

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

میکروبیولوژی تجربی

اصول بنیادی و کاربردها

دکتر جمشید فقری

استادیار گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

سرشناسه	:	فقری، جمشید
عنوان و نام پدیدآور	:	میکروبیولوژی تجربی / نویسنده جمشید فقی.
مشخصات نشر	:	تهران : محیا
مشخصات ظاهری	:	۴۳۰ ص.
شابک	:	978-600-5252-25-5
وضعیت فهرست نویسی	:	فیا
عنوان دیگر	:	میکروبیولوژی تجربی: اصول بنیادی و کاربردها.
موضوع	:	میکروبشناسی
شناسه افزوده	:	دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان اصفهان
رده بندی کنگره	:	۹م۷/۴۱/۲QR
رده بندی دیویی	:	۵۷۹
شماره کتابشناسی ملی	:	۵۱۸۹۰۰۲

میکروبیولوژی تجربی

نویسنده: جمشید فقی

ناشر: محیا

تیراژ: ۲۰۰ جلد

نوبت چاپ: اول ۱۳۹۲

قیمت: ۳۰۰۰۰۰ ریال

شابک: ۵-۲۵-۵۲۵۲-۶۰۰-۹۷۸

تلفن: ۰۹۱۲۳۵۹۱۴۴۳-۶۶۴۰۶۴۷۷

پیش گفتار

کتاب میکروبیولوژی آزمایشگاهی برای دانشجویان و علاقه مندان به رشته میکروبیولوژی تدوین شده، در این اثر سعی گردیده نیازهای کسانی که برای اولین بار با میکروارگانیسم‌ها و انجام بسیاری از روش‌های میکروبی سروکار دارند به طور کامل برآورده شود. در واقع، این کتاب آزمایشگاهی جامعی است که حاوی اطلاعات لازم برای دانشجویان بوده و با تکیه بر آن می‌توان اصول پیچیده و مبهم در هر آزمایش را درک نموده و آن را انجام داد. تمرین‌ها بصورتی دقیق و عملی طراحی گردیده است.

اما ممکن است علی‌رغم انجام دقیق یک آزمایش، گاهی نتایجی خلاف انتظار حاصل شود؛ بنابراین، اگر در طول انجام آزمایشی شکست خوردید ناامید نشوید و به خاطر داشته باشید شما با ارگانیسم‌های زنده سروکار دارید که از خود تغییرپذیری نشان می‌دهند و در برخی مواقع، منجر به غیر قابل پیش‌بینی شدن نتایج می‌گردند. مهمترین جنبه انجام تمرین‌های آزمایشگاهی، ثبت و تفسیر وقایعی است که مشاهده می‌شود. بنابراین، در پایان هر تمرین، یک بخش مربوط به نتایج آمده که در ثبت و تفسیر یافته‌هایی که به دست آمده کمک می‌کند. همچنین سؤالاتی مناسب با تمرین‌های کتاب ضمیمه گردیده است که به شما فرصت می‌دهد تا درک خود را از اصول علمی و اطلاعات بدست آمده از تجربیات، تکمیل نمایید.

ضمناً، تمرین‌های ویژه و پیشرفته‌ای انتخاب شده که معمولاً برای انجام آنها نیاز به تجهیزاتی خاص مانند گاز کروماتوگرافی و دستگاه الکتروفورز می‌باشد و امکان دارد در هر آزمایشگاه میکروبیشناسی معمولی در دسترس نباشد. با این حال، اصولی که پایه و مبنای میکروبیشناسی مدرن هستند، از جمله تکنیک‌هایی برای استفاده از رادیوایزوتوپ که در بیولوژی مدرن و آشکارسازی اسرار نهفته در ساختمان و متابولیسم سلولی بصورت یک نیاز مبرم درآمده و تکنیک‌های الکتروفوریتیک جدید به عنوان راهنما در بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک، به طور مفصل شرح داده شده است. این آزمایش‌ها را انجام دهید زیرا تعداد بیشماری از روش‌های نوین و معاصر را که در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی مدرن بکار می‌روند، به معرض نمایش می‌گذارند.

