

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

تاریخ: ۱۴۰۳/۰۲/۰۲

شماره:

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی



اصفهان - کدپستی ۸۳۱۱۱-۸۴۱۵۶ - تلفن ۲۳۹۱۲۲۵۵ - دورنویس ۲۳۹۱۲۲۵۴

گزارش پروژه

مشاوره علمی در رابطه با نکات میکروبی مهم و نحوه صحیح شمارش کلونی‌ها، برای طراحی

دستگاه کلونی شمار خودکار و ارزیابی دقت دستگاه ساخته شده توسط

شرکت آداک الکترونیک پارتاک

مجری: دانشگاه صنعتی اصفهان

بهمن ماه ۱۴۰۲





فهرست مطالب

۳ مقدمه

۴ محیط کشت‌ها و باکتری‌های مورد استفاده در پژوهش

۴ نتایج ارزیابی دستگاه کلونی شمار خودکار ساخته شده توسط شرکت آداک الکترونیک پارتاک

۴ ۱- بررسی دقت دستگاه

۵ ۲- بررسی کلونی‌های موکونیدی و خشک

۵ ۳- شمارش بر روی محیط کشت‌های با رنگ‌های مختلف

۶ ۴- شمارش کلونی‌های با رنگ‌های مختلف

۷ ۵- بررسی حساسیت دستگاه به لکه‌های غیر از کلونی باکتری

پیوست ۱. روش انجام آزمایش و نتایج برای بررسی دقت دستگاه کلونی کانتر ساخت شرکت آداک الکترونیک

۸ پارتاک





تیم پژوهشی انجام پروژه

دکتری میکروبیولوژی- استادیار گروه صنایع غذایی دانشگاه صنعتی اصفهان Email: fanaei_2010@yahoo.com, fanaei.m@iut.ac.ir	مریم فنائی
کارشناسی ارشد رشته صنایع غذایی، گرایش زیست فناوری دانشگاه صنعتی اصفهان	زهرا رخصت‌زاده

مقدمه

شمارش تعداد میکروارگانیسم‌ها یکی از آزمایش‌های مهمی است که در علوم مختلف مانند تشخیص بیماری‌های انسانی، کنترل کیفیت مواد غذایی و ... کاربرد دارد. روش سنتی که برای این آزمایش استفاده می‌شود، شمارش دستی است که نیاز به زمان زیاد توسط کاربر داشته و خطاهای انسانی در آن دخیل می‌باشد. دستگاهی که بتواند این روند را تسهیل کند، می‌تواند باعث صرفه‌جویی در انرژی و نیروی انسانی شده و خطاهای مربوط به آزمایش را کاهش دهد.

این گزارش در ارتباط با مشاوره برای نکات میکروبی مهم در طراحی دستگاه کلونی کانتر و ارزیابی دستگاه ساخته شده توسط شرکت آداک الکترونیک پارتاک می‌باشد. در این راستا، پتری دیش‌هایی با تعداد کلونی متفاوت از باکتری‌ها تهیه شده و شمارش میکروبی باکتری‌ها توسط دستگاه کلونی کانتر انجام شد. در مرحله اول، پیشنهادهای از طرف تیم تحقیقاتی به این شرکت داده شد تا بر اساس آن دستگاه کلونی کانتر ارتقا داده شود. در ادامه، ارزیابی کارامدی دستگاه برای شمارش میکروبی انجام گرفت و شمارش کلونی‌ها با دستگاه و به صورت دستی انجام گرفته و با هم مقایسه شدند. در این مرحله، پارامترهایی نظیر دقت و حساسیت دستگاه برای شمارش کلونی‌های باکتریایی بر روی پتری دیش بررسی شدند. علاوه بر این، تاثیر رنگ کلونی‌ها، مورفولوژی کلونی‌ها (موکونیدی یا خشک) و رنگ محیط کشت بر روی شمارش با این دستگاه نیز ارزیابی شد.



