

باسمه تعالی



دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل

# دستور کار آزمایشگاه بیوتکنولوژی

استاد پروفسور قاسم نجف پور

گردآورندگان:

مهندس سهیل عسکری نشاط

مهندس علی متین فر

## فهرست

| جلسه  | عنوان آزمایش                                  | صفحه |
|-------|-----------------------------------------------|------|
| اول   | ایمنی در آزمایشگاه و آشنایی با ابزار          | ۵    |
| -     | آزمایشات کنترل کیفیت مواد غذایی               |      |
| دوم   | روش تهیه منحنی استاندارد DNS                  | ۲۱   |
| سوم   | اندازه گیری قند موجود در بیسکوئیت             | ۲۴   |
| چهارم | اندازه گیری میزان خاکستر در فرآورده های غذایی | ۲۹   |
| -     | آزمایشات میکروبیولوژی                         |      |
| پنجم  | تهیه محیط کشت مایع و جامد میکروارگانیسم ها    | ۳۲   |
| ششم   | اندازه گیری دانسیته نوری و وزن خشک سلول       | ۳۷   |
| هفتم  | شمارش باکتری ها                               | ۳۸   |
| هشتم  | مقدمه ای بر رنگ کردن میکروارگانیسم ها         | ۳۹   |
| -     | آزمایشات محیط زیست                            |      |
| نهم   | اندازه گیری COD آب و فاضلاب                   | ۴۶   |
| دهم   | اندازه گیری انواع جامدات پساب                 | ۵۱   |



## مقدمه:

بیوتکنولوژی، علمی میان‌رشته‌ای است که از آمیختن علوم بیولوژی و شیمی در علوم مهندسی پدید می‌آید. در حقیقت می‌توان گفت بیوتکنولوژی، دانش استفاده از ریز موجودات زنده، یا همان میکروارگانیسم و محصولات جانبی آن‌ها، همچون آنزیم‌ها، متابولیت‌های ثانویه و هر فرآورده‌ای که از pathway موجودات زنده تولید می‌شود، می‌باشد.

در حقیقت بیوتکنولوژی را می‌توان به درختی شبیه کرد که ریشه‌های تناور آن‌را علمی مانند زیست‌شناسی به‌ویژه زیست‌شناسی مولکولی، ژنتیک، میکروبیولوژی، بیوشیمی، ایمونولوژی، شیمی، مهندسی شیمی، مهندسی بیوشیمی، گیاه‌شناسی، جانورشناسی، داروسازی، کامپیوتر و... تشکیل می‌دهند.

در دهه‌های گذشته، کاربرد بیوتکنولوژی تنها به بیوتکنولوژی جانوران یا تکنولوژی سلول‌های گیاهی و نیز علم باغبانی محدود می‌شد، اما امروزه با پیشرفت این علم در بسیاری از حوزه‌های مهندسی همچون پیشرفت در فرآورده‌های نانو-بیوتکنولوژی و بیومواد، این مرزها و حصارها پشت سر گذاشته شده است.

در اواسط قرن نوزدهم، لوئی پاستور کاربرد صنعتی میکروارگانیسم‌ها را در تولید محصولات، با استفاده از فرآورده‌های بیولوژیکی گوناگون کشف کرد. بر این اساس مواد خام به عنوان سوستر و مواد مغذی برای میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار گرفت تا منجر به تولید محصولات مناسبی گردد. میکروارگانیسم‌ها در شرایط عادی، حجم انبوهی از مواد شیمیایی، دارویی و غذایی را تولید می‌کنند.

از دیگر موارد استفاده از میکروارگانیسم‌ها، کاربرد آن در استخراج و بیولیچینگ می‌باشد. (مثال: کاربرد در صنعت استخراج فلزات از سنگ آهن با درجه خلوص پائین). میکروارگانیسم‌ها در بسیاری از فرآورده‌های تصفیه و زیست‌پالائی<sup>1</sup> و در حذف آلاینده‌های آلی موثر می‌باشند. آن‌ها قادرند آلاینده‌های نامطبوع را از فاز آبی حذف نمایند. در بیوفیلترها، مواد آلاینده با عبور از مدیا فیلتر، از جریان هوا جدا می‌شوند. تجزیه بیولوژیکی ترکیبات آلی فرار (VOCs) به‌وسیله کنسرسیومی از میکروارگانیسم‌های فعال در بستر فیلتر صورت می‌پذیرد. کاربرد میکروارگانیسم‌ها در بسیاری از فرآورده‌های بیولوژیکی به دلیل صرفه اقتصادی و مسائل زیست‌محیطی آن رشد و گسترش داشته است. به طور کلی، کاربرد صنعتی میکروب‌ها را می‌توان در معادله واکنشی ساده خلاصه نمود:

محصولات اصلی و جانبی خالص و تجزیه‌شده → میکروب‌ها + مواد خام و آلاینده‌های آلی به عنوان سوستر

<sup>1</sup>Bioremediation

<sup>2</sup>Beer-Lambert



## مقررات آزمایشگاهی

از آنجا که سلامتی به عنوان اصل اول قبل از شروع هر آزمایش مد نظر است، برای حفظ سلامتی و ایمنی تمام افرادی که در آزمایشگاه مشغول کارند، توجه به نکات زیر همواره ضروری است:

۱. تنها موادی را که در آزمایش آن روز به آن نیاز دارید روی میز کار خود قرار دهید. کیفها، لباسها، کتابهای اضافی و غیره را در محل نگهداری آنها یا در زیر میز کار خود قرار دهید تا خراب یا آلوده نشوند. استفاده از روپوش آزمایشگاهی برای کلیه دانشجویان ضروری است.

۲. از آنجا که استفاده از میکروارگانیسم ممکن است مشکلاتی را به همراه داشته باشد، توجه به روشهای ضد عفونی کردن در استفاده و انتقال همه میکروارگانیسمها ضروری است.

۳. خوردن، آشامیدن، استعمال دخانیات و دست به دهان بردن در آزمایشگاه ممنوع است. چنانچه نیاز به استراحت کوتاه دارید، دستهای خود را با صابون ضد عفونی کننده بشوئید و آزمایشگاه را ترک کنید.

۴. هنگامی که می خواهید محیط کشت را دور بریزید به مراحل زیر توجه کنید:

الف. لوله کشت را به سرعت در سطل پلاستیکی زیر هود بیندازید تا لوله آلوده با کسی تماس پیدا نکند.

ب. از هم گروهی خود بخواهید تا مقدار زیادی ایزوپروپیل الکل را روی محل آلوده شده اسپری کند. قبل از اینکه الکل را اسپری کنید از خاموش بودن شعله مطمئن شوید. بعد از چند دقیقه محل مورد نظر را با دستمال کاغذی خشک کنید.

ج. هر دو دستهای خود را با صابون ضد عفونی کننده بشوئید.

۵. هرگونه بریدگی، سوختگی و یا هر جراحت دیگری را به استاد آزمایشگاه خود گزارش دهید.

۶. با استفاده از ماژیک روغنی روی همه لولههای کشت تلقیح شده یا پتری دیشها را با نام یا حروف اول میکروارگانیسمی که رشد می دهید، با یک علامت یا هر اطلاعات مناسب دیگری نام نویسی کنید.



همه مواد تلقیح شده را فقط روی طبقه ای از انکوباتور که با توجه به بخش آزمایشگاهی شما، به شما اختصاص داده شده است، قرار دهید. لوله‌های کشت باید در بشرهای پلاستیکی به صورت عمودی نگهداری شوند در حالیکه پتری دیش‌ها را باید وارونه انباشته و تلقیح کرد.

۷. پس از اتمام هر آزمایش کلیه وسایل مورد استفاده را کاملاً مرتب کنید.

### \* تجهیزات آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل

| نام دستگاه        | مدل                            | توضیحات                    |
|-------------------|--------------------------------|----------------------------|
| GC system         | Agilent 7890A                  | -                          |
| HPLC              | KNAUER                         | آشکارساز UV و IR, ستون C18 |
| اتوکلاو           | HIRAYAMA, HICLAVE HV-25        | -                          |
| میکروسکوپ اپتیک   | Nikon YS100                    | -                          |
| سانتریفیوژ        | Hermle, z 233 M-2              | -                          |
| سانتریفیوژ        | Hermle, z 326 K                | -                          |
| روتاری اوپراتور   | Stuart, RE 300                 | -                          |
| انکوباتور         | ParsAzma                       | Cooled and Hot Incubator   |
| انکوباتور شیکردار | IKA KS 4000 (i) & (ic) control | -                          |
| انکوباتور شیکردار | نور صنعت فردوس                 | -                          |
| کوره              | Nabertherm                     | ۳۰-۳۰۰۰ درجه سانتی‌گراد    |
| اولتراسونیک       | Elmasonic, S10 H               | -                          |
| ترازو             | GR-200                         | -                          |
| ترازو             | AND MA 3000                    | -                          |
| مایکروویو         | Samsung, CQ 4250               | -                          |
| حمام آب           | Julabo                         | -                          |

|                      |                             |                           |
|----------------------|-----------------------------|---------------------------|
| هیتر-استیرر مغناطیسی | AREX                        | -                         |
| اسپکتروفتومتر        | Jenway 6320D                | -                         |
| اسپکتروفتومتر        | Unico 2100Spectrophotometer | بازه جذب ۱۰۰۰-۳۲۵ نانومتر |
| آون                  | Binder                      | -                         |
| pH متر               | HANNA pH11 instrument       | -                         |
| هود میکروبی لامینار  | Laminar Flow, JTLVC2X       |                           |
| پمپ خلاء             | Edwards                     |                           |
| پمپ خلاء             | GB Platinum                 |                           |
| هموژنایزر            | IKA®T18 basic/ Ultra-Turrax |                           |
| فرمانتور             | Infors HT                   | سوئیس - Minifors          |
| آب مقطر ساز          | WSB/4                       |                           |
| دایجستر              | Gerhardt                    |                           |

## شناخت و کاربرد برخی وسایل آزمایشگاهی

### اتوکلاو:

وسیله‌ای است که توسط آن کلیه وسایل آزمایشگاهی و محیط‌های کشت قبل از استفاده و محیط‌های کشت میکروبی و غیره توسط حرارت مرطوب، استریل می‌شوند. این دستگاه قادر است بخار آب اشباع شده را با حرارت ۱۲۱ درجه سانتیگراد ایجاد نماید که این درجه حرارت در شرایط بخار ایجاد شده می‌تواند موجب تخریب ساختمان میکروبها و هاگ آنها شده و تقریباً باعث نابودی تمام میکروارگانیسم‌های شناخته شده می‌شود. اتوکلاوهای آزمایشگاه میکروبیولوژی اغلب روی فشار ۱۵ پوند تنظیم شده اند که در این فشار بخار آب دمای آن به ۱۲۱ درجه سانتیگراد می‌رسد.





### انکوباتور:

دستگاهی است که توسط آن گرمای لازم جهت رشد باکتریها بعد از مرحله کشت، فراهم می شود. محیطهای کشت (مایع و جامد) را بعد از کشت دادن در درون این دستگاه قرار داده و درجه حرارت مورد نیاز باکتری را توسط دستگاه تنظیم می کنیم و بعد تا مدت معین محیطهای کشت در آن باقی می مانند. دمای درون اتاقک انکوباتور توسط یک دماسنج کنترل می شود.

### بن ماری یا حمام آب:

وسیله ای است که در آن بوسیله آب محتوی آن می توان حرارت معینی را ثابت نگهداشت که درجه حرارت تا ۱۰۰ درجه قابل تنظیم می باشد که در این حالت به آن بن ماری جوش می گویند. از این دستگاه می توان بعنوان گرمخانه گذاری محیطهای کشت و همچنین ذوب نمودن محیطهای کشت هم استفاده نمود. بن ماری بهتر است حاوی دماسنج نیز باشد.





### شعله گاز یا چراغ بونزن:

شعله آزمایشگاهی وسیله ای برای حرارت دادن و سترون کردن لوازمی مانند سوزن کشت و دهانه ظروف و لوله های آزمایش و غیره و در واقع فضایی معادل ۱۵ سانتیمتر اطراف خود را استریل و عاری از میکروب می نماید.

### پتری دیش یا پلیت:

ظروف شیشه ای یا پلاستیکی (یکبار مصرف) هستند که حاوی درب می باشند و جهت نگهداری محیط های کشت و کشتهای میکروبی از آن استفاده می شود.







### لوله آزمایش :

وسیله ای شیشه ای و استوانه ای شکل در سایزهای مختلف جهت نگهداری و کشت دادن میکروب در محیطهای مایع و انجام عملیات رقیق سازی و امور دیگر کاربرد دارد .



### لام :

یک صفحه شیشه ای نازک با سایزهای استاندارد که عملیات گسترش میکروبی و رنگ آمیزی روی آن انجام می گیرد.

**لامل:**

صفحه شیشه ای بسیار نازک با ابعاد مختلف استاندارد که روی لام قرار می گیرد و برای مطالعه لام زیر میکروسکوپ از لامل استفاده می شود.

**هود:**

وسیله ای اتاقک مانند با حفاظ شیشه ای متحرک و دارای هواکش و سیستم روشنایی که بعضی از آنها حاوی لامپ UV جهت استریل کردن هوای داخل آن در هنگام کار با عوامل میکروبی و محیط های کشت داده شده، می باشند.

**ترازوی آزمایشگاهی:**

وسیله ای برای توزین با دقت های ۱/، ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ در آزمایشگاه می باشد. ترازوهای با دقت بالا بعلت ظرافت و حساسیت باید از جریان هوا دور نگه داشته شده و در یک جای مسطح و محکم قرار داده شوند و جای آن حتما باید تراز باشد.

