تک یاختگان تا انسان‌ها جدا شده اند. میزبان مهم ویروس‌ها در بی‌مهره‌گان، بندپایان هستند خصوصا 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 علایم آن‌ها به صورت تومور نمایان می‌شود. ویروس ها در انسان نیز بیماری های گوناگونی مانند اوریون ، سرخک ، تب زرد ، آبله ، آنفلوانزا و غیره ایجاد می‌کنند. (شکل ۲–۳)



شکل ۲–۳

## تکثیر ویروسها

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

- مرحله اتصال یا جذب سطحی ویروس‌ها بر روی سلول
- مرحله ورود و نفوذ در سلول
- مرحله سنتز اجزای ویروسی
- مرحله رسیدن و کامل شدن ویروس
- مرحله آزاد شدن ویروس از سلول میزبان و نفوذ آن در سلول های سالم

رده بندی ویروسها از روی محل تاثیر آن بر روی اندام‌های 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 می‌شوند). | آبله انسانی، آبله گاوی، سرخک، سرخچه، آبله مرغان و تب زرد |
| سیستم عصبی | آنسفالیت ، هاری و منتژیت |
| سیستم تنفسی | آنفلوانزا ، ذات‌الریه 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 |

## فکر کنید

۱- محیط مناسب جهت بقا ویروس خارج از میزبان دارای چه ویژگی می‌باشد.

۲- نکات بهداشتی و ایمنی وزیست محیطی در آزمایشگاه ، شامل چه مواردی می‌شود ، بیان کنید.

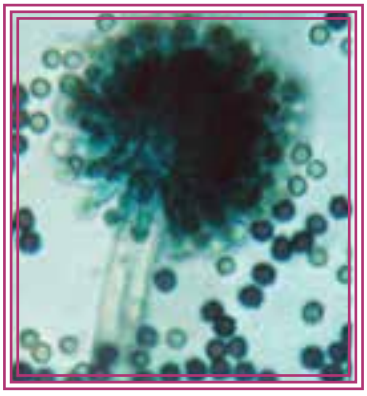
## واژه‌های فصل سوم

ویروس
میزبان
میکروسکوپ الکترونی
اولتراسانتریفوژ
باکتریوفاژ
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
زونا
ملتحمه چشم
هپاتیت
گاسترونیت

۴

# فصـــــل چهارم

## قـــــارچ‌ها



در حالت کلی قارچها را به دو دسته عمده تقسیم می کنند: کپک[1]ها (شکل۱-۴) و مخمر[2]ها

هردو دسته برای رشد به شرایط خاصی نیاز دارند که عبارتند از :

۱- pH : هر میکروارگانیسم نیازمند pH خاص خود می باشد مثلا اکثر باکتری‌ها در pH خنثی و یا قلیایی رشد می کنند ولی میدان فعالیت قارچها بسیار زیاد است ، مثلا کپک ها در ۱۱- pH=۱/۵ و مخمرها در ۸/۵-۲/۵= pH به خوبی رشد می کنند . به همین علت میوه جات بیشتر کپک می‌زنند و باکتری روی آن ها رشد نمی کند.

۲- رطوبت : برای رشد هر میکروارگانیسم رطوبت لازم می‌باشد. اما بسیاری از کپک ها و برخی ازمخمرها قادر به رشد در محیط هایی با رطوبت پایین می‌باشند.

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

۴- دما : قارچ‌ها از نظر درجه حرارت برای رشد معمولا مزوفیل[3] (۳۵ C° تا ۲۵ C°)هستند و بعضی هم سرما دوست هستند و در دمای ۵ C° تا ۱۰ C°- درجه به خوبی رشد می کنند. مانند نمونه هایی از آسپرژیلوس‌ها

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 می‌توانند مقداری از مواد مورد نیاز خود را بسازند.

## شکل ظاهری قارچ‌ها :

در شناسایی قارچ‌ها ظاهر اندام‌های بارز و اسپورهای غیر جنسی که بر روی آن ها تشکیل می گردد کمک بزرگی می کند. برای مثال در قارچ‌هایی که اسپورانژیوم[4] تشکیل می‌شود بررسی شکل اسپورانژیوفور[5]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 می‌شود،کنیدیوفور[6]ها ممکن است حامل یک کنیدی و یا شامل تعداد زیادی کنیدی باشند ، که در محل‌های مختلف و با اشکال مختلف استقرار یافته‌اند. 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 جنس‌های کپک‌ها می توان به کپک‌های آلترناریا، پنی سیلیوم، آسپرژیلوس، 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 می گردد، 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 ۳-۲ 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 لاکتو فنل 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 میسلیوم

شکل میسلیوم ،شاخه دار یا بی شاخه بودن آن و ساختمان داخلی میسلیوم

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 میکروارگانیسم ها آسان است . فقط کشت برخی از گونه ها مشکل می باشد. محیط پایه برای کشت قارچ ها اغلب سابرودکستروز آگار می‌باشد که حاوی مقداری کلرامفنیکل است. کار این آنتی بیوتیک جلوگیری از رشد باکتری ها در این محیط می‌باشد.در مواردی نیز جهت انتخابی کردن محیط از ترکیبات اسیدی استفاده می‌شود. قارچ ها معمولا در دمای محیط آزمایشگاه ($^{o}C$ ۲۵)بخوبی رشد می کنند .

