جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۰۵۱۱-۶۶۴۱۲۶۰ تماس حاصل نمایید

«به نام همه هستی »

دانشگاه جامع علمی - کاربردی سازمان حفاظت محیط زیست

«.....»

کارشناسی ناپیوسته علمی - کاربردی بازیافت

« آزمایشگا میکروبیولوژی محیطی»

گزارشات انجام آزمایشات میکروبیولوژی محیطی

استاد: .....

.....

دانشجوی رشته بازیافت .....

.....

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۰۵۱۱-۶۶۴۱۲۶۰ تماس حاصل نمایید

عنوان آزمایش : ۱- جمع آوری و نگهداری نمونه های خاک

۲ - تهیه لام های دفن شده در خاک

آشنایی با روش نمونه برداری، نگهداری و تهیه لام از خاک

میکرو بیولوژی و شیمی خاک حایز اهمیت می باشند که بر اساس اصول صحیح جمع آوری و نگهداری کرده و آزمایش مورد نظر را انجام می دهیم نکته مهم اینکه خاک از جمله محیطهایی است که حتی در یک محدوده معین ویژگیها و شرایط آن از نظر فیزیکی- بیولوژیک و شیمیایی با همدیگر فرق دارند. مثلاً در یک محدوده خاص مثل بلندی تپه در مقایسه با ارتفاع کم ویژگیهای متفاوت می باشد و حتی در یک باغچه که به آن کود داده می شود جاهایی که کود بیشتری دریافت کرده و یا کمتری دریافت کرده شرایط متفاوتی دارد، بنابراین تهیه این نمونه ها یا به منظور انجام آزمایشهایی میکرولوژی انجام می شود و یا آزمایشهای شیمیایی که این دو تفاوتی کوچک از نظر جمع اوری و نگهداری دارند. برای نمونه برداری و جمع آوری از دستگاههای نمونه بردار خاصی آگلر استفاده می شود که غالباً نوعی لوله نمونه برداری است که طول و قطر مشخص دارد و جنس آن عموماً فلزی می باشد و ویژگی که دارند روی سطح آنها مدرج شده است که به منظور اندازه گیری از عمق مورد استفاده قرار می گیرد که به شکل عمودی بر روی نقطه ای که برای برداشت نمونه مشخص شده است قرار گرفته است و با فشار دادن دست یا فشارمکانیکی در خالک فرورفته تا عمق مورد نظر ازخاک

جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۶۶۴۱۲۶۰-۰۵۱۱ تماس حاصل نمایید

پر می شوند و بعد محتویات آنها با یک ظرف ترجیحاً استریل یا یک کیسه پلاستیکی منتقل می شوند.

مرحله دوم نگهداری نمونه ها می باشد که اگر مجبور به نگهداری شویم بایستی نمونه های جمع آوری شده در شرایطی که از نظر دما و رطوبت تشابه زیادی با زمان برداشت نمونه دارند نگهداری شوند که مثلاً در مورد نمونه های میکروبی دمای مشابه دمای برداشت نمونه (4^{oc}) مناسب بوده که فعالیت میکرو ارگانسیم ها را کند می کند در مورد آزمایشهای شیمیایی روشهایی مانند منجمد کردن و خشک کردن برای نگهداری مورد نظر می باشد .

مرحله انجام آزمایش:

برای شروع کار ابتدا یک نقطه مناسب را برای برداشت نمونه در نظر می گیریم و در مرحله اول باید یک برچسب تهیه کرده و مشخصات دقیق محل برداشت نمونه را روی آن برچسب می نویسیم یعنی اینکه اگر برای برداشت مجدد نیاز باشد بایستی بتوانیم نمونه برداری را عیناً تکرار کنیم که بتدریج فناوریهای جدید مثل GPS نیز مورد استفاده قرار می گیرد در درجه دوم مشخصات ظاهری خاک را بایستی یادداشت کنیم که شامل: نوع دانه بندی خاک- پستی و یا بلندی - خشکی و دیگر مشخصات و بعد از مدتی که مراجعه کردیم متوجه تغییرات آن شویم معمولاً این برچسبها حاوی تاریخ، شرایط اقلیمی، نام نمونه بردار و هر اطلاعات دیگری که لازم بوده و به تفسیر نتایج آزمایش کمک کند می باشد.

جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۶۶۴۱۲۶۰-۰۵۱۱ تماس حاصل نمایید

انجام آزمایش:

پس از تحویل گرفتن وسایل مورد نیاز شامل یک کیسه نایلون تمیز و دماسنج و تیغه محل نمونه برداری پشت آزمایشگاه کنار درخت بزرگ زبان گنجشک و قسمت شمال غربی آن تعیین گردید و ضمن مراجعه در محل با استفاده از لوله مخصوص که برای نمونه برداری پیش بینی شده بود با فشار مکانیکی در محل مورد نظر اقدام به نمونه برداری و تخلیه آن داخلا یک پلاستیکی گردید البته قبلاً با استفاده از دما سنج مخصوص و با فرو کردن آن در داخل و ایست چند دقیقه ای درجه حرارت خاک 7 تعیین گردید سپس درجه حرارت هوا نیز اندازه گیری و 10 بود. پس از ثبت مشخصات شامل ۱- نام نمونه بردار: علی اکبر نوروزی ۲- ساعت ۱۵/۱۵ روز دوشنبه ۸٤/۱۲/۳ ۳- مکان: آموزشکده محیط زیست پشت آزمایشگاه میکرولوژی جنب درخت بزرگ زبان گنجشک و قسمت شمالی آن ٤- درجه حرارت هوا 10 ٥- درجه حرارت خاک 7 ٦- شرایط اقلیمی : هوا مرطوب و پس از حدود ده ساعت بارندگی متناوب