کتاب حاضر، دارای چهارده بخش، شامل: "کشت و بررسی میکروارگانیسم‌ها، مشاهده ساختمان میکروارگانیسم‌ها، متابولیسم میکروبی، رشد میکروبی، ژنتیک میکروب، ویروس‌شناسی، طبقه‌بندی میکروبی، آرشی باکتری‌ها، میکروبیشناسی مواد غذایی، میکروبیشناسی صنعتی، میکروبیشناسی محیطی، میکروبیشناسی پزشکی، ایمنی‌شناسی و دفاع میزبان علیه بیماری و حساسیت آنتی‌بیوتیکی است" که وسعت علم میکروبیولوژی را نشان می‌دهد.

آنچه مرا بر آن داشت تا تقریری در رشته میکروبیشناسی داشته باشم، کمبود منابع جامع فارسی حاوی مطالب علمی بنیادی - کاربردی در رشته میکروبیشناسی و اعتقاد راسخ به این سخن گرانمایه است که «زکات علم نشر آن است»، لذا حاصل چندین سال تلاش و تدریس و خدمت به جامعه علمی را در این اثر به یادگار گذاردم.

نیک می‌دانم که هیچ اثری بدون پیرایه نخواهد بود لذا از کلیه سروران و عزیزان تقاضا می‌کنم که با پیشنهادات خویش مرا در تکمیل تجدید چاپ این اثر یاری نمایند.

اعتقاد راسخ دارم که درک جهان هستی تلاش و کوششی مستمر می‌طلبد و باید در این راه از تجربیات گرانبها بهره گرفته و دانش خویش را توسعه بخشیم تا جهان هستی را از دریچه‌ای دیگر بنگریم.

دکتر جمشید فقری

استادیار گروه میکروبیشناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

فهرست

II	پیشگفتار
۱	بخش اول: بررسی و کشت میکروارگانیسم‌ها
۲	۱- تهیه محیط‌های کشت
۳	A. تهیه محیط‌های مرکب
۵	B. تهیه محیط‌های معین شده
۷	۲- رشد میکروارگانیسم‌ها
۷	A. وجود و حضور میکروارگانیسم‌ها در محیط
۸	B. نیازهای غذایی جهت رشد
۱۰	۳- تکنیک آسپتیک در هنگام انتقال میکروارگانیسم‌ها از یک محیط به محیط دیگر
۱۱	A. انتقال محیط مایع حاوی میکروارگانیسم‌ها از یک لوله به لوله دیگر
۱۲	B. انتقال از یک آگار به فرم مورب به دیگری
۱۵	۴- ایجاد کشت‌های خالص: استریک کردن پلست یا کشت به روش خطی
۲۰	۵- نگهداری محیط‌های کشت: تهیه و تولید محیط کشت ذخیره
۲۳	بخش دوم: مشاهده میکروارگانیسم‌ها و ساختمان میکروبی
۲۴	۶- مشاهده میکروارگانیسم‌ها: به روش میکروسکوپی
۲۸	A. مشاهده میکروارگانیسم‌ها با میکروسکوپ زمینه روشن
۳۰	B. بررسی میکروارگانیسم‌های زنده توسط میکروسکوپ زمینه روشن
۳۱	C. اندازه گیری سلولهای میکروبی با استفاده از میکرومتر
۳۲	D. کار با میکروسکوپ فازکنتراست
۳۵	E. کار با میکروسکوپ فلورسنس - تکنیکی پیشرفته
۴۲	۷. رنگ‌آمیزی میکروارگانیسم‌ها
۴۲	A. رنگ‌آمیزی ساده و تهیه گسترش
۴۴	B. رنگ‌آمیزی گرم
۴۸	C. رنگ‌آمیزی اسید - فاست
۴۹	D. رنگ‌آمیزی برای اسپور باکتریایی
۵۰	E. رنگ‌آمیزی فلاژل - اختیاری
۵۱	F. رنگ‌آمیزی منفی - رنگ‌آمیزی کپسول
۵۷	۸- نقش دیواره سلولی
۶۲	۹- حرکت باکتری‌ها در پاسخ به محرک‌ها: کموتاکسی
۶۲	A. رفتار باکتری‌های متحرک

