

به نام خدا



Industrial Microbiology

By: **Dr. A. Mohammadi**

Department of Biology,
Faculty of science,
University of Alzahra

جلسه سوم

غربالگری میکروارگانیزم ها و طراحی محیط کشت

هدف: بررسی ترکیب محیط کشت بر جداسازی میکروارگانیزم ها

کار ۱

۱. شمارش کلنی ها و محاسبه تعداد در ۱ گرم از خاک
۲. تعیین نوع میکروارگانیسم: رنگ آمیزی کلنی های فراوان تر به روش گرم برای باکتری ها و بلولاکتیک برای قارچ ها و مخمرها (نوع، شکل و آرایش)
۳. 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					
F	E	D	C	B	A

تهیه لاکتوفنل کاتن بلو (LCB) و رنگ آمیزی

4

مواد لازم: کریستال فنل ۲۰ گرم / گلیسرول ۴۰ میلی لیتر / اسید کدلتیک ۲۰ میلی لیتر / آب مقطر ۲۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

مواد فوق را با هم کاملاً مخلوط کرده و توسط حرارت حل نمائید . سپس مقدار ۵/۰ گرم کاتن بلو را به اضافه نموده و استفاده نمائید.

روش رنگ آمیزی لاکتوفنل کاتن بلو (ویژه قارچها)

روی یک لام تمیز قطره ای از محلول کاتن بلو ریخته و سپس با آنس مقدار کمی از پرگنه محیط کشت را برداشته و روی آن قرار داده و با رنگ کاملاً مخلوط نمائید آنگاه یک لامل تمیز روی لام گذاشته سپس با لاک سفید اطراف آنرا مسدود نموده تا لامل در اثر خشک شدن لاک جابه جا نشود.

روش دیگر :

می توان ابتدا با چند قطره الکل متیلیک کشت را روی لام ثابت نموده و سپس رنگ کاتن بلو را به آن اضافه نمائید.

مزایای لاکتوفنل کاتن بلو جهت تشخیص قارچ ها به ویژه قارچ های مسیلیال (کپکی) در محیط کشت به کار میرود. *در این رنگ آمیزی اسید لاکتیک به داخل هیف قارچ نفوذ کرده و موجب حفظ ساختمان و پیکره قارچ می شود . فنل سلول های زنده را غیر فعال می کند. کاتن بلو قارچ را رنگ می کند و گلیسرول باعث می شود رنگ، نیمه دائمی شده و به احتمال قوی رسوب رنگ را کاهش می دهد.

کار ۲ (ادامه جداسازی مخمر)

5

- انتقال حدود ۱ میلی لیتر از محلول آب سیب حاصل از ته ظرف به ۵ میلی لیتر محیط YMB. (جهت غنی سازی مخمر)
- افزودن حدود ۱ سانتی متر پارافین (سترون)
- ۷۲-۴۸ ساعت در ۳۰ درجه انکوبه
- انتقال به یخچال برای هفته آتی

کار ۳

6

روز چهارشنبه

- ، انتقال ۰/۱ میلی لیتر مخمر رسوب کرده ته ظرف به محیط جامد SDA و کشت خطی (حدود دو قطره از محلول مورد نظر به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در روی محیط کشت قرار داده تا جذب شود، آنگاه کشت خطی ۴ مرحله)
- گرمخانه گذاری در ۲۸ درجه به مدت ۲۴ ساعت

منابع:

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