## سوزن کشت یا آنس:

وسیله ای با نوک تیز یا حلقوی برای برداشتن نمونه میکروبی و کشت آن بر روی محیط کشت.

## سایر ابزار و تجهیزات آزمایشگاه میکروبیولوژی:

دسیکاتور، بشر، ارلن، استوانه مدرج، سوآپ، قاشقک (اسپاتول)، ترمومتر، پیست، رک یا جا لوله‌ای، جعبه کمک‌های اولیه، ظروف رنگ آمیزی، بورت، ظروف پنی‌سیلین، قیف بوخزر، ظروف شیشه‌ای نگهدارنده، کپسول آتش‌نشانی و...

## • روش استفاده از میکروسکوپ (نایکون مدل CH-2)

### ۱- طریقه انتقال میکروسکوپ



بازوی میکروسکوپ را با یک دست گرفته و با دست دیگر پایه را نگه دارید. هنگام استفاده از میکروسکوپ دقت کنید، زیرا دستگاه گران قیمتی بوده و ارزش آن بیش از ۲۵۰۰ دلار است. قبل از اینکه دستگاه را به برق متصل کنید، پیچ تنظیم ولتاژ را به سمت راست پایه میکروسکوپ بچرخانید (شکل ۱). حال دستگاه را به برق بزنید و با استفاده از دکمه روشن/خاموش که در جلوی میکروسکوپ قرار دارد آن را روشن کنید (شکل ۲). اطمینان حاصل کنید که سیم برق میکروسکوپ روی میز کار شما قرار دارد و آویزان نیست زیرا ممکن است به پای شما گیر کند. پیچ تنظیم ولتاژ را روی ۱۰ تنظیم کنید.

## ۲- تنظیم عدسی‌های چشمی

این میکروسکوپ‌ها از نوع دوربین دار هستند و این بدین معنی است که دو عدسی چشمی دارند. برای تنظیم آنها، ابتدا فاصله مشخص بین چشم‌های خود و عدسی‌ها را با بستن یک چشم خود و حرکت آهسته سر خود به سمت عدسی تا زمانی که دید واضحی داشته باشید ایجاد کنید (تقریباً ۱ اینچ). سر خود را ثابت و چشمان خود را در یک سطح نگه دارید. اکنون چشم دیگر خود را باز نموده و فاصله بین عدسی‌ها را به تدریج افزایش دهید تا زمانی که فاصله آنها برابر با فاصله بین دو چشم شما شود. در فاصله درست شما باید یک ناحیه دید واضح داشته باشید.

## ۳- قرار دادن اسلاید

اسلاید را رو به بالا روی صفحه بگذارید به گونه ای که نمونه در وسط صفحه، جاییکه نور از آن می گذرد قرار گیرد. اسلاید را میان (نه زیر) بازوهای نگهدارنده اسلاید قرار دهید. اکنون می توانید اسلاید را از نقطه ای به نقطه دیگر با استفاده از دو پیچ کنترل که در زیر صفحه در سمت راست میکروسکوپ واقع شده اند حرکت دهید.

## ۴- تنظیم نور

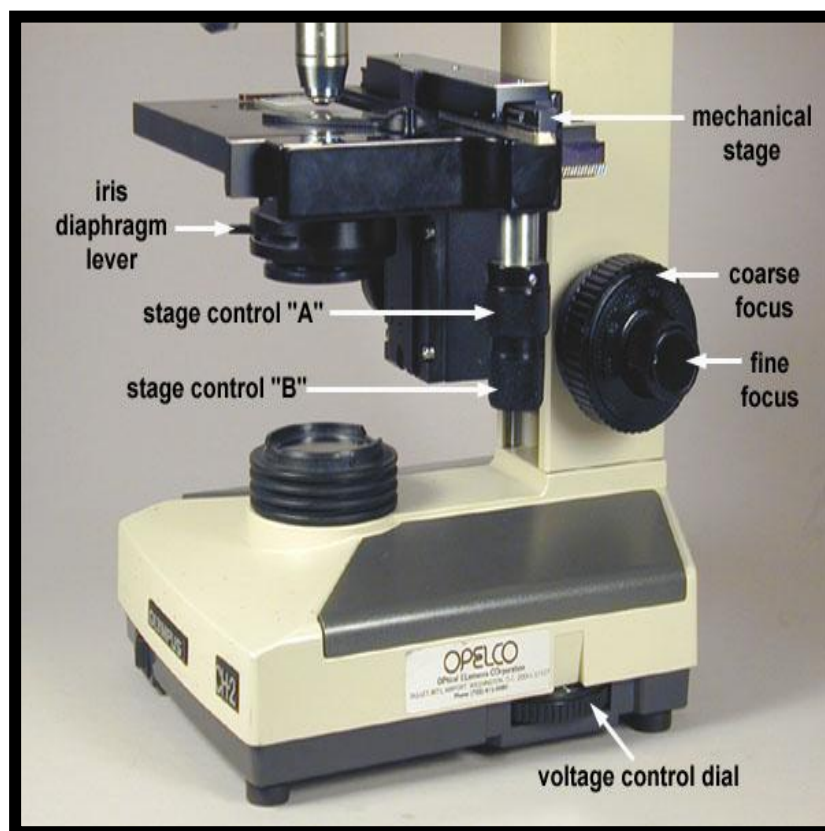
الف. ولتاژ را با چرخاندن پیچ کنترل که در سمت راست انتهای پایه میکروسکوپ قرار دارد تنظیم کنید. هنگام استفاده از روغن ایمرسون (۱۰۰۰ برابر) نور را روی ۹ یا ۱۰ تنظیم کنید. برای بزرگنمایی‌های کمتر نور کمتری مورد نیاز است.

ب. میزان نور ورودی از میان عدسی را با استفاده از اهرم دیافراگم که در زیر صفحه در جلوی میکروسکوپ قرار گرفته است تنظیم کنید. تنظیم نور با استفاده از اهرم دیافراگم برای داشتن کنتراست واضح ضروریست.



هنگام استفاده از روغن ایمرسون (۱۰۰۰ برابر)، اهرم دیافراگرم را باید روی حالت کاملاً باز (به سمت چپ شما برای حداکثر نور) تنظیم کرد. برای قدرت‌های کمتر مانند ۱۰۰ برابر، اهرم دیافراگرم باید تقریباً بسته باشد (به سمت راست شما برای حداقل نور).

ج. تنظیم کننده ارتفاع عدسی (پیچی که زیر صفحه در سمت چپ میکروسکوپ قرار گرفته است) باید به گونه ای تنظیم شود که همواره عدسی به سمت بالا باشد.



شکل ۱

## ۵- بدست آوردن بزرگنمایی‌های مختلف

بزرگنمایی نهایی نتیجه استفاده از ۲ لنز با اندازه‌های متفاوت بوده و میزان بزرگنمایی عدسی چشمی ۱۰ تا ۱۰۰ برابر است. عدسی‌های شیئی بالایی روی صفحه و بالای لام قرار دارند. لنزهای کوچک با خط زرد



بزرگنمایی ۱۰ برابر، لنزهای با خط آبی بزرگنمایی ۴۰ برابر و لنزهای سفید با روغن ایمرسون بزرگنمایی ۱۰۰ برابر دارند.

## **۶- تنظیم لنزها از بزرگ نمایی کوچک به بزرگ**

الف. عدسی شیئی زرد با بزرگنمایی ۱۰ برابر را بچرخانید تا در جای خود قفل شود (بزرگنمایی کلی ۱۰۰ برابر).

ب. دکمه بزرگ را چرخانده تا متوقف شود.

ج. از میان عدسی‌های چشمی نگاه کنید و دکمه بزرگ را به آرامی بسمت خود بچرخانید تا زمانی که نمونه در فاصله کانونی قرار گیرد (پیچ بزرگتر).

د. با استفاده از پیچ کوچک نمونه را در فاصله کانونی دقیق قرار دهید و نور را برای داشتن کنتراست بهینه با استفاده از اهرم دیافراگم تنظیم کنید.

ه. چنانچه نیاز به بزرگنمایی بیشتر دارید، عدسی شیئی آبی با بزرگنمایی ۴۰ برابر را بچرخانید (بزرگنمایی کلی ۴۰۰ برابر) به گونه ای که نمونه همواره در فاصله کانونی باشد.

و. برای داشتن بیشترین بزرگنمایی (۱۰۰۰ برابر یا روغن ایمرسون) عدسی شیئی آبی با بزرگنمایی ۴۰ برابر را به آرامی از جای خود بگردانید و یک قطره از روغن ایمرسون را روی اسلاید بریزید. اکنون عدسی شیئی سفید را در جای مورد نظر قرار دهید. مجدداً نمونه باید در فاصله کانونی باقی بماند.

## **۷- تمیز کردن میکروسکوپ**



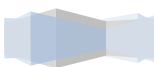
لنزهای چشمی و شیئی خارجی را قبل و بعد از هر آزمایش فقط با دستمال مخصوص لنز پاک کنید (دستمال کاغذی خشن ممکن است لنزها را خط بیندازد). قبل از آنکه میکروسکوپ را در جای خود قرار دهید همه روغن‌ها را از روی لنز روغن ایمرسون را پاک کنید.

## ۸- علت استفاده از روغن ایمرسون

معمولا هنگامی که امواج نوری از یک محیط به محیط دیگر می‌روند می‌شکنند. بنابراین هنگامی که نور از اسلاید شیشه‌ای عبور می‌کند امواج نوری همانند مداد خم شده (هنگامی که مداد در یک لیوان آب قرار می‌گیرد) می‌شکنند. میکروسکوپ این شکستگی را بزرگ می‌کند. همچنین اگر از بزرگنمایی بیشتر استفاده شود، نور بیشتری لازم است.

روغن ایمرسون همانند شیشه عمل می‌کند، بنابراین محیطی همگن بین اسلاید و لنزهای شیئی ایجاد می‌کند. امواج نوری از میان اسلاید شیشه‌ای به روغن که همانند شیشه عمل می‌کند رفته و نهایتاً به لنزهای شیشه‌ای می‌رسند بدون اینکه هیچگونه پراکندگی یا انحراف در تصویر به وجود آید. به عبارت دیگر روغن ایمرسون نور را جمع می‌کند و مانع از اثرات شکنندگی نور می‌شود.

روغن ایمرسونی که در میکروسکوپ استفاده می‌شود اثر بازتابشی همانند شیشه دارد بدین معنی که از نظر اپتیکی همانند شیشه عمل می‌کند. در شکل زیر روغن ایمرسون با قطره چکانی که با هوا پر شده، نشان داده شده است. شاخص بازتابش هوا ۱ است در حالی که این شاخص برای روغن ۱/۵۲ می‌باشد.





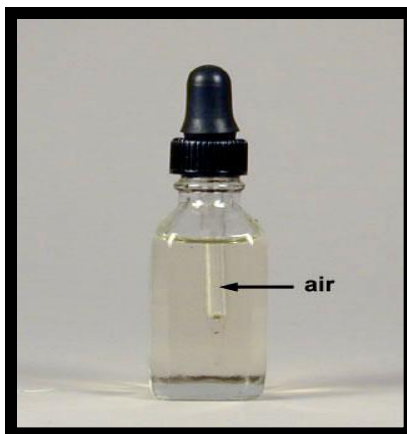


Figure 2: Using Immersion Oil to Create an Optically Homogeneous Light Path

### • آشنایی با اسپکتروفتومتر

اسپکتروفتومتر یا طیف سنج یک دستگاه آزمایشگاهی اولیه است که جهت خواندن نتایج آزمایش‌های که واکنش آنها از نوع End point هستند بکار می‌رود (شکل ۳). این دستگاه میزان جذب یا عبور طول موجهای مشخصی از انرژی تابشی (نور) از یک محلول را اندازه‌گیری می‌نماید بیشترین کاربرد آن در آزمایشگاه در بخش بیوشیمی است.

اساس کار اسپکتروفتومتر همانند بسیار از دستگاههای آزمایشگاهی، براندازه‌گیری میزان نور جذب شده توسط یک محلول رنگی است که طبق قانون بیر-لامبرت<sup>۲</sup> میزان جذب نور (OD) متناسب با غلظت ماده حل شده در محلول است.

قانون بیر-لامبرت زمانی صادق است که:

۱- نور منتشر شده بر روی ماده مورد نظر تک رنگ باشد

۲- غلظت ماده حل شده باید در محدوده خطی باشد

اسپکتروفتومترهای مرئی و فرابنفش رایجترین، نوع آنها در مراکز تشخیصی و آزمایشگاهی است اسپکتروفتومترها بر اساس تعداد پرتوهای نوری که به آشکارساز دستگاه می‌رسد به دو نوع تک پرتویی و دوپرتویی تقسیم میشوند. در نوع تک پرتویی یک جایگاه برای محلول و بلانک وجود دارد در دستگاههای دو پرتویی دو جایگاه منظور شده است. پرتو تابش شده بطور خودکار مجزا شده و از محلول بلانک و نمونه همزمان عبور می‌کند این دستگاهها بسیار حساس می‌باشند.