۶۳	B. رفتار کموتاکیک باکتری ها - تمرین پیشرفته
۶۹	بخش سوم : متابولیسم میکروبی
۷۲	۱۰- ATP : نقش مرکزی آن در متابولیسم
۷۷	۱۱- کوآنزیم ها : نقش NAD در واکنش های اکسید و احیاء
۷۷	A. برگرداندن لاکتات به پیرووات
۷۸	B. برگرداندن پیرووات به لاکتات
۷۹	C. بیوستز گلوتامیک اسید از قدرت احیاء کنندگی NADPH استفاده می کند
۸۲	۱۲- آنزیمها : آزمایشاتی جهت تعدادی آنزیمهای میکروبی ویژه
۸۲	A. کاتالاز
۸۳	B. سیتوکروم اکسیداز
۸۴	C. دکربوکسیلاز
۸۵	D. دی آمیناز
۸۶	E. تریپتوفاناز (تولید اندول توسط هیدرولیز تریپتوفان)
۸۶	F. سیستئین دسولفوراز (تولید سولفید هیدروژن)
۸۶	G. ژلاتیناز
۸۷	H. اوره آز
۸۷	I. آمیلاز
۸۸	J. نیتراتاز (احیاء نیترات)
۸۸	K. کوآگولاز
۸۹	L. دی ان آز
۹۵	۱۳ - چرخه متابولیکی
۹۷	A. تولید اسید و گاز از تخمیر کربوهیدرات
۹۷	B. مسیر تخمیری بوتان دی ال (آزمایش VOGES - PROSKAUER (VP))
۹۸	C. مسیر تخمیر اسیدی مخلوط (تست متیل رد)
۹۸	D. استفاده از یک منبع کربن برای رشد مصرف سیترات
۱۰۲	۱۴- مشخص نمودن میزان باروری اولیه به وسیله اندازه گیری ثبوت CO_2 - تمرین پیشرفته
۱۰۷	بخش چهارم : رشد میکروبها
۱۰۸	۱۵ - شمارش میکروارگانیزمها
۱۰۸	A. شمارش پلیت زنده
۱۰۹	روش شمارش پلیت زنده
۱۱۱	روش پخش شدن در پلیت

