شمارش باکتری‌ها و روش‌های تهیه و شناسایی رقت‌های میکروبی

ابراهیم قرنجیک
دبیر زیست‌شناسی و علوم تجربی (متوسطه اول و دوم)
شهرستان گمیشان - استان گلستان

کلیدواژه‌ها: رقت، کلنی، پلیت استاندارد، اشریشیاکلی، نوترینت آگار، گرم‌خانه.

مقدمه

در جنبه‌های مختلف باکتری‌شناسی، پس از شناسایی باکتری‌ها در بسیاری مواقع شمارش باکتری‌ها و تعیین تعداد آن‌ها در واحد حجم ضروری است. این شمارش به خصوص در مورد باکتری‌های بیماری‌زا اهمیت بسزایی دارد. با شمارش در محدوده‌های زمانی مشخص می‌توان سرعت تکثیر باکتری و گسترش عفونت و بیماری در بدن یک فرد بیمار و یا در قلمرو گسترده‌تر در یک جامعه پی برد.

در بحث شمارش و تعیین تعداد باکتری تاکنون روش‌های مختلفی در بین متخصصان میکروبیولوژی به‌کار رفته است. در بعضی موارد با کمک اندازه‌گیری مقدار گاز تولید شده در مورد باکتری‌های تولیدکننده گاز در شرایط آزمایشگاهی در لولهٔ آزمایش تعداد باکتری‌ها را می‌توان به‌صورت نسبی به دست آورد.

در مواردی با اندازه‌گیری میزان کدورت ایجاد شده در محیط کشت تعداد باکتری‌ها را می‌شود مشخص کرد. البته، در روش کدورت‌سنجی اندازهٔ همهٔ باکتری‌ها، اعم از زنده و غیرزنده مشخص خواهند شد.

شمارش با پلیت‌های استاندارد (روش کمی) یکی دیگر از روش‌های شمارش باکتری‌های موجود در شیر، آب و مواد غذایی است. از این روش در مراکز آزمایشگاهی بیشتر استفاده می‌شود و درصد اطمینان آن نیز بالاتر است.

در انجام این روش‌ها، تهیهٔ رقت از باکتری‌های مورد مطالعه در طی مراحل مختلف بسیار مهم است. استفاده از رقت‌سنجی برای شمار باکتری‌ها در مراکز آزمایشگاهی واحدهای نگهداری و تهیهٔ شیر و مواد غذایی و همچنین در تصفیهٔ آب کاربرد فراوانی دارد.

با توجه به اینکه سرعت رشد باکتری‌ها در شیر و مواد غذایی خاص زیاد است، لذا کیفیت شیر و یا مواد غذایی به مرور زمان دستخوش تغییرات زیادی می‌شود. بر همین اساس شناسایی نوع میکروب و تعداد آن در واحد حجم اهمیت فراوان دارد.

اجرای آزمایش و روش کار

در این آزمایش از باکتری اشریشیاکلی برای تهیهٔ رقت و شمارش استفاده می‌شود.

مواد لازم: محیط کشت باکتری ـ نوترینت آگار ـ ارلن یا بشر ـ پلیت‌های آزمایشگاهی (۴ عدد یا بیشتر و مضربی از ۴) ـ لوله‌های آزمایش ـ ظروف یا بطری‌های شیشه‌ای ـ پیپت ـ بن‌ماری یا گرم‌خانه.

در اجرای این روش حداقل از سه شیشه و در

صورت امکان از شیشـــه‌های بیشتر اســـتفاده کنید، نتایج حاصل از این روش از اطمینان بیشتری برخوردار است.

الف) در ابتدا ۸۰ سی سی از محلول نوترینت آگار را به مدت ۸ دقیقه می‌جوشانیم تا کاملاً ذوب شود و سپس آن را در بن‌مـــاری به مدت ده دقیقه قـــرار می‌دهیم و آن را تا دمای ۵۰ درجه سرد می‌کنیم و برای مراحل بعدی کنار می‌گذاریم.

یادآوری: می‌توانیم دانش‌آموزان را به دو یا سه گروه و یا بیشتر تقسیم کنیم و برای هر گروه یک دســـته ۴ تایی از پلیت‌های حاوی محیط کشـــت همانند قبل در نظر بگیریم. با این کار و تکرار آزمایش توســـط گروه‌های دیگر نتیجهٔ آزمایش در کل اطمینان بیشـــتری خواهد داشت.

