دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی و میکروبیولوژی، آزمایشگاه میکروبیولوژی

آزمایشگاه میکروب ۲

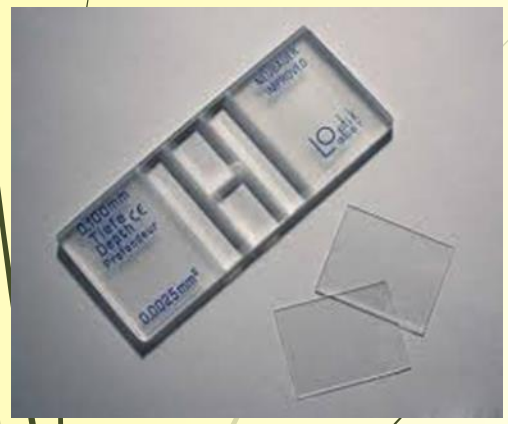
اندازه گیری رشد و رسم منحنی رشد باکتری‌ها

تهیه کننده : سهیلا عباسی

شمارش باکتری

- در بسیاری از آزمایش‌های میکروبی باید بتوانیم تعداد باکتری را بشماریم. این شمارش می‌تواند در یکسان‌سازی دوز مصرفی باکتری یا مقایسه و سنجش اثر یک ماده بر شمار باکتری به‌کاربرده شود.
- باکتری های منفرد به طور معمول با یکی از روش‌های زیر شمارش می‌شوند:
- شمارش مستقیم میکروسکوپی
- شمارش صفحه (پاشیدن و پخش)
- صافی غشایی
- تخمیر چند لوله‌ای

شمارش مستقیم



- روش کار در این حالت شمارش مستقیم کلونی ها با استفاده از میکروسکوپ‌ها می‌باشد. چون در این روش تمایز بین سلول‌های زنده و مرده دشوار است شمارش صورت گرفته شمارش کلی است.
- روش دیگر برای دست یابی به شمارش مستقیم به وسیله یک قطعه شمارنده الکترونیکی است که در آن نمونه شامل باکتری از سوراخی عبور داده می‌شود. با عبور باکتری از روزنه‌ی دستگاه قابلیت هدایت الکترونیکی مایع داخل روزنه کاهش می‌یابد.

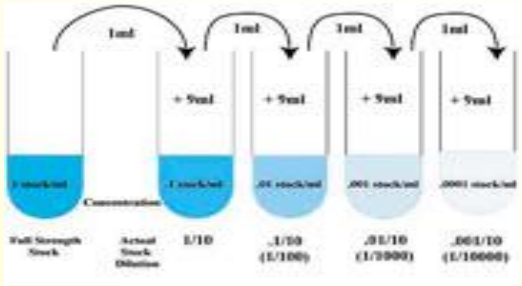
تعداد دفعات این کاهش و میزان ان بسته به تعداد باکتری است. متأسفانه قطعه الکترونیکی نمی‌تواند بین باکتری و ذرات غیر زیستی تفاوت قائل شود. همچنین گرفتگی روزنه یکی از مشکلات جدی این روش است.

- **شمارش غیر مستقیم میکروارگانیسم‌ها**

- روش تهیه‌ی رقت :
- ابتدایی‌ترین روش شمارش باکتری‌ها کشت دادن حجم خاصی از سوسپانسیون آن‌ها روی محیط کشت می‌باشد. در این روش حجم خاصی از سوسپانسیون باکتری روی محیط کشت جامد کشت داده می‌شود و پس از سپری‌شدن زمان لازم برای رشد باکتری، تعداد کلنی‌ها شمارش می‌شود (اگر این حجم خیلی کم باشد دقت کار پایین می‌آید).
- هر کلنی به توده‌ای از باکتری‌ها گفته می‌شود که در نتیجه‌ی رشد یک عدد باکتری اولیه روی محیط جامد ایجاد شده است .

- بنابراین پس از رشد، می‌توان تعداد کلنی‌ها را برابر با تعداد باکتری‌ها در سوسپانسیون اولیه در نظر گرفت. ایراد این روش، فراگیر نبودن آن می‌باشد. زیرا در صورتی که تعداد باکتری‌ها خیلی زیاد باشد، آن‌ها تمام سطح پلیت را می‌پوشانند و تفکیک و شمارش تعداد کلنی‌ها ممکن نیست.
- از طرفی برخی میکروب‌ها ممکن است روی محیط جامد قابل کشت نباشند. اما با این حال هنوز این روش در بسیاری موارد کاربردی و مفید است.
- برای رفع اشکال فراوانی بیش از حد شمار باکتری‌ها (و در نتیجه به هم چسبیدن کلنی‌ها) از روش تهیه‌ی سریال رقت به ترتیب زیر استفاده می‌شود.

- ۱۰عدد لوله‌ی آزمایش دربسته حاوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر یا سرم فیزیولوژی یا محیط کشت (بسته به نیاز) را استریل کنید. لوله‌ها را از ۱ تا ۱۰ شماره‌گذاری کنید و به ترتیب درون جا لوله‌ای قرار دهید.
- از نمونه‌ی اولیه که می‌خواهید باکتری‌های آن را بشمارید یک میلی‌لیتر در شرایط استریل (کنار شعله یا زیر هود) به لوله‌ی شماره‌ی ۱ منتقل کنید .
- محتوای لوله اول را خوب مخلوط کنید تا رقت 10^{-1}
- مرحله‌ی قبل را به ترتیب برای لوله‌های بعدی تکرار کنید تا رقت 10^{-10} به دست آید. در شکل زیر همین روند را مشاهده می‌کنید. هر چه رنگ کم‌رنگ‌تر می‌شود نشان‌دهنده‌ی رقیق‌تر شدن سوسپانسیون اولیه است.



- حال می‌توانید از تمام رقت‌ها هر کدام حجم معینی (مثلاً ۱ میلی‌لیتر) را به یک پلیت محیط‌کشت جامد منتقل کنید و پس از سپری‌شدن زمان رشد، تعداد کلنی‌ها را بشمارید و بر رقت تقسیم کنید تا تعداد باکتری در حجم اولیه به دست آید.
- ۳۰۰عدد کلنی ۱ میلی‌لیتر از رقت ۵-۱۰
- مجهول ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اولیه یا رقت ۱۰۰

$$\text{مجهول} = \frac{۳۰۰ \times ۱}{۱۰^{-۵}} = ۳۰۰ \times ۱۰^{۵}$$

- از آن جا که به دلیل وجود خطا در انجام آزمایش ممکن است تعداد باکتری اولیه‌ی به دست آمده از هر رقت با دیگران برابر نباشد، داده‌های پرت را کنار بگذارید و از بقیه میانگین بگیرید.

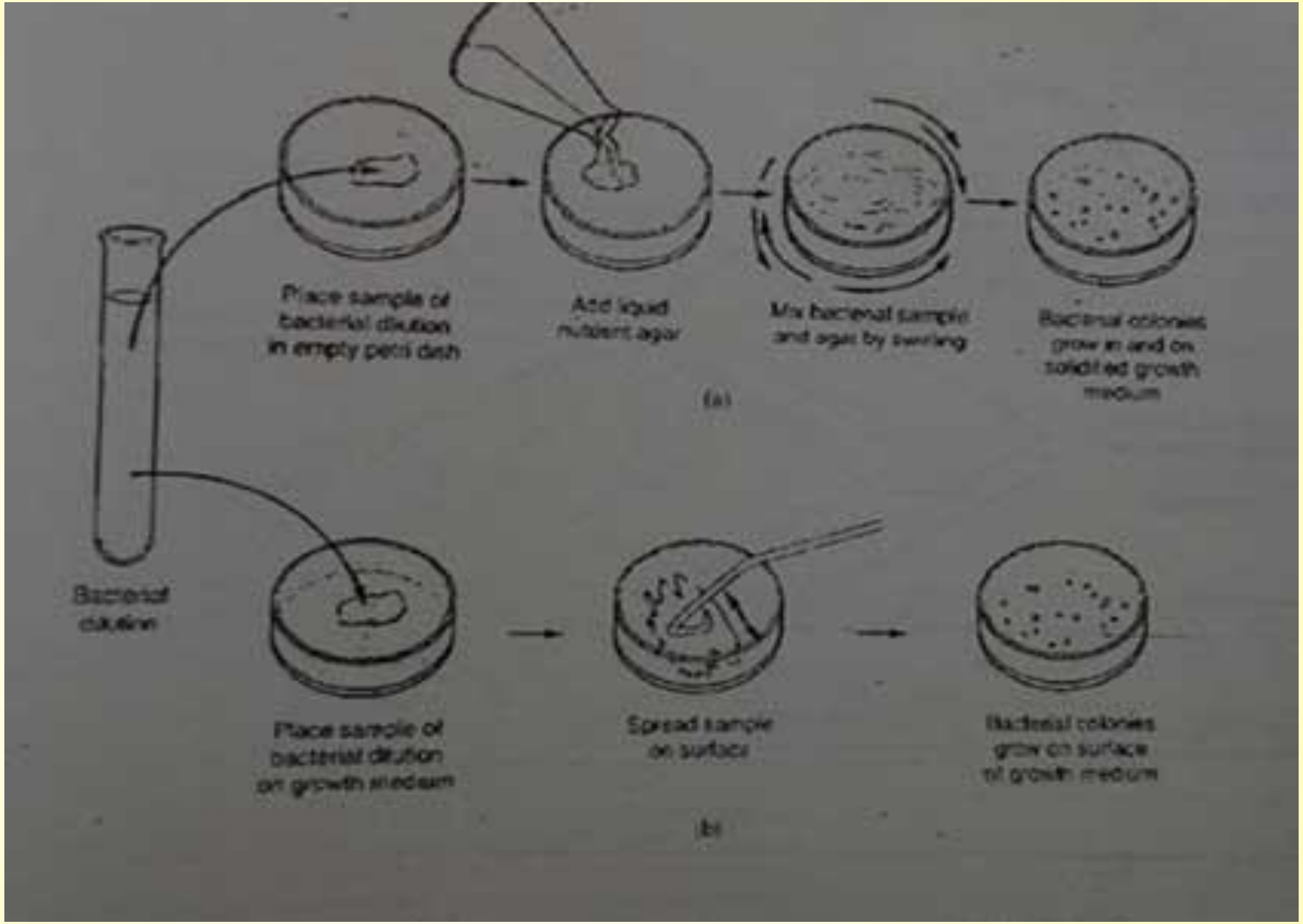
مثال

رقت	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
تعداد باکتری در ۱ میلی‌لیتر از رقت کشت داده شده	زیاد- غیر قابل شمارش	زیاد- غیر قابل شمارش	زیاد- غیر قابل شمارش	بیش از ۳۰۰۰	۲۹۷	۳۲	۴	۰	۰	۰
محاسبه‌ی تعداد باکتری در ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اولیه	-	-	-	-	$10^{5}\times 297$	$10^{6}\times 32$	$10^{7}\times 4$	-	-	-
محاسبه‌ی میانگین به عنوان شمار نهایی باکتری‌ها	$\text{میانگین} = \frac{297000000 + 32000000 + 4000000}{3} = 339000000 \cong 3 \times 10^{8}$									

یکی از مهم‌ترین کاربردهای این روش در تعیین MIC یا کم‌ترین غلظت مهارکننده‌ی رشد باکتری است که برای تعیین توانایی مهارکنندگی مواد ضدباکتری مانند آنتی‌بیوتیک‌هاست.

روش شمارش صفحه پاشیدن و پخش

- این روش برای کشف، شناسایی و شمارش باکتری ها به کار می‌رود. در این روش نمونه به صورت پیاپی رقیق می‌شود و مقدار کمی از هر رقت با یک محیط کشت مایع گرم شده مخلوط شده و در ظرف کشت ریخته می‌شود و اجازه داده می‌شود که پس از سرد شدن سفت شود سپس تحت شرایط کنترل شده داخل انکوباتور قرار می‌دهند.
- کلونی های جداگانه برتر که پس از انکوباسیون روی پلیت ایجاد شده است و نتایج به عنوان (colony-forming units)در واحد حجم نمونه بیان می‌شود(cfu/ml).
  دراین روش کشت گسترده مقدار کمی از نمونه رقیق‌شده روی سطح یک ظرف کشت آماده که شامل محیط کشت جامد مناسب است ریخته و گسترده می‌شود.


