



راهنمای عملی آزمایشگاه میکروبی شناسی

مؤلفین

منیر دودی و سارا محمودی پور

سرشناسه	: دودی، منیر، ۱۳۵۰ -
عنوان و نام پدیدآور	: راهنمای عملی آزمایشگاه میکروپوشناسی / مولفین منیر دودی، سارا محمودی پور.
مشخصات نشر	: اصفهان: علم گستران، ۱۳۹۸.
مشخصات ظاهری	: ۲۱۷ص.
شابک	: 978-622-99877-4-2
وضعیت فهرست نویسی	: فیبا
موضوع	: آزمایشگاه‌های میکروپوشناسی
موضوع	: Microbiological laboratories
موضوع	: میکروپوشناسی -- دستنامه‌های آزمایشگاهی
موضوع	: Microbiology -- Laboratory manual
موضوع	: آزمایشگاه‌های میکروپوشناسی -- وسایل و تجهیزات
موضوع	: Microbiological laboratories-- Equipment and supplies
شناسه افزوده	: محمودی پور، سارا، ۱۳۶۹-
رده بندی کنگره	: ۱۳۹۸ ۱۳۹۸ / ۲۱۵۹ QR۳۸۰
رده بندی دیسی	: ۵۷۹
شماره کتابشناسی ملی	: ۵۶۷۳۰۲۳



هنمای عملی آزمایشگاه میکروپوشناسی

مؤلفین:	منیر دودی و سارا محمودی پور
ناشر:	علم گستران
نوبت چاپ:	اول-۱۳۹۸
تیراژ:	۱۰۰۰ نسخه
صفحه آرای	فاطمه شاهنظری
طرح جلد	آرش جهانی
قیمت	۴۰۰۰۰۰ ریال
چاپ	دانا
صحافی	اسپادانا
شابک	۹۷۸-۶۲۲-۹۹۸۷۷-۴-۲

مراکز پخش: کتابیران - تهران: ۶۶۴۱۱۷۳ - ۶۶۴۸۴۷۱۵ و ۰۲۱-۶۶۴۸۴۷۱۵

انتشارات علم گستران: ۰۹۱۳۱۰۹۷۵۸۷

فهرست مطالب

مقدمه مؤلفین ن

بخش اول - آشنایی با آزمایشگاه میکروب شناسی، اصول ایمنی و استریلیزاسیون

هشدارها	۲
روش ها و اصول ایمنی	۲
اصول کار در آزمایشگاه	۳
الف- رعایت اصول کار در آزمایشگاه	۳
ب- کار در آزمایشگاه	۳
شناخت و کاربرد برخی وسایل آزمایشگاهی	۴
لوازم (فیلد پلاتین)	۵
پی پت	۶
الف- تیت معرری	۶
ب- پی پت پاستور	۶
میکرو پی پت یا سمپلر	۶
بالن ژوژه	۶
ارلن مایر	۷
استوانه مدرج	۷
قیف شیشه ای	۷
بشر	۷
پخش کننده شیشه ای	۷
لوله های کشت (Culture tubes)	۸
پتری دیش (Plate)	۸
سوآب (Swab)	۸
لام یا اسلاید (Slide)	۹
لامل	۹
پوآر (مکنده پلاستیکی)	۹

۹.....	چراغ بنسون
۹.....	شیشه‌های قطره چکاندار
۱۰.....	پنس
۱۰.....	آبفشان یا پی ست
۱۰.....	فور (Oven)
۱۱.....	انکوباتور (Incubator)
۱۱.....	اتوکلاو (Autoclave)
۱۲.....	بن ماری یا حمام آب گرم (Water Bath)
۱۲.....	سانتریفوژ (Centrifuge)
۱۳.....	صافی (Filter)
۱۳.....	کلنی‌کانتور (Colony counter)
۱۴.....	شیکر
۱۴.....	شیکر لوله (ورتنر)
۱۵.....	ترازو
۱۵.....	جار
۱۶.....	هود لامینار
۱۷.....	اسپکتروفتومتر
۱۷.....	میکروسکوپ
۱۸.....	اجزاء یک میکروسکوپ
۱۹.....	استریلیزاسیون
۲۱.....	فیلتراسیون
۲۱.....	پروتئین