ب) در مرحلهٔ بعد، برای هر گروه ســـه شیشه یا لولهٔ آزمایش را علامت‌گـــذاری می‌کنیم و آن‌ها را به نام‌هـــای B-C-A می‌نامیـــم و در هر کدام ۹۹ میلی‌لیتر آب مقطر می‌ریزیم.

۱. یک سی‌ســـی از محلول حـــاوی باکتری (در این‌جا اشریشیا کلی) را در شیشهٔ A می‌ریزیم تا به غلظت $\frac{۱}{۱۰۰}$ برسد.

۲. از ظرف A یـــک میلی‌لیتر محلول باکتریایی برداشته و در شیشهٔ دوم (B) که حاوی ۹۹ میلی‌لیتر آب است، می‌ریزیم تا به رقت $\frac{۱}{۱۰۰۰۰}$ برسد.

۳. دوبـــاره یک سی‌ســـی از لولـــهٔ آزمایش B را برمی‌داریم و در شیشـــهٔ سوم (C) که محتوی ۹۹ سی‌ســـی آب مقطر اســـت می‌ریزیم تا رقت را به $\frac{۱}{۱۰۰۰۰۰۰}$ (یک میلیونیوم) برسانیم.

هر سه شیشه را به آرامی به مدت ۷ ثانیه و حدود ۲۵ بار تکان می‌دهیم.

ج) در مرحلـــهٔ بعـــد، برای هر یـــک از گروه‌های دانش‌آموزی یک دسته ۴ تایی از پلیت‌ها را در نظر می‌گیریم و بعد از شماره‌گذاری از ۱ تا ۴ به ترتیب زیر عمل می‌کنیم:

هر گـــروه دانش‌آمـــوزی از شیشـــهٔ B به کمک پیپت یک بار ۱ میلی‌لیتر و بار دیگر ۰/۱ میلی‌لیتر را برمـــی‌دارد و به ترتیـــب در پلیت‌های اول و دوم می‌ریزد.

ســـپس از شیشـــهٔ C به کمک پیپت یک‌بار یک سی‌ســـی و بار دیگر ۰/۱ سی‌سی را برمی‌دارد و در پلیت‌های سوم و چهارم می‌ریزد.

نتیجهٔ این مرحله: بدین ترتیب پلیت‌های باکتریایی به ترتیب شماره از یک تا چهار به ترتیب:

۱. $\frac{۱}{۱۰۰۰۰}$ ۲. $\frac{۱}{۱۰۰۰۰۰}$

۳. $\frac{۱}{۱۰۰۰۰۰۰}$ ۴. $\frac{۱}{۱۰۰۰۰۰۰۰}$

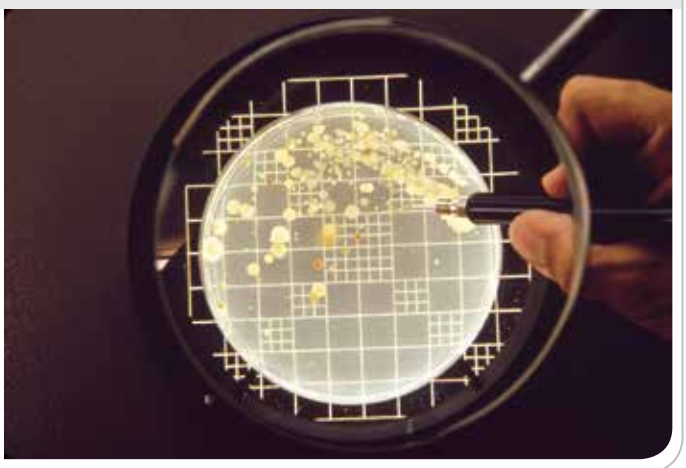
رقت را خواهند داشت.

د) به پلیت‌های حاوی باکتری با رقت‌های متفاوت در مرحلهٔ بعد هر کدام یک چهارم از محلول ذوب شده محیط کشت (۲۰ سی‌سی) که در مرحله اول تهیه شده بود را اضافه می‌کنیم و سپس آن‌ها را به مدت ۴۸ - ۷۲ ساعت به‌صورت وارونه در گرم‌خانه (آون) در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم تا باکتری‌ها رشد و تکثیر یافته و کلنی‌های مختلف ایجاد شوند.

تذکر ۱: برای رقت‌های بیشتر می‌توانیم از شیشه‌های بیشـــتری استفاده کنیم (هرچه شیشه‌ها بیشـــتر رقت‌ها هم بیشتر خواهد بود یعنی محلول میکروبی رقیق‌تر که تعداد میکروب‌های آن در شمارش میکروبی کمتر خواهند بود و این کار شمارش را دقیق‌تر و آسان‌تر خواهد کرد)

تذکر ۲: اگر در آزمایشگاه فقط یک دستگاه گرم‌خانه موجود باشـــد بهتر است هر گروه پلیت‌های خود را نامگذاری کنند.