<sup>2</sup> Beer-Lambert





شکل ۳

قسمت‌های مختلف یک اسپکتروفتومتر (شکل ۴) :

- ۱- منبع نور (Light Source)
- ۲- تک رنگ ساز (Monochromator)
- ۳- شکاف عبور یا متمرکز کننده پرتو (Focusing Device)
- ۴- کووت یا محل قرار دادن نمونه (Cuvet)
- ۵- دتکتور یا آشکار ساز (Detector)
- ۶- صفحه نمایشگر (Display device)

#### • منبع نور :

معمولاً از لامپ‌های تنگستنی که تولید نور با طول موج ۳۰۰-۹۹۰ نانومتر مینمایند استفاده می شود برای تولید پرتوهای فرابنفش غالباً از لامپ‌های هیدروژنی یا دوتریومی (با طول موج ۴۵۰-۲۰۰ نانومتر) استفاده می شود لامپ‌های دوتریومی معمولاً پایدارترند و طول عمر بیشتری دارند.

#### • تک رنگ ساز :

این قسمت دستگاه، نور مخلوط را به پرتوهای تک رنگ تجزیه می کند این عمل در اسپکتروفتومتر معمولاً توسط منشور یا سیستم گریٹینگ (Grating) انجام می گیرد.



### • شکاف عبور یا متمرکز کننده پرتو :

ترکیبی از عدسی‌ها، آئینه‌های کوچک می باشد که فقط به طیف رنگی با طول موج مورد نظر اجازه عبور می دهند هر قدر عرض شکاف نور کمتر باشد کیفیت پرتوها بهتر خواهد بود. میزان منوکروماتیک بودن نور تابیده شده به کووت بسیار مهم می باشد که با  $SBW^3$  پهنای باند طیف برحسب نانومتر مشخص می شود هرچقدر عدد  $SBW$  کوچکتر باشد کیفیت دستگاه بهتر خواهد بود که بستگی به نوع گریٹینگ و پهنای شکاف عبور نور دارد. بهترین  $SBW$  برای اسپکتروفتومترهای آزمایشگاهی ۸ نانومتر و برای دستگاههای تحقیقاتی ۴-۸/۱ نانومتر می باشد.

### • کووت یا محل قرار دادن نمونه :

کووتها محفظه‌های شفاف هستند که محلول موردآزمایش در آن ریخته شده و در جایگاه خاص خود که در مسیر نور تکرنگ تعبیه شده است قرار می گیرد. کووتها با توجه به نوع مصرف جنس، شکل و حجم متفاوتی دارند. برای محلولهای اسیدی و قلیایی از کووتهای مخصوص شیشه ای و برای طول موجهای زیر ۳۲۰ نانومتر از لوله کوارتز یا پلاستیک استفاده می شود.

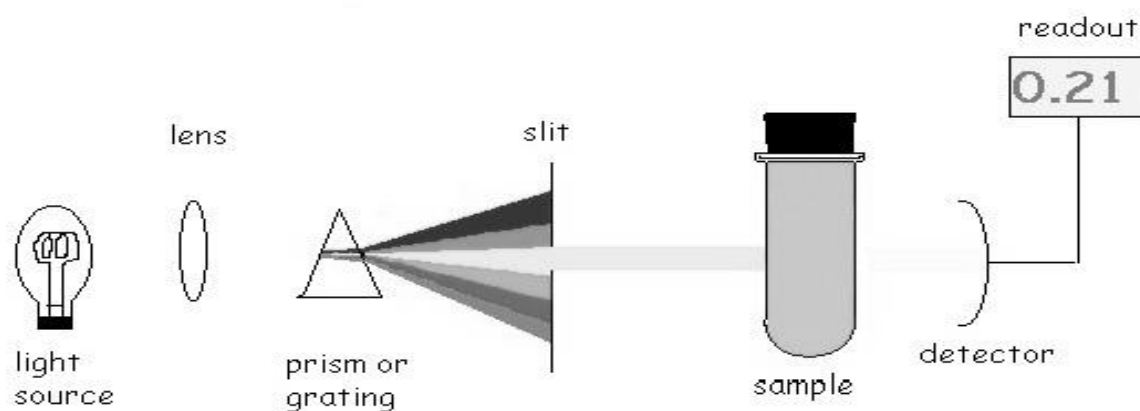
### • دتکتور یا آشکار ساز :

دتکتور یا آشکار ساز انرژی نورانی (عبور کرده از محلول را) به انرژی الکتریکی تبدیل و آن را تقویت می کند. آشکار سازها معمولاً به سه گروه تقسیم می شوند:  
 ۱- فتوالکتریکی ۲- فتوشیمیایی ۳- حرارتی  
 در اسپکتروفتومتر از آشکار سازهای فتوالکتریکی استفاده می شود. فتوسل و فتوتیوب از جمله آنهاست.

### • صفحه نمایشگر :

داده‌های بدست آمده از یک آشکار ساز بوسیله یک دستگاه بازخوانی مانند یک گالوانومتر یا اسلوسکپ نشان داده می شود. انواع مختلف نمایشگر در اشکال عقربه ای، دیجیتالی و کامپیوتری در اسپکتروفتومترها وجود دارد.

<sup>3</sup> Spectral Band Width



شکل ۴

### طریقه کار با دستگاه اسپکتروفتومتر

- ۱- پس اتصال به برق دستگاه را روشن می کنیم حدود ۱۰ الی ۱۵ دقیقه صبر می کنیم تا به اصطلاح دستگاه گرم شود (Warm-up).
- ۲- طول موج مورد نظر را انتخاب می کنیم.
- ۳- با استفاده از بلانک دستگاه را صفر می کنیم.
- ۴- استاندارد آزمایش و نمونه به ترتیب به کووت منتقل نموده و جذب آن را می خوانیم.
- ۵- با یک سری محاسبه غلظت نمونه را بدست می آوریم.

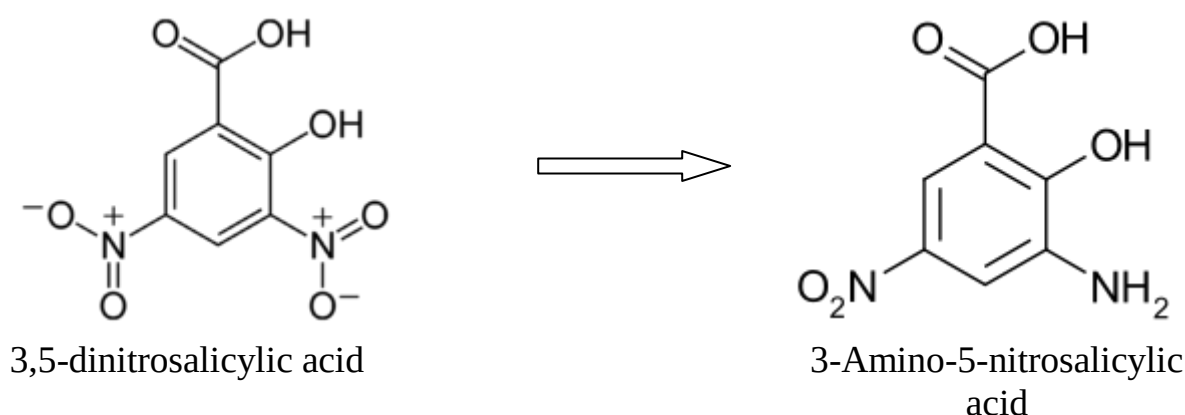


## جلسه دوم

- روش تهیه منحنی استاندارد DNS<sup>۴</sup>

در علم تغذیه اندازه گیری ترکیبات غذایی از جمله میزان قند موجود در ماده غذایی حائز اهمیت است. گلوکز قند مونومری است که برای سنجش آن از معرف DNS استفاده می شود. معرف DNS (دی نیتروسالسیلیک اسید) برای اندازه گیری قندهای مونومر بکار می رود.

۳و۵- دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) ترکیب آروماتیکی است که با قندهای احیا شونده<sup>۵</sup> واکنش داده و تشکیل ۳- آمینو-۵- نیترو سالیسیلیک اسید می دهد. در این واکنش گروه ۳-آمین ( $NH_2$ ) جایگزین یک گروه نیتراته ( $NOO^-$ ) می شود و این ترکیب نور را به شدت در طول موج ۵۴۰ نانومتر جذب می کند (شکل ۵).



شکل ۵

به هر قندی که در محلول بازی تشکیل آلدئید یا کتون دهد قند احیا شونده گفته می شود. قندهای احیا شونده عبارتند از: گلوکز، فروکتوز، گلیسرآلدئید، لاکتوز، آربینوز و مالتوز.

## روش آماده سازی معرف DNS:

الف. مقدار ۱۰ گرم ماده ۳و۵- دی نیترو سالیسیلیک اسید را در ۲۰۰ میلی لیتر محلول سود ۲ مولار حل کنید. برای ساختن محلول سود ۲ نرمال مقدار ۱۶ گرم سود را با ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر به حجم برسانید. محلول

<sup>۴</sup>3,5-Dinitro salicylic acid<sup>۵</sup>Reducing sugar

DNS را روی همزن مغناطیسی قرار داده همزن را روشن کنید تا محلول همراه با گرم شدن به خوبی مخلوط شود.

ب. محلولی جداگانه از ۳۰۰ گرم تارتارات مضاعف سدیم-پتاسیم ( $KNaC_4H_4O_6.4H_2O$ ) در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر تهیه کنید و همانند مرحله قبل آن را حرارت داده و خوب مخلوط کنید. محلول نمک گرم را به آرامی و همراه با همزدن به DNS بیفزایید تا حجم محلول به یک لیتر برسد.

### مواد مورد نیاز برای رسم منحنی استاندارد DNS :

محلول ۲ گرم گلوکز

معرف DNS

آب مقطر

لوله آزمایش

دستگاه اسپکتروفوتومتر

### روش ساخت محلول استاندارد گلوکز:

محلول ۲ گرم گلوکز را در یک لیتر آب مقطر حل کنید تا محلول ۲ گرم/لیتر گلوکز حاصل شود. بهتر است این محلول را از روز قبل تهیه کنید تا محلول کاملاً پایداری حاصل شود.

### روش انجام آزمایش:

۶ لوله آزمایش آماده کنید. لوله‌ها را مطابق جدول زیر پر کنید:

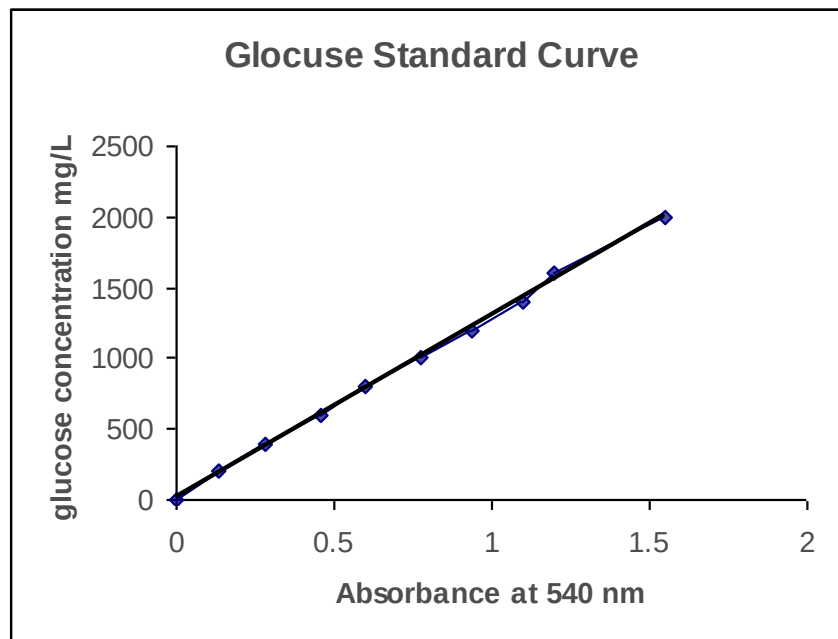
| شماره لوله آزمایش | محلول گلوکز ( میلی لیتر ) | آب مقطر ( میلی لیتر ) | غلظت محلول گلوکز میلی گرم در لیتر |
|-------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| ۱                 | ۱                         | ۹                     | ۲۰۰                               |
| ۲                 | ۲                         | ۸                     | ۴۰۰                               |
| ۳                 | ۳                         | ۷                     | ۶۰۰                               |
| ۴                 | ۴                         | ۶                     | ۸۰۰                               |
| ۵                 | ۵                         | ۵                     | ۱۰۰۰                              |

|      |    |   |   |
|------|----|---|---|
| شاهد | ۱۰ | - | ۶ |
|------|----|---|---|

پس از تهیه ۶ نمونه از محلول گلوکز، از هر نمونه ۱ میلی لیتر برداشته و با ۱ میلی لیتر محلول DNS مخلوط کنید. لوله‌های آزمایش در داخل آب در حال جوش به مدت ۱۵ دقیقه قرار دهید تا واکنش انجام شود و سپس آنها را در آب یخ بگذارید.

برای خواندن میزان جذب محلول‌ها، به هر نمونه ۸ میلی لیتر آب بیفزایید تا حجم کل محلول به ۱۰ میلی لیتر برسد. دستگاه اسپکتروفتومتر را روشن کرده و طول موج دستگاه را در ۵۴۰ نانومتر تنظیم کنید. با استفاده از نمونه شاهد میزان جذب نور را روی صفر تنظیم کنید و سپس مقداری از هر نمونه را داخل سل اسپکتروفتومتر بریزید. جذب ۵ نمونه را خوانده و مقدار آنها را یادداشت کنید.

غلظت محلول گلوکز را برحسب مقدار جذب خوانده شده از اسپکتروفتومتر رسم کنید. در شکل زیر (شکل ۶) نمونه‌ای از منحنی استاندارد DNS به عنوان مثال رسم گردیده است.



شکل ۶

نکته:

✓ برای آنکه واکنش بین گلوکز و معرف DNS بهتر انجام شود باید بعد از مخلوط کردن آنها را حرارت دهیم.