Place sample of bacterial dilution in empty petri dish
Add liquid nutrient agar
Mix bacterial sample and agar by swirling
Bacterial colonies grow in and on solidified growth medium
(a)
Bacterial culture
Place sample of bacterial dilution on growth medium
Spread sample on surface
Bacterial colonies grow on surface of growth medium
(b)

روش تخمیر چند لوله‌ای

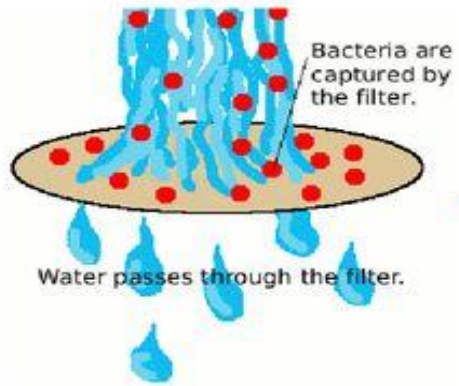
- این روش بر اصل رقیق‌سازی در حد محو شدن استوار است. غلظت باکتری های کلی فرم اغلب به صورت mpn/100ml گزارش می‌شود.
- تأکید می‌شود که mpn غلظت خالص ارگانیسم های موجود نیست بلکه یک تخمین آماری از این غلظت است. روند کامل فن تخمیر چند لوله‌ای برای کلیفرم سه بخش است که با: احتمالی، تأییدی، تکمیلی بیان می‌شود.
- روشی مشابه برای باکتری‌های کلی فرم مدفوعی و همچنین سایر گروه‌های باکتری وجود دارد mpn .می‌تواند مستقیماً با استفاده از توزیع و یا با معادله‌ی توماس تعیین شود .

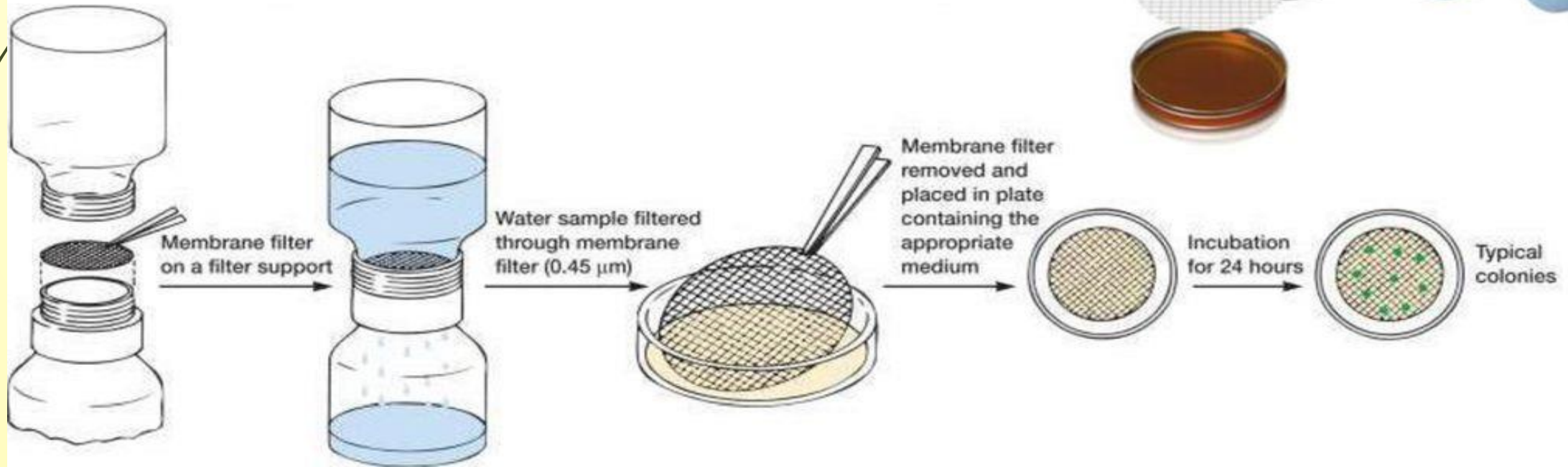
روش فیلتر غشایی mf

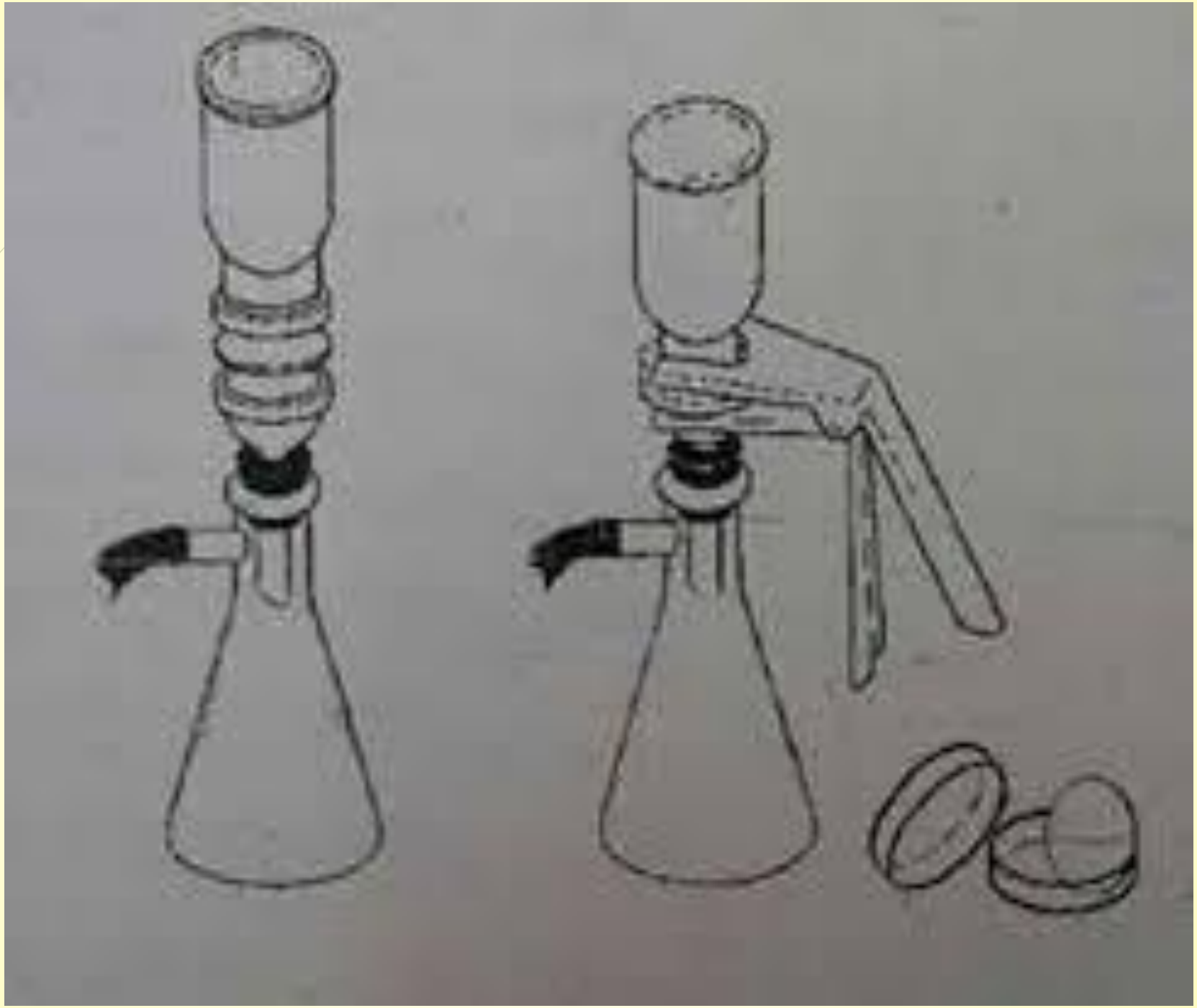
- در این روش حجم مشخصی از نمونه از فیلتر غشایی که سوراخ‌هایی کوچک در حد ۰.۴۵ میکرومتر دارد عبور داده می‌شود.
- باکتری به دلیل اندازه‌شان روی فیلتر باقی می‌مانند سپس باکتری را در تماس با نوعی از محیط کشت که دربردارنده‌ی مواد مغذی برای رشد باکتری موردنظر است قرار می‌گیرد و پس از انکوباسیون کلونی های روی سطح کشت قابل شمارش بوده و غلظت در نمونه‌ی اصلی مشخص می‌شود mf..
- نسبت به روش mpn در سریع‌تر بودن و ارائه شمارش مستقیمی از ارگانیسم ها برتری دارد.
- در مسائل محیط زیستی روش mf برای کلیفرم و انتروکوکوس های مدفوعی برخلاف روش‌های شمارش مستقیم و کشت گسترده به کار می‌رود

فیلتر غشایی

از این روش برای جداسازی باکتری‌ها از آب یا سایر مایعات رقیق نظیر انواع عرقیات و گلاب استفاده می‌شود.







منحنی رشد

- در میکروبیولوژی، رشد به صورت افزایش در تعداد سلول‌ها تعریف می‌شود. سلول‌های میکروبی دوره‌ی زندگی محدودی دارند و تنها به دلیل رشد دائم جمعیت یک گونه است که بقای آن‌ها تضمین می‌شود.

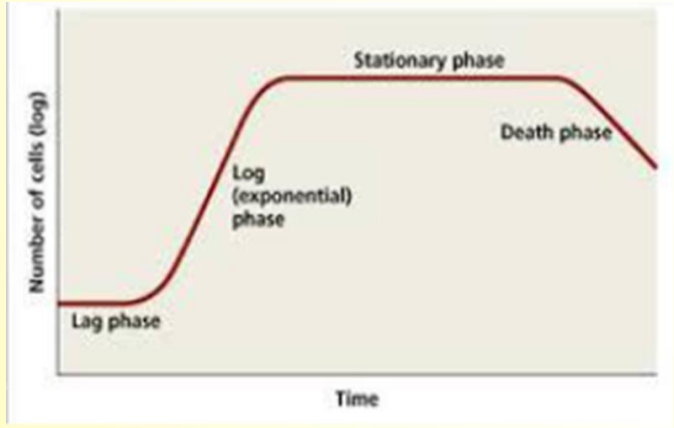
- دلایل متعددی برای اهمیت مطالعه رشد میکروبی وجود دارد.برای مثال، بسیاری از فرایند-های کاربردی نیازمند کنترل رشد میکروبی، به ویژه رشد باکتریایی هستند. آگاهی از چند و چون توانایی گسترش سریع جمعیت‌های میکروبی برای طراحی روش‌هایی جهت کنترل رشد میکروبی سودمند خواهد بود،

- چه این روش‌ها برای درمان بیماری‌های عفونی خطرناک به کار گرفته شوند یا برای تولید یک محصول و چه ساده‌تر از آن برای ضدعفونی کردن یک سطح مورد استفاده قرار گیرند.

- در طی تقسیم، یک سلول به دو سلول تبدیل می‌شود. در طول زمان صرف شده برای این پدیده (زمان تقسیم)، هم تعداد کل سلول و هم حجم آن دو برابر می‌شود. این الگوی افزایش جمعیت، که در آن تعداد سلول‌ها در بازه‌ی زمانی خاص دو برابر می‌شود، رشد نمایی خوانده می‌شود. هنگامی که تعداد سلول به عنوان تابعی از زمان روی محور مختصات حسابی (خطی) به صورت نمودار رسم شود. منحنی با شیب همواره رو به افزایش حاصل می‌شود.

- در طی رشد نمایی، افزایش تعداد سلول در ابتدا نسبتاً آهسته است. اما به مرور زمان سرعت آن افزایش می‌یابد. این افزایش سرعت منجر به افزایش ناگهانی تعداد سلول‌ها می‌شود. به دلایل متعدد، ارگانیسمی که در یک ظرف بسته، مانند یک لوله یا فلاسک، رشد می‌کند (شرایط رشدی که به کشت بچ موسوم است)، نمی‌تواند به طور نامحدود رشد نمایی داشته باشد. در عوض، منحنی رشد مشخصی برای جمعیت به دست می‌آید.

- منحنی رشد معرف چرخه‌ی کامل رشد است و شامل فاز تأخیری (Lag phase)، فاز لگاریتمی (Exponential phase)، فاز سکون (Stationary phase) و فاز مرگ (Death phase) است.