بخش دوم - مطالعه باکتری‌ها، روش‌های تهیه گسترش و انواع رنگ آمیزی

۲۴.....	شکل میکروسکوپی باکتری‌ها
۲۶.....	آزمایش مستقیم با میکروسکوپی
۲۶.....	آزمایش میکروسکوپی باکتری‌های زنده بدون رنگ آمیزی
۲۷.....	آزمایش میکروسکوپی باکتری‌ها پس از رنگ آمیزی
۲۷.....	مراحل انجام آزمایش میکروسکوپی
۲۷.....	الف - تهیه گسترش (Smear)

- انتقال باکتری بر روی لام ۲۷
- ۱- برداشت از محیط مایع ۲۷
- ۲- برداشت از محیط جامد ۲۸
- ب - خشک کردن (Drying) ۲۸
- ج - ثابت کردن (Fixation) ۲۸
- د - رنگ آمیزی (Staining) ۲۸
- روش های رنگ آمیزی براساس تعداد رنگ و مراحل رنگ آمیزی ۲۹
- الف- رنگ آمیزی ساده ۲۹
- ب- رنگ آمیزی مرکب ۲۹
- رنگ آمیزی گرم (Gram staining) ۳۰
- مکانیسم رنگ آمیزی گرم ۳۱
- رنگ آمیزی دیواره سلولی ۳۳
- رنگ آمیزی دیواره سلولی ۳۴
- رنگ آمیزی اسپور ۳۵
- الف- رنگ آمیزی اسپور به روش شافر- فولتون (Schaeffer-Fulton) ۳۵
- ب- رنگ آمیزی اسپور به روش مولر (Moeller) ۳۶
- ج- رنگ آمیزی اسپور به روش دورنر (Dorner) ۳۶
- رنگ آمیزی اسید فاسف (روش زیل نیلسون) Ziehl-Nelson Method ۳۷
- روش رنگ آمیزی اسید فاسف ۳۷
- رنگ آمیزی کپسول (رنگ آمیزی منفی یا زمینه سیاه) ۳۸
- کاربرد کپسول در باکتری ها ۳۸
- مکانیسم رنگ آمیزی کپسول ۳۹
- الف- رنگ آمیزی کپسول به روش نکریس (رنگ چین-روش مرطوب) ۳۹
- ب- رنگ آمیزی کپسول با مرکب چین - روش خشک ۴۰
- ج- رنگ آمیزی کپسول به روش هیس (Hiss Method) ۴۰
- د- رنگ آمیزی کپسول به روش ولج (Welch Method) ۴۱
- ه- رنگ آمیزی کپسول به روش چرچمن (Churchman Method) ۴۱
- رنگ آمیزی دانه های متاکروماتیک یا ولوتین (Volutin- Metachromatic Granules) ۴۱
- الف- رنگ آمیزی دانه های متاکروماتیک به روش آلبرت (Albert Method) ۴۲
- ب- رنگ آمیزی دانه های متاکروماتیک با روش نایسر (Neisser Method) ۴۲

- ۴۲..... رنگ آمیزی دانه‌های چربی
- ۴۳..... رنگ آمیزی دانه‌های چربی به روش بوردن (Burdon Method)
- ۴۳..... رنگ آمیزی دانه‌های ذخیره‌ای پلی ساکاریدی
- ۴۴..... رنگ آمیزی دانه‌های ذخیره‌انی پلی ساکاریدی به روش استفاده از لوگل و سافرانین
- ۴۴..... رنگ آمیزی هسته باکتری ها
- ۴۵..... رنگ آمیزی هسته به روش فولگن (Feulgen Method)
- ۴۶..... رنگ آمیزی تاژک (فلاژل)
- ۴۷..... الف- رنگ آمیزی تاژک به روش املاح نقره
- ۴۷..... ب- رنگ آمیزی تاژک به روش گری (Grey Method)
- ج- رنگ آمیزی تازه به روش فونتانا تری بوندو (Fontana Tribondeau Method)
- ۴۸.....

