

فصل پنجم

روش‌های کشت میکروارگانیسم‌ها

هدف‌های رفتاری: در پایان این فصل، فرآگیر باید بتواند:

- ۱- روش پورپلیت یا استاندارد را برای شمارش باکتری‌های فعال انجام دهد.
- ۲- سایر روش‌های شمارش باکتری‌های را انجام داده، آن‌ها را با یکدیگر مقایسه نماید.
- ۳- وسایل و تجهیزات آزمایشگاهی لازم برای شمارش میکروارگانیسم‌ها را شناسایی نماید.
- ۴- نمونه‌ای از مواد غذایی اطراف خود مانند آب آشامیدنی را مورد آزمون قرار دهید.
- ۵- روش‌های کشت بی‌هوازی باکتری‌ها را شرح دهد.

۵- روشهای کشت میکروارگانیسم‌ها

۱-۵- کشت میکروارگانیسم‌های هوازی

برای شمارش میکروارگانیسم‌ها چندین روش وجود دارد که بترتیب توضیح داده می‌شوند.

۱-۱-۵- روش کشت پورپلیت یا استاندارد پلیت‌کانت:

این روش به طور وسیعی در موارد مختلف کنترل بهداشتی و صنعتی و استاندارد کردن بکار می‌رود و به اعتقاد متخصصان، دقیق‌ترین روش برای تعیین تعداد باکتری‌های فعال قادر به رشد در محیط کشت بکار رفته می‌باشد (البته روش‌های اتوماتیک و جدیدی با استفاده از تکنیک‌های پیش‌رفته ارائه شده‌اند که ادعا می‌شود از دقت بسیار زیادی برخوردارند ولی هنوز این روش‌ها عمومیت نیافتدۀ‌اند). در روش پورپلیت با توجه به رقت‌های مختلف تهیه شده از نمونه‌ی غذایی برای هر رقت ۲

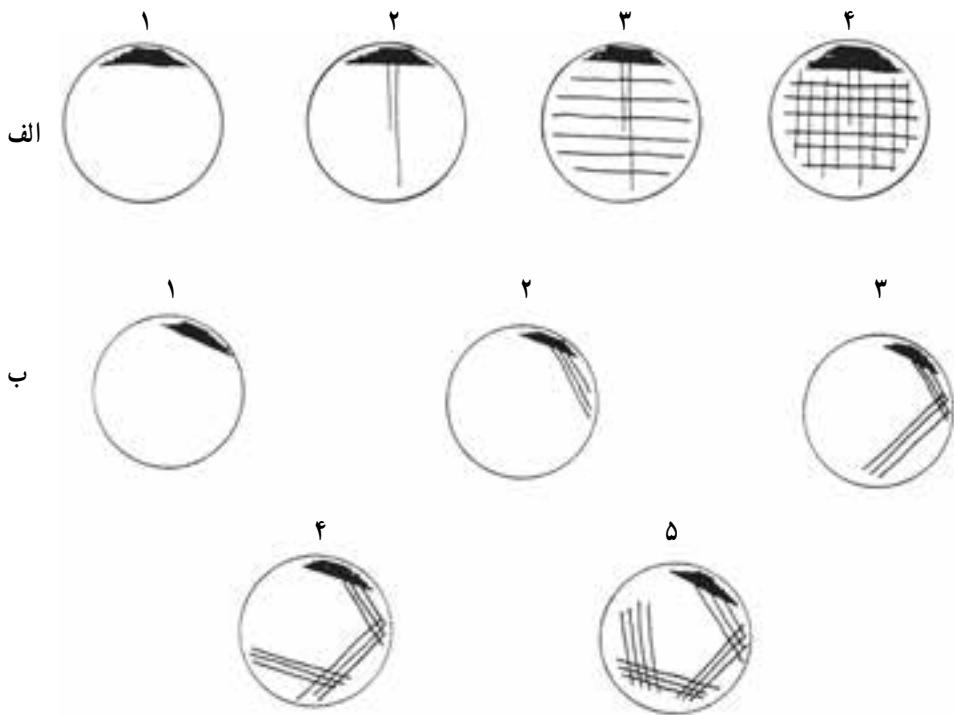
۱- Standard plate count (SPC)