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

**مواد و لوازم مورد نیاز :**

- محیط کشت سابرودکستروز آگار
- آنس
- چراغ الکلی یا گازی

**روش انجام آزمایش :**

۱- محیط سابرودکستروز آگار را تهیه کرده و در داخل پلیت‌های 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 کپک‌ها می توانید بصورت نقطه‌ای 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 قارچ‌ها 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 می‌رسد که یک بررسی ظاهری پرگنه‌ها و بررسی میکروسکوپی آن‌ها مورد نظرتان باشد.

## گزارش کار

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## نتیجه گیری

.....

.....

.....

.....

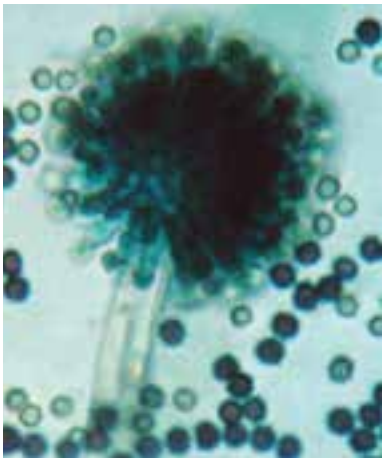
.....

## فکر کنید

۱- علت کشت نقطه‌ی در روش کشت کپک‌ها چیست ؟

۲- به نظر شما چه خصوصیاتی کشت قارچ‌ها دارا می‌باشد ، که روند رشد آن ها را در محیط کشت می توان مشاهده کرد ؟

## خواص ظاهری کپک‌ها



شکل ۱–۴

جهت مطالعه کلنی‌های رشد یافته می توان 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 قارچ های بیماریزا تنوع رنگ کمتر است و معمولا سفیدند. تنوع رنگ مربوط به ساپروفیت ها[1] است .

### وجود رنگدانه

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

## خواص ریزبینی یا میکروسکوپی

با مشاهده میکروسکوپی قارچ‌ها ، بر اساس ساختمان قارچ می‌توانید نوع قارچ را تعیین کنید. مثلا وجود میسیلیوم یا عدم وجود آن و اینکه میسیلیوم دیواره عرضی دارد یا نه ؟

قارچ‌ها در ساختمان خود اندام‌هایی دارند که بصورت رشته‌های درهم پیچیده می‌باشند به این اندام‌ها میسیلیوم گفته می‌شوند که این میسسلیوم‌ها 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 قارچ ها اغلب در دمای پاستوریزاسیون غیر فعال می‌شوند.

۱ – saprophytes

## 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 لاکتو فنل – 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 حباب های هوا از زیر آن خارج شوند .

۴- آن را با بزرگنمایی ۱۰× و ۴۰× میکروسکوپ مشاهده کنید و برای بررسی آن با بزرگنمایی ۱۰۰× ،یک قطره روغن سدر(ایمرسیون) روی لامل بریزید و لام را مشاهده کنید.

### توجه‌کنید

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 مستقیما 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

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

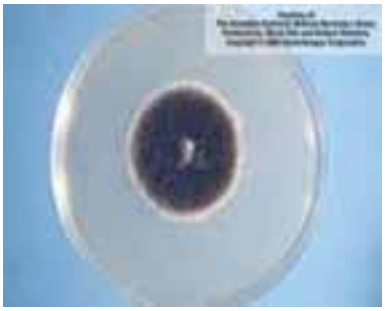
## فکر کنید

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[1]



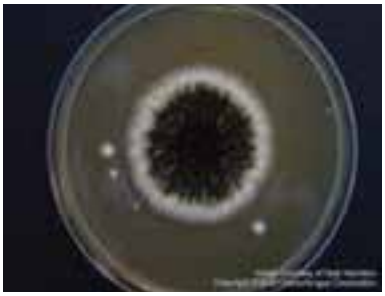
شکل ۲–۴

شکل ۳–۴

این کپک واجد کلنی های چند سلولی و گلابی شکل می باشد که متصل به یک کنیدیوفور می باشند میسیلیوم 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 میسیلیوم های هوایی آن به رنگ خاکستری بوده و خیلی متراکم نیستند. (شکل های ۲–۴ و ۳–۴)

