به نام خدا

Industrial Microbiology

By: **Dr. A. Mohammadi**

Department of Biology,
Faculty of science,
University of Alzahra

fppt.com

جلسه دوم
غربالگری میکروارگانیسم ها و طراحی محیط کشت

هدف: بررسی ترکیب محیط کشت بر جداسازی میکروارگانیسم ها

fppt.com

نکات غربالگری

- دقت در جداسازی سویه صنعتی
- برخلاف تشخیص های کلینیک، عدم دسترسی به محیط کشت آماده
- عامل مهم غربالگری: طراحی محیط کشت.
- ابداع فرمولاسیون نیازمند دانستن ویژگی های زیستی میکروارگانیسم
- مستلزم کشت خالص
- به صورت تجربی و با تغییر مواد موثره محیط
- محیط ساختگی دارای ترکیب ثابت و مشخص است.
- محیط نیمه ساختگی علاوه بر مواد شیمیایی دارای فراورده های زیستی با ترکیب نامشخص مثل عصاره ها یا خیسانده ها

تنظیم عوامل محیطی

- ترکیب غذایی مناسب در محیط کشت
- تنظیم پی اچ و وضعیت بافری محیط
- حضور اکسیژن و یا دیگر گازها با تراکم کافی
- مقدار رطوبت در محیط کشت
- عوامل واکنش‌دهنده‌ی مناسب در محیط
- دمای مناسب
- سترون کردن محیط و جلوگیری از آلودگی

محیط نیمه ساختگی

- ساخت محیط نیمه ساختگی A
- تغییر محیط A با کاستن و افزودن مواد که موجب افتراق گروه های خاص می شود.

۱) افزودن یک معرف پی اچ نظیر قرمز خنثی که جذب سلولهای زنده می‌شود، موجب افتراق کلنیهای مولد اسید (کلنی‌های قرمز) خواهد شد.

۲) افزودن منبع کربن پلیمری (نشاسته) و حذف منبع کربن آسان جذب (مثل گلوکوز) به انتخاب باسیلوسها خواهد انجامید.

۳) بالا بردن تراکم قند ساده و حذف عامل بافر کننده موجب افت شدید پی. اچ و رشد بهتر کپک‌ها می‌گردد.

۴) اضافه کردن بازدارنده‌های رشد نظیر کریستال ویوله به حذف گرم مثبت ها، منجر می‌شود.

۵) فقیر کردن محیط کشت از راه کاهش تراکم منبع کربن و محدود کردن منبع نیتروژن تنها به یک اسید آمینه (مثل آرژینین که استرپتومایستها به آن نیاز دارند) و بالابردن تراکم آگار که سرعت جذب مواد توسط سلولها را کاهش می‌دهد، موجب گزینش میکروارگانیسم‌های کند رشد نظیر اکتینومایستها خواهد شد.

روش کار

۱) ساخت محیط کشت های A تا F را بر اساس ۱۰۰ میلی لیتر محیط

جدول (۳-۱) فرمولبندی محیط های کشت A تا F

محیط کشت	مقادیر بر حسب گرم در لیتر					
	A	B	C	D	E	F
ترکیبات گلوکوز	۵/۰	۵/۰	۵/۰	–	–	۱۰/۰
پتاسیم دی هیدروژن فسفات	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	–
پتاسیم مونوهیدروژن فسفات	۰/۶	۰/۶	۰/۶	۰/۶	۰/۶	–
آمونیوم نیترات	۱/۰	۱/۰	۱/۰	۱/۰	–	–
عصارهٔ مخمر	۳/۰	۳/۰	۳/۰	۱/۰	–	۵/۰
نشاسته	–	–	–	۳/۰	۱/۰	–
قرمز خنثی	–	۰/۰۳	–	–	–	–
کریستال ویوله	–	–	۰/۰۰۲	–	÷	–
آرژنین	–	–	÷	–	۱/۰	–
آگار	۱۵/۰	۱۵/۰	۱۵/۰	۱۵/۰	۲۰/۰	۱۵/۰

پی. اچ کلیهٔ محیط های کشت را در فاصلهٔ ۶/۵ تا ۷ تنظیم کنید.

استوک ۱ % : ۵۰ سی سی
استوک ۱ % : ۵۰ سی سی

قرمز خنثی ۰/۱ % : ۵۰ سی سی
کریستال ویوله ۰/۱ %

روش کار

۱) انتقال مقادیر به یک فلاسک (با حجمی ۲–۳ برابر حجم نهایی)

۲) افزودن آب و تنظیم pH

۳) جوشاندن محیط کشت در صورت داشتن آگار

۴) برچسب گذاری و اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه

۵) قراردهی فلاسک ها در حمام آب گرم ۴۵ درجه سانتی گراد

۶) تهیه سوسپانسیون از نمونه خاک تازه (۱۰ گرم خاک در ۹۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژیک)، افزودن توییین ۸۰ (۰/۱% = افزودن ۰/۱ گرم) و ساخت رقت های متوالی 10^{-2} تا 10^{-6}

۷) افزودن ۱ میلی لیتر از رقت ها به پلیت خالی (انتقال آسپتیک)

۸) افزودن محیط کشت ذوب شده (۱۲–۱۵ میلی لیتر)

۹) پلیت ها به صورت وارونه به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه

جلسه بعد

- شمارش کلنی ها و محاسبه تعداد در ۱ گرم از خاک
- تعیین نوع میکروارگانیسم: رنگ آمیزی کلنی های به روش گرم برای باکتری ها و بلولاکتیک برای قارچ ها و مخمرها (نوع، شکل و آرایش)
- کشت کوادرات: ۱) مخمر و قارچ در SDA ۲) باکتری در NA

جدول (۴-۱) تراکم میکروارگانیسمها در محیطهای کشت A تا F

	تعداد کلنیها به ازای هر گرم خاک در هر یک از محیطهای کشت					
میکروارگانیسم	A	B	C	D	E	F
باکتریهای گرم مثبت						
باکتریهای گرم منفی						
مخمرها						
کپک‌ها						
اکتینومیستها						
باسیلوسها						

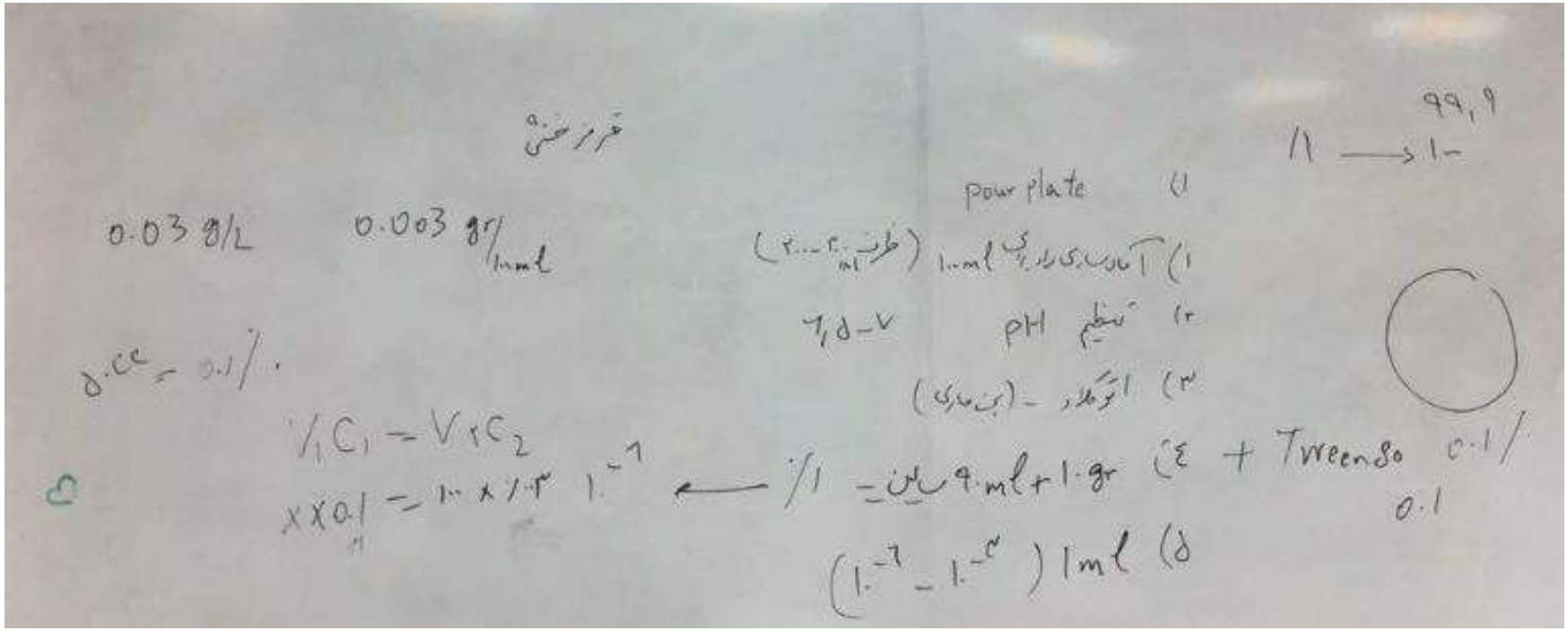
آمادسازی جلسه بعد

fppt.com

روش کار جداسازی مخمر

هفته ۱

- مقداری میوه‌ی تازه (شستشو بدون استفاده از مواد شوینده)، جوانه‌ی جو یا خیسانده‌ی کشمش، سیب یا خرما را له کرده
- انتقال سیب رنده شده به درون ظرف دهانه گشاد ۲۰۰ میلی لیتری و افزودن آب به اندازه وزن آن؛ مجموع حجم اشغال شده ¾ باشد.
- همزدن و بستن درب بطری و قرار دادن در دمای اتاق (۲۵ تا ۳۰ درجه) به مدت یک هفته


pour plate
0.03 gr/L
0.003 gr/1ml
Tween80 0.1/.
0.1

منابع:

- صعودی، محمد رضا. **مبانی و آزمونهای فرایندهای تخمیری،** انتشارات دانشگاه الزهرا، چاپ نخست، ۱۳۷۷.
- محمدی، علی و میرشفیعی، حمیده. **مهارت های آزمایشگاه میکروب شناسی** ، جلد ۱– ۳ . انتشارات دانشگاه الزهرا، چاپ نخست، ۱۳۹۵.
- محمدی، علی و کریمی، ابراهیم. **اصول میکروب شناسی محیطی و صنعتی.** انتشارات آراد کتاب، چاپ نخست، ۱۳۹۳.

fppt.com