✓ برای متوقف کردن واکنش بین گلوکز و معرف DNS باید آنها را در آب یخ قرار می دهیم.

## جلسه سوم: اندازه‌گیری قند موجود در بیسکوئیت

آشنایی با واکنش‌ها و متابولیسم مواد قندی (کربوهیدرات‌ها)

### کربوهیدرات‌ها :

کربوهیدرات‌ها (هیدرات‌های کربن یا مواد قندی) یکی از انواع مولکول‌های زیستی هستند که از نظر شیمیایی آنها را پلی هیدروکسی آلدئید یا پلی هیدروکسی کتون می‌دانند. کربوهیدرات‌ها یا بصورت تک واحدی هستند (تک قندی یا مونو ساکاریدها) و یا بصورت دایمر، تریمر و یا پلیمرهایی از این واحدها هستند که به ترتیب دو قندی (یا دی ساکارید) و چند قندی (یا پلی ساکارید) نامیده می‌شوند. یک مونوساکارید یا قند ساده، آلدئید یا کتونی با حداقل دو گروه هیدروکسیل است. قندهای پیچیده از اتصال قندهای ساده همراه با حذف آب بدست می‌آیند. قندهای آلدئیدی بصورت آلدوزها طبقه بندی می‌شوند و آنهایی که عامل کتونی دارند کتوز خوانده می‌شوند.

### سوخت و ساز کربوهیدرات‌ها :

کربوهیدرات‌ها به گلوکز تبدیل می‌شوند و گلوکز به دو طریق سوخت و ساز (متابولیسم) هوازی دارد.

### متابولیسم هوازی گلوکز :

بدین صورت که ابتدا ملکول گلوکز می‌شکند و دو ملکول اسید پیرویک ایجاد می‌کند. اسید پیرویک دیکربوکسیله می‌شود و به مشتق استیل تبدیل می‌شود. مشتق استیل با کوآنزیم A ترکیب می‌شود و استیل کو آنزیم A را ایجاد می‌کند. استیل کوآنزیم A وارد چرخه کربس می‌شود و طی یک سری واکنش‌های پیایی به آب، انرژی و  $\text{CO}_2$  تبدیل می‌شود.

### متابولیسم بی هوازی :

زمانی که بدن در شرایط اضطراری قرار می‌گیرد متابولیسم بی هوازی رخ می‌دهد. مثلاً ورزشکاری که فعالیت سنگین انجام می‌دهد قادر به تأمین کل انرژی مورد نیاز خود از طریق هوازی نیست، قسمتی از انرژی خود را از طریق بی هوازی تأمین می‌کند یا در شرایطی که فرد در حالت خفگی قرار می‌گیرد بدن از طریق متابولیسم بی هوازی سعی در حفظ حیات می‌کند. بدین صورت که ملکول گلوکز می‌شکند و دو ملکول اسید پیرویک ایجاد می‌کند، هر ملکول اسید پیرویک احیا می‌شود و اسید لاکتیک ایجاد می‌کند.

علت اینکه اسید لاکتیک باعث گرفتگی ماهیچه یا خستگی ورزشکاران می شود، متابولیسم بی هوازی است. بنابر این در شرایط بی هوازی از متابولیسم گلوکز دو ATP (آدنوزین تری فسفات) و در شرایط هوازی از متابولیسم گلوکز سی و هشت ATP انرژی آزاد می شود. البته ممکن است تصور کنید متابولیسم بی هوازی باعث هدر رفتن انرژی می شود، در صورتی که اسید لاکتیک جمع شده در ماهیچه با جریان خون به کبد می رود و مجدداً تبدیل به گلیکوژن می شود و دوباره قند می سازد.

ساختار تمام کربوهیدراتها یکسان نیست. کربوهیدراتهای ساده که در چپس، کلوچه و نان سفید وجود دارند به سادگی هضم می شوند اما کربوهیدراتهای مرکب که در میوه ها و سبزی ها و نان جو و سایر حبوبات وجود دارند به سرعت هضم نشده و درصد سوخت آنها پایین است.

### گلوکز :

به هر قندی که در محلول بازی تشکیل آلدئید یا کتون دهد، قند احیا شونده گفته می شود. گلوکز یک قند آلدئیدی و در نتیجه یک قند احیا شونده است. گلوکز یا قند خون به دکستروز موسوم است، یک پنتاهیدروکسی هگزانال بوده، از این رو در خانواده آلدوز هگزوزها جای دارد. گلوکز بصورت طبیعی در بسیاری از میوه ها و گیاهان و همچنین با غلظتی در گستره ۰/۰۸ درصد تا ۰/۱ درصد در خون انسان وجود دارد.

### منابع گلوکز :

گلوکز که در طبیعت به حالت آزاد و یا در ترکیب یافت می شود، نه تنها متداولترین قند است بلکه فراوانترین ترکیب شیمیایی طبیعت نیز محسوب می شود. این قند، همراه با D- فروکتوز در غلظتهای قابل ملاحظه در انگور، انجیر و سایر میوه های شیرین و در عسل وجود دارد.

سلولز، نشاسته و گلیکوژن، تماماً از واحدهای گلوکز تشکیل شده اند. همچنین گلوکز بزرگترین جزء ساختمانی بسیاری از الیگوساریدها بویژه ساکاروز و بسیاری از گلیکوزیدها را تشکیل می دهد.

گلوکز را می توان به روش تجاری از هیدرولیز نشاسته ذرت، توسط یک اسید معدنی رقیق تهیه کرد. گلوکز تجاری حاصله، در حد زیادی در کارخانجات شیرینی، مربا، الکل و کمپوت سازی مورد استفاده واقع می شود.

### واکنش های گلوکز؛





**اثر اسیدها:**

مونوساکاریدها در اسیدهای معدنی رقیق و گرم پایدارند، اما تحت اثر اسیدهای غلیظ مانند اسید سولفوریک، ساختمان خود را از دست داده، تولید ماده حلقوی به نام فورفورال و مشتقات آن می کنند.

به عنوان مثال زمانی که گلوکز در اسید کلریدریک قوی حرارت داده می شود، به ۵-هیدروکسی متیل فورفورال تبدیل می شود. فورفورالها در مجاورت فنلها متراکم می شوند و ترکیبات رنگی بوجود می آورند که از آنها در رنگ سنجی قندها استفاده می شود.

**اثر بازها :**

محلول غلیظ قلیاییها مانند سود یا پتاس، باعث پلیمری شدن و یا تجزیه قندها می گردد، ولی قلیاییهای رقیق باعث توتومری قندها و تبدیل آنها به یکدیگر می شوند.

بدین ترتیب، فروکتوز و گلوکز و مانوز در محیط قلیایی رقیق می توانند به یکدیگر تبدیل شوند و این تبدیلها با تشکیل شکلهای حد واسط انولی، که ان دیولها نامیده می شوند، همراه است.

**مواد و ابزار مورد نیاز :**

بیسکوئیت

معرف DNS

اسید کلریدریک رقیق

محلول سود ۵ مولار

فنل فتالین

بالن ژوژه ۵۰ میلی لیتری و ۲۵۰ میلی لیتری

بشر

ترازو



## لوله آزمایش

دستگاه اسپکتروفوتومتر

## روش کار:

- تکه‌ای از بیسکوئیت را وزن کرده (حدود ۳-۲ گرم)، آن را کاملاً خرد نمائید. بیسکوئیت را در ۱۰۰ میلی لیتر اسید کلریدریک رقیق (۷/۴ درصد) حل کرده و مگنتی را داخل بشر بیندازید. روی بشر را با یک شیشه ساعت بپوشانید و آن را روی هیتر قرار دهید.
- حدود ۲۰ دقیقه صبر کنید تا بیسکوئیت همراه با همزدن و حرارت کاملاً در اسید حل شده و محلول یکنواختی حاصل شود.
- سپس به این محلول چند قطره فنل فتالئین بیفزائید و آن را با محلول سود ۵ مولار تیتراً کنید تا رنگ صورتی حاصل شود.
- محلول را در بالن ژوژه ۲۵۰ میلی لیتری به حجم برسانید. ۲ میلی لیتر از این محلول را برداشته و مجدداً در بالن ژوژه ۵۰ میلی لیتری به حجم برسانید.
- اکنون از این محلول ۱ میلی لیتر بردارید و ۱ میلی لیتر DNS به آن بیفزائید. در لوله آزمایش دیگری ۱ میلی لیتر آب مقطر و ۱ میلی لیتر DNS بریزید و آن را به عنوان شاهد استفاده کنید.
- نمونه اصلی و نمونه شاهد را در آب جوش قرار داده و به مدت ۱۵ دقیقه بجوشانید و سپس آنها را در آب یخ قرار دهید.
- به هر کدام از نمونه‌ها ۸ میلی لیتر آب مقطر اضافه کنید و جذب آنها را در اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۴۰ نانو متر بخوانید.
- با توجه به منحنی استاندارد که قبلاً به دست آورده‌اید و ضریب رقت، قند موجود در بیسکوئیت را گزارش کنید.



ضریب رقت  $\times$  غلظت واقعی = غلظت خوانده شده از منحنی استاندارد

نکته :

✓ برای حل کردن بیسکوئیت از اسید رقیق استفاده می کنیم زیرا معرف DNS برای اندازه گیری قندهای مونومر استفاده می شود در نتیجه برای شکسته شدن شاخه های قند موجود در بیسکوئیت از اسید استفاده کرده و برای خنثی کردن اسید آنرا با سود تیترو می کنیم.

✓ علت رقیق سازی آن است که دستگاه اسپکتروفتومتر قادر به خواندن ضریب جذب محلولهای غلیظ نمی باشد.



### جلسه چهارم: اندازه گیری میزان خاکستر در فرآورده های غذایی

مواد معدنی با ساختاری ساده، در بسیاری از فعالیت های متابولیک نقش دارند. اکثر آنها موجب تسریع فعالیت های شیمیایی بدن و موجب تنظیم و کنترل بافت ها، ماهیچه ها و دستگاه های بدن انسان ها و حیوانات می شوند. مثلاً کلسیم و فسفر در ساختمان بافت استخوانی ما شرکت دارند و یا آهن در ساختمان بافت خون نقش دارد. همچنین عناصر معدنی در ترشحات مایعات بدن مثل هورمون ها یا ساختمان آنزیم ها نقش داشته و بطور کلی در حفظ و نگهداری تعادل بدن موثرند. هر ماده غذایی با هر منبعی که باشد دارای مقادیر متغیری از مواد معدنی می باشد. اگر مواد غذایی منبع گیاهی داشته باشد، گیاه مواد معدنی را از خاک دریافت کرده و در ساقه و برگ خود ذخیره می کند میزان ذخیره مواد غذایی در گیاه بستگی به عوامل مختلفی دارد از جمله خاک منطقه ای که گیاه در آن رشد کرده است. هر چه خاک منطقه از عناصر معدنی غنی تر باشد میزان ذخیره سازی این عناصر در گیاهان بیشتر است. اگر ماده غذایی منبع حیوانی داشته باشد این عناصر توسط حیوان در زمان حیات از محیط دریافت شده و در بافت ها ذخیره می شود که این ذخیره سازی مواد معدنی در بافت های مختلف نیز متفاوت است مثلاً مقدار کلسیم موجود در استخوان خیلی بیشتر از میزان آن در قسمتهای دیگر می باشد.

#### دسته بندی مواد معدنی :

مواد معدنی اصلی: کلسیم، فسفر، کلر، منیزیم، پتاسیم، سدیم و سولفور.

مواد معدنی اثر گذار : ید، آهن، روی، سلنیم، فلوراید، مس، منگنز و غیره.

در بدن ۶۰ ماده معدنی گوناگون مورد نیاز است تا فعالیت ها طبیعی و متعادل باشند.

#### کلسیم:

در بین مواد معدنی کلسیم جایگاه ویژه ای دارد زیرا بیشترین ماده معدنی که در بدن ما وجود دارد کلسیم است. در استخوان های یک فرد بالغ حدود نود تا صد و چهل گرم کلسیم وجود دارد. کلسیم و فسفر همراه هم می باشند و این امر نقش اصلی این دو عنصر را در ساختمان استخوانها نشان می دهد.

#### خاکستر :

هر ماده غذایی دارای فاکتورهای مختلفی در درون خود بوده که جداسازی هر کدام از آنها روش خاص خود را دارد. مواد معدنی یکی از این فاکتورها می باشند.

برای جداسازی مواد معدنی از دیگر فاکتورها باید کل مواد در دمای بالا سوزانده شوند که در اثر این کار تمامی مواد آلی (از جمله مواد پروتئینی، فیبرخام، چربی و غیره) سوزانده شده و فقط مواد معدنی باقی می ماند که مجموع آنها خاکستر خام نامیده می شود.

بقایای تمام مواد غذایی پس از هضم شدن در بدن به صورت خاکستر می باشد. با توجه به محتوای معدنی مواد غذایی اولیه، این بقایای خاکستر می توانند به صورت خنثی، اسیدی و یا بازی باشند. به عنوان مثال، پتاسیم، کلسیم، منیزیم، سدیم، روی، نقره، مس و آهن، خاکستر بازی و سولفور، فسفر، کلر و ید خاکستر اسیدی به وجود می آورند.

### مواد و ابزار مورد نیاز :

بیسکوئیت

بوته چینی

آون

ترازو

کوره حرارتی

دسیکاتور

پنس (انبرک)

### روش آزمایش:

آون حرارتی را روشن کنید تا دمای آن به حدود ۱۰۰ درجه سانتیگراد برسد. بوته چینی را در داخل آون قرار دهید. پس از چند دقیقه آن را با گیره برداشته و در داخل دسیکاتور قرار دهید تا خنک شود.