در مرحله بعد از تحویل گرفتن یک عدد بوکال (وسیله قراردادن خاک و لام ها و تماس آنها با همدیگر به منظور ایجاد تماس مناسب محیط کشت با خاک) و ٦ عدد لام یا اسلاید که با استفاده از میکروفیلم آنها را به هم چسباند هو نفوذ ناپذیری آن را تضمین می کنیم که یک طرف آنها را با سواپ که قبلاً با استفاده از محیط کشت نوترینت براث (NB) آغشته می کنیم (در شرایط استریل)

جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۶۶۴۱۲۶۰-۰۵۱۱ تماس حاصل نمایید

پس از آماده کردن سه عدد اسلاید دو طرفه که یک طرف آن آغشته به محیط کشت NB می باشد آنها را با فاصله در داخل بوکال قرار می دهیم و سپس با استفاده از قاشقک میان آنها را با آرامی با خاک پر می نماییم و درب بوکال را بسته و در دمای $20-25^{oc}$ گرما گذاری می کنیم که اگر شرایط دمای اطاق این باشد مطلوب است در غیر اینصورت آن را داخل انکوباتور به مدت دو هفته قرار می دهیم تا میکروارگانیم ها روی آن رشد کند.

عنوان آزمایش: الف) شمارش باکتریهای هتروتروف هوازی خاک به روش plate count

هدف: آشنایی با روش کلاسیک شمارش باکتریهای زنده

تاریخ: ۸٤/۱۲/۱۰

انجام آزمایش:

باکتریها غالبترین جمعیت میکروارگانیم های خاک را تشکیل می دهند و در خاکهای معمولی بین $10^{6}-10^{9}$ عدد در هر گرم خاک موجود می باشند در خاکهای فاضلاب و لجن فعال یا کشاورزی یا کود دهی بالا با میکروبی بالایی دارند.

استفاده از رفتهای متوالی و کشت در پلیت به روش pour plate می باشد خاک بدلیل اینکه دارای باکتریهای زیادی می باشد قابل کشت بصورت مستقیم نمی باشد لذا ابتدا سوسپانیون را تهیه و با استفاده از مایع مناسب که آسیبی به سلولها نرساند ماده جامد را وارد آن می کنیم و با استفاده از روشهای مکانیکی آن را به هم می زنیم یا با استفاده از

جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۶۶۴۱۲۶۰-۰۵۱۱ تماس حاصل نمایید

دستگاهی بنام shaker که با دور مشخص (مثلاً 2000RPM یادویست دور در دقیقه) به مدت ده دقیقه که سلولها به هم چسبیده جدا و معلق شوند البته این روش علاوه بر خاک در مواد غذایی نیز مورد استفاده دارد . روش مناسب دقیق سازی تهیه وقتهای متوالی است که مایع مناسب برای آن سرم فیزیولوژیک یا آب مقطر می باشد.

دقت $\frac{1}{10}$ $\quad 100cc \rightarrow 90cc + 10g$ (خاک) سرم فیزیولوژیک

که به ازای هر رقت یک پلیت خالی استریل در نظر می گیریم البته صحیح آن ۳ دست برای هر لوله می باشد که به شرح ذیل می باشد که این عمل با استفاده از پیپت مدرج استریل و یا رعایت شرایط سترون صورت می گیرد

پس از تلقیح نمونه ههای رقیق شده بر روی هر یک از پلیت های استریل بر روی هر پلیت 20^{oc} محیط کشت که قبلاً آماده کرده ایم (N.A) ریخته و آن را با حرکات ۸ مانند زیگزاگی به هم می زنیم تا کاملاً مخلوط شوند پس آنها را با ثبت مشخصات گروه در دمای $25^{o} - 30^{oc}$ به مدت ۲٤ تا ٤۸ ساعت در داخل انکوباتور گرما گذاری می‌کنیم.

ب) عنوان آزمایش: تعیین PH و در صد رطوبت خاک برای اندازه گیری PH ابتدا ۵ گرم از خاک را در داخل استوانه مدرج (مزور) که 50^{oc} آب مقطر در داخل آن ریخته شده است و به داخل بشر می ریزیم البته آب مقطر بایستی به آرامی روی خاک ریخته شود و با استفاده از میله شیشه ای به هم می زنیم و می گذاریم تا کاملاً ته نشین شود و

جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۶۶۴۱۲۶۰-۰۵۱۱ تماس حاصل نمایید

بعد با استفاده از PH متر آن را اندازه می گیریم البته الکترود آن بیایستی به ته تشر بچسبد.

PH=7027

برای اندازه گیری رطوبت خاک 100g خاک را داخل یک بشر مناسب که قبلاً وزن شده است اندازه می گیریم :

X= وزن خاک+ وزن بشر

پس نمونه را با بشر به مدت ٢٤ ساعت در دمای 80^{c} قرار می دهیم و پس ازخارج کردن آن را وزن می کنیم

درصد رطوبت خاک= ۱۰۰ × رطوبت خاک = وزن بشر با خاک – X

عنوان آزمایش: ۱- مشاهده لام های دفن شده در خاک

۲- شمارش و تعیین تعداد باکتریهای هتروتروف هوازی در خاک

باکتریها به صورت اتفاقی در محیط وجود ندارد و بصورت تجمعی هستند و در خاک هم ترجیح می دهند با استفاده از سطوحی که در خاک وجود دارد در صورت امکان اطراف جمع شده و توده ها و تجمعاتی ایجاد کنند. به هر حال خاک نسبت به محیط سنتزی امکاناتش محدودتر است و کلونیهای مشخص و بزرگی را که روی یک محیط کشت دیده می شود در خاک مشاهده نمی شود به همین جهت به آنها میکروکلونی گفته می شود یکی از روشهای مطالعه میکروبها در خاک استفاده از سطح مصنوعی در خاک و ایجاد میکرو کلونی می باشد که این عمل با استفاده از اسلایدهای کلیشه ای