بسمتعالی

تاریخ: ۱۴۰۳/۰۲/۰۲

شماره:

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی



اصفهان - کدپستی ۸۲۱۱۱-۸۴۱۵۶ - تلفن ۳۳۹۱۲۲۵۵ - دورنویس ۳۳۹۱۲۲۵۴

محیط کشت‌ها و باکتری‌های مورد استفاده در پژوهش

محیط کشت‌هایی که در این آزمون بررسی شدند: نوترینت آگار (NA) و انوزین متیلین بلو (EMB)

باکتری‌های استفاده شده در این پروژه: اشریشیا کلای، کلبسیلا، باسیلوس سابتیلیس

نتایج ارزیابی دستگاه کلونی شمار خودکار ساخته شده توسط شرکت آداک الکترونیک پارتاک

۱- بررسی دقت دستگاه

دستگاه کلونی کانتر مورد بررسی در این پژوهش طی دو مرحله توانست شمارش کلونی‌ها را انجام دهد که در ادامه در مورد آن توضیح داده می‌شود:

مرحله ۱: شمارش خودکار کلونی‌ها: بررسی‌های انجام شده نشان داد که این دستگاه می‌تواند با دقت ۸۸٪ کلونی باکتری‌ها را به صورت خودکار شمارش کند. در پیوست ۱ جزئیات آزمایش‌ها و نتایج آن‌ها توضیح داده شده است.

مرحله ۲: شمارش نیمه خودکار: این مرحله پس از شمارش خودکار انجام گرفت. در این مرحله تصویر پتری دیش بر روی صفحه‌ی دستگاه نمایش داده شد و کلونی‌هایی که شمارش شده بودند، با علامت نقطه بر روی آنها مشخص شده بودند. در این مرحله امکان تشخیص خطای دستگاه به صورت چشمی وجود داشت. که با کلیک کردن بر روی آنها، حذف یا اضافه‌ی کلونی‌های دلخواه امکان پذیر بود. با این روش، شمارش کلونی‌ها با دقت ۱۰۰٪ امکان پذیر شد. با توجه به اینکه امکان زوم کردن بر روی تصویر نیز وجود داشت، تصحیح خطاها به راحتی انجام گرفت.

لازم به ذکر است که شمارش خودکار هر کدام از پتری دیش‌ها سه مرتبه انجام شده و نتایج به صورت میانگین گزارش شده‌اند که نشان‌دهنده‌ی تکرار پذیری مناسب شمارش صورت گرفته توسط دستگاه نیز می‌باشد.





۲- بررسی کلونی‌های موکوئیدی و خشک

با توجه به اینکه باکتری‌ها مسیرهای متابولیکی مختلفی دارند، نوع محیط کشت می‌تواند در ساخته شدن مواد باکتریایی تاثیرگذار باشد. برای مثال، برخی از باکتری‌ها می‌توانند در محیط کشت‌های مشخصی کپسول تولید کنند. باکتری‌هایی که کپسول دارند، اغلب به صورت موکوئیدی دیده می‌شوند که کلونی آن‌ها در سطح پتری دیش پخش می‌شود. علاوه بر تولید کپسول، مواد دیگری نیز وجود دارد که می‌تواند باعث موکوئیدی شدن کلونی باکتری‌ها شود. در این صورت کلونی‌ها به صورت مرطوب و متورم در می‌آیند و گاهی حالت پخش شدگی بر روی پتری دیش پیدا می‌کنند. در این پروژه دو نوع محیط کشت مختلف انتخاب شد که با استفاده از آنها بتوان توانایی دستگاه برای شمارش کلونی‌های خشک و موکوئیدی را ارزیابی کرد. وقتی باکتری کلبسیلا بر روی محیط کشت EMB رشد می‌کند، کپسول‌های پلی ساکاریدی تولید کرده و کلونی‌های آن به صورت موکوئیدی دیده می‌شود. از این‌رو از این نوع باکتری و محیط کشت EMB در ارزیابی‌ها استفاده شد. برای بررسی کلونی‌های خشک، از محیط کشت نوترینت آگار استفاده شد که باکتری باسیلوس سابتیلیس بر روی آن کلونی‌های خشکی را ایجاد کرد. در این ارزیابی‌ها نشان داده شد که دستگاه می‌تواند کلونی‌های موکوئیدی و پخش شده بر روی پلیت را به صورت یک کلونی مجزا تشخیص داده و آن‌ها را به صورت صحیح شمارش کند.

۳- شمارش کلونی‌های باکتری‌ها بر روی محیط کشت با رنگ‌های مختلف

یکی از مشکلاتی که در شمارش باکتری‌ها از روی پتری دیش مطرح است، کم بودن تضاد رنگ محیط کشت و کلونی‌های باکتری‌ها است. در شمارش دستی کلونی‌ها، معمولا شمارش به این صورت می‌باشد که بدون باز کردن در پتری دیش، کلونی‌ها از سمت پشتی آن شمارش می‌شوند. در این حالت، هر کلونی با یک علامت مشخص می‌شود تا از شمارش مجدد آن جلوگیری شود. وقتی محیط کشت رنگی باشد، شمارش به روش ذکر شده امکان پذیر نیست و حتما باید در پلیت باز شود. در این صورت، علامت‌گذاری کلونی‌ها برای جلوگیری از شمارش مجدد آنها نیز با چالش روبرو است.