تا ۴ ظرف پتری اختصاص داده می شود و یک ظرف نیز به عنوان کنترل برای اطمینان از سترون بودن پلیت ها و محیط کشت در نظر گرفته می شود. روی ظروف پتری را با شماره‌ی نمونه، رقت و تاریخ آزمایش مشخص کرده، در هر دو یا چهار ظرف پتری از رقت مربوط، یک میلی لیتر قرار می دهند (می توان با یک پیپت از رقیق ترین لوله شروع کرده، هر بار پس از ریختن نمونه داخل ظرف پتری، پیپت را در رقت دوم خوب شستشو داد و از آن برداشت کرد) به این ترتیب با استفاده از یک پیپت، کلیه‌ی رقت‌ها به پلیت منتقل می شوند. محیط کشت مناسب ذوب و در حمام ماری 45°C درجه سانتی گراد نگهداری می شود پس از ریختن رقت‌های مختلف ماده غذایی به داخل پلیت، به هر ظرف حدود ۱۵ میلی لیتر از محیط کشت مذاب که دمای آن بیشتر از 45°C نباشد اضافه می شود (در مورد باکتری‌های ترموفیل دمای محیط کشت می تواند بیشتر باشد) پس از آن بلا فاصله در ظرف را بسته، آن را ۵ بار از عقب به جلو، ۵ بار در جهت حرکت عقره‌های ساعت، ۵ بار از چپ به راست و بالا خر ۵ بار در جهت خلاف حرکت عقره‌های ساعت به آرامی حرکت می دهند تا نمونه و محیط کشت بخوبی مخلوط شوند. کمی صبر کنید تا محیط بینند. بعد، از محیط مایع که همچنان در حمام ماری نگهداری شده مقدار کمی روی هر پلیت می ریزند به طوری که لایه نازکی از محیط سطح پلیت را پیوشنند. در نتیجه‌ی این عمل از آلوده شدن سطحی جلوگیری می شود و همچنین تا اندازه‌ای شرایط بی‌هوایی برای نشان دادن حالات تخمیری برخی از باکتری‌ها ایجاد می گردد. پس از بسته شدن لایه دوم، پلیت را به طور واژگون در گرمخانه با توجه به درجه دما مناسب رشد باکتری مربوط قرار می دهند (باکتری‌های سرماگرا در 5°C - 0°C و باکتری‌های مزوفیل 37°C - 25°C و باکتری‌های گرمادوست در 55°C) دمای انتخابی با توجه به هدفی که از شمارش باکتری مورد نظر است انتخاب می شود. در مورد غذایی که در حالت انجام نگهداری می شوند دمای (5°C - 0°C) و 35°C هر دو را انتخاب می کنند تا ضمن شمارش باکتری‌های سرمادوست، میکروب‌های بیماری زا نیز مشخص گردند. ولی چنانچه هدف شمارش آلوده کننده‌های گرمادوست باشد که در کارخانه‌ها از راه پمپ‌ها و دستگاه‌ها وارد مواد غذایی می شوند باید دمای 55°C را انتخاب کرد. به هر حال انتخاب دما به دلیل اهمیتی که دارد باید در نتیجه آزمایش قید گردد. کشت‌ها را مدت 24 ساعت در گرمخانه نگهداری می کنند و پس از این مدت به کمک دستگاه پرگنه شمار، پرگنه‌های ظاهر شده در پلیت را که بین 30°C - 0°C پرگه دارند می شمارند. 24 ساعت دیگر ظروف را در گرمخانه قرار داده، پس از این مدت یک بار دیگر نیز تعداد پرگنه‌ها را می شمارند. میانگین تعداد پرگنه‌های شمارش شده در دو یا چهار پلیت با در نظر گرفتن رقت آن تعداد میکرووارگانیسم‌های موجود در ماده‌ی غذایی را تعیین می کند. در ظرفی که به عنوان

کنترل سترون بودن در نظر گرفته شده نباید هیچ پرگنه ظاهر گردد. مدت گرمخانه‌گذاری در مورد باکتری‌های گرمادوست^۱ و میان‌دامادوست^۲ ۴۸ تا ۲۴ ساعت و در مورد سرمادوست‌ها^۳ بیشتر می‌باشد ولی برای قارچها و مخمرها ممکن است یک هفتة یا بیشتر ادامه یابد.