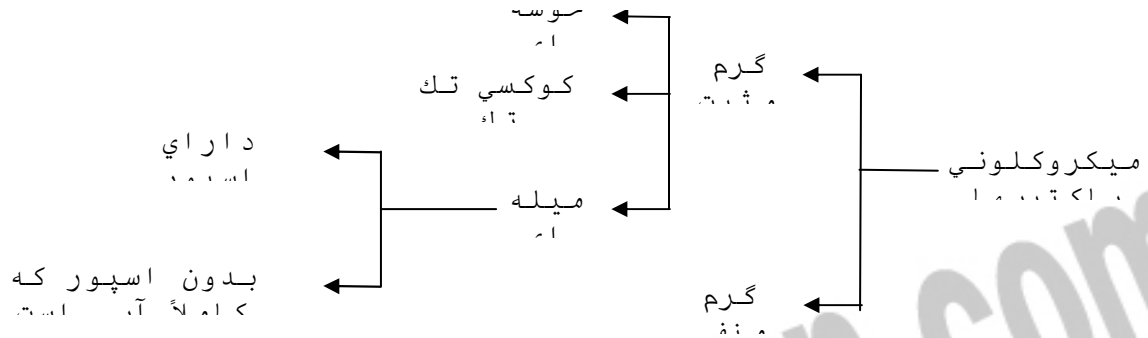
جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۶۶۴۱۲۶۰-۰۵۱۱ تماس حاصل نمایید

روی یک طرف لام که ماده غذایی روی آن قرار داشته است را رنگی آمیزی کرده و میکروکلونی را می بینیم. خارج کردن اسوایه با یستی به آرامی صورت بگیرد و توصیه این است که روی یک تکه روز نامه با یک میله شیشه ای خاک اطراف اسلاید را کنار می زنیم و پس از آزاد سازی آن را بیرون می آوریم پس از آن یک لبه اسلاید که به پارافیلم چسبیده گرفته و روی روزنامه بازتر دیگر ضربه می زنیم به روی میز تا خاکهای به هم چسبیده جدا شوند پس پارافیلم را جدا کرده و سطح خارجی آغشته به سلولها و سطح داخلی کاملاً تمیز است سطح داخلی (تمیز) : به منظور فیکس شدن سلولها سه بار روی شعله گرفته و فیکس می کنیم و رنگ آمیزی G انجام می دهیم و پس از آن زیر میکروسکوپ مشاهده می کنیم که در نهایت قارچ میسلیوم قرمز دیده می شود.

یاد آوری مراحل انجام رنگ امزی G : ۱- کریستال ویوله ٦۰ ثانیه ۲- شستشو با آب مقطر ۳- ایودین ٦۰ ثانیه ٤- شستشوی با آب مقطر ٥- الکل واستن ٦-٥ ثانیه ٦- سافرانین ٤٥-۳۰ ثانیه ۷- شسشو با آب مقطر.

انواعی از تراکمها که قابل مشاهده می باشد: ۱ - ریسه قارچها که میسلیوم قارچی بوده وچون اولین رنگ را جذب می کند آب مشاهده می شود و بدلیل اینکه G^- و G^+ مختص باکتریها ست و قارچ پپتید و گلیکان ندارد که در شکل دیواره عرض میسلیوم به شکل منشعب می باشد و اگر به خوبی رشد کند اسپور آن به خوبی قابل مشاهده است

جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۰۵۱۱-۶۶۴۱۲۶۰ تماس حاصل نمایید



۳- اکتینو میستها که باکتریهای گرم مثبت و ظاهر رشته ای هستند و تقریباً شبیه میسلیوم قارچها می باشند م مهمترین تفاوت آن این است که قطر رشته ای خیلی ظریف تر از قارچها می باشد و قارچها قطورتر و منشعب تر هستند.

٤- ویروسها که دیده نمی شوند ٥- گاهی اوقات اگر خاک خیلی مرطوب باشد پروتوزوئرها دیده می شوند

ادامه کار هفته قبل:

پلیت ها را به ترتیب افزایش دقت ۱-تا ٦- به ترتیب کوچک شدن قرار می دهیم که بایستی تراکم کلونیهای رشد کرده کمی با شد و شمارش را با شیوه ذیل شروع می کنیم البته بهترین روشهای شمارش نیز خالی از خطا نمی باشد که عبارت است از : الف) کم بودن رقت ها (خطای انساتی) ب) خود محیط کشت ممکن است برای همه باکتریها قابل استفاده نبوده باشد ج) اگر خطا ها را به حداقل برسانیم می توانیم این کار را با دقت بیشتر انجام داده و به نتیجه بهتر برسیم

لخوه شمارش: از مجموع پلیت های کشت داده شده یکی را انتخاب می کنیم و از قطر تراکمی که بین ۳۰۰-۳۰ کلونی داشته باشد زیرا اگر کمتر از ۳۰ تا باشد احتمال انتقال

جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۶۶۴۱۲۶۰-۰۵۱۱ تماس حاصل نمایید

آلودگی محیط و بالعکس وجود دارد و قابل استناد نیست و اگر بیشتر از ۳۰۰ مورد باشد ظرفیت ظرف بیش از آن نمی باشد. واحد شمارش آن C. . F.U (Colony forming uhit) و اساس آن بر این است که هر کلونی نماینده یک سلول می باشد که لازم آن جدا شدن سلولها از خاک با شرایط قابل قبول است اگر تعداد کلونیها را دقیق بشماریم مثل این است که تعداد سلولها را شمارش کرده ایم که در بعضی آزمایشگاهها از دستگاه کلونی شمار (Colony counter) استفاده می شود. روی پلیت نور مناسب تابیده شده و با استفاده از یک قلم الکترونیکی کلونی شمارش می شود و قلم روی شیشه علامت گذاری کرده و احتمال شمارش مجدد از بین می‌رود.