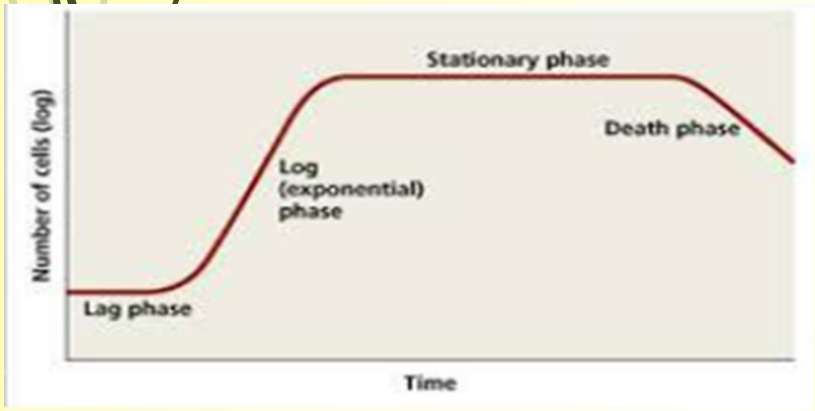


- **منحنی رشد**

- اگر باکتری های مشخصی را در یک محیط کشت مایع بسته کشت دهیم و این محیط حاوی مواد غذایی مناسب و گاز های مورد نیاز باکتری باشد، سرعت رشد و تکثیر باکتری ها در زمان های مختلف از الگوی منحنی رشد تبعیت می کند. محور طولی این منحنی زمان و محور عرضی آن لگاریتم تعداد باکتری زنده را نشان می دهد. این منحنی نشان می دهد که الگوی رشد باکتری ها در یک محیط کشت بسته شامل چهار مرحله است:

- **مرحله‌ی خفته یا تاخیری (Lag phase)**

- این مرحله با ورود باکتری ها به محیط کشت شروع می شود. در اوایل این مرحله باکتری ها فاقد قدرت تکثیر هستند و حد نمو آنها صفر است. در ادامه این مرحله، حد نمو و سرعت تکثیر آنها کم کم افزایش می یابد تا در پایان این مرحله به حداکثر می رسد. در این مرحله عملاً متابولیت ها و گاز های زاید در محیط وجود ندارد. این مرحله تقریبا دو ساعت طول می کشد.



مرحله‌ی فعال تکثیر یا رشد و تکثیر لگاریتمی (Log phase)

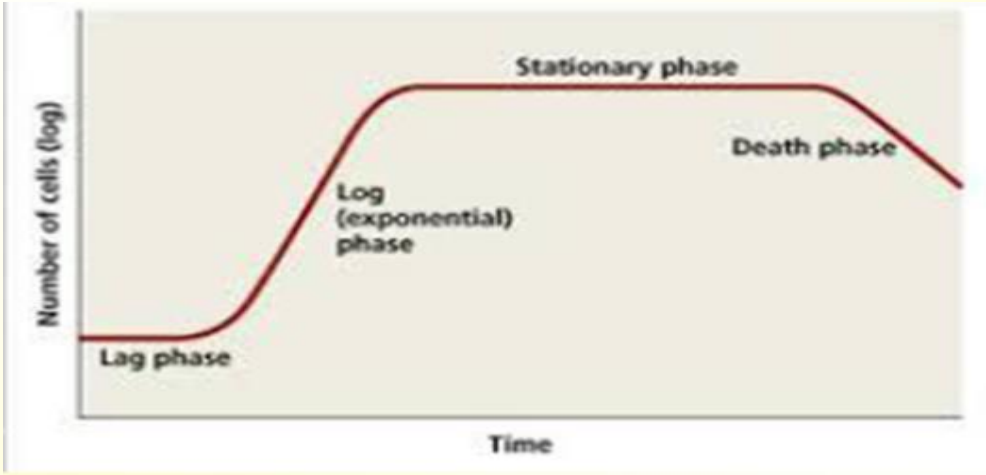
- این مرحله بلافاصله از زمانی آغاز می شود که سرعت رشد به حداکثر و در عین حال به میزان ثابتی رسیده است. در این مرحله، بدون هیچ مانع آشکاری باکتری ها به طور آزاد تکثیر می یابند و زمان تولید مثل به کوتاهترین حد ممکن رسیده است. تراکم باکتری ها به طور تصاعدی افزایش می یابد و تمام آنها زنده هستند. متابولیت ها و گاز های زاید به حداقل میزان در محیط وجود دارند.

- **مرحله‌ی سکون یا تکثیر کند (Stationary phase)**

- در اوایل این مرحله میزان رشد به تدریج رو به نقصان می گذارد و افزایش تعداد باکتری ها دیگر به صورت تصاعدی نیست. زیرا زمان تولید مثل طولانی می شود و حد نمو رو به کاهش می رود تا به صفر برسد.

- عواملی که در پیدایش این مرحله دخالت دارند شامل کاهش یا فقدان مواد غذایی مورد نیاز در محیط کشت، تجمع متابولیت های سمی و همچنین کاهش میزان گاز های مورد نیاز باکتری است.

- در باکتری های هوازی هنگامی که غلظت باکتری از $۱۰^{۷}$ باکتری در میلی لیتر افزایش نشان می دهد، حد نمو کاهش خواهد یافت. هنگامی که غلظت سلولی به $۵/۴ \times ۱۰^{۹}$ باکتری در میلی لیتر برسد، با وجود وارد کردن هوا به طور مصنوعی، میزان نفوذ اکسیژن برای رفع نیاز های باکتری کافی نیست و به تدریج میزان نمو کند می شود و به صفر می رسد.



- مرحله‌ی زوال یا مرگ (Death phase)

- در این مرحله میزان مرگ و میر باکتری ها افزایش می‌یابد و از تراکم باکتری‌های زنده کاسته می‌شود. میزان رشد در این مرحله منفی است، به نحوی که به علت کمبود شدید مواد غذایی و گازهای مورد نیاز و همچنین افزایش متابولیت‌ها، قسمتی از باکتری‌ها اتولیز می‌شوند و مرگ این دسته به وسیله‌ی تولید سلول‌های جدید جبران نمی‌شود.

- یک سلول باکتریایی با افزایش اجزای تشکیل دهنده سلولی در مدت زمان کوتاهی اندازه اش دو برابر میشود.مدت زمانی که لازم است تا یک سلول میکروبی یا جمعی از آنها دو برابر شوند را زمان نسل (generation time) مینامند و آنرا با G نمایش میدهند.

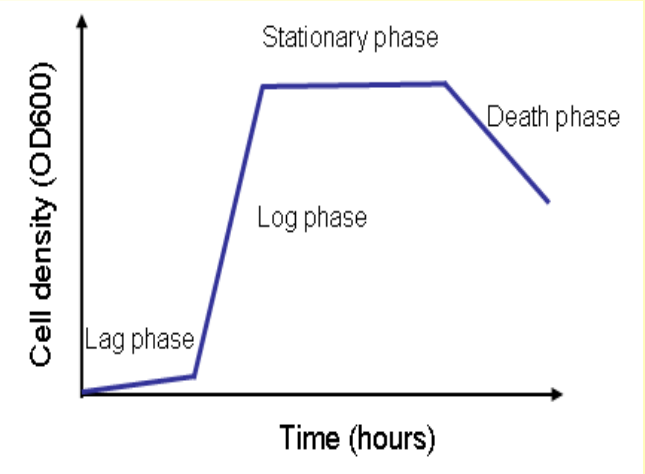
$$G=\frac{t}{n}$$

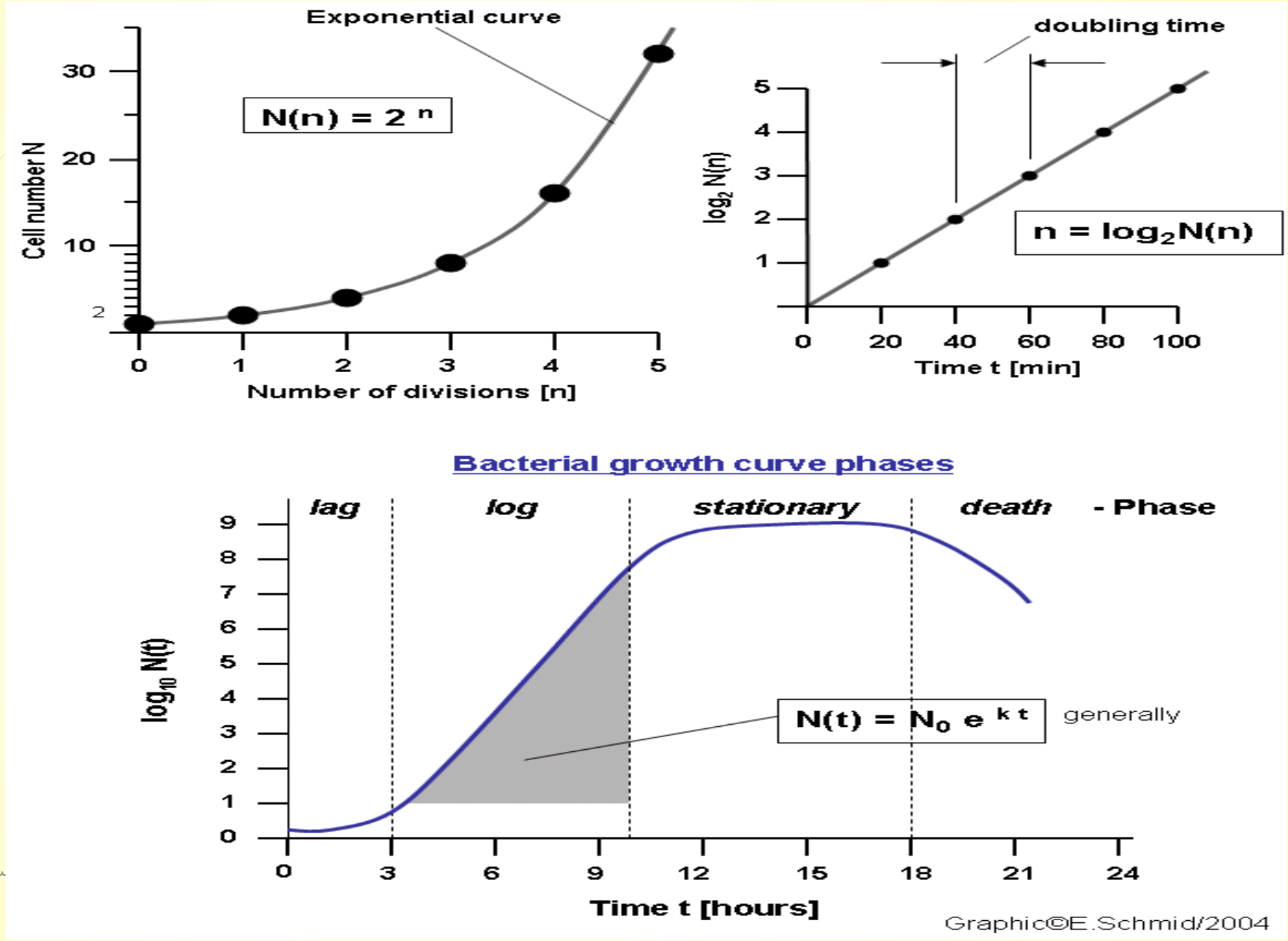
- n که تعداد تقسیمات میباشد را میتوان از طریق فرمول زیر بدست آورد:

$$B_n=B_0\times 2^n$$

$$n=\frac{\log Bn-logB0}{log2}$$

(تعداد سلول ها پس از ان بار تقسیم $B_n=$,تعداد اولیه سلول $B_0=$)




Exponential curve
N(n) = 2 n
Cell number N
30
20
10
2
0
1
2
3
4
5
Number of divisions [n]
doubling time
log2 N(n)
5
4
3
2
1
n = log2N(n)
0
20
40
60
80
100
Time t [min]
Bacterial growth curve phases
lag
log
stationary
death
- Phase
log10 N(t)
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
N(t) = N0 e k t
generally
0
3
6
9
12
15
18
21
24
Time t [hours]
Graphic©E.Schmid/2004

شمارش میکروسکوپی

- تعداد کلی میکروب‌ها را می‌توان با استفاده از یک میکروسکوپ و مشاهده و شمارش سلول‌های موجود در یک کشت یا نمونه‌ی طبیعی به دست آورد. این روش ساده است ولی نتایج آن ممکن است غیردقیق باشد.