۱۱۲	B. روش بیشترین شمارش احتمالی (MPN)
۱۱۴	C. شمارش مستقیم با استفاده از محفظه شمارش
۱۱۵	D. بر آورد توده زیستی میکروب ها به وسیله اندازه گیری پروتئین : روش LOWRY
۱۲۰	۱۶ - اندازه گیری میزان رشد میکربی
۱۲۳	۱۷ - اثرات محیطی بر روی میزان رشد میکروبی
۱۲۴	A. اثر درجه حرارت بر روی رشد میکروبی
۱۲۶	B. اثر فشار اسمزی بر روی رشد میکروبی
۱۲۷	C. اثر PH بر روی رشد میکروبی
۱۲۸	D. اثر اکسیژن بر روی رشد باکتری ها
۱۳۱	E. تکنیک های کشت بی موازی
۱۳۷	۱۸- محیط های انتخابی و افتراقی
۱۴۳	۱۹- مرگ میکروارگانیسم ها
۱۴۳	A. کشتن حرارت : روش های گرمایی برای کشتن
۱۴۴	B. اثرات گندزداها روی میکروارگانیسم ها
۱۴۸	C. اثرات کشندگی نور ماوراءبنفش
۱۴۹	D. اثر شستن دست ها بر روی تعداد میکروارگانیسم های پوست
۱۵۵	بخش پنجم : ژنتیک میکروب ها
۱۵۷	۲۰ - جهش ها
۱۵۷	A. جدا کردن یک جهش یافته خود بخودی
۱۵۹	B. Replica Plating به عنوان تکنیکی برای شناسایی جهش یافته ها
۱۶۴	۲۱ - تست Ames برای تشخیص موتاژن ها و مواد سرطان زا
۱۶۵	A. تست Ames با استفاده از روش سنجش بوسیله دیسک
۱۶۵	B. تست Ames به روش کمی
۱۶۹	۲۲ - تنظیم بیان ژن: رشد دو فازی
۱۷۳	۲۳- ترانسفورماسیون باکتریایی
۱۷۷	۲۴- ترانسداکسیون
۱۸۰	۲۵- تعیین نقشه ژنتیکی به وسیله آمیزش متناوب - کونژوگاسیون - تمرین پیشرفته
۱۸۴	۲۶- جداسازی و توصیف DNA پلاسمیدی - تمرین پیشرفته
۱۸۴	A. جداسازی و تلخیص DNA پلاسمیدی
۱۸۶	B. تشخیص DNA پلاسمیدی به وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگارز
۱۸۹	۲۷- مهندسی ژنتیک : کلون کردن ژن - تمرین پیشرفته

۱۹۳	بخش ششم: ویروس شناسی
۱۹۷	۲۸- چرخه تکثیر باکتریوفاژلیتیک
۲۰۱	۲۹- شناسایی تاکسونومیک به وسیله فازتایپینگ
۲۰۳	۳۰- جداسازی باکتریوفاژ
۲۰۷	۳۱- عفونت گیاهان به وسیله ویروس موزائیک توتون
۲۱۰	۳۲- کشت ویروس حیوانی در تخم مرغ جنین دار
۲۱۳	بخش هفتم: تاکسونومی میکربی
۲۱۹	۳۳- شناسایی میکروارگانیسم های ناشناخته
۲۱۹	A. شناسایی باکتری های ناشناخته
۲۲۱	B. معیارهای مورد استفاده برای شناسایی قارچ ها
۲۲۳	C. معیارهای مورد استفاده در شناسایی دیاتومه ها
۲۲۷	D. معیارهای مورد استفاده در شناسایی پرده تور و آها
۲۳۱	۳۴- شناسایی باکتریایی با استفاده از سیستم های شناسایی تجارتي
۲۳۱	A. شناسایی یک باکتری روده ای مجهول با استفاده از سیستم ایتروتیوب
۲۳۵	B. شناسایی یک باکتری روده ای مجهول با استفاده از سیستم API 20
۲۴۲	۳۵- تشخیص سرولوژیکی باکتریهای مهم کلینیکی
۲۴۴	۳۶- تشخیص باکتری های بی هوازی اجباری با استفاده از کرماتوگرافی گاز مایع - روش پیشرفته
۲۴۷	۳۷- طبقه بندی باکتریال براساس آنالیز ژنتیکی: تعیین مول %G+C - تمرین پیشرفته
۲۵۱	بخش هشتم: آرکئوباکتريا
۲۵۳	۳۸- باکتری های متان زا
۲۵۶	۳۹- باکتری های هالوفیل اجباری
۲۵۹	بخش نهم: میکروبیولوژی غذایی
۲۶۰	۴۰- میکروارگانیسم های مربوط به غذا
۲۶۰	A. جداسازی میکروارگانیسم های سایکروفیل - سایکروتروفیک از همبرگر
۲۶۱	B. جدا سازی مخمر از میوه
۲۶۵	۴۱- فاسد شدن غذا
۲۶۵	A. فساد میکروبی میوه ها و فرآورده های میوه
۲۶۶	B. فساد میکروبی نان
۲۶۷	C. فساد میکروبی غذاهای کنسرو شده
۲۷۲	۴۲- نگهداری از مواد غذایی
۲۷۲	A. استفاده از حرارت به منظور افزایش نیمه عمر شیر