در روش دستی پشت پلیت را با ماژیک وایت برد به چند قسمت تقسیم کرده و شمارش را از بالا پایین شروع می کنیم البته یک خط را به صورت مشخص و قراردادی بایستی با خانه بالایی یا پایین محاسبه کرد و برای کاهش خطاها سه بار این کار را انجام می دهیم و میانگین میگیریم پلیت انتخاب شده مربوط به 10^4 می باشد

62×10^4 CFU

عنوان آزمایش : ۱- تهیه میکروکالچر (اسلاید کالچر) یا میکروکشت

هدف: تهیه نمونه مناسب برای مشاهده قارچ ریسه ای

تاریخ ۸۳/۱۲/۱۰

جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۰۵۱۱-۶۶۴۱۲۶۰ تماس حاصل نمایید

ظاهرکلونی کپک توده ای در هم رفته از میسلیوم قارچ می باشد برداشتن یک میسلیوم و جداکردن آن مشکل می باشد و روش اسلایه کالچه نمونه های میکروسکوپی مناسب از کپکها تهیه می شود و اصطلاحاً روش کشت روی لام نیز گفته می شود که در واقع قطعه ای از محیط کشت را روی یک لام میکروسکوپی قرار داده و با پوشاندن آن که قبلاً توسط محیط کشت تلقیح شده است قارچ از یک طرف چسبیده به محیط کشت می دهد. بدین منظور ابتدا با چاقوی مخصوص به اندازه لازم به صورت چهارگوش در محیط کشت برش داده و با رعایت شرایط سترون بر روی لام قرار می دهیم و به داخل پلیت روی شیشه سه گوش مستقر می کنیم (محیط کشت مورد استفاده در این روش SDA است) و سپس با رعایت شرایط لازم با استفاده از سوزن که نوک آن را با استفاده از حرارت استریل می کنیم قارچ را از محیط کشت قبلی برداشته و کناره های محیط کشت SDA روی لام به صورت SDA تلقیح می کنیم که نبایستی زیاد برش بخورد چون زودتر خشک می شود ولی اگر کمتر برش بخورد رشد نمی کند و اگر اندازه محیط کشت برداشتی خیلی کوچک باشد تبادل هوا مشکل و مقدار غذا کم می‌باشد ولی اگر اندازه محیط کشت برداشتی مطلوب نخواهد بود سپس لامل را روی آن قرار داده و درب پلیت را بسته و پس از این مراحل پلیت را به مدت یک هفته در درجه حرارت ۲۷-۲۵ درجه سانتی گراد (دمای اتاق یا انکوباتور) گرماگذاری می‌کنیم البته بایستی قبل از این عمل مقداری آب مقطر داخل پلیت زیر میله سه گوش شیشه ای تلقیح کنیم تا رطوبت تعادل داشته باشد

جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۰۵۱۱-۶۶۴۱۲۶۰ تماس حاصل نمایید

عنوان آزمایش ۲- MPN (Most Probable Number)

هدف : آشنایی با روش استاندارد تعیین آلودگی میکروبی آب

این روش به منظور رد یابی و شناسایی و تعیین احتمالی آلودگی آب با فاضلاب می‌باشد.

با این آزمایش باکتریهایی که منشأ آنها دستگاه گوارش انسان و جانوران خونگرم میباشد در آب شناسایی کرد. آزمایش MPN از سه مرحله: احتمالی، تأیید و تکمیلی تشکیل شده است . در مرحله احتمالی با توجه به نمونه و منشأ باکتری آلوده به کلی فرم باشد بررسی احتمال وجود می باشد نمونه ها را در محیط کشت لاکتوز براث کشت می دهیم دراین مرحله از لوث خص تولید اسید و تغییر رنگ که نشان دهنده مصرف قند لاکتوز توسط باکتریهای کلی فرمی است و همچنین تولید گاز و جمع شدن آن در لوله دور هام (لوله ای کوچک که در داخل لوله آزمایش بصورت معکوس در داخل نمونه قرار داده می شود) که هر چند بالاتر باشد نشانگر فعالیت بیشتر باکتریها و تعداد بیشتر آنها می باشد. البته در این آزمایش از L-T-B (لوریل تریپتوبراث) استفاده شده است.

روش کار:روش کار بدین صورت می باشد که ابتدا ۹ لوله سه تایی را انتخاب کرده و به ترتیب در سه لوله اول 10^{cc} به هر کدام از لوله ها با غلظت دو برابر از محیط کشت می ریزیم و به سه لوله دوم از غلظت یک یا غلظتی که توسط کارخانه سازنده اعلام شده است به هر کدام از لوله ها 10^{cc} اضافه می کنیم و به سه لوله سوم نیز مثل سه لوله

جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۶۶۴۱۲۶۰-۰۵۱۱ تماس حاصل نمایید

دوم عمل می کنیم سپس به سه لوله اول در شرایط سترون و کنار شعله با استفاده از پیپت استریل به هر کدام 10^{cc} از نمونه آب را تلقیح می کنیم سپس به سه لوله دوم به هر کدام از لوله ها ۱ cc از نمونه آب به هر کدام از لوله ها اضافه می نماییم لازم به ذکر است که هنگام برداشت نمونه توسط پیپت و اضافه کردن آن داخل محیط کشت لوله های حاوی نمونه بایستی تکان داده شود تا باکتریها یکنواخت توزیع شده باشند. به سه لوله سوم 1^{cc}% از نمونه ۱ در شرایط استریل و کنار شعله با پیپیت استریل اضافه کرده درب آن را با پنبه خودش می بندیم و نمونه ها را به مدت ۲٤ تا ٤۸ ساعت در دمای $35-37^{oc}$ گرماگذاری (در داخل انکوباتور) می کنیم. پس از مدت لازم و خوانده لوله ها مشاهده شد که در سه لوله اول هر سه لوله تغییر رنگ و تولید گاز و در سه لوله دوم دو لوله و در سه لوله سوم هیچکدام رشد نداشته اند پس طبق جدول تعیین میزان آلودگی MPN 3-2-o