- رایج ترین روش شمارش کل، روش شمارش میکروسکوپی سلول‌ها است. شمارش میکروسکوپی را هم می‌توان برای نمونه‌های خشک شده روی لام و هم نمونه‌های مایع انجام داد.البته نمونه‌های خشک شده را می‌توان برای افزایش تمایز بین سلول‌ها و پس‌زمینه‌ی آن‌ها رنگ آمیزی کرد.

- برای نمونه‌های مایع، محفظه‌های شمارش با طراحی ویژه به کار گرفته می‌شوند (لام توما و نئوبار). در این محفظه شمارش، شبکه‌ای با مربع‌هایی با مساحت مشخص روی سطح شیشه‌ی لام حک شده‌اند. هنگامی که لامل بر روی محفظه قرار داده می‌شود، هر یک از مربع‌های شبکه حجم دقیقاً مشخصی دارد. تعداد سلول ها در حجم اندک محفظه را به ما ارائه می‌دهد. تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون با به کار گیری یک ضریب تبدیل بر اساس حجم محفظه نمونه محاسبه می‌شود.

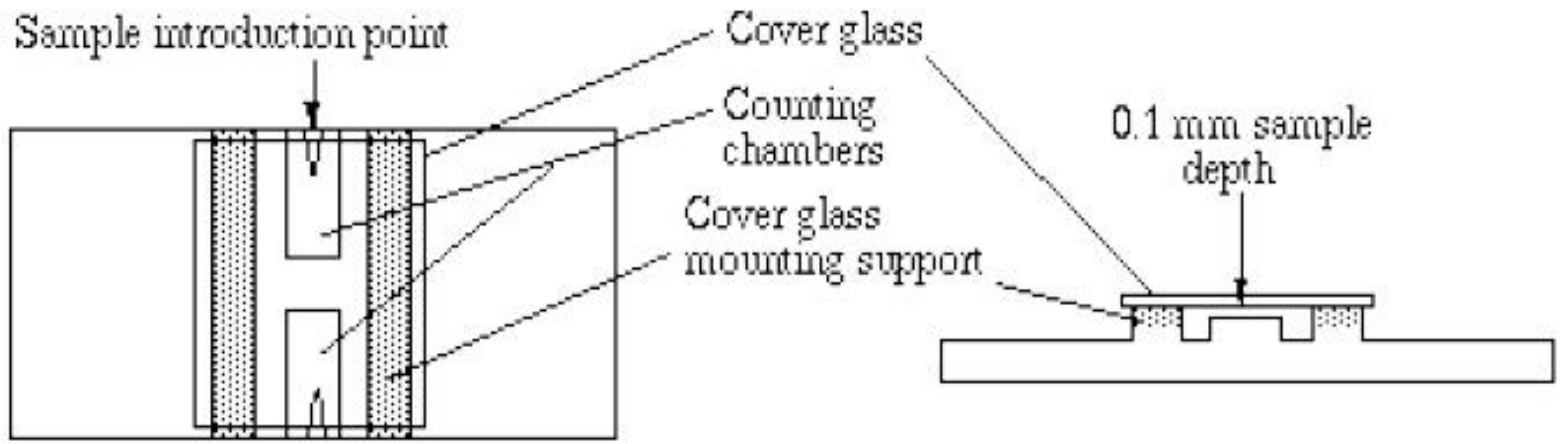
- روش دیگر برای شمارش سلول‌ها در نمونه‌های مایع، استفاده از فلوسیتومتر است. فلوسیتومتر دستگاهی است که از یک پرتو لیزر و الکترونیک پیچیده برای شمارش سلول‌های منفرد استفاده می‌کند. فلوسیتومتری به ندرت برای شمارش معمول سلول‌های میکروبی به کار می‌رود.

- در بسیاری از روش‌های زیستی مانند **میکروبیولوژی، کشت سلولی**، کار با خون و بسیاری از تکنیک‌های دیگر که از **سلول‌ها** استفاده می‌کنند نیاز داریم که غلظت سلول‌ها را در آزمایش بدانیم. شمارش سلول‌ها به صورت کلی نیازمند روش عمومی استفاده از اتاقک‌های شمارش کننده به نام **هموسایتومتر** می‌باشد.

- این ابزار به وسیله یک آناتومیست فرانسوی در قرن ۱۹، به نام Louis-Charles Malassez برای شمارش سلول‌های خون ابداع شد. یک هموسایتومتر از یک **لام میکروسکوپی** نازک شیشه‌ای دارای شبکه‌ای از مربع‌های هاشور خورده در وسط تشکیل شده است. این شبکه قطر مشخصی دارد و ناحیه پوشیده شده به وسیله خطوط مشخص شده است، در نتیجه شمارش تعداد سلول‌ها در حجم مشخصی از محلول امکان پذیر می‌شود.

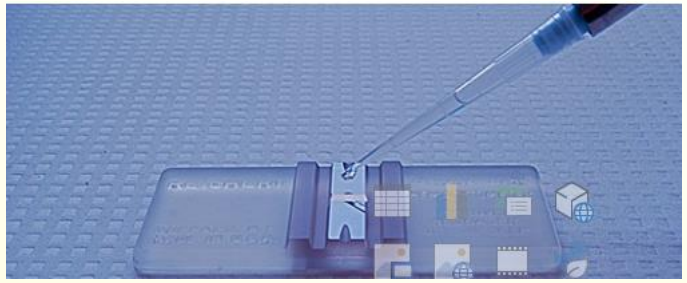
- معمول ترین نوع هموسایتومتر یک ساختار H مانند دارد که در وسط لام هاشور خورده است و شامل دو سطح مشبک شیشه مانند مجزا و ناحیه ای است که لامل بر روی آن قرار می‌گیرد.

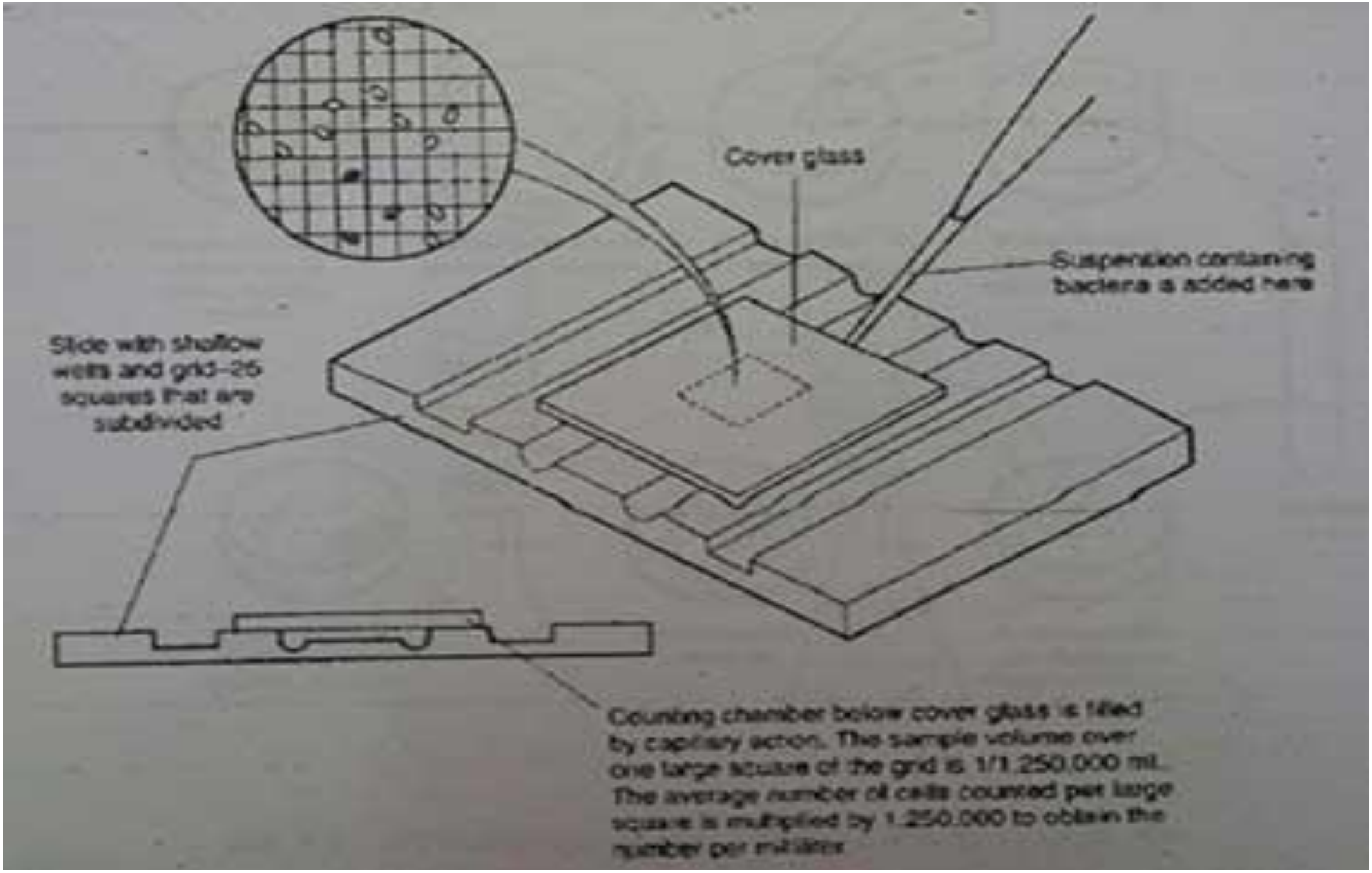
0,100 mm
Tiefe
Depth
Profondeur
0,0025 mm²
Neubauer
Improved
Assistent
Germany

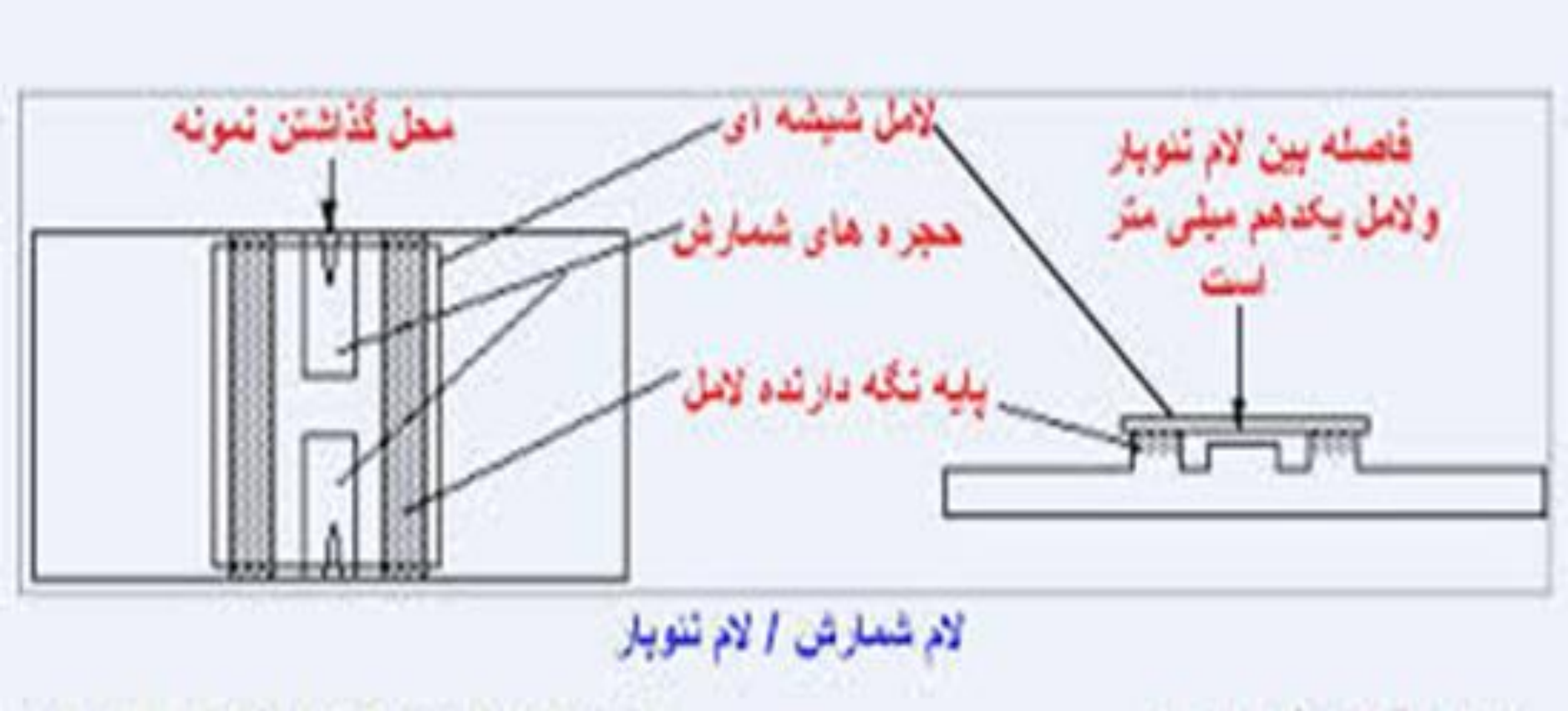

Sample introduction point
Cover glass
Counting chambers
Cover glass mounting support
0.1 mm sample depth