۱– Alternaria

## کپک آسپرژیلوس[1]



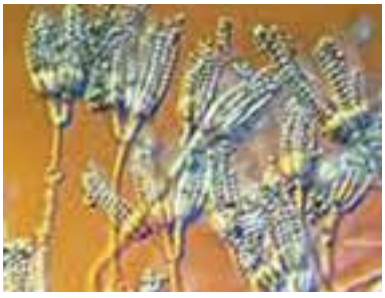
شکل ۴-۴

شکل ۴-۵

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[2]

شکل ۴-۶



شکل ۴-۷

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 بالغ آن خاکستری تیره می باشند. (شکل های ۴-۶ و ۴-۷)

## کپک رایزوپوس[3]

شکل ۴-۸

شکل ۴-۹

۱– Aspergillus
۲– Penicillium
۳– Rhizopus

اسپورهای این کپک تخم مرغی شکل می باشد. میسیلیوم دارای دیواره عرضی است و اسپورانژیوسپورهای 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 میسیلیوم های هوایی آن تیره می شوند. کلنی های آن پنبه ای و کرک مانند است. (شکل های ۸-۴ و ۹-۴)

شکل ۱۰-۴

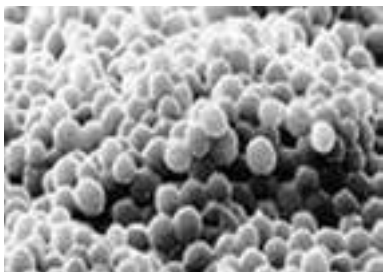
## کپک موکور[1]

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

شکل ۱۱-۴

.

## مخمرها



شکل ۱۲-۴

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

شکل ۱۳-۴

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[2] می باشد.

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

شکل ۱۴-۴

۱- Mucur
۲- candida

## آزمایش کنید: مشاهده مخمر ساکارومایسس سرویزه آ[1]

### مواد و لوازم مورد نیاز :

- کشت ۲۴ ساعته مخمر ساکارومایسس سرویزه آ در محیط کشت مناسب مانند گلوکز براث
- لام و لامل تمیز
- آنس و پیپت پاستور سترون

### روش انجام آزمایش :

۱- مقدار ۳-۲ 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 میکروسکپی قرار دهید.

۳- سلول مخمر رابا دقت از نظر وجود قسمتهایی نظیر هسته، واکوئل، گرانول، دیواره سلولی،جوانه وغیره مورد بررسی قرار دهید. مشاهدات خود را در محل مشخص شده در گزارش کار ترسیم کنید.

### گزارش کار

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

### نتیجه گیری

.....

.....

.....

.....

.....

۱ – Saccharomyces cerevisiae

## A واژه های فصل چهارم

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

# منـــــابع


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 دکترا رشته میکروبیولژی،دانشکده پزشکی،دانشگاه تربیت مدرس.

۲- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۸۱. میکروبیولژی 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. میکروبیولژی 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. میکروبیولژی مواد غذایی - جستجو و شناسایی سالمونلا با استفاده از روش امپدانس. شماره ۷۷۲۷، چاپ اول.

۵- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۸۴. میکروبیولژی مواد غذایی و خوراک دام- شمارش استافیلوکوکوس اوریوس کوآگولار مثبت (استافیلوکوکوس اریوس 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. میکروبیولژی مواد غذایی و خوراک دام- روش جستجو و شمارش اشریشیا کلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی. شماره ۲۹۴۶،تجدیدنظر دوم.

۷- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۸۸. میکروبیولژی مواد غذایی - ردیابی سالمونلابه روش واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR). شماره ۱۲۶۳۸،چاپ اول.

8- Amin, M.,Kalantar E., Mohammad-Saeid, N., Ashan, B., 2010. Antibacterial ettect 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 multifora*) against some food-borne bacteria, J. Food Control (18): 646-649.

13- Harborn, J.B. 1988. Introduction to ecological biochemistri. 3rd 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, Antistapyloccalactivity of Zataria multiflora essebtial 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 *Staphylococus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membanes. J. Food Research International 41, 1050-1057.

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

18- Ntzimani, G.A., Giatrakou, 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$^{o}$C: Microbiological and sensory evalution, 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. Coagulasepostitive 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, Staphlococcus aureus* and *Listeria monocytogenes.* J. Food Control 18(5): 414-420.

21- Piggot, P.J., 2009. *Bacilus Stbtilis*, [a]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 defferent 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 antibacterialand antixidant 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.