سپس بوته چینی را به دقت وزن نموده و وزن آن را یادداشت نمایید. مقداری بیسکوئیت ( ۱-۵/۰ گرم) را در داخل بوته ریخته و وزن آن را نیز یادداشت کنید. کوره را روشن کنید تا دمای آن به حدود ۶۰۰ درجه سانتیگراد برسد. نمونه را روی شعله آتش بسوزانید و سپس آن را در داخل بوته قرار دهید.



بوته حاوی نمونه را داخل کوره بگذارید و تا زمان سفید شدن نمونه حرارت را ادامه دهید. در صورتی که محتویات درون بوته به رنگ سفید درنیامد، چند قطره آب مقطر به آن اضافه کرده و مجدداً در کوره قرار دهید تا به رنگ سفید (خاکستر) درآید.

بوته چینی را توسط گیره از کوره خارج کرده و در دسیکاتور قرار دهید تا خنک شود. بوته حاوی خاکستر را به دقت وزن کنید و آن را یادداشت نمایید.

درصد خاکستر موجود در نمونه با استفاده از رابطه زیر حاصل می شود:

$$\text{درصد خاکستر بر حسب گرم: } \left[ \frac{(M_2 - M_1)}{A} \right] \times 100$$

$M_1$  = وزن بوته خالی

$M_2$  = وزن بوته همراه با خاکستر نمونه

$A$  = وزن نمونه اولیه



### جلسه پنجم: تهیه محیط کشت مایع و جامد میکروارگانیسم‌ها

محیط کشت، محیط مایع یا جامدی است که به منظور کمک به رشد میکروارگانیسم یا سلول‌ها طراحی می‌شود. این محیط‌ها حاوی منبع کربن و نیتروژن مشخص و عناصر ضروری و ویتامین‌های مورد نیاز میکروب می‌باشد. محیط‌های کشت را متناسب با نوع آزمایش می‌توان به دو صورت مایع و جامد تهیه کرد.

#### ۱- محیط کشت مایع:

محیط‌های مایع به علت نداشتن آگار در ترکیب خود به صورت جامد در نیامده و متناسب با نوع میکروارگانیسم و آزمایش‌های مورد نظر می‌توان آنها را در لوله‌های آزمایش، ارلن مایر و یا ظروف دیگر مورد استفاده قرار داد. این محیط در مواردی که تعداد باکتری زیاد باشد به کار می‌رود، به این محیط کشت "براث"<sup>۶</sup> می‌گویند.

#### ۲- محیط کشت جامد:

محیط‌های جامد به علت دارا بودن آگار در ترکیب خود به صورت جامد بوده و متناسب با میکروارگانیسم‌ها و آزمایش‌های مورد نظر می‌توان آنها را در لوله ظروف پتری و یا ظروف دیگر مورد استفاده قرار داد. همچنین از دو قسمت ژلاتینی و جامد تشکیل شده است و قسمت ژلاتینی ممکن است از جنس خود ژلاتین یا آگار و یا سیلیکاژن باشد و در واقع آگار عصاره‌ای از جلبک قرمز دریایی می‌باشد که به محیط کشت شکل می‌دهد.

انواع محیط‌های کشت را از نظر ترکیب شیمیایی و دارا بودن مواد غذایی یا مواد بازدارنده نیز می‌توان به چند دسته تقسیم بندی کرد:

#### ۱- محیط کشت انتخابی<sup>۷</sup>:

این محیط‌ها برای جدا کردن یک یا دسته‌ای از میکروارگانیسم‌ها بکار می‌روند و به علت دارا بودن مواد بازدارنده، از رشد میکروارگانیسم‌های ناخواسته جلوگیری می‌کنند این محیط‌ها برای رشد باکتری‌های مطلوب بهینه شده‌اند. در این محیط‌ها تنها باکتری‌های مورد نظر رشد می‌یابند. برای مثال اگر یک ارگانیسم به آنتی بیوتیک خاصی مثل آمپی سیلین یا تتراسیکلین مقاوم باشد میتوان این آنتی بیوتیک را به محیط کشت اضافه نمود، در این صورت سایر سلول‌های حساس به این آنتی بیوتیک قادر به رشد نخواهند بود.

<sup>6</sup> Broth

<sup>7</sup> Selective

۲- محیط‌های کشت غنی کننده<sup>۸</sup> :

این محیط‌ها معمولا در مواردی به کار می روند که تعداد میکروارگانیسم مورد جستجو در نمونه غذایی کم بوده و یا به علت و مواد pH وجود زیاد میکروارگانی میهای دیگر جدا کردن آن با اشکال مواجه است. این محیط‌ها با ترکیب خاص خود از نظر غذایی امکان رشد برای میکروارگانیسم مورد نظر را فراهم میکند، مانند محیط گوشت پخته برای جدا کردن استافیلوکوکوس اورئوس. این محیط شامل نیازهای غذایی پیچیده مورد نیاز برای رشد میکروارگانیسم می باشد.

## ۳- محیط کشت کامل یا عمومی:

مانند محیط کشت نوترینت آگار (na) یا نوترینت براث (nb) و این محیط‌ها حاوی کلیه مواد لازم برای رشد باکتری‌ها هستند و فاقد مواد ضد میکروبی اند.

## ۴- محیط کشت اختصاصی:

در این محیط فقط یکسری باکتری‌های خاص می توانند رشد کنند و از رشد باکتری‌های دیگر جلوگیری می شود.

## ۵- محیط کشت انتقالی:

برای جلوگیری از از بین رفتن مقداری از میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه ای که مدتی طول میکشد تا از محل گرفتن نمونه به آزمایشگاه برسد بکار می رود

## Agar :

آگار یک پلی ساکاریدی است که از دو جزء ساخته شده است:

- آگارز<sup>۹</sup>
- آگاروپکتین<sup>۱۰</sup>

آگارز پلی ساکاریدی خطی است که از بتا دی گالاکتوز و ۳ و ۶ ان هیدرو آلفا ال گالاکتوز تشکیل شده است :

<sup>8</sup> Enrichment

<sup>9</sup> agarose

<sup>10</sup> agaropectin







آگاروپکتین یک پلیمر اسیدی است. واحدهای آگاروپکتین مانند آگارز است با این تفاوت که در برخی از جایگاهها گروههای سولفات، متیل و پیرویک اسید جایگزین شده است.

آگار در دمای ۳۰-۴۰ درجه سانتیگراد به فرم ژل و در دمای ۹۰-۹۵ درجه به حالت شل در می آید. آگارز در ایجاد حالت ژل در آگار نقش دارد. آگار برای جامد کردن محیطهای کشت استفاده می شود و با سایر ترکیبات موجود مانند عصاره گوشت، پپتون، پروتئینها، قند، پیگمانها، معرفها، بازدارندهها و غیره واکنش نمی دهد. حتی پس از اتوکلاو نیز تغییر ساختار یا رنگ نمی دهد. علاوه بر اینها ارگانیسمها قادر به استفاده از آگار به عنوان منبع انرژی نیستند.

### آماده سازی محیط کشت مایع میکروارگانیسم:

محیط کشت، محیط مایع یا جامدی است که میکروارگانیسمها در آن رشد می کنند . برای رشد میکروارگانیسمهای متعدد محیط کشتهای متفاوتی وجود دارد. برای تهیه محیط کشت مایع یا براث برای میکروارگانیسمها باید از ترکیبات لازم و ضروری برای رشد میکروارگانیسمها استفاده کرد.

**مواد مورد نیاز :** به ازای ۱۰۰ میلی لیتر آب

۱- گلوکز به مقدار ۱۰ g/l

۲- پودر مخمر به مقدار ۱/۵ g/l

۳-  $K_2HPO_4$  به مقدار ۰/۵ g/l

۴-  $NH_4Cl$  به مقدار ۰/۵ g/l

ابتدا مواد مورد نیاز را با استفاده از ترازو توزین کرده و به ارلن حاوی ۱۰۰ میلی لیتر آب اضافه می کنیم. روی ظرف محیط کشت را با پنبه و فویل می پوشانیم و برای استریل کردن محیط کشت آن را داخل اتوکلاو قرار می دهیم. محیط کشت در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد در فشار ۱۵ psia به مدت ۲۰ min استریل می شود.

## تلقیح میکروارگانیسم:

عمل تلقیح در کنار شعله صورت می گیرد تا میکروارگانیسمی غیر از میکروارگانیسم مورد نظر وارد محیط کشت نشود. برای دقت بیشتر محیط اطراف محل کار را با پنبه آغشته به اتانول تمیز می کنیم. در کنار شعله چند قطره از میکروارگانیسم مورد نظر را وارد محیط کشت می کنیم. سپس محیط کشت را دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قرار می دهیم تا میکروارگانیسم ها در دما و محیط کشت مناسب رشد کنند.

بهتر است محیط کشت حاوی میکروارگانیسم را درون انکیباتور مجهز به شیکر<sup>۱۱</sup> قرار دهیم تا محیط کشت همواره یکنواخت شود.

## تهیه محیط کشت جامد (آگار):

مواد لازم:

پپتون: ۰/۱ گرم

گلوکز: ۰/۵ گرم

آگار: ۱/۲۵ گرم

آب مقطر: ۵۰ میلی لیتر

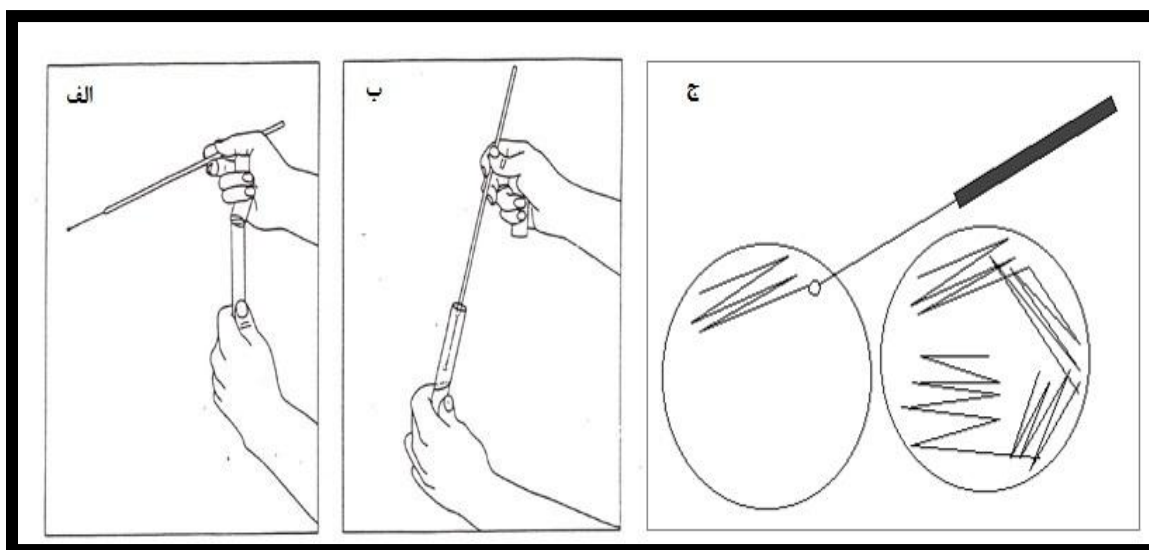
ابتدا پپتون و گلوکز را در داخل ارلن حاوی ۵۰ میلی لیتر آب مقطر می ریزیم. یک عدد مگنت در ارلن قرار داده (برای هم زدن و ایجاد یک محلول همگن) و آگار را کم کم به ارلن اضافه می کنیم تا یک محلول یک دست ایجاد شود و سپس ارلن را روی هیتر می گذاریم تا محلول شفاف ایجاد شود. سپس درب ارلن را با پنبه و فویل می پوشانیم و در اتوکلاو قرار می دهیم. در مدت استریل شدن محیط کشت آگار پتری دیش را با پنبه و الکل در زیر هود لامینار ضد عفونی می کنیم تا از هر گونه آلودگی دور شود. بعد از بیرون آوردن محلول از اتوکلاو، آن را در حضور شعله در پتری دیش پخش می کنیم. تا فیلم نازکی از محلول در پتری دیش تشکیل شود، کمی صبر می کنیم تا محیط جامد شود. پس از جامد شدن درب پتری دیش را می گذاریم و آن را بر می گردانیم و به یخچال منتقل می کنیم.

<sup>11</sup> shaker

## تلقیح میکروارگانیسم بر روی محیط کشت آگار :

## روش کار:

- عمل تلقیح در کنار شعله صورت می گیرد تا میکرو ارگانیسمی غیر از میکروارگانیسم مورد نظر وارد محیط کشت نشود. برای دقت بیشتر محیط اطراف محل کار را با پنبه آغشته به اتانول تمیز می کنیم.
- ظرف یا لوله حاوی محیط کشت استوک را با یک دست گرفته و با دست دیگر لوپ را بر روی شعله داغ میکنیم.
- پس از سرخ شدن لوپ، درب محیط کشت اصلی (استوک) را برداشته (شکل ۷-الف) و لوپ را با آگار تماس می دهیم تا خنک شود (شکل ۷-ب).
- با لوپ قسمت اندکی از آگار برمی داریم و درب محیط کشت اصلی را میگذاریم (شکل ۷-ب).
- در کنار شعله لوپ را به صورتی که در شکل ۷-ج نشان داده شده بر روی محیط کشت تازه می کشیم و سپس درب آن را می بندیم.
- با استفاده از شعله لوپ را مجددا استریل می کنیم.
- نام خود، اسم میکروارگانیسم و تاریخ تلقیح را بر روی بدنه پلیت یادداشت می کنیم.