قرار دادن نمونه بر روی هموسایتومتر

- پیش از شروع کار اطمینان حاصل کنید که هر دوی هموساتومتر و لاملی که روی آن قرار می‌گیرند با استفاده از یک کاغذ تمیز کننده لنز کاملا عاری از هر نوع غبار و ذره ای باشند. لامل استفاده شده بر روی هموساتومتر ضخیم تر از لامل‌های معمول به کار رفته در سنجش‌های میکروسکوپی است، تا بتوانند بر کشش سطحی یک قطره مایع غلبه کنند.
- مطمئن شوید که پیش از قرار دادن محلول سلولی، لامل را بر روی سطح شمارش کننده قرار دهید. سپس نوک سمپلر حاوی نمونه خود را همانطور که در تصویر نشان داده شده در یکی از چاهک‌های V شکل قرار داده و نمونه را تخلیه کنید. ناحیه زیر لامل با استفاده از نیروی مویینه پر خواهد شد. به میزان کافی نمونه باید در محل مورد نظر قرار گیرد تا سطح شیشه ای کاملا پوشیده شود، که این مقدار معمولا ۱۰ میکرولیتر است. دقت کنید بیش از مقدرا لازم نمونه بر روی لام قرار ندهید.
- می‌توانید دو نمونه را بر روی یک هموسایتومتر قرار دهید به صورتی که هر نمونه بر روی یک ناحیه مشبک قرار گیرد.

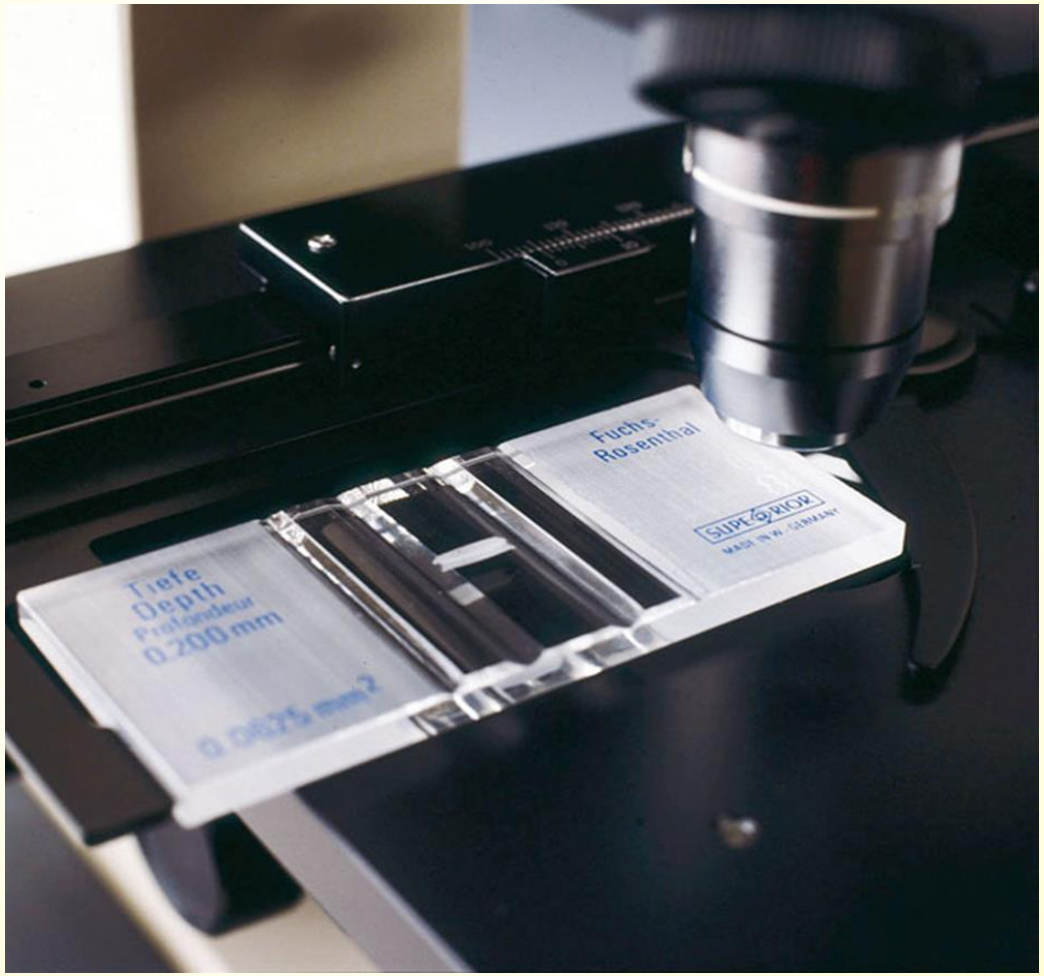


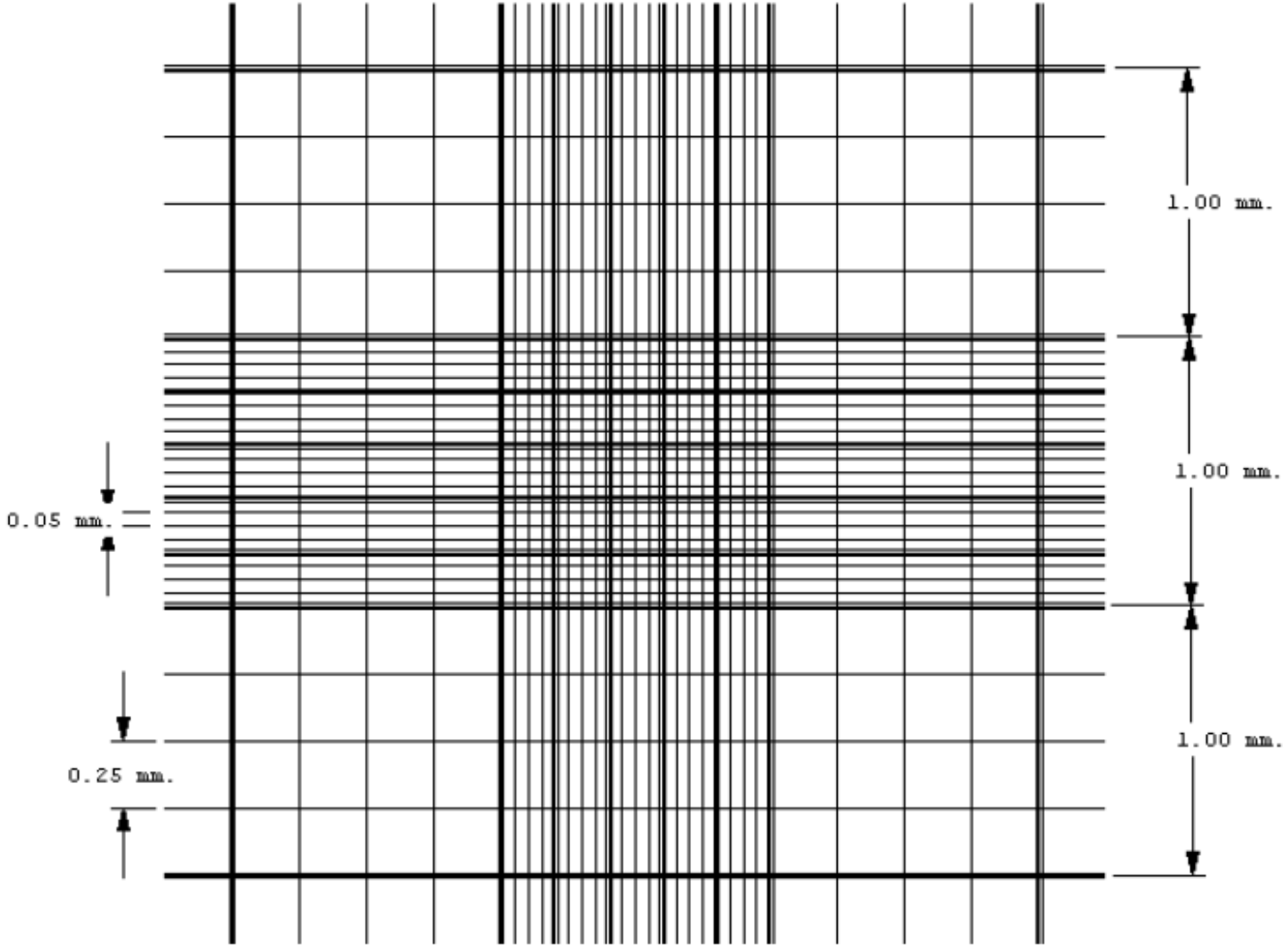

Cover glass
Suspension containing bacteria is added here
Slide with shallow wells and grid–25 squares that are subdivided
Counting chamber below cover glass is filled by capillary action. The sample volume over one large square of the grid is 1/1,250,000 ml. The average number of cells counted per large square is multiplied by 1,250,000 to obtain the number per milliliter



لام شمارش / لام تنوبار

- سپس هموسایتومتر دارای نمونه بر روی صفحه میکروسکوپ قرار گرفته و بر روی بخش مشبک با قدرت کم تمرکز می‌شود. اجازه دهید نمونه برای چند دقیقه ثابت بماند و از برداشتن لامل خود داری کنید زیرا این کار باعث خواهد شد حباب‌های هوا در زیر آن تشکیل شده و شمارش دشوار شود.