بخش سوم- محیط‌ها، روش‌های کشت و بررسی خصوصیات ماکروسکوپی باکتری‌ها

- ۵۲..... انواع محیط کشت در نظر شکل ظاهری (فیزیکی)
- ۵۲..... الف- محیط‌های کشت جامد (Solide Media)
- ۵۳..... ب- محیط‌های کشت نیمه جامد (Semi Solide Media)
- ۵۳..... ج- محیط‌های کشت مایع یا براث (Liquia Media)
- ۵۳..... د- محیط‌های کشت دو فاز (Biphasic)
- ۵۳..... انواع محیط کشت از نظر کاربرد
- ۵۳..... الف- محیط‌های کشت پایه (Basic Media)
- ۵۳..... ب- محیط‌های کشت غنی شده (Enriched Media)
- ۵۴..... ج- محیط‌های کشت متمایز کننده (Separating Media)
- ۵۴..... د- محیط‌های کشت انتخابی (Selective Media)
- ۵۴..... ه- محیط‌های کشت افتراقی (Differential Media)
- ۵۵..... و- محیط‌های کشت انتقالی (Transport Media)
- ۵۵..... ز- محیط‌های بیوشیمیایی
- ۵۵..... ح- محیط کشت شمارشگر
- ۵۷..... کشت باکتری
- ۵۷..... روش‌های کشت باکتری‌ها
- ۵۸..... ۱- روش‌های کشت در محیط‌های مایع

- ۵۸..... ۲- کشت در محیط‌های جامد لوله‌ای شیب دار (Slant)
- ۵۸..... ۳- کشت در محیط‌های نیمه جامد
- ۵۸..... ۴- کشت در محیط‌های جامد در پتری دیش
- ۵۹..... کشت چهار مرحله‌ای یا کشت خطی (Streak Plate Method)
- ۶۰..... کشت گسترده (Spread Plate Method)
- ۶۰..... روش پورپلیت (Pour Plate Method)
- ۶۰..... تلقیح به حیوانات حساس آزمایشگاهی (Animal Inoculation)
- ۶۱..... خصوصیات ماکروسکوپی باکتری‌ها
- ۶۱..... ۱- صفات ظاهری
- ۶۱..... ۲- رنگ کلنی
- ۶۱..... ۳- اندازه کلنی
- ۶۲..... ۴- حالت کلنی
- ۶۲..... ۵- سی کلنی

بخش چهارم - مجش - اثرات ضد باکتریائی آنتی بیوتیک‌ها

- ۶۴..... ۱- روش «شار» دیسک در آگار
- ۶۵..... مراحل انجام آزمایش انتشار از دیسک در آگار
- ۶۵..... الف- تهیه سوسپانسیون باکتری
- ۶۵..... ب- تعیین تقریبی تعداد باکتری موجود در سوسپانسیون
- ۶۶..... ج- محیط کشت مناسب
- ۶۶..... د- نحوه انجام کشت چمنی (Streaking)
- ۶۷..... ه- دیسک گذاری
- ۶۷..... و- آنکوباسیون
- ۶۷..... ز- تفسیر نتایج
- ۶۸..... ۲- روش رقت سازی متوالی
- ۶۹..... ۳- روش انتشار گرادایانت یا E. test
- ۷۰..... بررسی سینرژسم در استفاده توأم از آنتی بیوتیک‌ها

بخش پنجم - روش‌های شناسائی کوکوس‌های گرم مثبت

- ۷۲..... کوکوس‌های گرم مثبت و کاتالاز مثبت

- الف- استافیلوکوک کاسه ۷۲
- ب- میکروکوک کاسه ۷۲
- روش های شناسایی مستقیم ۷۳
- روش های شناسایی باکتری ۷۳
- ۱- آزمایش کاتالاز ۷۳
- ۲- جداسازی خانواده میکروکوک کاسه از استافیلوکوک کاسه ۷۴
- ۳- تشخیص گونه های مختلف جنس استافیلوکوکوس ۷۴
- الف- کشت در محیط مانتیول سالت آگار ۷۵
- ب- تخمیر و اکسیداسیون گلوکز در محیط (Oxidation-Fermentation) OF ۷۵
- نخه گلوکز در محیط OF ۷۵
- سیداسیون گلوکز در محیط OF ۷۵
- ج- آزمایش نوآگولاز (روش لامی و روش لوله ای) ۷۶
- الف- روش لای (Slide test) ۷۶
- ج- هیدرولیز LN_1 ۷۷
- ه- تست حساسیت نووباسین ($NB\ 5\mu g$) ۷۷
- ۲- کوکوس های گرم مثبت و کاتالاز منفی ۷۸
- الف- استرپتوکوک کاسه ۷۸
- ب- انتروکوک کاسه ۷۸
- ۱- روش شناسایی آنتی ژن ۷۸
- ۲- رنگ آمیزی گرم ۷۹
- ۳- کشت ۷۹
- ۴- شرایط و زمان انکوباسیون ۷۹
- شناسایی کوکسی ها ۷۹
- تست همولیز (Hemolysis test) ۷۹
- تست حساسیت به باسیتراسین (Bacitracin test) ۸۰
- آزمایش CAMP (Christie Atkins Monch-Peterson Test) ۸۱
- تست PYR ۸۲
- تست حلالیت در صفرا (Bile Solubility) ۸۳
- تست هیدرولیز هیپورات (Hippurate Hydrolysis Test) ۸۴
- تست بایل اسکولین (Bile Esculin Test) ۸۴