شکل ۷



جلسه ششم : اندازه گیری دانسیته نوری و وزن خشک سلول؛

مواد مورد نیاز :

شش لوله آزمایش

محیط کشت تلقیح شده

دستگاه اسپکتروفوتومتر

فیلتر ۰/۴۵ میکرون

برای تعیین میزان رشد سلولی از دستگاهی به نام اسپکتروفوتومتر استفاده می‌کنیم. ابتدا ۵ نمونه از محیط کشت با رقت‌های مختلف و یک نمونه آب مقطر به عنوان شاهد تهیه می‌کنیم و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر میزان دانسیته نوری را برای هر محلول می‌خوانیم.

| نمونه سلولی | آب مقطر | ضریب جذب نوری |
|-------------|---------|---------------|
| 1 CC        | 4 CC    |               |
| 2 CC        | 3 CC    |               |
| 3 CC        | 2 CC    |               |
| 4 CC        | 1 CC    |               |
| 5 CC        | 0 CC    |               |

روش دیگر برای تعیین میزان رشد سلولی تعیین وزن خشک سلول می‌باشد. برای این منظور فیلتر را در یک شیشه‌ی ساعت قرار می‌دهیم و به مدت ۱۰ دقیقه در آن قرار می‌دهیم تا رطوبت آن از بین رود. سپس آن را به دقت توزین می‌کنیم. از ارلن محتوی نمونه (محیط کشت تلقیح شده) مقداری از محلول کشت داده شده را از فیلتر عبور داده و فیلتر را درون آن قرار می‌دهیم تا بعد از گذشت ۲ ساعت و خشک شدن وزن سلول را با ترازوی دیجیتالی بدست می‌آوریم.

وزن اولیه فیلتر = ..... وزن فیلتر بعد از خشک کردن = ..... وزن سلول خشک = .....

وزن فیلتر و سلول بعد از خشک کردن - وزن فیلتر خشک = وزن خشک سلولی

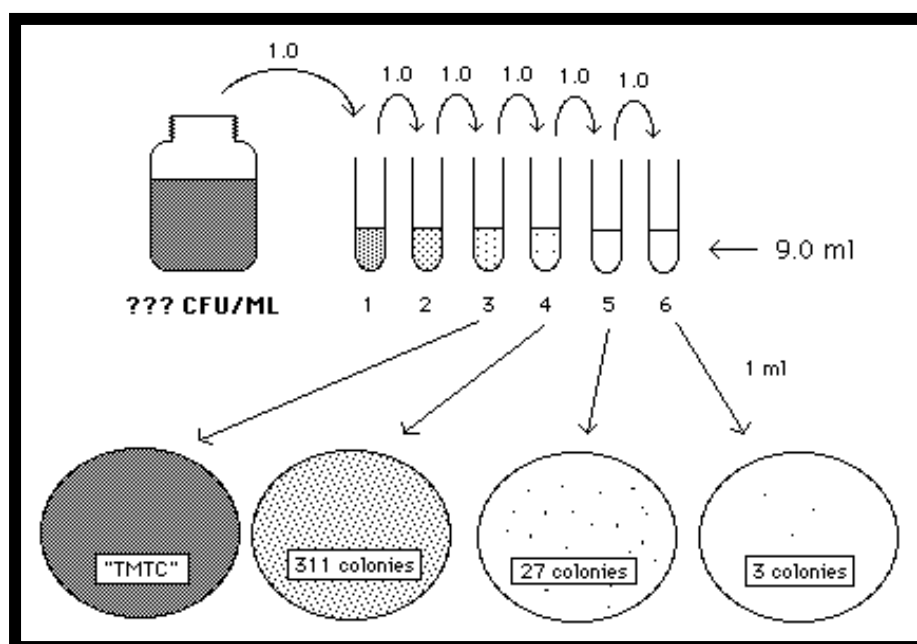


## جلسه هفتم: شمارش باکتری‌ها

## روش کار:

۶ عدد لوله‌ی آزمایش در بسته حاوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر را استریل کنید. لوله‌ها را از ۱ تا ۶ شماره‌گذاری کنید و به ترتیب درون جا لوله‌ای قرار دهید. از نمونه‌ی اولیه سوسپانسیون باکتری *E.coli* که می‌خواهید باکتری‌های آن را بشمارید یک میلی‌لیتر در شرایط استریل (کنار شعله یا زیر هود) به لوله‌ی شماره‌ی ۱ منتقل کنید. محتوای لوله‌ی اول را خوب مخلوط کنید تا رقت ۱۰-۱ شما کاملاً یک نواخت گردد. سپس ۱ میلی‌لیتر از آن را در شرایط استریل به لوله‌ی بعدی منتقل کنید. مرحله‌ی قبل را به ترتیب برای لوله‌های بعدی تکرار کنید تا رقت ۱۰-۶ به دست آید. از آخرین لوله ۱ میلی‌لیتر را بیرون ریخته تا تمام لوله‌ی آزمایش‌ها حاوی ۹ میلی‌لیتر سوسپانسیون باشند. در شکل زیر همین روند را مشاهده می‌کنید. هر چه رنگ کم‌رنگ‌تر می‌شود نشان‌دهنده‌ی رقیق‌تر شدن سوسپانسیون اولیه است.

حال که رقت‌ها را تهیه کردیم، نوبت به کشت آنها می‌رسد. برای هر رقت یک پلیت استریل مشخص می‌کنیم. از هر لوله مقدار ۱ میلی‌لیتر برداشته و به داخل پلیت‌های مربوط به آن رقت می‌ریزیم.



شکل ۸

## جلسه هشتم: مقدمه‌ای بر رنگ کردن میکروارگانیسم‌ها

بحث:

ساختار و مورفولوژی باکتریایی ممکن است با یکی از روشهای زیر بررسی شود:

✓ با مشاهده ارگانیسم‌های زنده و بدون رنگ

✓ با مشاهده ارگانیسم‌های تثبیت شده و مرده رنگ شده

با توجه به اینکه باکتری‌ها تقریباً بی رنگند در نتیجه تفاوت کمی با محیط کشت برآث که در آن معلقند دارند بنابراین، مشاهده آنها در حالی که بی رنگ هستند مشکل است. رنگ کردن میکرو ارگانیسم‌ها ما را قادر می سازد تا:

- مقایسه بهتری بین ارگانیسم و زمینه محیطی انجام دهیم.
  - میان مورفولوژی‌های مختلف تفاوت ایجاد شود (از روی شکل، آرایش، واکنش‌های گرم و غیره).
  - ساختارهای مختلف را مشاهده کنیم.
- قبل از رنگ کردن باکتری شما باید بدانید چگونه باکتری را روی اسلاید تثبیت کنید. در غیر این صورت ارگانیسم‌ها در حین رنگ شدن، شسته می شوند. روش مرسوم خشک کردن با هوا و تثبیت کردن پروتئین سلولی با گرما است. ارگانیسم‌ها با عبور هوای خشک از میان شعه‌های چراغ گازی تثبیت می شوند. گرما پروتئین‌های ارگانیسم‌ها را لخته کرده و موجب چسبیدن باکتری به اسلاید می گردد.

### روند تثبیت به وسیله گرما؛

- ۱- اگر محیط کشت از یک محیط آگار گرفته شده باشد:
  - به کمک یک قطره چکان که در ابزار شما موجود است نیم قطره آب را با تماس قطره چکان روی یک اسلاید تمیز قرار دهید.
  - مقدار کمی از محیط کشت را از سطح آگار در شرایط ضدعفونی جدا کنید و چندین مرتبه آن را با قطره آب در تماس قرار دهید تا کدر شود.
  - باقیمانده باکتری را از روی لوپ بسوزانید (اگر مقدار محیط کشت اضافه شده به آب زیاد باشد، شما نمی توانید باکتری‌های رنگ شده مشخص را مشاهده کنید).

- با استفاده از لوپ، سوسپانسیون را روی سطح اسلاید پهن کنید تا فیلم نازکی حاصل شود.
- اجازه دهید تا این سوسپانسیون نازک در معرض هوا کاملاً خشک شود.
- اسلاید را (در حالی که سمت فیلم رو به بالا است) ۳ یا ۴ مرتبه از میان شعله عبور دهید تا در اثر حرارت فیلم ثابت شود. دقت کنید که حرارت زیاد ممکن است ارگانیسم را از بین ببرد و در مورد باکتری‌های رنگ شده، ممکن است باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی به نظر برسند. اسلاید باید به مقدار کافی گرم شود، اما نه به اندازه‌ای که نتوان آن را با دست نگه داشت.

۲- اگر ارگانیسم از محیط کشت برآش گرفته شود:

- ۲ یا ۳ لوپ از محیط کشت را در شرایط ضدعفونی روی یک اسلاید تمیز قرار دهید (از آب استفاده نکنید).
- با استفاده از لوپ سوسپانسیون را روی اسلاید پهن کنید تا لایه نازکی به وجود آید.
- اجازه دهید تا این سوسپانسیون نازک در معرض هوا کاملاً خشک شود.
- اسلاید را (در حالی که سمت فیلم رو به بالا است) ۳ یا ۴ مرتبه از میان شعله عبور دهید تا در اثر حرارت فیلم ثابت شود.

برای درک بهتر از اینکه رنگها چگونه عمل می‌کنند، دانستن نکاتی در مورد طبیعت فیزیکی و شیمیایی رنگها موثر خواهد بود. رنگها عموماً نمک‌هایی هستند که در آنها یکی از یونها رنگی است (نمک ترکیبی است که از یونهای باردار مثبت و منفی تشکیل شده است). برای مثال، رنگ متیلن بلو در واقع نمک کلراید متیلن بلو است که در آب به یون مثبت متیلن بلو که آبی رنگ است و یون منفی کلراید که بی رنگ است تفکیک می‌گردد.

رنگها را می‌توان به دو گروه بازی و اسیدی تقسیم بندی کرد. اگر قسمت رنگدار ماده رنگی در یون مثبت بماند، همانند مثال بالا، رنگ بازی نامیده می‌شود (مثالها: متیلن بلو، بنفش بلوری، سافرانین). چنانچه قسمت رنگدار ماده رنگی در یون با بار منفی باشد، رنگ اسیدی نامیده می‌شود (مثالها: نیگروزین، قرمزکنگو و فوشین).

به دلیل طبیعت شیمیایی، سیتوپلاسم همه سلولهای باکتریایی هنگام رشد در محیطی با pH تقریباً خنثی، اندکی بار منفی دارد. بنابراین، هنگام استفاده از یک رنگ بازی، قسمت رنگدار ماده رنگی که بار مثبت دارد با سیتوپلاسم باکتریایی با بار منفی ترکیب می‌شود (بارهای ناهمنام یکدیگر را جذب می‌کنند) و ارگانیسم



مستقیماً رنگی می شود. یک رنگ اسیدی با توجه به طبیعت شیمیائی اش به گونه ای متفاوت عمل می کند. از آنجا که قسمت رنگدار ماده رنگی در یون منفی است با سیتوپلاسم باکتریائی با بار منفی ترکیب نخواهد شد (دفع بارهای همنام). در عوض، رسوبی در اطراف ارگانیسم تشکیل می دهد که موجب می شود ارگانیسم خودش بی رنگ به نظر برسد. از آنجا که ارگانیسم به صورت غیر مستقیم دیده می شود، این نوع رنگ آمیزی غیرمستقیم یا منفی نامیده می شود و برای دید دقیق تری از اندازه، شکل و آرایش باکتری ها به کار می رود.

### رنگ آمیزی مستقیم با استفاده از رنگ بازی

در رنگ آمیزی مستقیم، قسمت رنگدار ماده رنگی که بار مثبت دارد با باکتری با بار منفی ترکیب می شود و ارگانیسم ها مستقیماً رنگ آمیزی می گردند.

### ارگانیسم ها :

محیط کشت خالص از استرپتوکوکی اپیدرمیدیس (کوکسی با آرایش استافیلوکوکی) یا میکروکوکوس لتوس (کوکسی با آرایش سارسینا یا چهارتایی) و اشیریشیا کولی (باسیلوس کوچک) یا انتروباکتر اروژنس (باسیلوس کوچک).

### روش کار

- به روش زیر یک لکه اشیریشیا کولی یا انتروباکتر اروژنس را با گرما تثبیت کنید :
- به وسیله قطره چکان یک قطره کوچک آب را روی یک اسلاید تمیز قرار دهید.
- در شرایط ضد عفونی مقدار کمی محیط را از آگار جدا کرده و چندین بار آن را با قطره تماس دهید تا کدر شود.
- باقیمانده باکتری را از روی لوپ بسوزانید (اگر محیط کشت بسیار زیاد را به آب اضافه کرده باشید قادر نخواهید بود باکتری را مشاهده کنید).
- به وسیله لوپ سوسپانسیون را روی کل اسلاید پخش کنید تا به صورت یک لایه نازک درآید.
- اجازه دهید تا این سوسپانسیون نازک کاملاً به کمک هوا خشک شود.
- اسلاید را (در حالی که سمت فیلم رو به بالا است) ۳ یا ۴ مرتبه از میان شعله عبور دهید تا در اثر حرارت فیلم ثابت شود.





- اسلاید را روی سینی قرار دهید و روی فیلم را کاملاً به وسیله سافرانین بپوشانید و بگذارید به مدت 1 دقیقه باقی بماند.
- انتهای اسلاید را گرفته و آن را از یک گوشه روی سینی بگیرید. به وسیله سینی شستشو به آرامی سافرانین اضافی را از روی اسلاید بشویید. همچنین لکه‌هایی که در زیر اسلاید به وجود آمده اند را نیز بشویید.