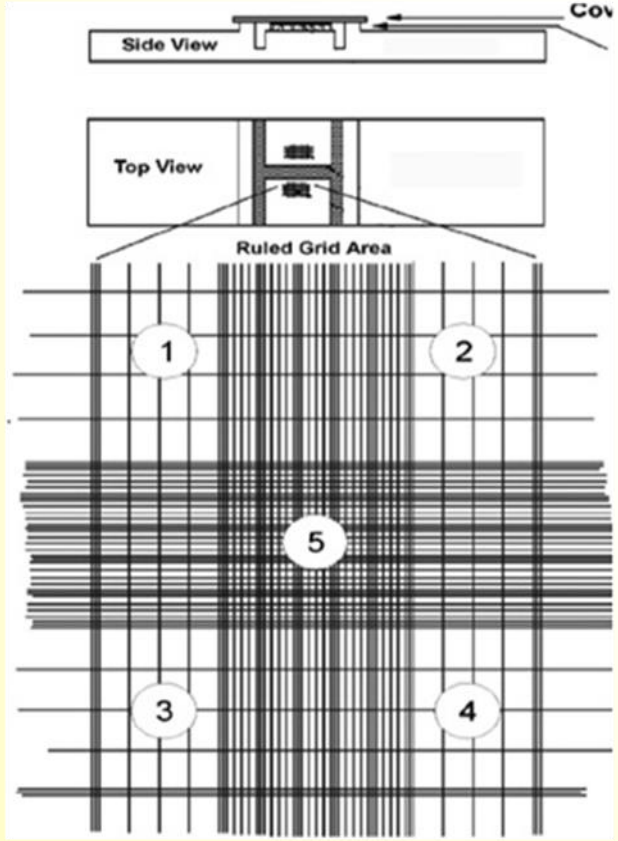


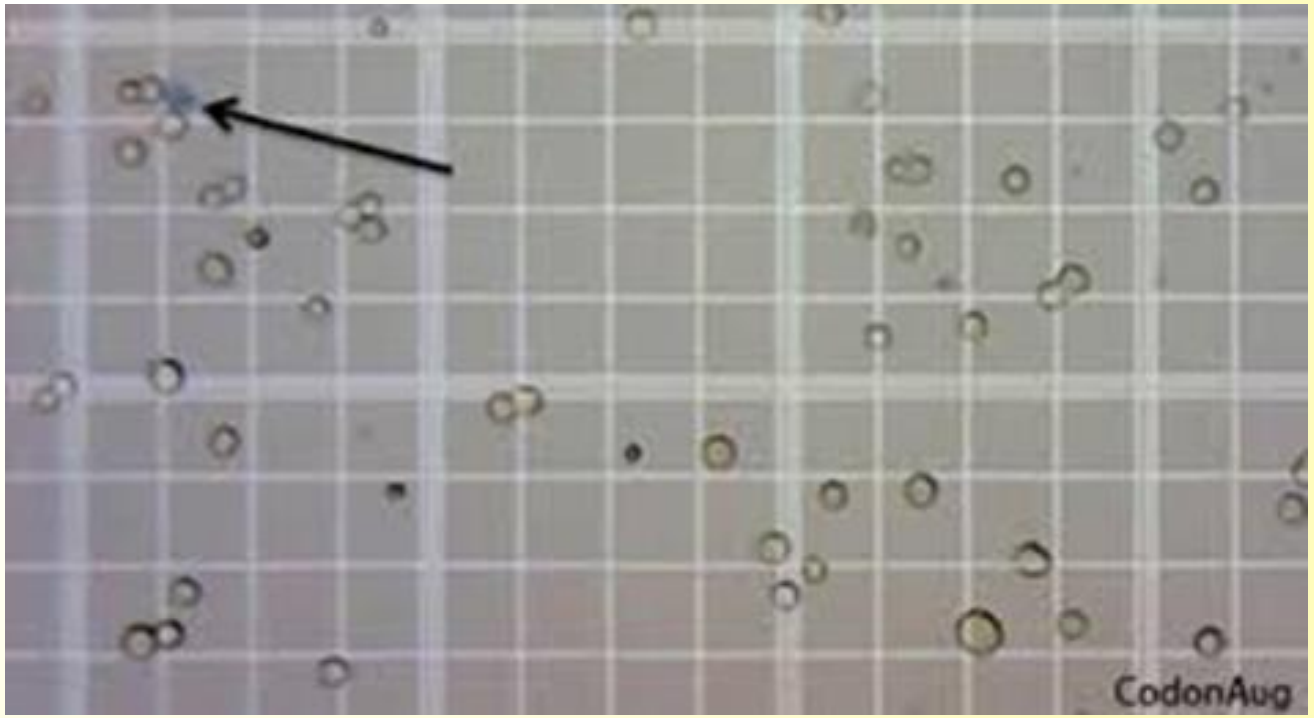


شکل ۲. الگوی تقسیم‌بندی خانه‌ها در لام شمارش

- استفاده از لام مخصوص شمارش : در این روش ازلام به خصوصی شبیه به لام توما استفاده می شود. در وسط این لام قسمتی وجود دارد که میکروارگانیسم‌ها ۰/۰۲ میلیمتر از سایر قسمت های لام پایین تر قرار دارند. در قسمت فرورفته لام یک میلی متر مربع به ۴۰۰ مربع کوچک تقسیم شده است که سطح هر مربع کوچک ۱۰ است. پس از قرار دادن لام بر سطح حجم هر کدام از مکعب مستطیل های کوچک برابر است با :

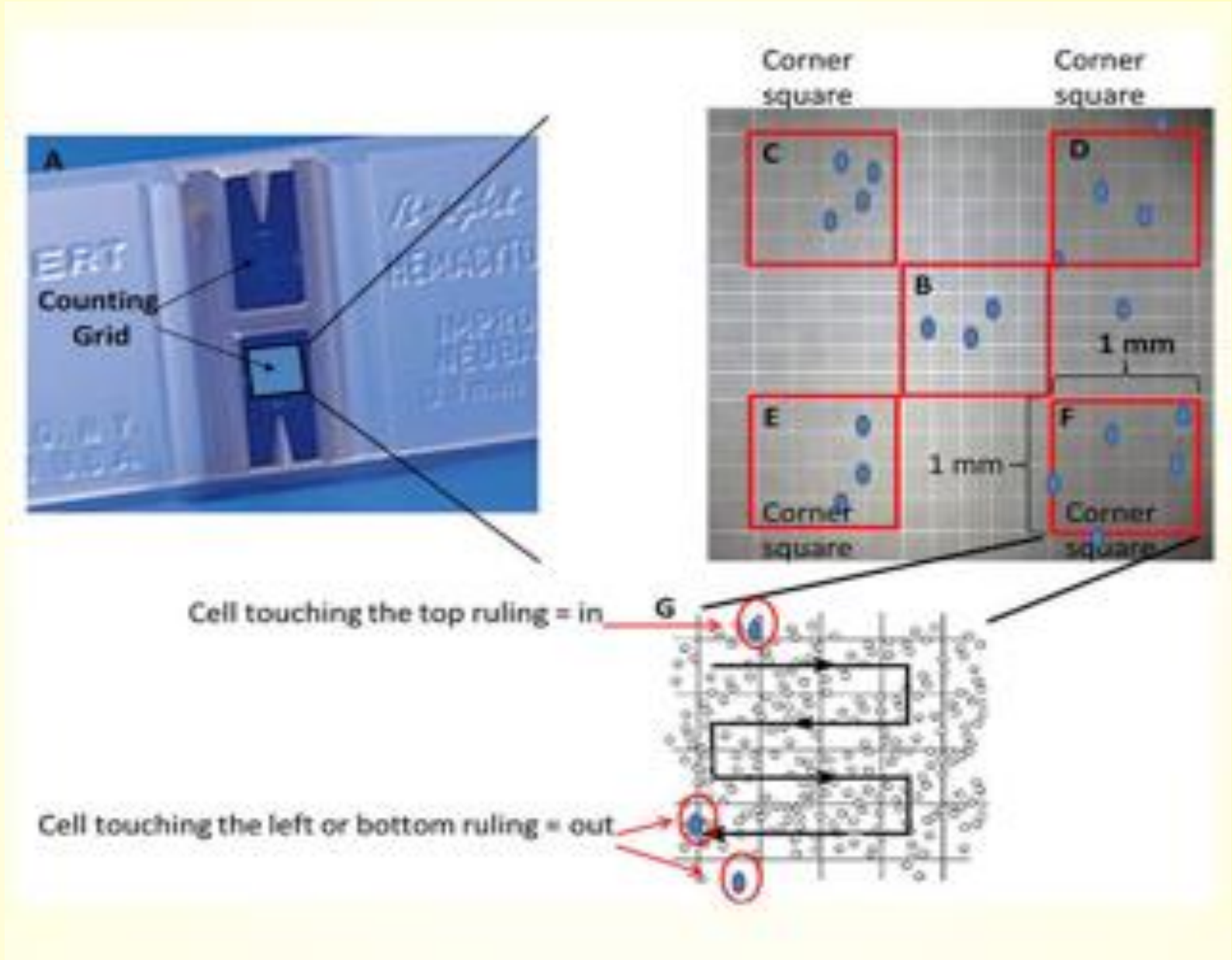
- $۰/۰۲ \times ۰/۰۰۰۰۲۵ = ۵ \times ۱۰^{۸} ml = mm^{۳}$



