بسم الله الرحمن الرحيم

# مهارت‌های آزمایشگاه

# میکروب‌شناسی

## جلد اول


تألیف و ترجمه:

**دکتر علی محمّدی**
عضو هیئت علمی دانشگاه الزهرا (س)

**دکتر حمیده میرشفیعی**
دانشگاه شهید بهشتی

# فهرست مطالب


۳ .....

**فصل اول: ایمنی در آزمایشگاه ..... ۱۳**

سطوح ایمنی زیستی ..... ۱۵

سطح ۱ ایمنی زیستی (BSL-1) ..... ۱۵

سطح ۲ ایمنی زیستی (BSL-2) ..... ۱۶

سطح ۳ ایمنی زیستی (BSL-3) ..... ۱۸

سطح ۴ ایمنی زیستی (BSL-4) ..... ۱۹

اصول کار در آزمایشگاه ..... ۲۱

**بخش اول مهارت‌های اصولی ..... ۲۷**

**فصل دوم: آماده‌سازی محیط کشت ..... ۳۱**

لوله‌های کشت و پتری‌دیش‌ها ..... ۳۲

انواع محیط کشت از نظر حالت ..... ۳۳

انواع محیط کشت از نظر کاربرد ..... ۳۶

آماده‌سازی محیط نوترینت براث و آگار ..... ۳۸

الف) لوله‌های نوترینت آگار ( عمیق و شیب‌دار) ..... ۴۰

ب) پلیت‌های نوترینت آگار ..... ۴۰

ج) نوترینت براث ..... ۴۱

**فصل سوم: انتقال و تلقیح آسپتیک ..... ۴۳**

شیوه های متداول ..... ۴۴

دریافت نمونه با لوپ یا سوزن تلقیح ..... ۴۷

تلقیح محیط‌های مختلف ..... ۴۸

**فصل چهارم: جداسازی باکتری‌ها ..... ۵۳**

کشت خطی (استریک پلیت) ..... ۵۴

روش کوادرانت (ربع) ..... ۵۴

روش زیگزاگ با سُواپ ..... ۵۵

کشت یکنواخت (اسپرید پلیت) ..... ۵۸
کشت آمیخته (پورپلیت) ..... ۶۱
جداسازی کشت خالص ..... ۶۲
**فصل پنجم: ذخایر کشت باکتریایی ..... ۶۵**
روشهای متداول نگهداری ..... ۶۵
۱) واکشت‌های (تجدید کشت) متوالی ..... ۶۶
۲) ذخیره در دماهای پایین ..... ۶۶
۳) انجماد خشک (لیوفیلیزاسیون) ..... ۶۷
۴) ذخیره‌سازی در آب مقطر ..... ۶۸
۵) خشک‌کردن ..... ۶۸
نگهداری کوتاه‌مدت ..... ۶۹
نگهداری بلندمدت ..... ۶۹
روش ۱: به‌کارگیری گلیسرول و محیط براث ..... ۷۱
روش ۲: به‌کارگیری دانه‌های پلاستیکی ..... ۷۲
بازیابی و کشت ذخایر منجمد ..... ۷۲

**بخش دوم: رشد میکروبی ..... ۷۵**

**فصل ششم: تنوع رشد میکروارگانیسم‌ها ..... ۷۸**
مکان میکروارگانیسم‌ها ..... ۷۸
مورفولوژی کلنی ..... ۸۰
الگوهای رشد در آگار شیب‌دار ..... ۸۸
الگوهای رشد در براث ..... ۹۰
**فصل هفتم: عوامل محیطی مؤثر در رشد ..... ۹۳**
ارزیابی محیط کشت ..... ۹۳
تأثیر دما بر رشد ..... ۹۵
تأثیر pH بر رشد ..... ۹۹
تأثیر فشار اسمزی بر رشد ..... ۱۰۲
روش ۱ - در محیط براث ..... ۱۰۵
روش ۲ - در محیط آگار ..... ۱۰۵

تأثیر اکسیژن اتمسفری ۱۰۶
**فصل هشتم: کشت بی‌هوازی‌ها ۱۱۱**
کشت عمقی آگار ۱۱۴
محیط تیوگلیکولات براث ۱۱۵
سیستم بی هوازی گازپک ۱۱۷

**بخش سوم: کنترل پاتوژن‌ها ۱۲۱**
**فصل نهم: کنترل فیزیکی پاتوژن‌ها ۱۲۵**
حرارت مرطوب ۱۲۶
کنترل استریلیزاسیون ۱۲۷
اثر کشندگی UV ۱۳۰
**فصل دهم: کنترل شیمیایی پاتوژن‌ها ۱۳۴**
تست حساسیت آنتی‌بیوتیک کربی بائر ۱۳۶
سینرژیسم داروهای ترکیبی ۱۴۳
تشخیص فعالیت پنی‌سیلین در حضور یا عدم حضور پنی‌سیلیناز ۱۴۶
گندزداها و مواد ضدعفونی ۱۵۰
ارزیابی داروهای ضدمیکروب ۱۵۵
تست رقت ۱۵۶
ضریب فنل (PC) ۱۵۷
ارزیابی الکل به‌عنوان عامل میکروب‌زدا ۱۶۲