۱-۵-۱ - روش کشت سطحی: در این روش باید ظروف پتربالی حاوی محیط کشت تهیه شده باشند و سطح محیط با قراردادن آن‌ها در گرمخانه 55°C به مدت نیم تا دو ساعت خشک شود. در این مدت باید در پلیت باز و سطح محیط رو به پایین باشد و یا می‌توان محیط‌های کشت را با در بسته به مدت ۴ ساعت در گرمخانه 37°C قرار داد تا خشک شوند. سپس با توجه به رقت‌های تهیه شده، برای هر رقت ۲ تا ۴ پلیت انتخاب نمود و یک ظرف به عنوان کنترل منفی در نظر گرفت. روی هر ظرف پتربالی را با شماره نمونه رقت و تاریخ کشت مشخص می‌کنند و پس از تهیه رقت‌ها، از رقیق‌ترین آن‌ها به کمک پیپت $1/10$ میلی‌لیتری برداشت کرده، در سطح محیط می‌ریزند و بعد همان پیپت را در رقت بعدی که 10 برابر بیشتر است سه بار شسته و $1/10$ از آن را برداشته، در پلیت مربوط می‌ریزند. به همین ترتیب ادامه داده می‌شود تا آخرین رقت، سپس برای هر رقت از یک پخش‌کننده‌ی شیشه‌ای سترون استفاده کرده، نمونه را بخوبی در سطح پلیت می‌گسترانند. (برای تهیه پخش‌کننده، یک میله شیشه‌ای را به کمک شعله تحت زاویه 90° درجه خم کرده، سترون می‌کنند). نحوه حرکت میله شیشه‌ای یا آنس پلاتین روی سطح محیط کشت باید به گونه‌ای باشد که از زخمی کردن سطح محیط کشت جلوگیری کند. انجام این کار با استفاده از میله شیشه‌ای سترون آسان‌تر می‌باشد. سپس پلیت را مانند روش قبل با توجه به انتخاب و زمان گرمخانه‌گذاری، مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ قرار داده، پس از ۲۴ ساعت ظروفی را که بین 30° - 40° پرگنه دارند می‌شمارند. دوباره ظروف را برای ۲۴ ساعت دیگر گرمخانه‌گذاری کرده، پس از آن پرگنه‌ها را شمارش می‌کنند و میانگین شمارش را بدست می‌آورند تعداد باکتری‌ها در یک گرم از ماده‌ی غذایی با توجه به میانگین پرگنه‌ها و رقت بکار رفته محاسبه می‌شود.

۱-۵-۲ - روش کشت قطره‌ای: در این روش از پیپت‌های پاستور کالیبره که حجم قطرات آن‌ها مشخص می‌باشد استفاده می‌شود (پیپت‌هایی که 25 ، 20 یا 40 قطره آن‌ها یک میلی‌لیتر است) ظروف پتربالی حاوی محیط کشت به همان ترتیب روش شمارش سطحی تهیه و سطح آن‌ها خشک می‌شود. سپس با ماژیک یا مداد روغنی ظروف پتربالی را در قسمتی که حاوی کشت می‌باشد به سه قسمت مساوی تقسیم می‌کنند. پس از قید شماره، هر یک از سه بخش را به یک رقت