به منظور بررسی توانائی شمارش کلونی‌ها بر روی محیط کشت با رنگ‌های مختلف، در این پروژه از دو نوع محیط کشت با رنگ‌های شیری (NA) و قرمز (EMB) استفاده شد. با توجه به اینکه باکتری کلبسیلا بر روی محیط کشت EMB رنگ قهوه‌ای تا سیاه دارد، از این محیط کشت و باکتری به عنوان نمونه‌ای استفاده شد که تمایز رنگ کلونی‌ها با محیط کشت کم می‌باشد. در این حالت، شمارش کلونی‌ها از پشت پتری دیش نیز امکان پذیر نبود. بررسی‌های انجام گرفته با استفاده از دستگاه کلونی کانتز نشان داد که رنگ محیط کشت بر روی شمارش آن تاثیر نمی‌گذارد. کلنی کانتز طراحی شده امکان انتخاب زاویه نورپردازی (از بالا یا پایین) و همچنین تنظیم شدن روشنایی را دارا می‌باشد. با توجه به رنگ نمونه‌ی مورد نظر و بسته به شفاف بودن یا رنگی بودن محیط کشت، می‌توان برای افزایش دقت، زاویه‌ی نورپردازی مناسب را انتخاب نمود.

۴- شمارش کلونی‌های با رنگ‌های مختلف

به منظور بررسی تاثیر رنگ کلونی‌ها بر روش شمارش آنها با دستگاه کلونی کانتز، از محیط کشت‌هایی استفاده شد که کلونی‌های با رنگ‌های متفاوت بر روی آن ایجاد شود. رنگ‌های کلونی‌های ایجاد شده در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. رنگ کلونی‌های باکتریانی که در این پژوهش استفاده شدند، باکتری مربوطه و محیط کشت آن‌ها

محیط کشت		باکتری
EMB	NA	
سبز با جلای فلزی	سفید	اشریشیا کلای
قهوه‌ای تا سیاه	سفید	کلبسیلا
-	شیری	باسیلوس سابتیلیس

بررسی‌های انجام گرفته با استفاده از دستگاه کلونی کانتز نشان داد که این دستگاه می‌تواند کلونی‌های با رنگ‌های مختلف را

شمارش کند و رنگ کلونی تاثیری بر شمارش آن‌ها ندارد.



بِسْمِ تَعَالَى

تاریخ: ۱۴۰۳/۰۲/۰۲

شماره:

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی



اصفهان - کدپستی ۸۳۱۱۱-۸۴۱۵۶ - تلفن ۲۳۹۱۲۲۵۵ - دورنویس ۲۳۹۱۲۲۵۴

۵- بررسی حساسیت دستگاه به لکه‌های غیر از کلونی باکتری

بررسی‌های انجام گرفته برای شمارش کلونی باکتری‌ها با استفاده از دستگاه کلونی کانتر نشان داد که این دستگاه نمی‌تواند تمایزی بین کلونی و لکه‌هایی که با ماژیک بر روی شیشه‌ی پتری دیش کشیده می‌شود، قائل شود. برای شمارش کلونی‌ها شیشه‌ی پتری دیش باید عاری از لکه‌های مداخله‌گر باشد.





پیوست ۱. روش انجام آزمایش و نتایج برای بررسی دقت دستگاه کلونی کانتر ساخت شرکت آداک

الکترونیک پارتاک

در این پژوهش، بیش از ۱۵ پتری دیش کشت شده از نوع محیط Nutrient agar (رنگ روشن) و ۱۸ پتری دیش از نوع محیط EMB (رنگ تیره) مورد تست و ارزیابی قرار گرفت. باکتری‌ها به صورتی بر روی محیط‌ها کشت داده شدند که در پتری دیش‌ها ۲۰ تا ۳۰ کلونی وجود داشته باشد. تعداد کلونی‌ها به هر دو روش شمارش با دستگاه و شمارش دستی بررسی شده و نتایج آن با هم مقایسه شد.