## رنگ آمیزی گرم<sup>۱۲</sup>

بحث:

رنگ کردن گرم مهم‌ترین روش مورد استفاده برای رنگ کردن در باکتریولوژی است. این روش، رنگ کردن تشخیصی نیز نامیده می‌شود زیرا بین باکتری گرم مثبت و گرم منفی تفاوت قائل می‌شود. باکتری‌هایی که با روش رنگ آمیزی گرم به رنگ ارغوانی، رنگ می‌شوند گرم مثبت و آنهایی که به رنگ صورتی، رنگ می‌شوند گرم منفی نامیده می‌شوند. عناوین مثبت و منفی ربطی به بار الکتریکی ندارد اما به سادگی دو گروه مورفولوژیکی خاص را مشخص می‌کند. باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به دلیل تفاوت‌های اساسی در ساختار دیواره سلولیشان به طور متفاوتی رنگ آمیزی می‌شوند. دیواره سلولی باکتریایی اندازه و شکل باکتری را تعیین می‌کند و مانع از بین رفتن اسمتیک می‌شود. مواد به کار رفته در دیواره سلولی باکتریایی که موجب سختی آن می‌شود پپتیدوگلیکان است. در تصویر برداری میکروسکوپ الکترونی، دیواره سلولی باکتری گرم مثبت دیواره پهن و متراکمی با ضخامت ۲۸-۲۰ نانومتر به نظر می‌رسد که متشکل از چندین لایه پپتیدوگلیکانی به هم پیوسته است. از نظر شیمیایی ۶۰ تا ۹۰ درصد دیواره سلولی باکتری گرم مثبت پپتیدوگلیکان است. بافتهای در هم تابیده در دیواره سلولی باکتری گرم مثبت تیکوئیک اسیدها هستند. تیکوئیک اسیدها<sup>۱۳</sup> که از میان و اطراف دیواره سلولی توسعه یافته اند، متشکل از پلیمری از گلیسرول، فسفات‌ها و قند الکلی ریبیتول هستند. برخی از آنها یک اتصال لیپیدی نیز دارند (لیپوتیکوئیک اسید<sup>۱۴</sup>). سطح خارجی پتیدوگلیکان با پروتئین‌هایی پر شده است که با گونه و جنس باکتری متفاوت است.

از طرف دیگر، دیواره سلولی باکتری گرم منفی از فقط ۳-۲ لایه پتیدوگلیکان تشکیل شده است و با یک غشا خارجی متشکل از فسفولیپیدها، لیپوپلی ساکارید، لیپوپروتئین و پروتئین‌هاست. فقط ۲۰-۱۰ درصد دیواره

<sup>12</sup> Gram Staining

<sup>13</sup> Teichoic acid

<sup>14</sup> Lipoteichoic acid

سلولی باکتری گرم منفی پتیدوگلیکان است. فسفولیپیدها عمدتاً در لایه داخلی غشا خارجی قرار گرفته اند، مثل اینکه لیپوپروتئینها غشا خارجی را به پتیدوگلیکان متصل می نمایند. لیپوپلی ساکاریدها که در لایه بیرونی غشا خارجی قرار دارند، از بخش چربی تشکیل شده که لیپید A نامیده می شود و در غشا جای گرفته و یک بخش پلی ساکاریدی خارجی در سطح باکتریایی توسعه یافته است. غشا خارجی همچنین حاوی پروتئینهایی است که با نوع و گونه باکتری متفاوت است.

فرآیند رنگ کردن شامل چهار مرحله زیر است :

۱- در ابتدا باکتری توسط رنگ بنفش بلوری بازی رنگ می شود. هم باکتری گرم مثبت و هم باکتری گرم منفی مستقیماً رنگ می شوند و پس از این مرحله ارغوانی به نظر می رسند.

۲- سپس باکتریها با محلول ید گرم فرآوری می شوند. این امر موجب می شود که رنگ با تشکیل کمپلکس ید-بنفش بلوری نامحلول، بهتر باقی بماند.

۳- رنگبر گرم که مخلوطی از اتیل الکل و استون است، به آن اضافه می شود. این مرحله جهت ایجاد تمایز است. باکتری گرم مثبت به صورت کمپلکس ید-بنفش بلوری باقی می ماند درحالیکه باکتری گرم منفی بی رنگ می شود.

۴- نهایتاً از ضد رنگ سافرانین (همچنین یک رنگ بازی) استفاده می شود. از آنجا که باکتری گرم مثبت به رنگ ارغوانی درآمده است، تحت تاثیر ضد رنگ قرار نمی گیرد. باکتری گرم منفی که اکنون بی رنگ است، مستقیماً با سافرانین رنگی می شود. بنابراین، باکتریهای گرم مثبت ارغوانی و باکتریهای گرم منفی صورتی به نظر می رسند.

بر اساس تئوری موجود در مورد رنگ آمیزی گرم، تصور می شود که در باکتریهای گرم مثبت بنفش بلوری و ید ترکیب می شوند تا مولکول بزرگتری را به وجود آورند که این مولکول رنگی در بیرون سلول رسوب می کند. سپس مخلوط الکل و استون موجب دهیدراته شدن پتیدوگلیکان چند لایه ای می شود، بنابراین فضای مابین مولکولها کاهش یافته و موجب می شود که دیواره سلولی کمپلکس بنفش بلوری-ید را داخل سلول حبس کند. در مورد باکتریهای گرم منفی، مخلوط الکل و استون به عنوان حلال چربی عمل می کند که غشا بیرونی دیواره سلولی را در خود حل می کند و همچنین ممکن است موجب خرابی غشا سیتوپلاسمی که پتیدوگلیکان



به آن متصل است شود . لایه منفرد و ظریف پتیدوگلیکان قادر نیست که کمپلکس بنفش بلوری-ید را در خود نگه دارد و در نتیجه سلول بی‌رنگ می‌شود.

لازم به ذکر است که گرم مثبت بودن (توانایی نگهداشتن کمپلکس بنفش بلوری-ید) پدیده خیلی مهمی نیست اما قابل توجه است . عوامل متعددی وجود دارند که می‌توانند موجب شوند که یک ارگانیسم گرم مثبت به صورت گرم منفی رنگ شود :

۱- روش و تکنیک به کار رفته: حرارت دادن بیش از حد در هنگام تثبیت دمایی، هنگام رنگ زدایی با الکل و حتی شستشوی زیاد با آب در بین مراحل می‌تواند موجب شود که یک باکتری گرم مثبت کمپلکس بنفش بلوری-ید را از دست بدهد.

۲- طول عمر محیط کشت: محیط‌هایی که عمرشان بیش از ۲۴ ساعت باشد ممکن است قادر نباشند کمپلکس بنفش بلوری-ید را در خود نگهدارند.

۳- خود ارگانیسم: بعضی از باکتریهای گرم مثبت توانایی بیشتری در نگهداری کمپلکس بنفش بلوری-ید دارند.

بنابراین، در رنگ آمیزی گرم باید از تکنیک‌های دقیق استفاده کرد و نتایج را با احتیاط و دقت تحلیل کرد.

### مواد لازم:

- محیط کشت تلقیح شده
- لام
- کریستال ویوله
- لوگل
- الکل اتیلیک (رنگ بر)
- فوشین قلیایی
- میکروسکوپ

ابتدا یک لام را با اتانول در زیر هود لامینار به خوبی تمیز می‌کنیم و چند بار از روی شعله عبور می‌دهیم تا عاری از هر گونه آلودگی شود. سپس نوک لوپ را روی شعله قرار می‌دهیم تا سرخ شود (برای برطرف شدن



آلودگی). یک لوپ از میکروارگانیسم را برداشته و روی لام پخش می کنیم و مدتی آن را در هوای آزاد نگه داشته تا خشک شود. پس از خشک شدن، سه چهار بار از شعله عبور می دهیم تا پروتئین آن تثبیت شود.

برای رنگ آمیزی، ابتدا چند قطره از محلول کریستال ویوله را روی لام ریخته بعد از ۳۰ ثانیه با آب مقطر می شوئیم (برای شناسایی گرم مثبت). سپس ماده لوگول که یک محلول الکلی ید دار و به عنوان تثبیت کننده می باشد روی لام می ریزیم و بعد از ۳۰ ثانیه با آب مقطر می شوئیم. سپس از الکل به عنوان رنگ بر به مدت ۱۰ ثانیه استفاده می کنیم. باکتری هایی که رنگ نگرفته اند گرم منفی هستند، و در آخرین مرحله از محلول فوشین استفاده می کنیم و بعد از ۳۰ ثانیه با آب مقطر شستشو می دهیم. لام را زیر میکروسکوپ قرار می دهیم.

مشاهده می شود، باکتری هایی که به رنگ بنفش هستند گرم مثبت و باکتری هایی که به رنگ صورتی هستند گرم منفی می باشند.



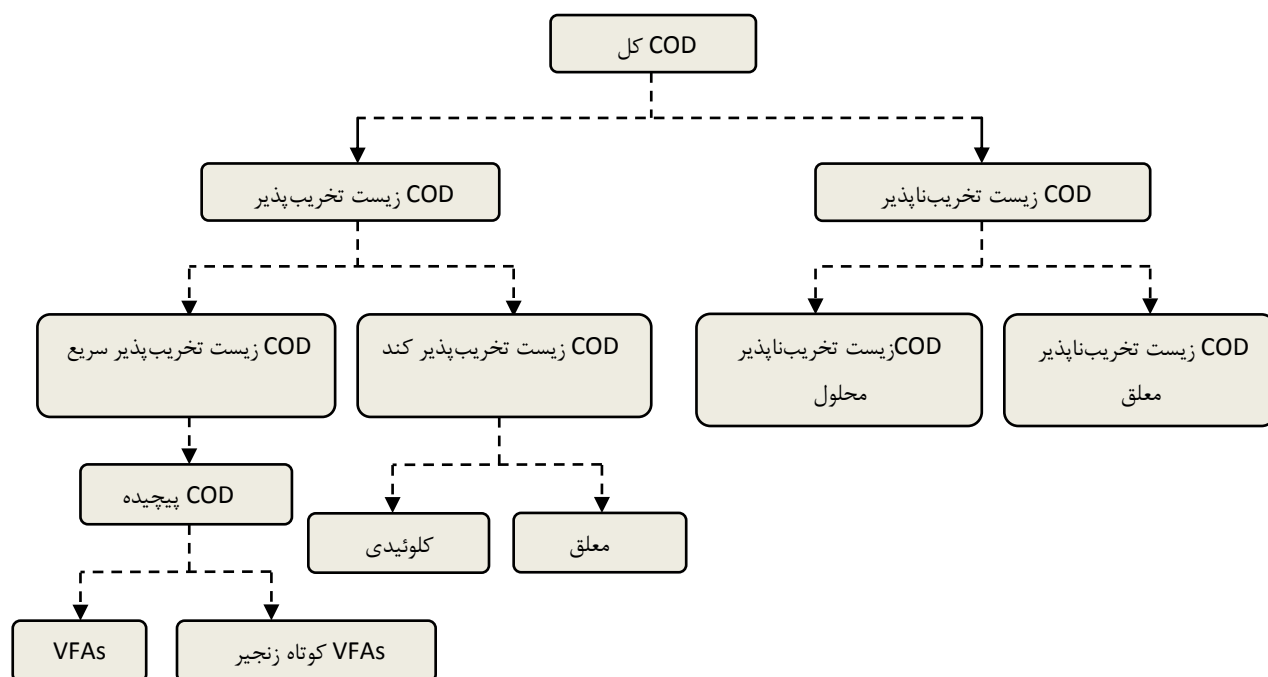
## جلسه نهم: آزمایش COD

### مقدمه‌ای بر BOD و COD پساب‌ها

اکسیژن محلول (DO) مورد نیاز میکروارگانیسم‌ها برای تبدیل بیوشیمیایی مواد آلی، که از آن به عنوان اکسیژن بیوشیمیایی مورد نیاز (BOD) یاد می‌شود، معمولاً به صورت BOD ۵ روزه ( $BOD_5$ ) گزارش می‌گردد. آزمایش اندازه‌گیری آن می‌تواند بازدهی فرآیند را ارزیابی، کیفیت جریان خروجی از تصفیه‌خانه‌ها را با توجه به محدودیت‌های اعمال شده کنترل و میزان اکسیژن محلول مورد نیاز برای اکسیداسیون بیوشیمیایی را برآورد نماید. اگر آمونیاک در پسابی وجود داشته باشد، می‌تواند ابتدا به نیتريت و سپس به نیترات (فرآیند نیتريفيکاسیون) تبدیل شود. برای این منظور، اکسیژن زیادی برای اکسیداسیون آمونیاک به نیترات، که به  $NBOD^{15}$  معروف است، مورد نیاز خواهد بود که می‌تواند در BOD مربوط به تجزیه مواد آلی مداخله کند. بنابراین، واکنش‌های نیتريفيکاسیون در آزمایشات BOD، از طریق افزودن مواد شیمیایی و یا از بین بردن ارگانیسم‌های نیترات‌ساز، به تعیین BOD کربنی (CBOD) ختم می‌شود. معمولاً آزمایش اندازه‌گیری CBOD تنها برای مقادیر کم مواد آلی قابل قبول است، با این حال در آزمایشات اندازه‌گیری CBOD از نمونه‌های فاضلاب تصفیه نشده با مقادیر بالای مواد آلی، در اندازه‌گیری مقدار BOD خطای زیادی قریب ۲۰ درصد رخ می‌دهد.