شکل ۱-۵ - حرکت آنس روی سطح پلیت با دو روش

اختصاص می‌دهند. (رقت 1^{-1} ، 1^0 - 2 و 3^{-1} که نماینده‌ی رقت‌های $1/1$ و $1^0/0^0$ و $1^0/0^1$ می‌باشد) بدین ترتیب برای هر رقت دو تا چهار ظرف در نظر گرفته می‌شود. بعد به کمک یک پیپت پاستور کالیبره که سر آن به یک حباب لاستیکی مجهز است از رقیق‌ترین لوله مقداری برداشت کرده، در سطح پلیت در همان بخشی که با علامت رقت مربوط مشخص شده، دو قطره جدا از هم قرار می‌دهند. سپس بقیه را در لوله خودش خالی کرده، در لوله بعدی که حاوی نمونه 1^0 برابر غلیظتر است سه بار پیپت را شسته، از آن برداشت می‌کنند و به همان ترتیب قبل دو قطره در بخش مربوط محیط کشت قرار می‌دهند. و به همین ترتیب تا کم ترین رقت (1^0) عمل می‌شود. پلیت را در حالی که درشان بسته است به همان وضعیت در گرمانخانه قرار می‌دهند تا قطره‌های موجود در سطح محیط کشت خشک شوند. بعد آن‌ها را به طور واژگون (به منظور جلوگیری از تداخل قطرات در یکدیگر) مدت ۲۴ ساعت در گرمانخانه در حرارت مناسب با نوع آزمایش قرار می‌دهند. پس از این مدت پلیت را که حاوی حداکثر 20° پرگنه در هر قطره می‌باشد شمارش می‌کنند. پلیت‌ها دوباره به مدت ۲۴

ساعت گرمخانه‌گذاری و پس از آن شمارش نمایند. این روش از نظر صرفه‌جویی در محیط کشت مناسب است و برای شمارش استافیلوکوک و باکتری‌های بی‌هواری اختیاری مانند کلستریدیوم پرفرترانس که مشخصات پرگنه در سطح محیط کشت در شمارش اهمیت دارد بکار می‌رود. می‌توان از محیط‌های اختصاصی مانند محیط بردپارکر برای استافیلوکوک و یا محیط ژلوزخون دار که سطح آن با نئومایسین آغشته شده برای کلستریدیوم پرفرترانس استفاده نمود.

۴-۱-۵ - روش اتوماتیک: برخی کارخانجات محیط‌های کشت آماده را، در ظروف مخصوص تهیه کرده‌اند که با فرو بردن آن‌ها در رقت معینی از نمونه و سپس قرار دادن در گرمخانه می‌توان با شمارش پرگنه‌های ظاهر شده، تعداد باکتری‌ها و حتی بعضی از انواع آن‌ها را تشخیص داد. همچنین دستگاه‌های خودکاری ساخته شده که از نمونه‌ی ماده غذایی رقت‌های مختلف (یک یا چند رقت) تهیه می‌کند و به وسیله‌ی سوزن مخصوص رقت تهیه شده را در سطح پلیت با روند گفته شده می‌گستراند که پس از گرمخانه‌گذاری با استفاده از جداول خاص و یا حتی با استفاده از دستگاه‌های مجهز به چشم الکترونیکی تعداد باکتری‌ها در نمونه بدست می‌آید. از دستگاه‌های مشابه کولتر کانتر^۱ که در پژوهشکی برای شمارش گلبول‌های خون بکار می‌رود برای شمارش باکتری‌ها در مواد غذایی مانند شیر استفاده می‌شود.

۴-۱-۵ - کشت باکتری‌ها به کمک کاغذ صافی: کاغذهای صافی مخصوص میکروب‌شناسی در صنعت ساخته شده است که به دلیل داشتن منافذ بسیار ریز، میکروب‌ها را در خود نگه می‌دارند. از این کاغذ صافی‌ها برای سترون کردن مایعات و محلول‌های مختلف حساس به حرارت استفاده می‌شود. بعضی از کارخانه‌های^۲ سازنده وسایل آزمایشگاهی از این نوع کاغذهای باقی‌های مخصوص که در برابر حرارت مقاوم‌اند و قابل سترون شدن می‌باشند برای شمارش و جست‌وجوی باکتری‌ها در آب و فرآورده‌های دارویی ساخته‌اند و حتی بعضی از سازندگان پلیت مخصوص که فقط آن‌ها متناسب با کاغذهای صافی است و محیط‌های کشت آماده در آمپول‌های کوچک برای یکبار کشت و حتی گرمخانه‌های کوچک که با برق اتومبیل و یا با باتری کار می‌کنند برای عملیات صحراوی تهیه و عرضه کرده‌اند. از این صافی‌ها برای جستجو و شمارش میکروب‌ها در آب معدنی و دیگر آشامیدنی‌هایی که تعداد باکتری‌های آن‌ها کم است و لازم می‌باشد که حجم زیادی از نمونه برای شمارش و جستجوی باکتری بکار رود استفاده می‌شود؛ به این ترتیب که مقدار کافی نمونه