- ۸۵..... آزمایش ایتوچین (Optochin Test)
- ۸۵..... تست مقاومت به نمک (Salt Tolerance)
- ۸۵..... تست حساسیت به XT

بخش ششم- روش های شناسایی کوکوس های گرم منفی

- ۸۸..... خصوصیات نایسریا:
- ۸۸..... تشخیص آزمایشگاهی سوزاک
- ۸۸..... ۱-آزمایش مستقیم
- ۸۹..... ۲-کشت
- ۸۹..... ۳-آزمایش اکسیداز
- ۹۰..... ۴-مصرف قندها
- ۹۰..... خصوصیات موراکسلا

بخش هفتم- روش های شناسایی باسیل های گرم منفی

- ۹۴..... انتروباکتریاهما باسیل های گرم منفی روده ائی
- ۹۵..... محیط های کشت انتخابی و افتراقی
- ۹۵..... محیط سلنیت F (Selenite Enrichment Broth)
- ۹۶..... محیط (Gram Negative Broth) GN Broth
- ۹۶..... محیط کشت انتخابی اتوزین متیلن بلو (Eosin Methylene Blue)
- ۹۷..... محیط کشت افتراقی مک کانکی آگار (Maccanki Agar)
- ۹۷..... محیط کشت انتخابی XLD (Xylose-Lysine Desoxycholate)
- ۹۸..... محیط کشت هکتون انتریک آگار (Hekton Enteric Agar)
- ۹۹..... محیط سالمونلا-شیگلا آگار (SS Agar)
- ۹۹..... تست های تشخیصی انتروباکتریاسه ها
- ۹۹..... تست احیای نترات (Nitrate Reduction)
- ۱۰۰..... بررسی تخمیر گلوکز و لاکتوز در محیط TSI (Triple Sugar Iron Agar)
- ۱۰۳..... تست مصرف سیتрат (Simmons Citrate Test)
- ۱۰۳..... تست SIM (SH₂ - Indole - Motility)
- ۱۰۴..... تست متیل رد و ووژ پروسکوئر (MR-VP)
- ۱۰۵..... تست هیدرولیز اوره (Urease Test)

۱۰۶.....	تست لایزین د- کربوکسیلاز (Lysine Decarboxylases Test)
۱۰۶.....	تست فنیل آلانین د- آمیناز (Phenylalanine Deaminase Test)
۱۰۷.....	تست تشخیصی اشرشیا کلی با استفاده از نوار MICRO - ID
۱۰۷.....	تست تشخیصی اتروباکتریاسه با استفاده از اتروتیوب (Entrotube)
۱۰۷.....	تست اکسیداز نقطه ائی
۱۰۸.....	تست تشخیصی O نیترو فیل بتا D گالاکتو پیرانوزید (ONPG)
۱۰۸.....	تست تشخیصی ایجکمن (Eijkman)
۱۰۸.....	اصطلاح IMViC
۱۰۸.....	کشت مدفوع
۱۰۸.....	وربونا سه
۱۰۹.....	جمع آوری و انتقال نمونه
۱۰۹.....	در بن های ششایی مستقیم
۱۱۰.....	آزمایش های جداسازی ویبریوی و بایوتیپ التور از کلاسیک
۱۱۱.....	سودوموناسه ها (باسیل های گرم منفی غیر تخمیری)
۱۱۲.....	تست های افتراقی
۱۱۲.....	آزمایش اکسیداتیو- فرانتاتیو در استفاده از قندها
۱۱۲.....	رشد در محیط ستریمید آ در
۱۱۳.....	خانواده پاستورلاسه
۱۱۳.....	هموفیلوس
۱۱۳.....	هموفیلوس دو کره ای
۱۱۳.....	هموفیلوس آنفلوانزا
۱۱۴.....	کمیلوباکتر و هلیکوباکتر
۱۱۴.....	کمیلوباکتر
۱۱۵.....	هلیکوباکتر
۱۱۶.....	یرسینیا
۱۱۷.....	بروسلا
۱۱۸.....	بررسی H ₂ S در بروسلاها
۱۱۹.....	فرانسیسلا
۱۱۹.....	بوردتلا
۱۲۱.....	لژیونلا