که عدد ۹/۵ می باشد ۹/۵ ×۱۰= ۹۵

نتیجه اینکه در هر 100^{cc} از نمونه آب ۹۵ نمونه کلی فردی

نوع آزمایش : مشاهده لام های قارچی تهیه شده به روش اسلاید کالچر

هدف: تعیین نوع قارچ رشد کرده زیر لامل با رنگ آمیزی ساده

لاکتوفنل کاتن بلو

برای رنگ آمیزی لاملها یک قطره رنگ آمیزی مخصوص قارچها (لاکتوز فنل کاتن بلو) کنار دست گذاشته و در کنار شعله پلیت را روی سکو قرار می‌دهیم و گوشه پلیت

جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۰۵۱۱-۶۶۴۱۲۶۰ تماس حاصل نمایید

را باز کرده و با پنس یک ضربه کوچک به داخل زده و با همان پنس لامل را برداشته و از سمتی که میسلیوم به لام چسبیده داخل رنگ می‌گذاریم و ۲۰ تا ۳۰ ثانیه صبر می‌کنیم و لام را زیر میکروسکوپ قارچ مورد نظر مطالعه می‌کنیم. پس از مشاهده زیر میکروسکوپ و تطبیق آن با جدول پیوست مشاهده گردید که مودر شماره ۱٤ Oospora یا Ceotvichum در زیر لامل رشد نموده است.

عنوان آزمایش: مرحله تاییدی MPN

هدف: تایید یا عدم تایید وجود آلودگی در نمونه، آبی

در این مرحله از محیط کشت‌های اختصاصی از EMB استفاده می‌کنیم که اختصاصی و هم افتراقی است دلیل اختصاصی‌ایی است که باکتریهای G^+ اجازه رشد نداده و مخصوص G^- هاست و به این دلیل افتراقی است که کلونیهای را تشکیل می‌دهند تا نسبتاً بزرگ، شل و آبکی و یک مرکز تیره رنگ دارند و از همه مهمتر اینکه اگر خود E.Coil باشد تصویر رنگ سبز جلای فلزی درخشان می‌باشد در صورتی که در سایر باکتریها این طور نیست.

- تعیین Fecal Coliform

روش عمل: در این مرحله به تعداد لوله‌های مثبت شده لوله آزمایش انتخاب کرده و در آن محیط کشت E.C.Broth داخل آن قرار داده و روی سه لوله اول که برای سه لوله مثبت شده مورد نظر قرار داده و عدد ۱۰ را ثبت می‌کنیم و برای دو لوله بعدی

جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۶۶۴۱۲۶۰-۰۵۱۱ تماس حاصل نمایید

که برای لوله‌های مثبت شده سه لوله دوم در نظر گرفته می‌شود عدد ۱ ثبت می‌کنیم و در کنار شعله و در شرایط ستورن در کنار شعله با استفاده از لوپ به شرح فوق در لوله‌ها تلقیح می‌کنیم و در دمای $45^{\circ c}$ به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور گرماگذاری می‌کنیم.

طبق مشاهده و قرائت نتیجه 0 1 3

در صد میلی لیتر نمونه وجود دارد $\rightarrow 4.5\times 10 = 45$

عنوان آزمایش: مرحله تکمیلی MPN

هدف: مشاهده تفکیکی کلی فرمها

در این مرحله دو تا از لوله‌های مثبت شده مرحله قلا مرحله تاییدی را انتخاب کرده و با کمک لوپ روی دو تا محیط کشت یکی کشت مجدد از کلونی‌هایی که بزرگ بوده و مرکز تیره دارند که این کشت در لوله حاوی B . L صورت می‌گیرد و لوله دوم که در لوله شیب دار N.A از کلونیهای دارای مشخصات کلی فرمی تلقیح می‌کنیم پس آنها را به مدت ۲٤ ساعت در درجه حرارت $35-37^{\circ c}$ گرما گذاری می‌کنیم در مشاهده اسمیر تهیه شده و رنگ آمیزی شده از محیط NA با سیلهای گرم منفی بدون اسپور (S^{-} gr^{-} B) تایید گردید.

اثر شیاکلی دارای مشخصات: لزج، جلای فلزی، کلونی کوچک می‌باشد.

جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۶۶۴۱۲۶۰-۰۵۱۱ تماس حاصل نمایید

در پایان مرحله تکمیلی اگر هدف شناسایی باکتری با استفاده از محیط شیب دار مورد نظر باشد وارد تستهای بیوشیمیایی می‌شویم. برای این تستها بایستی کشت خالص داشته باشیم (حداقل دو گونه باکتری) اگر خالص نباشد تستهای بیوشیمایی با کلید راهنما نمی‌تواند تستهای بیوشیمیایی با روش IMViC انجام می‌شود.

عنوان آزمایش: روش صافی غشایی

هدف: تعیین آلودگی آب

در استفاده از روش ضافی غشایی از صافی‌هایی استفاده می‌شود که قطر منافذ آنها از قطر باکتریها کمتر است وقتی نمونه مورد نظر از صافی بگذرد باکتریها روی ضافی را اگر روی پلیت حاوی محیط کشت بگذاریم رشد خواهد کرد.