۱ - Coulter Counter

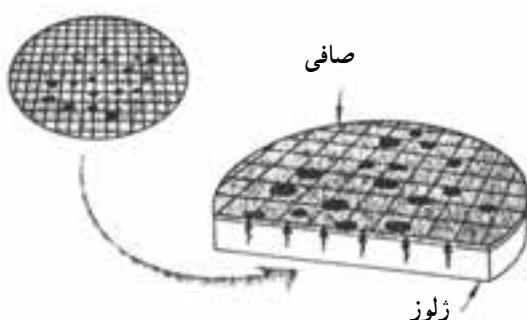
۲ - کارخانه میلی بور آمریکا و سوتز آلمان

از صافی عبور داده می‌شود تا کلیه باکتری‌های موجود در آن حجم در منافذ کاغذ به دام بیفتدند سپس کاغذ صافی روی محیط کشت جامد قرار داده می‌شود و در صورت لزوم ممکن است روی آن نیز با یک لایه‌ی نازک از محیط کشت مذاب که حرارت آن کمتر از 45°C است پوشانده شود. سپس این ظرف گرمانه‌گذاری شده پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تعداد پرگه‌های مورد نظر شمارش می‌شود. اگر منظور فقط جستجوی یک نوع میکروب، مانند سالمونلا، در یک آشامیدنی مانند آب باشد می‌توان حجم مناسبی از نمونه را از کاغذ صافی گذاری نمود و کاغذ صافی را در محیط کشت مایع قرار داد و پس از گرمانه‌گذاری از آن محیط برای جستجو و تشخیص میکروب مورد نظر استفاده نمود. از این روش در کارخانه‌های داروسازی برای کنترل سترونی محلول‌های دارویی مانند محلولهای تزریقی استفاده می‌شود. همچنین این روش، در بهداشت محیط و کنترل آب و فاضلاب و بررسی‌های همه‌گیری شناسی بسیار ارزشمند می‌باشد.



۲— گذاشتن صافی از روی دستگاه صاف کننده

۱— برداشتن صافی از روی دستگاه صاف کننده

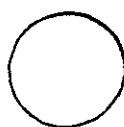


۳— انتشار مایع به طرف صافی

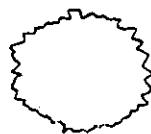
شکل ۲-۵— نمایش شمارش میکرو ارگانیسم‌ها به کمک صافی

۱. شکل

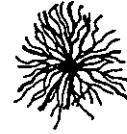
دایره‌ای



بی‌قاعده



ریزوئیدی



۲. سطح

صف



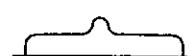
برآمده



مدور



سیخ‌دار برآمده

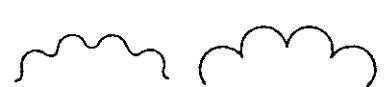


۳. لبه، کناره

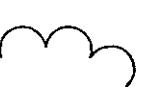
پیوسته



موجی



زائد دار



دندانه‌ای



ریزوئیدی



شکل ۳-۵ - شکل کلی‌ها روی محیط جامد

۲-۵ - روش‌های تأمین شرایط بی‌هوازی

۱- استفاده از گرمخانه بی‌هوازی که در آن دمای مناسب رشد و شرایط بی‌هوازی هم زمان تأمین می‌شود این گرمخانه‌ها اکسیژن داخل محفظه را با پمپ خلاً خارج کرده و به جای آن گاز کربنیک یا ازت وارد می‌کنند.

۲- جار بی‌هوازی دو نوع شیشه‌ای و پلاستیکی دارد که نوع پلاستیکی بهتر است زیرا سبک بوده و نرمی‌شکند.

برای ایجاد شرایط بی‌هوازی در این جار از بسته‌های تولید کننده گاز^۱ استفاده می‌شود که در بیشتر موارد تولید گاز هیدروژن می‌نماید که این گاز با اکسیژن داخل جار در حضور کاتالیزور پالادیوم ترکیب شده و تولید چند قطره آب می‌نماید.

برای تأیید شرایط بی‌هوازی درون جار از معرف استفاده می‌شود.