- ۲۷۳ B. استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی جهت افزایش نیمه عمر آب سبب
- ۲۷۶ ۴۳- تولید مواد غذایی تخمیرشده.....
- ۲۷۶ A. تولید آبجو
- ۲۷۷ B. تولید کلم شور
- ۲۷۸ C. تولید ماست
- ۲۸۱ بخش دهم : میکروبیولوژی صنعتی
- ۲۸۲ ۴۴- غربالگری برای جداسازی یک تولید کننده آنتی بیوتیک
- ۲۸۶ ۴۵- تولید میکروبی اسیدهای آلی
- ۲۸۹ بخش یازدهم : میکروبیولوژی محیطی
- ۲۹۰ ۴۶- جداسازی و کشت گروه‌های ویژه‌ای از باکتری‌ها
- ۲۹۰ A. غنی سازی باکتری‌های شرکت کننده در چرخه سولفور با استفاده از یک ستون وینوگراسکی
- ۲۹۲ B. جداسازی باکتری‌های بیولومیناس
- ۲۹۴ C. جداسازی باکتری‌های مگتوتاکنیک
- ۲۹۸ ۴۷- واکنش‌های متقابل بین میکروارگانیسم‌ها
- ۲۹۸ A. کامنسالیسم باکتریایی
- ۲۹۹ B. همزیستی بین جلبک یا سیانوباکتری و قارچ (گل‌سنگ)
- ۲۹۹ C. صید پروتوزوایی
- ۳۰۰ D. پارازیتسم باکتریایی
- ۳۰۳ ۴۸- اثرات متقابل بین میکرب‌ها و گیاهان
- ۳۰۳ A. رابطه همزیستی بین ریزوبیوم و گیاهان خانواده حبوبات
- ۳۰۴ B. پاتولوژی گیاهی
- ۳۰۷ ۴۹- گردش بیوژئوشیمیایی : سیکل نیتروژن
- ۳۰۸ A. آمونیفیکاسیون
- ۳۰۹ B. دی نیتروfikاسیون
- ۳۱۲ ۵۰- تجزیه بیولوژیکی مواد زائد و آلوده کننده ها
- ۳۱۲ A. تجزیه سلول
- ۳۱۴ B. تجزیه بیولوژیکی نفت خام
- ۳۱۸ ۵۱- کیفیت آب - شما رش کلی فرم ها
- ۳۲۱ بخش دوازدهم : میکروبیولوژی پزشکی
- ۳۲۲ ۵۲- اصول کخ
- ۳۲۲ A. مدل حیوانی

۳۲۴	B. مدل گیاهی
۳۲۷	۵۳- انتقال بیماری : راه ورود
۳۳۰	۵۴ - جداسازی و تشخیص میکروارگانیسم های بافت ها و مایعات بدن
۳۳۰	A. کشت گلو
۳۳۱	B. کشت ادرار
۳۳۳	C. میکروارگانیسم های موجود بر روی پوست انسان
۳۳۹	بخش سیزدهم : ایمنولوژی و دفاع های میزبان در برابر بیماری ها
۳۴۱	۵۵- دفاع های غیر اختصاصی میزبان : فاگوسیتوز
۳۴۲	A. شمارش تمایزی گلبول های سفید
۳۴۴	B. مدل سیستم فاگوسیتوز
۳۴۸	۵۶ - آگلوتیناسیون و تعیین گروه خونی
۳۵۲	۵۷- آگلوتیناسیون غیر فعال
۳۵۲	A. هماگلوتیناسیون غیر فعال
۳۵۳	B. آگلوتیناسیون غیر فعال با ذرات لاتکس
۳۵۶	۵۸- ثبوت کمپلمان
۳۵۹	۵۹- رسوب الکترولونی
۳۶۳	۶۰- ایمنواسی آنزیمی (EIA)
۳۶۷	۶۱- ایمنوفلورسانس غیر مستقیم
۳۷۱	بخش چهاردهم : حساسیت آنتی بیوتیکی
۳۷۳	۶۲- روش Kirby - Bauer دیسک
۳۷۶	۶۳- روش حداقل غلظت ممانعت کننده (MIC)
۳۸۱	ضمیمه ها
۴۰۹	منابع