**بخش چهارم: میکروسکوپ و رنگ‌آمیزی ۱۶۵**
**فصل یازدهم: میکروسکوپ ۱۶۹**
میکروسکوپ نوری ۱۷۰
اجزای اصلی میکروسکوپ نوری ۱۷۱
الف) اجزای مکانیکی ۱۷۱
ب) اجزای نوری ۱۷۳
عوامل مهم بکارگیری میکروسکوپ ۱۷۳
الف ) بزرگنمایی ۱۷۳

ب) توان تفکیک ۱۷۴
کالیبراسیون میکرومتر چشمی ۱۷۹
اندازه‌گیری ابعاد سلول ۱۸۲
میکروسکوپ زمینه تاریک ۱۸۴
میکروسکوپ اختلاف فاز ۱۸۵
**فصل دوازدهم: شیوه‌های آماده‌سازی نمونه ۱۸۷**
تهیه‌ی لام مرطوب و قطره معلق ۱۸۸
الف) تکنیک لام مرطوب ۱۹۰
ب) تکنیک قطره معلق ۱۹۱
تهیه گستره‌ی باکتریایی ۱۹۲
**فصل سیزدهم: رنگ‌آمیزی ساختاری و افتراقی ۱۹۷**
رنگ‌آمیزی ساده ۱۹۸
رنگ‌آمیزی منفی ۲۰۲
رنگ‌آمیزی گرم ۲۰۵
جایگزین‌های رنگ‌آمیزی گرم ۲۰۸
الف) تست رشته‌ای KOH ۲۰۹
ب) تست آمینوپپتیداز ۲۰۹
ج) رنگ‌های فلورسنت ۲۱۰
رنگ‌آمیزی اسید- فَست ۲۱۳
الف) روش زیل نلسون (ZN) ۲۱۵
ب) روش کینیون (K) ۲۱۶
رنگ‌آمیزی دیواره سلولی ۲۱۸
الف) روش اسید فسفومولیبدیک ۲۱۹
ب) روش چِنسز ۲۲۰
ج) روش رِینبو ۲۲۰
ح) روش رینگر ۲۲۰
د) روش ستیل پیریدینیوم ۲۲۱
رنگ‌آمیزی کپسول ۲۲۱
الف) روش آنتونی ۲۲۳
ب) روش هیس ۲۲۴

ج) روش گراهام و ایوانز ..... ۲۲۴
د) روش مانوال ..... ۲۲۵
ه) روش هوی و پاتریک کریک ..... ۲۲۵
رنگ‌آمیزی اسپور ..... ۲۲۷
الف) روش شفر- فولتون (SF) ..... ۲۳۱
ب) روش دورنر ..... ۲۳۲
ج) روش دورنر تغییریافته ..... ۲۳۲
رنگ‌آمیزی تاژک ..... ۲۳۳
الف) روش وست (WM) ..... ۲۳۵
ب) روش لیفسون ..... ۲۳۶
پ) روش دیفکو ..... ۲۳۷
ت) روش لام مرطوب ..... ۲۳۷
ج) روش گِری ..... ۲۳۸
ح) روش رُدز ..... ۲۳۸
د) روش کِسارز-گیل ..... ۲۳۹
رنگ‌آمیزی دانه‌های ولوتین ..... ۲۳۹
الف) روش آلبرت ..... ۲۴۲
ب) روش نیسر تغیر یافته ..... ۲۴۲
ج) روش لوفلر ..... ۲۴۲
رنگ‌آمیزی دانه‌های لیپیدی ..... ۲۴۳
الف) روش لام مرطوب ..... ۲۴۴
ب) روش دوم ..... ۲۴۴
رنگ‌آمیزی کریستال‌های پاراسپورال ..... ۲۴۵
رنگ‌آمیزی هسته ..... ۲۴۷
الف) روش فولگن ..... ۲۴۹
ب) روش گیمسا ..... ۲۴۹
رنگ‌آمیزی اسپیروکت‌ها ..... ۲۴۹
الف) روش فونتانا ..... ۲۵۱
ب) روش بِکِر ..... ۲۵۲

**بخش پنجم: روش‌های کمّی..... ۲۵۳**

**فصل چهاردهم: تکنیک‌های کمی..... ۲۵۵**

شمارش استاندارد پلیت ..... ۲۵۶

الف) روش اول- شمارش استاندارد پلیت با روش اسپرید پلیت ..... ۲۵۹

ب) روش دوم- شمارش باکتری‌های زنده با روش پورپلیت ..... ۲۶۱

کشت ادرار ..... ۲۶۵

شمارش مستقیم (پتروف هوسر) ..... ۲۶۷

رشد در سیستم بسته ..... ۲۶۹

الف) روش کلاسیک رسم منحنی رشد باکتری ..... ۲۷۳

ب) روش دوساعته رسم منحنی رشد باکتری ..... ۲۷۵

سنجش پلاک برای تیتر ویروس ..... ۲۷۷

الف) روش اول ..... ۲۸۱

ب) روش دوم ..... ۲۸۲

زمان مرگ حرارتی در مقابل میزان اعشاری کاهش ..... ۲۸۴

ضمیمه A: محیط کشت‌های میکروبی ..... ۲۹۱

ضمیمه B: معرف‌ها، محلول‌ها، رنگ‌ها و تست‌ها ..... ۳۰۵

منابع ..... ۳۱۱