۳- استفاده از محیط‌های کشت احیاء کننده: در فرمول برخی از محیط‌های کشت مانند

تیوگلیکولات براث ترکیباتی احیاکننده مانند سیستئن و تیوگلیکولات وجود دارند که با اکسیژن محلول در آن واکنش داده و آن را از دسترنس میکروب‌ها خارج می‌کنند.

صرف بی‌هوایی شدن این نوع محیط‌های کشت متیلن‌بلو یا رزاژورین^۱ می‌باشد.

۴—استفاده از دسیکاتور و شمع : در مواردی که به روش‌های یاد شده دسترنسی نباشد می‌توان از یک دسیکاتور و شمع یا گازپک برای ایجاد شرایط بی‌هوایی استفاده نمود. برای این منظور لازم است پلیت‌ها و لوله‌های کشت شده را داخل جار قرار داده روی آن یک شمع روشن قرار داده درب دسیکاتور را می‌بندیم. شمع در حال سوختن به تدریج بخش زیادی از اکسیژن داخل محیط را مصرف می‌کند چنانچه لازم باشد شرایط بی‌هوایی مطلق ایجاد شود لازم است از گاز پک استفاده شود.



شکل ۴-۵—جار بی‌هوایی

۳-۵- روش کشت بی‌هوازی

- ۱- لوله‌های حاوی تیوگلیکولات جوشانده و سرد کرده را با میکروب بی‌هوازی تلقیح کنید.
- ۲- تمام کشت‌ها را در گرماخانه 37°C بگذارید. در وقت بعدی آزمایشگاه آن‌ها را ملاحظه کنید. از روش گلوکریزیک برای بررسی کلنی‌های تولید شده استفاده کرده، محل تشکیل آن‌ها را در لوله یادداشت کنید. آیا هیچ گونه نشانی از تولید گاز وجود دارد؟



شکل ۵-۵- رابطه بین تراکم اکسیژن و رشد میکروب‌ها در محیط جامد

فکر کنید و پاسخ دهید:

- ۱- چرا اکسیژن محلول در آبگوشت تیوگلیکولات‌دار باعث وقفه در رشد میکروب‌های بی‌هوازی می‌شود؟
- ۲- آیا دو نوع از کلستریدیوم‌های مختلف، در یک محیط یکسان، به یک شکل رشد می‌کنند؟
- ۳- چه ماده‌ای را اکسیدکننده قوی و چه ماده‌ای را احیاکننده قوی می‌نامند؟
- ۴- شرایط رشد باکتری‌های بی‌هوازی از نظر نیروی اکسیدوردوکسیون محیط چگونه است؟

۴-۵- روش شمارش مستقیم

از این روش بهدلیل سرعت زیاد می‌توان در موارد فوری مانند تحویل گرفتن شیر در کارخانه‌ها استفاده نمود. البته دقت این روش به مراتب از روش‌های قبلی کمتر است.

(الف) در روش شمارش مستقیم می‌توان از لام‌های مخصوص نوبار^۱ و یا لام‌توما^۲ که برای شمارش گلبول‌های خون بکار می‌رود استفاده نمود. بدین ترتیب که نمونه مورد آزمایش به نسبت‌های

معین با آب مقطر و یا سرم فیزیولوژی و یا هر رقیق کننده مناسب دیگر، رقیق می‌شود (برای واضح‌تر دیدن میکروارگانیسم‌ها به مایع رقیق کننده مواد رنگی نظیر متیلن بلو و یا ویوله ژانسین و یا رنگ دیگری افزوده می‌شود) بعد از رقت تهیه شده روی لام توماریخته، یک لامل روی آن قرار می‌دهند. چند دقیقه صبر کرده، سپس در زیر میکروسکوپ با عدسی بزرگ‌نمایی $40\times$ میکروارگانیسم‌ها را در حجم معینی ($1/10$ میلی‌متر مکعب یا بیشتر) شمارش می‌کنند و با توجه به رقت نمونه – تعداد میکروارگانیسم‌ها در هر گرم و یا سانتی‌مترمکعب – بدست می‌آید.