◀ بخش اول

بررسی و کشت میکروارگانیسم‌ها

- تمرین ۱ (تهیه محیط های کشت) ۲
- تمرین ۲ (رشد میکروارگانیسم‌ها) ۷
- تمرین ۳ (تکنیک آسپتیک در هنگام انتقال میکروارگانیسم‌ها از یک محیط به محیط دیگر) ۱۰
- تمرین ۴ (ایجاد کشت‌های خالص: استریک کردن پلیت یا کشت به روش خطی) ۱۵
- تمرین ۵ (نگهداری محیط‌های کشت: تهیه و تولید محیط کشت ذخیره) ۲۰

به دست آوردن کشت خالص میکروارگانیسم در صورتی میسر است که سایر گونه‌های میکروبی از بین بروند. چون میکروارگانیسم‌ها به طور طبیعی در محیط وجود دارند، به دست آوردن و نگهداری کشت خالص نیاز به انجام مراحل زیر دارد:

به دست آوردن کشت خالص:

از بین بردن سایر میکروارگانیسم‌ها از محیط کشت (استریلیزاسیون)

جدا سازی میکروارگانیسم از سایرین با عمل کشت (ایزولاسیون)

انتقال میکروارگانیسم از یک پلیت به پلیت دیگر بدون هیچگونه آلودگی (انتقال آسپتیک)

نگهداری کشت خالص:^۲

دانشجویان میکروبیولوژی باید در تکنیک‌های پایه مهارت قابل اطمینانی داشته باشند که شامل:

تهیه محیط مناسبی که رشد میکروب را تقویت کند (توأم با استریلیزاسیون)

بررسی سلول‌های میکروبی و انتقال آسپتیک آنها

برای بررسی و مطالعه خصوصیات هر میکروارگانیسم، کشت آن به صورت خالص ضروری است. تپ‌های مختلفی از میکروارگانیسم‌ها وجود دارد و هر تپ‌ی دارای حداقل نیازها، حدودی تحمل یا تولرانس، و شرایط مطلوب برای رشد می‌باشد. میکروارگانیسم‌ها جهت رشد نیاز به محیط مناسب دارند. این محیط مناسب محیطی است که نیازهای غذایی آنها را بتواند برآورده و تأمین کند. بسیاری از گونه‌های باکتریایی می‌توانند روی محیط‌های معینی در آزمایشگاه رشد کنند که معمولاً حاوی کربن آلی مانند گلوکز و پروتئین، مواد معدنی مانند منبع نیترژن و فسفر و آب است. انواع مختلفی از محیط‌های کشت وجود دارند که برای رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها استفاده می‌شود.

کشت میکروارگانیسم‌ها علاوه بر محیط‌های رشد معین^۱، نیاز به کنترل‌های دقیق فاکتورهای محیطی مختلف دارد مثل دما که معمولاً با استفاده از دمای کنترل شده در رنج محدود به وسیله انکوباتور به دست می‌آید. با دانستن نیازهای رشد گونه‌های میکروبی داده شده می‌توان شرایط مورد نیاز را در محیط خارجی^۲ تهیه کرد به طوری که بتوان

رشد مطلوبی از میکروارگانیسم‌ها را فراهم کرد.

1- defined

2- in vitro

3- Preservation