۱۲۱..... خصوصیات لژیونلا

۱۲۲..... کشت و تعیین هویت لژیونلا

بخش هشتم- روش های شناسائی باسیل های گرم مثبت

۱- باسیل های گرم مثبت اسپوردار ۱۲۴

باسیلوس ها ۱۲۴

باسیلوس آنتراسیس ۱۲۴

سایر تست های تشخیصی باسیلوس آنتراسیس ۱۲۶

باسیلوس سرفوس ۱۲۶

باسیلوس سوبتیلیس ۱۲۷

کلستریدیوم ها ۱۲۷

کلستریدیوم بوتولینوم ۱۲۷

کلسیدیوم تانی ۱۲۹

کل ریپندوم دیفسیل ۱۳۰

کلستریدیوم پرفرجنس ۱۳۰

واکنش نلر (Nag. r) ۱۳۱

رنگ آمیزی اسپور ۱۳۲

دیسک های ضد میکروبی اختصاصی برای تشخیص اولیه ۱۳۲

۲- باسیل های گرم مثبت بدون اسپور ۱۳۲

کورینه باکتریوم ها ۱۳۲

محیط کشت لوفلر ۱۳۳

محیط کشت تلوریت پتاسیم ۱۳۳

محیط تینسدال آگار (Tinsdale Agar) ۱۳۴

تشخیص بر پایه صفات بیوشیمیایی ۱۳۵

تست اوره آز ۱۳۵

تست شیک (Schick Test): ۱۳۶

تست الک (Elek): ۱۳۶

روش های مولکولی بر پایه ی PCR ۱۳۶

لاکتوباسیلوس ۱۳۶

لیستریا ۱۳۷

مقدمه و هدف

علم میکروبیولوژی که گرایشی از زیست شناسی است به بررسی و مطالعه میکروارگانیسم‌ها می‌پردازد. در این علم ارتباط میکروارگانیسم‌ها با خودشان و همچنین با موجودات عالی‌تر مانند انسان، حیوانات و گیاهان بررسی می‌شود.

هدف از درس آزمایشگاه میکروبیولوژی یادگیری تکنیک‌های پایه آزمایشگاهی برای مشاهده، رشد، شناسایی و تشخیص میکروارگانیسم‌ها است. با استفاده از میکروسکوپ‌های گوناگون و روش‌های رنگ‌آمیزی مختلف می‌توان بررسی‌ای و آرایش باکتری‌ها را شناخت و با استفاده از انواع متفاوت کشت، رفتار این ارگانیسم‌های بسیار کوچک را که در سلامتی و بیماری انسان دارای اهمیت هستند را مطالعه نمود.

تکنیک‌ها و روش‌های آزمایشگاهی ارائه شده در این کتاب، براساس راهنمایی اساتید میکروبیولوژی تنظیم شده است. در این کتاب تلاش شده تا با مراد کردن و هدفمند نمودن دستور کار در راه صحیح، فراگیران را هرچه بیشتر به محتوای آموزشی مورد نیاز نزدیک نمود.

تکنیک‌های آزمایشگاهی در این کتاب در ده بخش موضوعی شامل اصول ایمنی و استریلیزاسیون، روش‌های تهیه گسترش و انواع رنگ‌آمیزی، روش‌های کشت و بررسی خصوصیات ماکروسکوپی باکتری‌ها، سنجش اثرات ضد باکتریایی مواد شیمیایی، روش‌های شناسایی کوکوس‌های گرم مثبت، روش‌های شناسایی کوکوس‌های گرم منفی، روش‌های شناسایی باسیل‌های گرم منفی، روش‌های شناسایی باسیل‌های گرم مثبت، روش‌های شناسایی مایکوباکتریوم‌ها و روش‌های شناسایی اسپروکت‌ها ارائه شده است.