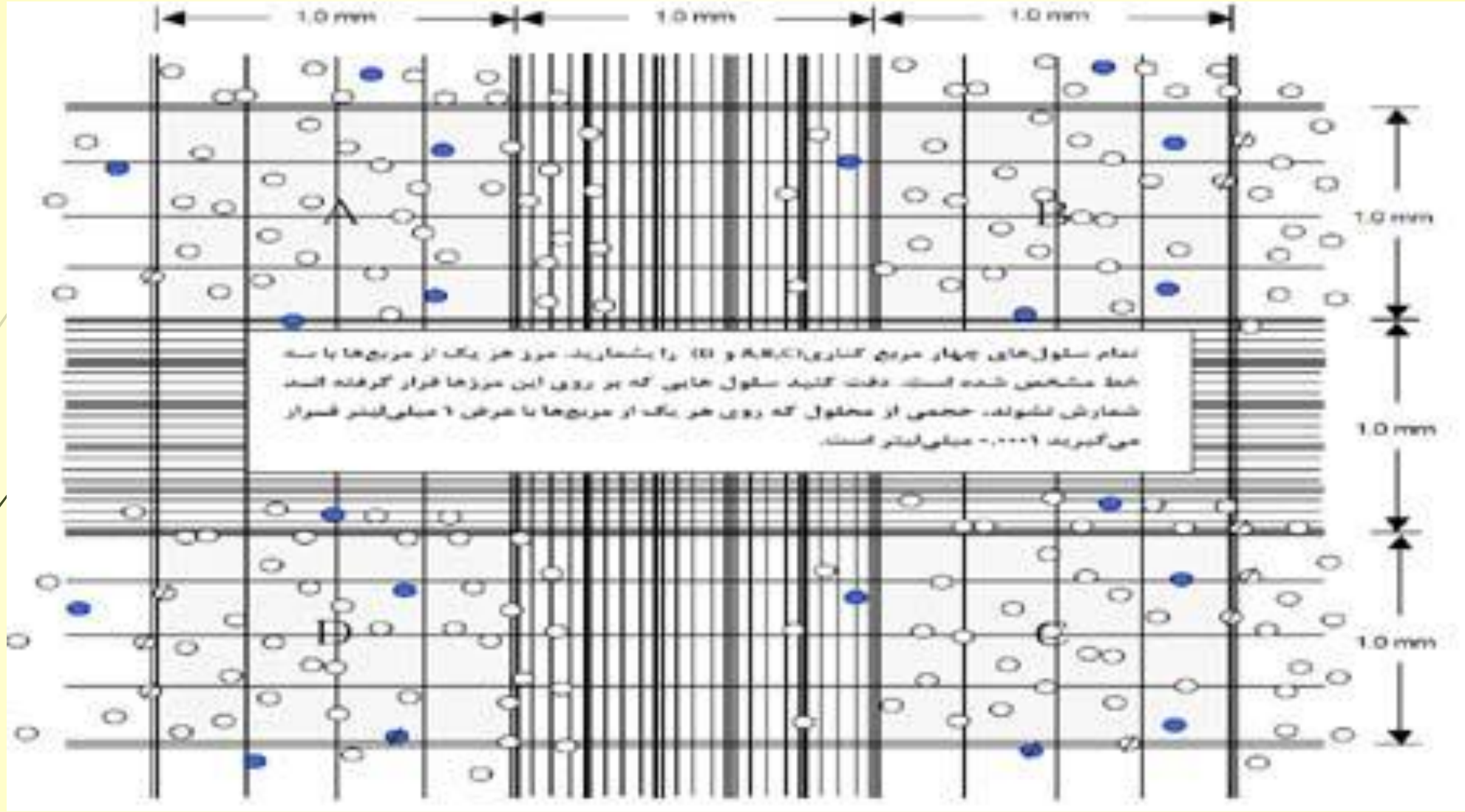


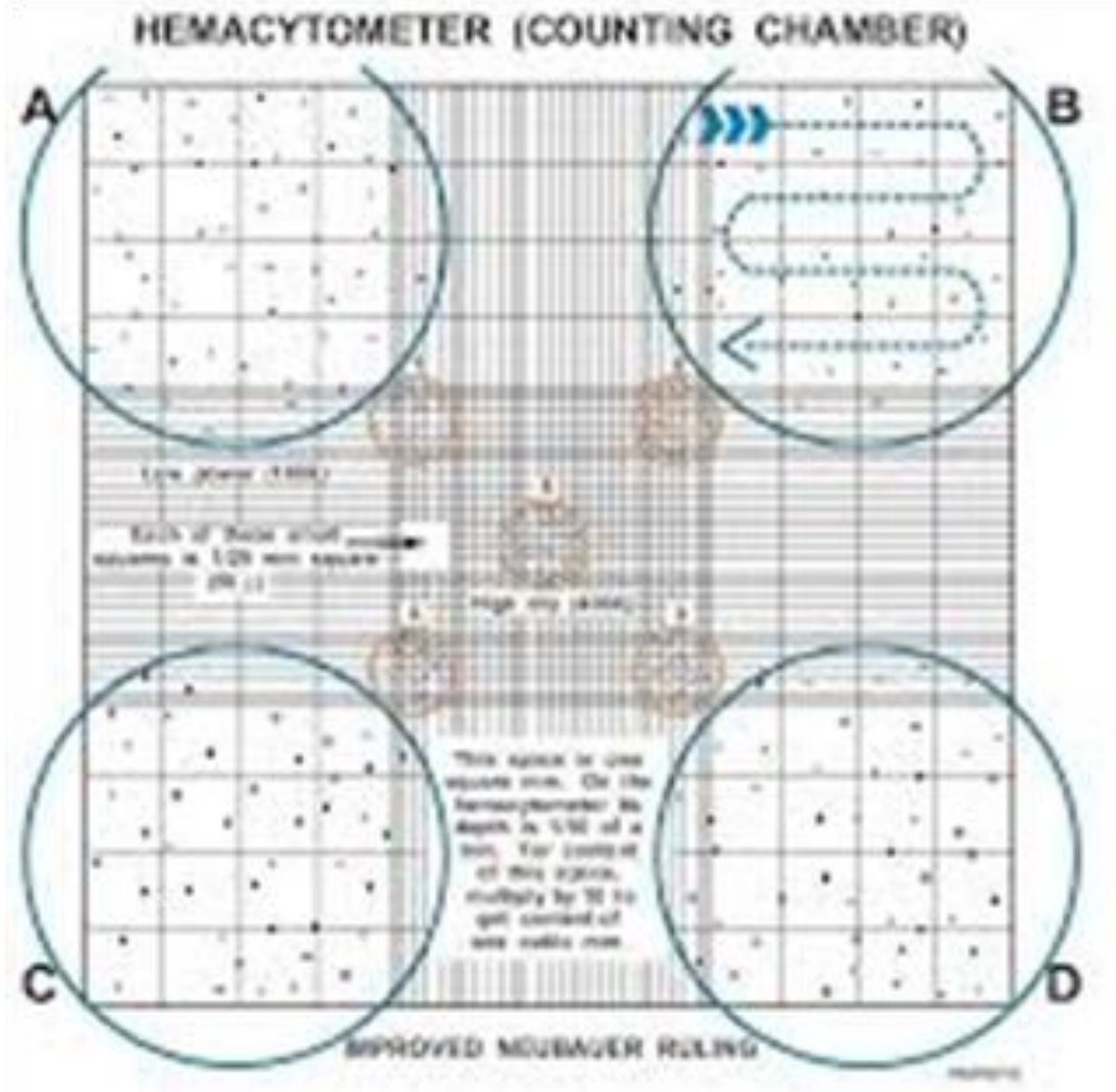
روش شمارش: برای شمارش بر اساس اینکه با سلول‌های یوکاریوتی یا پروکاریوتی سروکار داریم، می‌توان از مربع‌های بزرگ یا کوچک استفاده کرد (شکل ۲). همانطور که گفته شد، از تقاطع خطوط افقی و عمودی در مرکز صفحه یک مربع به عرض ۱ میلی‌متر ایجاد شده است که به ۲۵ مربع تقسیم می‌شود. هر یک از این مربع‌ها خود به ۱۶ مربع کوچک‌تر تقسیم می‌شود.

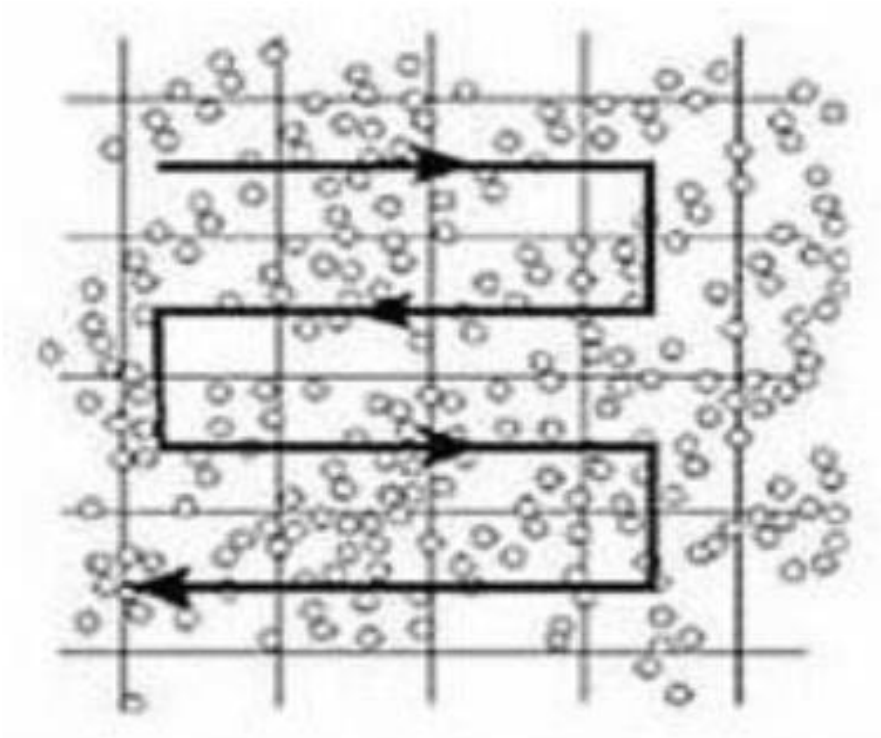
اندازه هر ضلع از ۲۵ مربع بزرگ ۰/۲ میلی‌متر و مساحت آن یک بیست و پنجم (۰/۰۴) میلی‌متر مربع و حجم آن برابر ۰/۰۰۴ میلی‌متر مکعب است. اندازه هر ضلع ۱۶ مربع کوچک‌تر، یک بیستم (۰/۰۵) میلی‌متر می‌باشد. بنابراین مساحت مربع کوچک برابر یک چهارصدم (۰/۰۰۲۵) میلی‌متر مربع می‌باشد. حجم مایع قرار گرفته روی مربع نیز حاصل ضرب مساحت در فاصله بین لام و لامل (۰/۱ میلی‌متر) می‌باشد. به عبارت دیگر حجم مایع قرار گرفته روی کوچک‌ترین مربع برابر ۰/۰۰۰۲۵ میلی‌متر مکعب می‌باشد.


A
Counting
Grid
Corner
square
Corner
square
C
D
B
1 mm
E
F
1 mm
Corner
square
Corner
square
Cell touching the top ruling = in
G
Cell touching the left or bottom ruling = out

- برای تفاوت گذاشتن بین سلول‌های مرده و زنده، نمونه معمولا در یک رنگ خاص مانند تریپان بلو محلول می‌شود. این روش رنگ آمیزی به نام رنگ آمیزی حذف با رنگ (dye exclusion staining) شناخته شده که با استفاده از یک رنگ دوظرفیتی که از غشاء سلول‌های مرده می‌گذرد و آنها را آبی می‌کند شناخته می‌شود، در حالی که سلول‌های زنده این رنگ را جذب نمی‌کنند و در نتیجه سلول‌های زنده از مرده تفکیک می‌شوند. هنگامی که این نمونه در زیر میکروسکوپ مشاهده شود سلول‌های مرده مانند نقطه‌های تاریک دیده می‌شوند.


1.0 mm
1.0 mm
1.0 mm
1.0 mm
1.0 mm
1.0 mm
A
B
C
D


HEMACYTOMETER (COUNTING CHAMBER)
A
B
C
D
APPROVED NEUBAUER RULING



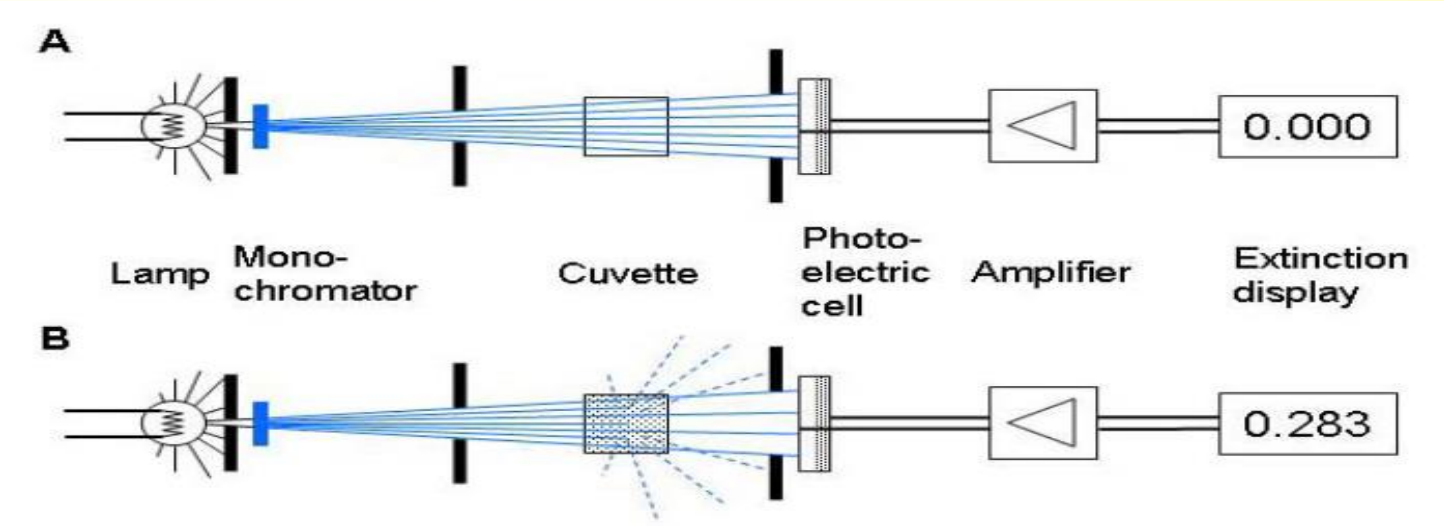
شکل ۳. روش شمارش خانه‌های مختلف

تعداد میکروب‌ها در هر خانه شمارش شده و معدل آن محاسبه می‌شود. توجه شود که تعداد به دست آمده در واحد میلی‌متر مکعب می‌باشد. همانطور که می‌دانیم، هر ۱۰۰۰ میلی‌متر مکعب برابر یک میلی‌لیتر (سانتی‌متر مکعب) است. بنابراین با تناسب بستن، تعداد میکروب‌ها در میلی‌لیتر ماده غذایی محاسبه و گزارش می‌شود.

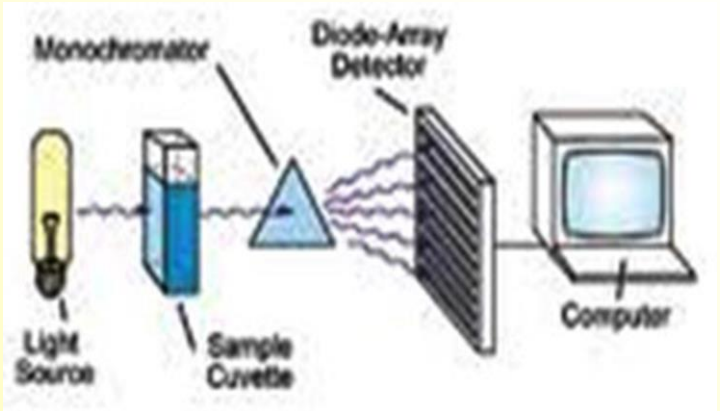
تمیز کردن لام شمارش: پس از پایان کار، لام را در ظرف آب قرار دهید. در صورتی که نمونه مورد بررسی روی لام خشک نشده باشد، تمیز کردن لام آسان خواهد بود. لام‌های شمارش آغشته به مواد چسبناک را در آب نگهداری نکنید. می‌توانید از یک شوینده به همراه دستمال نرم برای نظافت استفاده کنید. در ادامه لام را به خوبی شسته و در نهایت با آب مقطر آبکشی کنید. برای خشک کردن، لام را روی دستمال کاغذی به یک طرف قرار دهید.

اسپکتروفتومتری یا سنجش عبور نور

- برای کار با این دستگاه باید باکتری در محیط کشت مایع باشد. این دستگاه شامل یک منبع نوری، یک شبکه‌ی پراش برای پخش کردن نور به طول‌موج‌های تشکیل‌دهنده، ویال‌های شفاف (از جنس پلاستیک، شیشه و کوارتز بسته به نوع مصرف) با توانایی عبور نور نزدیک به صددرصد و یک آشکارکننده‌ی شدت نور عبوری می‌باشد .