در این روش از دستگاه ویژه‌ای استفاده می‌شود که شامل سه قسمت می‌باشد یکی قیف که فیلتر در درون آن قرار می‌گیرد دوم پایه نگهدارنده و ارلن خلأ یا تخلیه که با یک شلنگ به پمپ خلأ وصل می‌شود که به غیر از پمپ سایر اجزاء بایستی استریل باشد برای این کار قبلاً با یک تکه آلومینیوم کاغذ فویل آلومینیومی می‌پوشانیم و همه اجزاء را داخل اتوکلا قرار می‌دهیم و نزدیک شعله پس از استریل کردن بر روی هم سوار می‌کنیم. البته بهتر است فیلتر را داخل گذاشته و سپس استریل کنیم پوشش روی آن را وقتی بر می‌داریم که خواهیم آب را صاف کنیم. اگر آب کدورت بالایی داشته باشند ما مجبور به روشن کردن پمپ می‌باشیم پس از این

جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۶۶۴۱۲۶۰-۰۵۱۱ تماس حاصل نمایید

مرحله آب داخل ارلن را جمع می‌کنیم و در کنار شعله اجزای دستگاه را جدا می‌کنیم و پنس را داخل الکل قرار داده و کنار شعله استریل کرده و فیلتر را برداشته و به همان شکل داخل محیط کشت قرار داده و در داخل اتکوباتور به مدت ۲۵ ساعت در دمای $37^{\circ c}-35$ گرماگذاری می‌کنیم برای این روش معمولاً محیط کشتی را انتخاب می کنیم که نیمه جامد بوده و آثار کمتری داشته باشد که سریعتر جذب فیلتر شود. اگر باکتریها واقعاً وجود داشته باشند پس از ۲٤ ساعت گرماگذاری روی فیلتر کلی فرمها قابل مشاهده و شمارش هستند البته حجم آب بایستی مشخص باشد. روش صافی سریعتر از روش MPN می‌باشد بدین صورت که در روش صافی غشایی تا ۲٤ ساعت نتیجه مشخص می‌شود در صورتی که در روش MPN سه تا چهار روز نتیجه طول می‌کشد. فایده روش ضافی سرعت عمل آن می‌باشد و عیب آن این است که در مورد آبهای تصفیه شده راحت می‌باشد ولی در مورد آب رودخانه که هم که مدت و هم تنوع باکتریها بالاست ممکن است سطح فیلتر برای باکتری مناسب باشد و یا نامناسب بوده و پاره می‌شود که البته متداولترین روش برای آبهای تصفیه شده است.

عنوان آزمایش: تست IMViC

هدف: تشخیص باکتریهای اشر شیاکلی، انتروباکتر و کلبسیلا در آب آلوده نمونه

جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۶۶۴۱۲۶۰-۰۵۱۱ تماس حاصل نمایید

ویژگیهای درون سلول یعنی توانایی متابولیسمی و آنزیمی سلول چون جنسهای مختلف و گونه‌های مختلف واکنشهای متابولیسمی متفاوتی دارند مثلاً حتی یک جنس واحد یک گونه می تواند از یک ماده غذایی خاص استفاده کند ولی اگر نتواند یک گونه دیگر است.

راه تشخیص: همان اتفاقی که در درون سلول می‌افتد با استفاده از مواد شیمیایی به نوعی قابل مشاهده کنیم.

تفاوت آنزیمها را به تستهایی که تستهای بیوشیمیایی گفته می‌شود اندازه‌گیری و مشخص می‌کنند مثلاً اگر میکروارگانیسمی الیه تولید کند می‌توان از راه سنجش PH آن را اندازه‌گیری کرد.

در مورد کلی فرمها یک باکتری مجهول را شناسایی و در اولین کار رنگ آمیزی G می‌کنیم اگر G^+ باشد شامل کوکی و با سیل و G^- شامل کولی و باسیل می‌باشد باسیل G^- از خانواده کلی فرمسهاست. یک آزمایش اختصاصی بیوشیمیایی G^- باسیل وجود دارد که به آن آزمون IMViC گفته می‌شود که اختصاصی کلی فرمهاست. چهار تست شیمیایی مجموع IMViC را تشکیل می‌دهند که برای تشخیص جنس و گونه‌های کلی فرمها به کار می‌رود. این تست برای شناسایی تمام جنس این گونه ها و خانواده‌ها کافی نیست اما باکتری که مورد نظر و جستجوی ماست یکی از سه باکتری ۱- اشر شیاکلی E-Coli ۲- انتروباکتر E.Bacter ۳- کلبسیلا می‌باشد که

جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۶۶۴۱۲۶۰-۰۵۱۱ تماس حاصل نمایید

هر سه باکتری روده‌ای و از مهمترین کلی فرما هستند. این تست برای تشخیص این سه گونه کفایت می‌کند بخصوص جواب این آزمون برای جستهای انتروباکتروکلبسیلا کاملاً یکسان است به همین خاطر بر اساس آزمون IMViC و به خاطر قشا به در یک گروه به نام گروه انتروباکترکلبسیلا نامیده می‌شود که اگر بخواهیم جداسازی بکنیم بایستی سراغ تستهای دیگری برویم.

روش کار قسمت IMViC :

۱) بررسی توانایی استفاده ایندول سلول توسط باکتری از اسید آمینه تریپتوفان استفاده می‌شود برای این امر از معرف شیمیایی به نام کواکس استفاده می‌کنیم که اگر اندول وجود داشته باشد ترکیب شده و رنگ قرمز رنگ تولید می‌کند و اگر وجود نداشته باشد تغییر رنگ نداده و زرد رنگ است.

