شمارش باکتری ها و روش های تهیه و شناسایی رقت های میکروبی

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 لولک 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 اندازک همک 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، تهیک رقت از باکتری‌های مورد مطالعه در طی مراحل مختلف بسیار مهم است. استفاده از رقت‌سنجی برای شمار باکتری‌ها در مراکز آزمایشگاهی واحدهای نگهداری و تهیک شیر و مواد غذایی و همچنین در تصفیک 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 تهیه رقت و شمارش استفاده می‌شود.

مواد لازم: محیط کشت باکتری ـ نوترینت آگارـ ارلن یا بشرـ پلیت‌های آزمایشگاهی (4 عدد یا بیشتر و مضربی از 4)ـ لوله‌های آزمایشـ ظروف یا بطری‌های شیشه‌ای ـ پیپت ـ بن‌ماری یا گرم‌خانه.

در اجرای این روش حداقل از سه شیشه و در صورت امکان از شیشه‌های بیشتر استفاده کنید، نتایج حاصل از این روش از اطمینان بیشتری برخوردار است.

الف) در ابتدا 80 سی سی از محلول نوترینت آگار را به مدت 8 دقیقه می‌جوشانیم تا کاملاً ذوب شود و سپس آن را در بن‌ماری به مدت ده دقیقه قرار می‌دهیم و آن را تا دمای 50 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 دسته 4 تایی از پلیت‌های حاوی محیط کشت همانند قبل در نظر بگیریم. با این کار و تکرار آزمایش توسط گروه‌های دیگر نتیجک آزمایش در کل اطمینان بیشتری خواهد داشت.

ب) در مرحلک بعد، برای هر گروه سه شیشه یا لولک آزمایش را علامت‌گذاری می‌کنیم و آن‌ها را به نام‌های B-C-A می‌نامیم و در هر کدام 99 میلی‌لیتر آب مقطر می‌ریزیم.

1 .یک سی‌سی از محلول حاوی باکتری (در این‌جا اشریشیا کلی) را در شیشک A می‌ریزیم تا به غلظت برسد.

2 .از ظرف A یک میلی‌لیتر محلول باکتریایی برداشته و در شیشک دوم (B)که حاوی 99 میلی‌لیتر آب است، می‌ریزیم تا به رقت برسد.

3 .دوباره یک سی‌سی از لولک آزمایش B را برمی‌داریم و در شیشک سوم (C)که محتوی 99 سی‌سی آب مقطر است می‌ریزیم تا رقت را به (یک میلیونیوم) برسانیم.

هر سه شیشه را به آرامی به مدت 7 ثانیه و حدود 25 بار تکان می‌دهیم.

ج) در مرحلک بعد، برای هر یک از گروه‌های دانش‌آموزی یک دسته 4 تایی از پلیت‌ها را در نظر می‌گیریم و بعد از شماره‌گذاری از 1 تا 4 به ترتیب زیر عمل می‌کنیم:

هر گروه دانش‌آموزی از شیشک B به کمک پیپت یک بار 1 میلی‌لیتر و بار دیگر 0/1 میلی‌لیتر را برمی‌دارد و به ترتیب در پلیت‌های اول و دوم می‌ریزد.

سپس از شیشک C به کمک پیپت یک‌بار یک سی‌سی و بار دیگر 0/1 سی‌سی را برمی‌دارد و در پلیت‌های سوم و چهارم می‌ریزد.

نتیجه این مرحله: بدین‌ترتیب پلیت‌های باکتریایی به ترتیب شماره از یک تا چهار به ترتیب:

د) به پلیت‌های حاوی باکتری با رقت‌های متفاوت در مرحلک بعد هر کدام یک چهارم از محلول ذوب شده محیط کشت (20 سی‌سی) که در مرحله اول تهیه شده بود را اضافه می‌کنیم و سپس آن‌ها را به مدت 48 - 72 ساعت به‌صورت وارونه در گرم‌خانه (آون) در دمای 35 درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم تا باکتری‌ها رشد و تکثیر یافته و کلنی‌های مختلف ایجاد شوند.

تذکر 1: برای رقت‌های بیشتر می‌توانیم از شیشه‌های بیشتری استفاده کنیم (هرچه شیشه‌ها بیشتر 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 2: اگر در آزمایشگاه فقط یک دستگاه گرم‌خانه موجود باشد بهتر است هر گروه پلیت‌های خود را نامگذاری کنند.

برای شمارش کلنی‌ها روی پلیت‌ها، می‌توانیم از شمارش‌گر مکانیکی استفاده کنیم و یا از کاغذ صافی با منافذ معین مخصوص با خطوط ریز عمودی و افقی استفاده کنیم. پلیت‌ها را روی دستگاه شمارش‌گر قرار می‌دهیم و تعداد کلنی‌ها را با کمک ذره‌بین می‌شماریم.

در شمارش با کمک کاغذ صافی ابتدا هر کدام از رقت‌های باکتریایی مورد نظر را با اضافه کردن آب به یک لیتر می‌رسانیم و سپس هر یک را از کاغذ صافی عبور می‌دهیم. به این ترتیب باکتری‌ها در منافذ کاغذ باقی می‌مانند. در مرحلک بعد کاغذهای صافی مورد نظر را روی پلیت‌های حاوی محیط کشت (نوترینت آگار) قرار می‌دهیم و سپس مجموعه را به مدت 48 ساعت در دمای 35 درجه 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 اندازک قطر دهانک پلیت‌ها باشند و همک سطح پلیت را بپوشانند.

پس از 2 تا 3 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 بیشتر و بزرگ‌تر دارند، انتخاب کنند (پلیت‌هایی را انتخاب کنید که بین 30 تا 300 کلنی داشته باشند).

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

یادآوری:

در تعیین و محاسبک 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 آزمایشگاهی در حدود 252 کلنی باکتریایی دیده می‌شود. رقت استفاده شده یک صدهزارم () است. تعداد تقریبی باکتری در یک سی‌سی از محلول داده شده حدود چقدر خواهد بود؟

25200000= 1× 105× 252

مثال دیگر:

در پلیتی با محتوی 0/1 میلی‌لیتر و در رقت با تعداد 134 کلنی 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).

1340000000= 134× 107= 134× 106× 101

منابع

1 .ملک‌زاده، فریدون و دیگران ـ میکروبیولوژی عمومی، مرکز نشر دانشگاهی، تهران، 1369.

2 .آل هاشم، سعید ـ میکروبیولوژی جاوتز ـ انتشارات آسیا، 1372.

3 .کاظمی، اختر الملوک، اصول میکروب‌شناسی، انتشارات دانش، 1369.

4 .مؤسسه استاندارد و تحقیقات ایران 1381، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام، شمارش استافیلو کوکوس اورئوس کواگولار و سایر گونه‌ها، چاپ اول، شمارک 6806.

5Burt, S., Reinders, R., 2003. Antibacterial activity of consequences of salmonella and campylobacter jejuni in raw poultry. J. Food