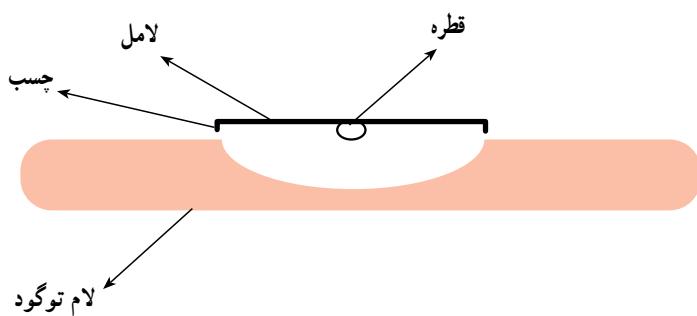
ب) سوسپانسیونی از مخمر که در زیر میکروسکوپ به وضوح قابل تشخیص‌اند و در محلول‌ها به خوبی به حالت تعليق در می‌آیند تهیه می‌شود و به روش فوق تعداد مخمرهای آن در میلی‌لیتر تعیین می‌گردد. سپس از این تعليق با حجم مساوی به رقت‌های تهیه شده از نمونه غذایی می‌افزایند بنابراین در محلول به دست آمده تعداد مخمر یا دیاتمه به $\frac{1}{\mu}$ تقلیل می‌یابد. حال اگر یک قطره از این محلول را در زیر میکروسکوپ قرار داده، در یک یا چند میدان تعداد مخمرها را بشمارند و تعداد میکروب‌ها را به دست آورند تعداد باکتری‌ها در ماده‌ی غذایی به دست می‌آید.

۵-۵- آزمون حرکت در باکتری

جهت آزمایش حرکت در باکتری‌ها بهتر است از کشت روی محیط نوتربین برات یا آگار خواهید در لوله به مدت ۱۸ ساعت استفاده شود.

برای این منظور لازم است از یک لام آزمایشگاهی مقعر یا توگود^۱ استفاده شود، نحوه انجام آزمون به این ترتیب است که یک قطره کوچک از رقت مناسب محتوی باکتری مورد آزمون را وسط یک لامل قرار داده و در چهار گوشه آن مقدار کمی واژلین گذاشته و آن را روی لام توگود قرار می‌دهیم به این ترتیب که قطره درست در وسط گودی لام قرار گیرد بعد مجموعه را زیر میکروسکوپ گذاشته یک قطره روغن سدر پشت لامل که زیر آن قطره قرار گرفته ریخته و با درشت نمایی $100\times$

۱-Cavity slide



مشاهده می کنیم در این آزمون باید از گرم شدن قطره جلوگیری شود تا حرکت ذرات محتوی مایع با حرکت باکتری اشتباه نشود.

خودآزمایی

- ۱- روش مناسب برای شمارش میکروارگانیسم‌ها کدام است؟ توضیح دهید.
- ۲- چگونه می‌توان با یک پیپت از کلیه‌ی رقت‌ها، نمونه را به ظروف کشت منتقل کرد؟
- ۳- در روش شمارش استاندارد، درجه حرارت گرمانه چگونه انتخاب می‌شود؟
- ۴- مدت گرمانه‌گذاری برای باکتری‌ها و فارج‌ها، پس از کشت، چگونه است؟ (در روش استاندارد)
- ۵- تفاوت روش شمارش سطحی و استاندارد را بیان کنید.
- ۶- مزایای روش شمارش قطره‌ای میکروارگانیسم‌ها چیست؟
- ۷- روش شمارش باکتری‌ها با کاغذ صافی چه مزایایی دارد و بیشتر در چه مواردی به کار می‌رود؟
- ۸- روش مستقیم شمارش میکروارگانیسم‌ها را در مورد باکتری‌ها و مخمرها شرح دهید.
- ۹- کلیه‌ی روش‌های شمارش میکروارگانیسم‌ها را نام ببرید.
- ۱۰- چگونه می‌توان با جوشاندن محیط کشت اکسیژن آن را خارج نمود؟
- ۱۱- آیا می‌توانید به کمک یک شمع محیط بسته‌ای را فاقد اکسیژن نمایید؟ چگونه؟
- ۱۲- مراحل کشت بی‌هوازی باکتری‌ها را شرح دهید.