اساس کار به این صورت است که در محیط کشت SIM(A) که نیمه آگار است به صورت عمقی در داخل لوله باکتری مورد نظر را به شکل عمقی با کمک سوزن در امتداد یک خط به شکل عمقی کشت می‌دهیم و به مدت ۲٤ ساعت در دمای $30-35^{\circ}c$ در داخل انکوباتور گرماگذاری می‌کنیم و پس از آن ۱۰-۵ قطره معرف کواکس را روی آن می‌ریزیم و ۱۵ دقیقه صبر می‌کنیم اگر مثبت باشد قرمز هاله‌ای تشکیل می‌شود و اگر منفی باشه هاله زرد رنگ می‌باشد. [پس از انجام مشاهده شد که قرمز شده است.]

جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۶۶۴۱۲۶۰-۰۵۱۱ تماس حاصل نمایید

۲) آزمون بعدی (M) متیل رد می‌باشد که دو تا تست در این آزمون انجام می‌دهیم که با استفاده از یک محیط کشت باشد این محیط کشت مایع MRVP می‌باشد که وجود مواد که بنی و قندی در آن که تعدادی از باکتریها می‌توانند این مواد را معرف و مقدار زیادی رسید تولید کنند و PH محیط را تا 4.5 – 4پایین بیاورند. معرف متیل رد را که اسیدی است قرمز رنگ می‌کند که نشانگر وجود باکتری است. اگر ترکیبات کربن دار هم معرف شوند PH = 4.5 و متیل رد قرمز رنگ می‌شود ولی اگر کم مصرف شود PH=6 و متیل رد زرد به رنگ چرکی می‌شود درجه حراست $30-35^{\circ c}$ و به مدت ۲٤ ساعت برای گرماگذاری در این مرحله لازم است. [پس از انجام مشاهده شد که قرمز رنگ شده است].

۳) لوله دوم در آزمون بعدی آزمون تست VP همان باکتری را در همان محیط کشت می‌دهیم و بعضی باکتریها تمام قند موجود در محیط را نمی‌توانند مصرف کنند و سایر ترکیبات را مصرف می‌کنند و از جمله فرآورده‌هایی را که تولید می‌کنند استیل متیل کابینول می‌باشد این ماده اگر با یک ماده شیمیایی به نام باریت ترکیب شود یک رنگ قرمز ایجاد می‌کند اما اگر در محیط نباشد تقریباً زرد چرکی ایجاد می‌شود. اساس کار در این مرحله اضافه کردن معرف پس از گرماگذاری ۲٤ ساعته در درجه حرارت $30-35^{\circ c}$ می‌باشد که ابتدا ۱۰ قطره محلول A و پس از یک الی دو دقیقه هم زدن ۱۰ قطره محلول B را اضافه می‌کنیم و هم می‌زنیم تا ترکیب شود سپس ۱۵

جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۶۶۴۱۲۶۰-۰۵۱۱ تماس حاصل نمایید

دقیقه صبر می‌کنیم که اگر رنگ قرمز رنگ شود VP مثبت است ولی اگـر زرد رنـگ شود VP منفی است [پس از انجام مشاهده شد که رنگ زرد می‌باشد.]

٤) در مرحله چهارم از محیط کشت خامی به نام سیمون سـیترات آگـار (SCA) کـه سبز رنگ می‌باشد استفاده می‌شود که یک محیط کشت اختصاصی و تنها ماده کربنـی و انرژی موجود در آن سیترات سدیم می‌باشد. بعضـی از باکتریهـای مـورد جسـتجو می‌توانند سیترات سدیم را به عنوان تنها منبع تغذیه‌ای استفاده کنند پس رشد می‌کنند اما اگر باکتری داشته باشیم که نتواند آن را استفاده کند نمی‌توانـد رشـد کنـد کـه راه تشخیص الف) تشکیل کلونی. ب) تولید ترکیبات اسیدی که رنـگ محـیط کشـت را عوض می‌کند و اگر رشد کند رنگ محیط را آبی می‌کنند ولی اگر رشد نکننـد رنـگ محیط کشت تغییری نکرده و سبز می‌ماند در این مرحله که احتیاجی به معرف بـرای تشخیص نهایی نمی‌باشد به مدت ٢٤ ساعت در دمای $35^{\circ C}$ – $30^{\circ c}$ گرماگذاری پـس از تلقیح لازم است (معرف موجود در داخل محیط کشت برموتیمول بلو است).

در پایان مراحل IMViC ←

D	M	VP	C
+	+	-	-

و با توجه به مثبت بودن I باکتری مورد نظر رشد شیاکلی تشخیص داده شد.

(اگر انتروباکتروکلبسیا باشد ←

جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۶۶۴۱۲۶۰-۰۵۱۱ تماس حاصل نمایید

I	M	VP	C
-	-	+	+

عنوان آزمایش: تعیین دانستیه میکروبی هوا

هدف: تعیین میازن تراکم باکتریها و قارچها در هوای یک محیط بسته هوا زیستگاه هیچ میکروارگانیسمی نیست چون شرایط زیستی شامل رطوبت ثابت مواد غذایی و عدم تغییر و تحول کافی نمی‌باشد اما مهترین محیط نقل و انتقال میکروارگانسم‌ها می‌باشد که برای تعیین کارآمدی سیستم‌های تهویه در محیط‌های بسته مثل بیمارستانها استفاده می‌شود.