برای شـــمارش کلنی‌ها روی پلیت‌ها، می‌توانیم از شـــمارش‌گر مکانیکی استفاده کنیم و یا از کاغذ



صافی با منافـذ معین مخصوص با خطوط ریز عمودی و افقی اســتفاده کنیم. پلیت‌ها را روی دستگاه شمارش گر قرار می‌دهیم و تعداد کلنی‌ها را با کمک ذره‌بین می‌شماریم.

در شــمارش با کمک کاغذ صافــی ابتدا هر کدام از رقت‌های باکتریایی مورد نظر را با اضافه کردن آب به یک لیتر می‌رســانیم و سپس هر یــک را از کاغذ صافی عبــور می‌دهیم. به این ترتیب باکتری‌ها در منافذ کاغذ باقی می‌مانند. در مرحلهٔ بعد کاغذهای صافی مورد نظر را روی پلیت‌های حاوی محیط کشت (نوترینت آگار) قرار می‌دهیم و سپس مجموعه را به مدت ۴۸ ســاعت در دمای ۳۵ درجــه در گرم خانه قرار می‌دهیم تا باکتری‌های روی کاغذ صافی روی محیط کشت رشد کنند و کلنی‌های میکروبی ایجاد کنند.

یادآوری: بهتر است قطر کاغذهای صافی به اندازهٔ قطر دهانهٔ پلیت‌ها باشند و همهٔ سطح پلیت را بپوشانند.

پس از ۲ تا ۳ روز هر گروه پلیت‌های خودشان را از گرم‌خانه بیرون بیاورند و تعداد کلنی‌های ایجاد شده در تک‌تک پلیت‌ها را بشمارند و پلیت‌هایی را که تعداد کلنی‌های بیشــتر و بزرگ‌تر دارند، انتخاب کنند (پلیت‌هایی را انتخاب کنید که بین ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی داشته باشند).

در ایــن مرحله برای تعیین مقایســه‌ای تعداد باکتری‌ها در محیط کشت ابتدا راهنمایی‌های لازم را به دانش‌آموزان می‌دهیم.

یادآوری:

در تعیین و محاسبهٔ تعداد باکتری‌های یک محلول یا محیط باید مقدار عددی رقت یا مقدار حجم محلول را در هنگام محاسبه با توان‌های مثبت بنویسید و عملیات ضرب را انجام دهید.

یک مثال:

روی پلیت آزمایشــگاهی در حدود ۲۵۲ کلنی باکتریایی دیده می‌شود. رقت استفاده شده یک صدهزارم ($\frac{۱}{۱۰۰۰۰۰}$) است. تعداد تقریبی باکتری در یک سی‌سی از محلول داده شده حدود چقدر خواهد بود؟

$۲۵۲ \times ۱۰^{۵} \times ۱ = ۲۵۲۰۰۰۰۰$

مثال دیگر:

در پلیتی با محتــوی ۰/۱ میلی‌لیتر و در رقت $\frac{۱}{۱۰۰۰۰۰۰}$ با تعداد ۱۳۴ کلنــی تعداد باکتری در یک سی‌سی از محلول اولیه چقدر خواهد بود (توان‌ها در مقدار رقت و مقدار محلول داده شده را به عدد مثبت می‌نویسیم).

$\times ۱۰^{۶} \times ۱۳۴ = ۱۰^{۷} \times ۱۳۴ = ۱۳۴۰۰۰۰۰۰۰$

$۱۰^{۱}$

منابع

۱. ملک‌زاده، فریدون و دیگران ـ میکروبیولوژی عمومی، مرکز نشــر دانشگاهی، تهران، ۱۳۶۹.
۲. آل هاشم، سعید ـ میکروبیولوژی جاوتز ـ انتشارات آسیا، ۱۳۷۲.
۳. کاظمی، اختر الملوک، اصول میکروب‌شناســی، انتشارات دانش، ۱۳۶۹.
۴. مؤسسه اســتاندارد و تحقیقات ایران ۱۳۸۱، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام، شمارش استافیلو کوکوس اورئوس کواگولار و سایر گونه‌ها، چاپ اول، شمارهٔ ۶۸۰۶.
5. Burt, S., Reinders, R., 2003. Antibacterial activity of consequences of salmonella and campylobacter jejuni in raw poultry. J. Food