- **برای سنجش مقدار سلول‌ها**
- مقدار مورد نیاز (معمولاً ۱ تا ۴ میلی‌لیتر) از سوسپانسیون باکتری‌ها در محیط کشت یا آب مقطر را در یک ویال شیشه‌ای می‌ریزیم. از مایع مورد استفاده در تهیه‌ی سوسپانسیون در ویال دیگری می‌ریزیم تا به عنوان شاهد استفاده شود. زیرا ممکن است درصدی از نور توسط ماده‌ی زمینه‌ای جذب شود.
- هر ماده‌ای طول‌موج ویژه‌ای را جذب می‌کند. بنابراین باید طول‌موج مخصوص به خودش را روی دستگاه تنظیم کرد.
- دستگاه با توجه به درصد نور عبوری و فرمول‌های محاسباتی که پیش‌تر در آن ذخیره شده است، عددی به ما می‌دهد که می‌توان با نمودارهای استاندارد مقایسه کرد و تعداد باکتری‌های موجود در واحد حجم را به دست آورد.



مواد و وسایل

- ۱- سمپلر
- ۲- لوپ
- ۳- محیط NA
- ۴- دستگاه اسپکتروفتومتر
- ۵-کووت
- ۶- لوله آزمایش
- ۷- باکتری نمونه
- ۸- لام توما
- ۹- میکروسکوپ

شرح آزمایش

- به منظور انجام ازمایش در یک ارلن ۱۰۰ میلی لیتری تلقیح باکتری را انجام داده و در محیط سترون ،بن ماری ۳۷ درجه قرار می دهیم و از یک ساعت بعد به صورت ۲ساعتی شمارش باکتری ها را به صورت اسپکتروفتومتری در جذب ۶۲۰ نانومترانجام داده در جدولی یاداشت کرده و در پایان نمودار زیر را برای این داده ها رسم می کنیم.
- همان طور که مشاهده می شود مراحل مختلف رشد باکتری در جدول زیر را می توان تشخیص داد .

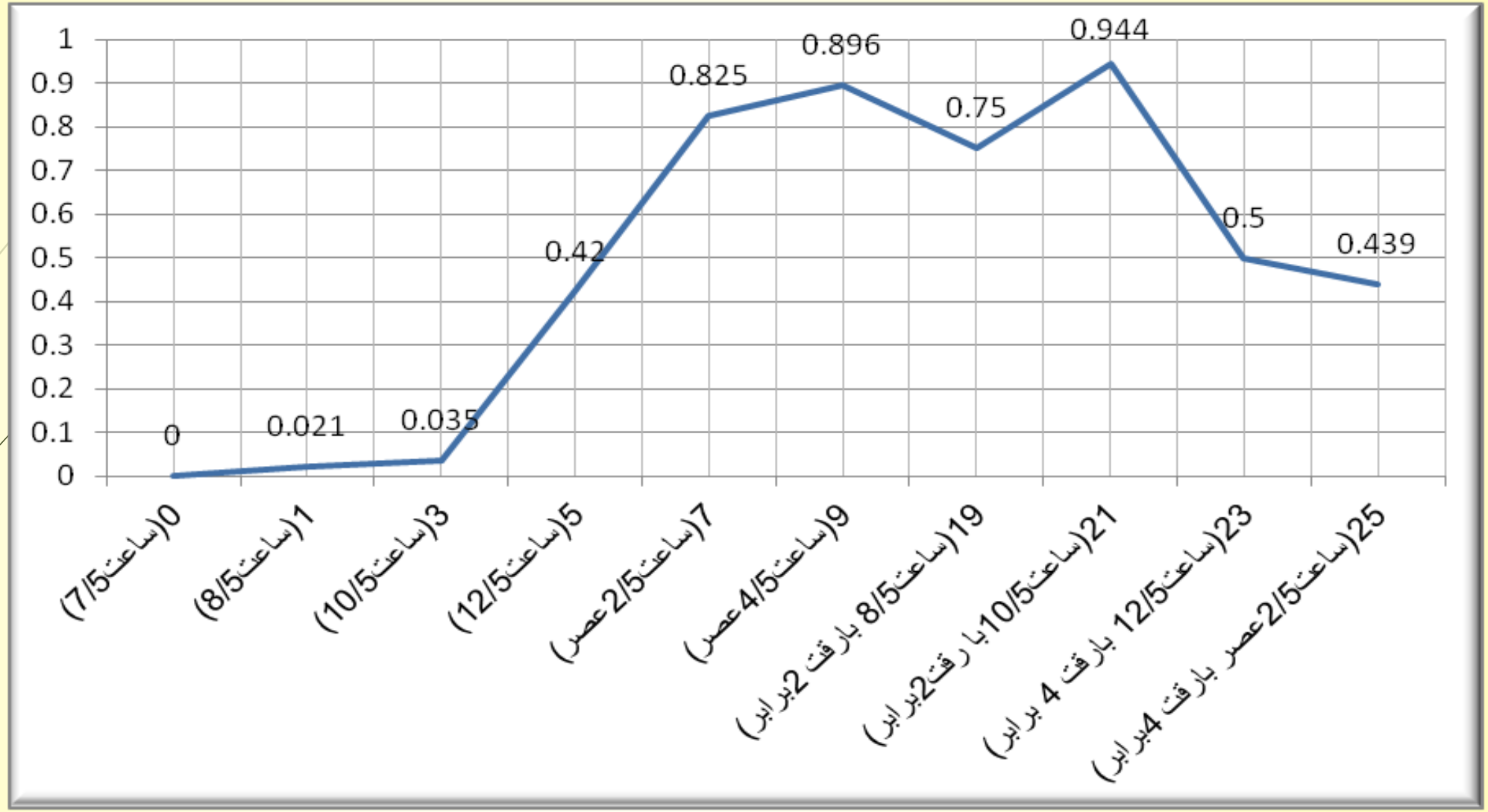
- در ادامه ۱۰۰ میکرو لیتر برای محاسبه کلنی کانت در پلیت ریخته و کشت چمنی می دهیم و در انکوباتور قرار داده به مدت ۲۴ ساعت سپس تعداد کلنی هارا محاسبه کرده نمودار را رسم می کنیم.

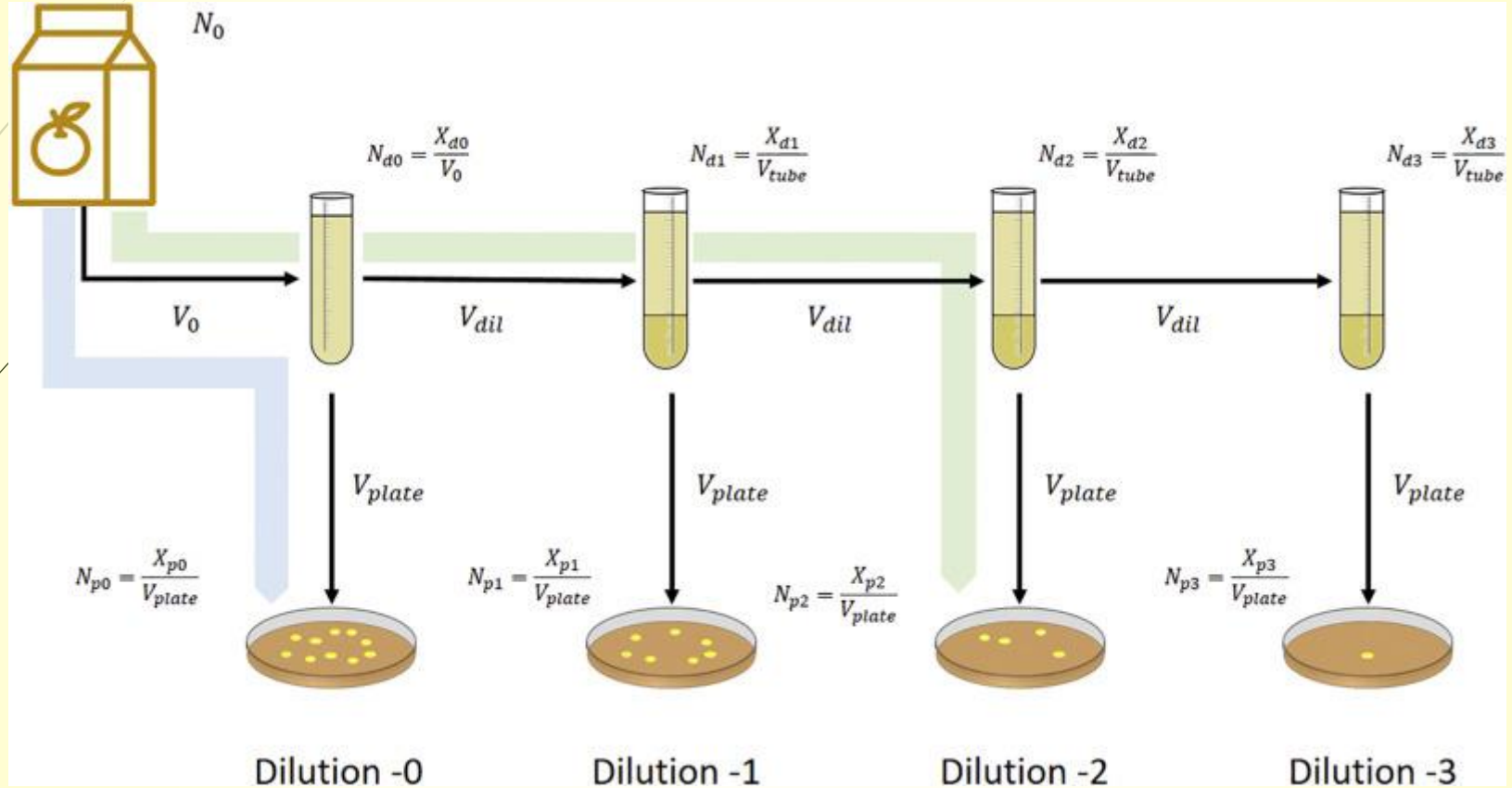
¤Number	¤Time	¤OD	¤Cell·Count
¤۱	¤7:30·AM	¤0	¤0
¤۲	¤9:30·AM	¤0	¤0
¤۳	¤11:30·AM	¤0.023	¤۷·در·مربع·۱۱·تایی¤
¤۴	¤1:30·PM	¤0.43	¤۱۰۴·در·مربع·۱۶· تایی¤
¤۵	¤3:30·PM	¤0.892	¤16·x·40·در·مربع· ۱۶·تایی¤
¤۶	¤7:30·AM	¤30·x·0.069	¤16·x·80
¤۷	¤9:30·AM	¤30·x·0.083	¤16·x·60
¤۸	¤11:30·AM	¤30·x·0.088	¤16·x·85
¤۹	¤1:30·PM	¤30·x·0.134	¤30·x·90
¤۱۰	¤3:30·PM	¤30·x·0.099	¤30·x·16·x·16

¶·

۳۰·ضرب·شده·در·OD··روز·دوم·ضریب·رقت·است.¶

¶


1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
0.021
0.035
0.42
0.825
0.896
0.75
0.944
0.5
0.439
(ساعت5/7)0
(ساعت5/8)1
(ساعت5/10)3
(ساعت5/12)5
(ساعت5/2عصر)7
(ساعت5/4عصر)9
(ساعت5/8 بارقت 2برابر)19
(ساعت5/10بارقت2برابر)21
(ساعت5/12 بارقت 4 برابر)23
(ساعت5/2عصر بارقت 4برابر)25


N_0
$N_{d0} = \frac{X_{d0}}{V_0}$
$N_{d1} = \frac{X_{d1}}{V_{tube}}$
$N_{d2} = \frac{X_{d2}}{V_{tube}}$
$N_{d3} = \frac{X_{d3}}{V_{tube}}$
V_0
V_{dil}
V_{dil}
V_{dil}
V_{plate}
V_{plate}
V_{plate}
V_{plate}
$N_{p0} = \frac{X_{p0}}{V_{plate}}$
$N_{p1} = \frac{X_{p1}}{V_{plate}}$
$N_{p2} = \frac{X_{p2}}{V_{plate}}$
$N_{p3} = \frac{X_{p3}}{V_{plate}}$
Dilution -0
Dilution -1
Dilution -2
Dilution -3

از حسن توجه شما سپاسگزارم
تهیه کننده : سهیلا عباسی