محل مورد آزمایش نباید آقتاب گیر بوده و در معرض جریان باد کولر یا بخاری باشد و حداقل نیم متربا با زمین فاصله داشته باشد. با رعایت شرایط فوق مهل روی میز آزمایشگاه در نظر گرفته شد و درب پلیت‌ها (دوپلیت‌ها) را به مدت ۳۰ دقیقه که یکی حاوی محیط کشت A. N می‌باشد که محیط کشت مشترک باکتریها و قارچها می‌باشد و یکی حاوی محیط که محیط کشت مشترک باکتریها و قارچها می‌باشد و یکی حاوی محیط کشت A . N می‌باشد که محیط کشت مشترک باکتریها و قارچها می‌باشد یکی حاوی محیط کشت SDA که اختصاصی برای قارچها می‌باشد را باز می‌گذاریم. به این دلیل بیشتر از ۳۰ دقیقه باقی نمی‌گذاریم که آب محیط کشت تبخیر می‌شود. پس از این مرحله هر دو محیط کشت را به مدت ۲٤ ساعت و در دمای $25^{\circ c}30^{\circ c}$ گرماگذاری می‌کنیم.

جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۶۶۴۱۲۶۰-۰۵۱۱ تماس حاصل نمایید

برای تعیین باکتریها و قارچها از فرمول‌های خاصی استفاده می‌شود:

تعدادکلونی باکتریها در محیط عمومی

$$Dm_B = \frac{12 \times B}{n \quad t}$$

دانستیه تعداد کلونیها

زمان (برحسب فوت مربع در ساعت تعداد پلیت‌ها باکتری

(برحسب فوت مربع در دقیقه)

تعدادکلونی قارچها در محیط کشت اختصاصی

$$Dm_f = \frac{12 \times B}{n \quad t}$$

دانستیه تعداد کلونیها

تعداد کل کلونیها در محیط عمومی

$$Dm_{(Bef)} = \frac{12 \times B}{n \quad t}$$

تعداد باکتریها در پلیت N . A

$$Dm_B = \frac{12 \times 22}{1 \times 0.5} = 132$$

(فوت مربع در ساعت)

تعداد قارچها در S. D. A

$$Dm_f = \frac{12 \times 25}{1 \times 0.5} = 42$$

(فوت مربع در ساعت)

تعداد باکتریها و قارچها در N . A

$$Dm_{(Bef)} = \frac{12 \times 25}{1 \times 0.5} = 150$$

(فوت مربع در ساعت)

جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۶۶۴۱۲۶۰-۰۵۱۱ تماس حاصل نمایید

ترجمه: یک پلیت خوب تعداد کلونی رنگی متفاوت خواهد داشت. دقت کنید به ویژگیهای کرکی طبیعی از کلونیها. بعلاوه نگاه کنید به کف بطری و کلونیهایی با صورت رنگی متفاوت مشاهده کنید. شناختن آنها بر اساس رنگ ظاهری، رنگ پنهان، ساختار گسترش و دیگر مشخصات الپورها می‌باشد. شکل ٤-٧ نشان دهنده مشخصات مشترک رشد بروز یافته است هنگامی که در محیط کشت Bourzvd's Agar تلقیح می‌شوند. در هنگام بهره‌برداری از شکل ٤-٧ توجه کنید مشخصه کلونی می‌تواند تغییر کند به طور محسوس در زمان بیشتر. تصاویر شکل ٤-٧ کلونیهای ۱۰ تا ۱۲ روزه است. مشخص کردن و شناخت قطعی نمی‌شود الا اینکه اسلاید میکروسکوپی ساخته شود که تیپ و نوع شخصیت اسپورها را تشخیص دهد. شکل ٤-٧ به شکل نموداری تفاوتهای میکروسکوپی که قابل مشاهده است را مورد توجه قرار داده است.

دو انتخاب : در هنگام ساختن اسلاید از انواع کلونیها می‌توان مستقیماً از قسمت مطلوب مرکز کلونی موجود ایجاد شده برداشت یا اسلایدها را به روش ذکر شده در تمرین ۲۳ ساخت. برای ساختن اسلایدهایی که به طور مستقیم از کلونیها ساخته می‌شود بایستی مراحلی را انجام داد. معلم شما به تعدادی که بایستی ساخته شود اشاره خواهد کرد.

موارد :

جهت خرید فایل word به سایت www.kandoocn.com مراجعه کنید
یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۶۶۴۰۶۸۵۷ و ۶۶۴۱۲۶۰-۰۵۱۱ تماس حاصل نمایید

تجمع ساختی روی سابرود آگار

اسلایدهای میکروسکوپی و لامل (شیشه) پوششی

لاکتوفنل پنبه‌ای آبی لکه‌ای

اسکالپل‌های نوک دار و تیز یا سوزنهای شکافنده

۱- پلیت های سرباز را در استج میکروسکوپ خود قرار دهید و لبه یک کلونی رنگی را با عدسی کم با قدرت کم مورد بررسی قرار دهید ساختار افقی و ترتیب اسپورها را جستجو کنید. کلونیهای سفید را نادیده بگیرید زیر آن‌ها بطور کلی کمبود اسپور دارند و تشخیص آنها مشکل می‌باشد.

۲- به شکل ٤-۷ و ٥-۷ مراجعه کنید و یک شناسایی مقدماتی بر اساس ویژگیهای کلونی و بزرگنمایی با قدرت پایین در خصوص هیف و اسپور به عمل آمدید.

۳- یک اسلاید مرطوب را با اضافه کردن مقدار کمی محیط کشت بر یک قطره آبی پنبه‌ای جهت بررسی بسازید. و یا یک شیشه لامل بپوشانید و زیر میکروسکوپ کم قدرت و خیلی خشک مورد بررسی قرار دهید. مجدداً به شکل ٥-۷ رجوع کنید تا هم نتایج ناشی از آزمایشات قبلی لبه کلونی تایید شود.

٤- روش بالا را برای کلونی‌های مختلف تکرار کنید.

گزارش آزمایشگاهی:

بعد از ثبت نتایج خود در گزارش آزمایشگاهی به همه سئوالات جواب دهید.