COD یک فاضلاب یا آب آلوده عبارت است از میزان اکسیژن مورد نیاز برای اکسیداسیون مواد قابل اکسید شدن در یک لیتر آن. در تست COD، دی‌کرومات به عنوان واکنش‌گر در محلول اسید برای اکسید شیمیایی مواد آلی نمونه آزمایش، مصرف شده که به میزان اکسیژن لازم برای این منظور، COD اطلاق می‌شود. از لحاظ زمان پایان آزمایش، معمولاً اندازه‌گیری COD به دلیل زمان کوتاه‌تر آزمایش (یعنی ۲-۲/۵ ساعت) بر تست BOD که پنج روز زمان می‌برد، ارجحیت دارد. در شکل زیر اشکال گوناگون COD موجود در فاضلاب به تصویر کشیده شده است.

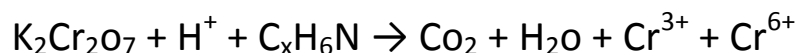
<sup>15</sup> nitrogenous biochemical oxygen demand



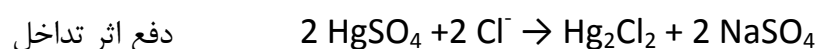
محدوده معمول COD برای برخی نمونه های فاضلاب به قرار زیر است:

| نمونه                        | رنج معمول |
|------------------------------|-----------|
| ورودی تصفیه خانه فاضلاب شهری | ۲۰۰-۴۰۰   |
| خروجی تصفیه خانه فاضلاب شهری | ۱۰-۸۰     |
| فاضلاب های صنعتی             | ۲۰۰-۴۰۰۰  |

ترکیبات معدنی معمولاً BOD داشته ولی COD ندارند؛ مثل آمونیاک. نسبت BOD به COD تعیین کننده میزان زیست تخریب پذیری (...قابل تجزیه بودن یا نبودن نمونه فاضلاب) بوده از این رو حفظ نسبت BOD به COD (یک به پنج) مهم می باشد. از آنجا که COD میزان اکسیژن مورد نیاز شیمیایی است از یک اکسید کننده قوی مانند دی کرومات پتاسیم استفاده می شود. در محیط اسیدی، مواد آلی موجود در پساب با افزودن اسید سولفوریک و سولفات نقره شکسته می شوند؛ این مرحله را هضم اسیدی می گویند. یون نقره در واقع کاتالیزور واکنش هضم جهت کمک به اکسیداسیون ترکیبات دیر اکسید شونده می باشد.



حضور یون کلرور ( $\text{Cl}^-$ ) موجب ایجاد مزاحمت برای عمل یون نقره می گردد. زیرا  $\text{Ag}^+$  با  $\text{Cl}^-$  ترکیب شده و رسوب  $\text{AgCl}$  را بوجود می آورد. برای جلوگیری از این مزاحمت، یون جیوه به محیط واکنش اضافه می شود:



واکنش هضم در حضور حرارت در دمای ۱۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت انجام می شود. ماده اکسید کننده (دی کرومات پتاسیم) دارای  $\text{Cr}^{6+}$  است که طی اکسیداسیون مواد آلی به  $\text{Cr}^{3+}$  احیا می شود. در صورتی که میزان  $\text{Cr}^{6+}$  اضافه شده از میزان مواد آلی قابل اکسید شدن بیشتر باشد، بخشی از  $\text{Cr}^{6+}$  به شکل اضافه (احیا نشده) باقی می ماند. با اندازه گیری میزان  $\text{Cr}^{6+}$  باقی مانده (از طریق تیتراسیون) و کم کردن آن از میزان  $\text{Cr}^{6+}$  اولیه به میزان  $\text{Cr}^{6+}$  مصرف شده پی می بریم که معادل مواد آلی اکسید شده می باشد.

### تقطیر برگشتی:

حرارت دادن به شکل تقطیر بخصوصی تحت عنوان تقطیر برگشتی انجام می شود. طی انجام تقطیر برگشتی با استفاده از مبرد از خروج مواد آلی فرار ممانعت به عمل می آید. عمل تقطیر برگشتی به دو صورت باز یا بسته می تواند انجام شود. تقطیر برگشتی را رفلکس می گویند. در صورتی که COD موجود در نمونه فاضلاب کم باشد (کمتر از ۵۰ میلی گرم بر لیتر باشد) معمولاً عمل تقطیر با استفاده از حجم زیادتری از محلول هضم انجام می شود. علت آن این است که در COD های کم حجم نمونه انتخابی باید زیاد باشد.

COD به دو روش اندازه گیری می شود:

۱- تیتراسیون (Open و Closed)



۲- رنگ سنجی (محلول استاندارد KHP 500 ppm را می سازیم و از آن با غلظت های (۵۰۰-۴۵۰-۴۰۰ و...-۵۰) با اختلاف ۵۰ ppm می سازیم.

دستگاه را با رنگ نارنجی کالیبره کرده تا رنگ نارنجی را جذب نکند سپس محلولهای ساخته شده را رنگ سنجی می کنیم و نتایج را به صورت نمودار ترسیم و با وارد کردن مقدار جذب نمونه مجهول به غلظت آن می توان پی برد.

### وسایل مورد نیاز:

- ۱- راکتور COD یا آون با دمای ۱۵۰ درجه
- ۲- پیپت های مناسب
- ۳- لوله آزمایش
- ۴- اسپکتروفتومتر با طول موج ۶۰۰ نانومتر

### مواد شیمیایی مورد نیاز:

- ۱- اسید COD: اسید سولفوریک + سولفات نقره
- ۲- محلول هاضم: سولفات جیوه + آب مقطر + سولفوریک اسید + دی کرومات پتاسیم

### روش کار:

#### روش Closed-reflux با رنگ سنجی نوری

در ویال مخصوص انجام این آزمایش حداقل ۵-۳ میلی لیتر از نمونه رقیق سازی شده را وارد نموده و در صورتی که هدف اندازه گیری SCOD پساب باشد، جامدات آن را به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰ دور بر دقیقه جداسازی می نماییم. حال در لوله آزمایش ۲/۵ سی سی از نمونه (یا نمونه سانتریفیوژ شده) را ریخته و به آن ۱/۵ سی سی محلول هاضم و ۳/۵ سی سی اسید مخصوص اضافه می کنیم. از آب مقطر به عنوان نمونه شاهد استفاده می شود، لذا مراحل افزودن مقادیر بالا برای آن نیز تکرار می شود. سپس لوله ها به وسیله دستگاه ورتکس به خوبی مخلوط شده و با فویل آلومینیومی درب





آن پوشانده می شود. سرانجام در دستگاه راکتور COD یا آون قرار داده و دستگاه را به مدت ۱۲۰ دقیقه در دمای ۱۵۰ درجه سانتیگراد قرار می دهیم. با پایان یافتن زمان واکنش و خنک شدن تدریجی لوله ها، دستگاه اسپکتروفتومتر را به روی ۶۰۰ نانومتر تنظیم نموده و اعداد جذب قرائت می شود. قاعدتا اعداد جذب را در نمودار کالیبراسیون از پیش تهیه شده قرار داده و مقدار COD پساب (با احتساب ضریب رقیق سازی آن در ابتدا) بدست می آید.

در گزارش کار خود عدد جذب، مقدار COD نهایی و خطاهای این آزمایش را ذکر نمایید.



## جلسه دهم؛

## آزمایش اندازه گیری انواع جامدات پساب:

جامدات فاضلاب شامل کلیه مواد جامد که به صورت معلق یا محلول در فاضلاب هستند می باشد. جامدات از جهات مختلف حائز اهمیت می باشند برای مشخص شدن چگونگی ته نشینی در حوضچه های فاضلاب و مشخص کردن مقدار مواد معلق خروجی تصفیه خانه ها کاربرد دارد.

TS<sup>۱۶</sup> چیست؟

به مجموع مقدار کلیه جامدات معلق (TSS) و محلول (TDS) پساب "جامد کل" گویند و با TS نشان می دهند. در واقع مقادیر باقی مانده از نمونه پساب به روی پلیت که در دمای مشخص (۱۰۳ تا ۱۰۵ درجه سانتی گراد) و زمان معین ۲ ساعت خشک شده و حرارت دیده است، مقدار جامد کل را تعیین می کند.

## اندازه گیری TS:

مواد و ابزار مورد نیاز:

پلیت یا ظرف شیشه ای مسطح

پیپت

آون

دسیکاتور

نمونه فاضلاب

جهت کاهش هرگونه خطا در اندازه گیری، ظرف شیشه ای یا پلیت را ابتدا به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰- ۱۰۵ خشک کرده و بعد از سرد نمودن در دسیکاتور، توزین می کنیم ( $W_1$ ) حال، حجم مشخصی از نمونه

<sup>16</sup> Total Solids



فاضلاب را درون آن ریخته و سپس با استفاده از حرارت آن در دمای ۱۰۳ الی ۱۰۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲۰ دقیقه آن را خشک می کنیم. فرآیند خشک کردن در دسیکاتور و توزین مجدد ( $W_2$ ) مراحل بعدی آزمایش است. با قرار دادن اعداد در رابطه مربوطه مقدار TS بدست می آید:

$$TS = W_2 - W_1 * 10^6 / V$$

$V$  = حجم نمونه اولیه

### TSS چیست؟

از جمله پارامترهای مهم معرفی خصوصیات فیزیکی پساب بوده که در کنار BOD پنج روزه گزارش می شود. جامداتی که به صورت کلوئیدی و معلق در فاضلاب وجود داشته و می توان آن ها را به وسیله فیلتراسیون جداسازی نمود در این دسته قرار می گیرند.

### اندازه گیری TSS

از روش فیلتراسیون برای اندازه گیری استفاده می گردد.

مواد و ابزار مورد نیاز:

نمونه فاضلاب

فیلتر Ashless ( فیلتر بدون خاکستر)

قیف بوختر

ارلن و پمپ خلاء

پیپت

آب مقطر



در روش فیلتراسیون، ابتدا کاغذ فیلتر را به مدت ۲ ساعت در دمای ۱۰۳-۱۰۵ درجه خشک کرده و بعد از خنک نمودن در دسیکاتور بلافاصله توزین می‌کنیم ( $W_1$ ). سپس فیلتر را در داخل قیف بوخنر به خوبی قرار داده تا تمامی منافذ قیف پوشانده شود، برای راحتی کار از آب مقطر استفاده می‌کنیم. حال با سرهم کردن اتصالات پمپ خلاء، ارن خلاء، قیف و کاغذ صافی، پمپ را روشن نموده و حجم مشخصی از نمونه فاضلاب را بدین وسیله فیلتر می‌کنیم. کمی فیلتراسیون را ادامه می‌دهیم تا تمامی نمونه از سطح کاغذ عبور کند.

در مرحله بعد، فیلتر را در آون با دمای ۱۰۳ تا ۱۰۵ درجه سانتی گراد به مدت (حداکثر) دو ساعت قرار می‌دهیم تا کاملاً خشک شود. سپس آن را در داخل دسیکاتور سرد و توزین ( $W_2$ ) می‌کنیم. مقدار آن از رابطه زیر بدست می‌آید:

$$Tss = W_2 - W_1 * 10^6 / V$$

$V$  = حجم نمونه اولیه

### VSS<sup>۱۷</sup> چیست؟

جامدات در پساب‌ها مشتمل بر دو نوع آلی و غیرآلی هستند. Volatile Suspended Solids یا همان جامدات معلق فرار را بخش خاصی از جامدات معلق آلی موجود در پساب فرض می‌کنند که در دمای بسیار بالا ساختار آن تخریب شده و از فاز جامد جدا می‌شوند. اگرچه ترکیبات آلی‌ای نیز وجود دارند که ساختارشان در دمای بالا دچار تخریب نشده، اما از طرف دیگر ترکیبات غیرآلی هم وجود دارند که ساختار شیمیایی‌شان شکسته و از فاز جامد، جدا می‌شوند.

### اندازه‌گیری VSS

مواد و ابزار موردنیاز:

بوته چینی

<sup>17</sup> Volatile Suspended Solids

کوره با دمای ۵۵۰ درجه سانتی گراد

روش کار مشابه تا قسمتی مشابه اندازه گیری TSS بوده با این تفاوت که بعد از اتمام اندازه گیری TSS، کاغذ فیلتر را توزین نموده و به همراه بوتله چینی (که از قبل آن را هم باید خشک، سرد و توزین نمود ( $W_1$ )) در دمای ۵۵۰ درجه به مدت ۱۵ دقیقه می سوزانیم. تا خنک شدن کوره تا دمای زیر ۱۰۰ درجه باید صبر نمود، چرا که باز نمودن درب آن در دمای بالا منجر به ورود هوا و اکسید شدن محفظه درونی آن گردیده و حتی ممکن است منجر به بروز آتش سوزی شود. سپس بوتله را خنک و توزین می کنیم ( $W_2$ ). با جایگذاری اعداد به دست آمده در رابطه زیر مقدار مواد تثبیت شده یا FSS (Fixed suspended solids) بدست می آید. از کسر این مقدار از TSS، مقدار جامدات معلق فرار بدست خواهد آمد.

$$FSS = W_2 - W_1 * 10^6 / V$$

$$TSS = VSS + FSS$$

برخی منابع:

- Metcalf and Eddy. *Wastewater Engineering Treatment and Reuse*, 4th Edition, 2007
- Najafpour, Ghasem. *Biochemical engineering and biotechnology 2nd edition*. Elsevier, 2015
- American Public Health Association (APHA). *Standard Methods of Water and Wastewater*. 18th edition, 1992

«موفق و پیروز باشید»

اسفند ۱۳۹۴