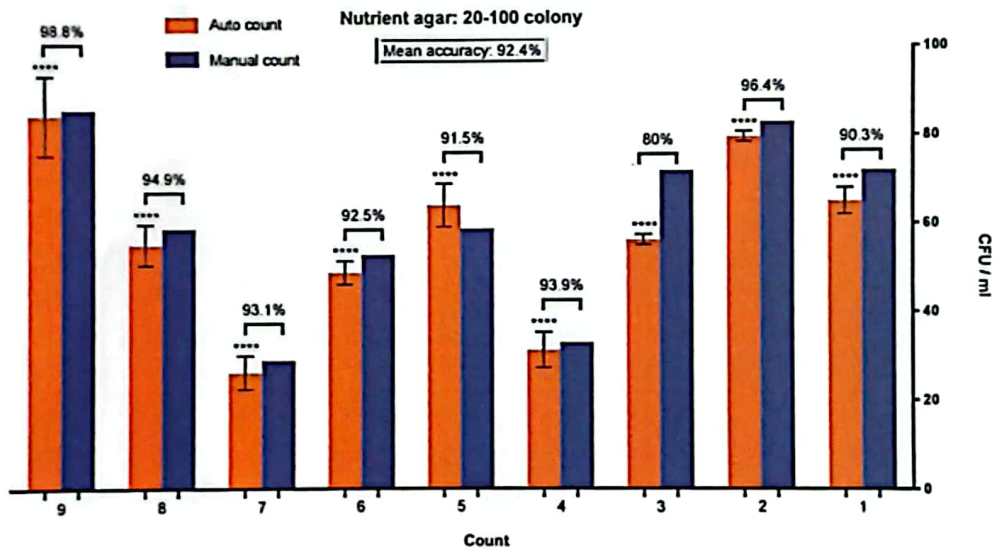
در جداول و تصاویر زیر نتایج حاصل از شمارش کلونی‌ها به صورت دستی و خودکار (توسط دستگاه) به تفکیک نوع نمونه کشت شده و تعداد کلونی در پتری دیش‌ها آورده شده است.





جدول ۲. میانگین دقت دستگاه در شمارش باکتری‌های کشت داده شده در محیط کشت Nutrient agar

۱۰۰ تا ۲۰	۳۰۰ تا ۱۰۱	تعداد کلونی‌ها
۹۲.۴٪	۸۰٪	دقت دستگاه
۸۶.۳٪		دقت کل




بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

تاریخ: ۱۴۰۳/۰۲/۰۲

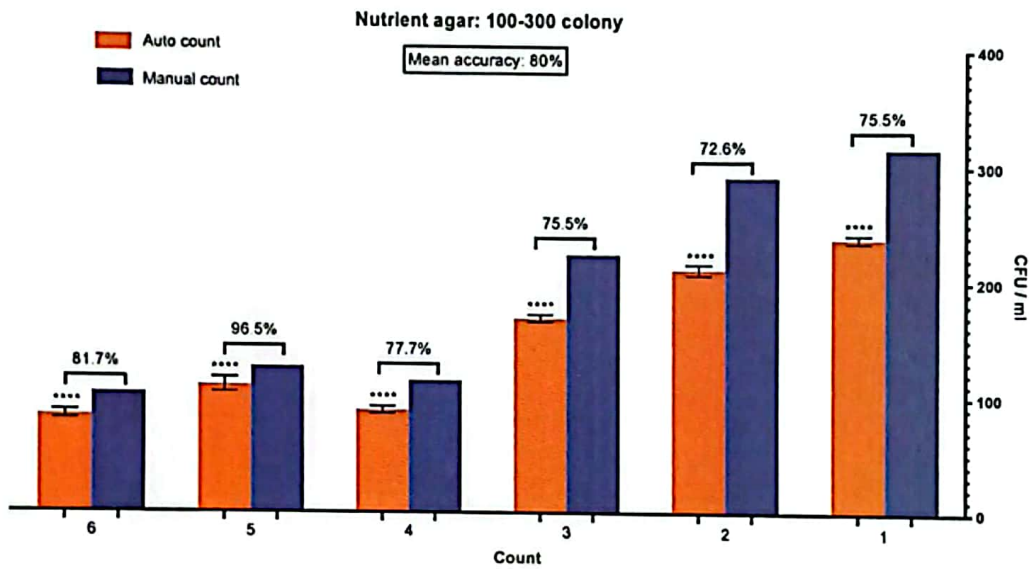
شماره:

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی



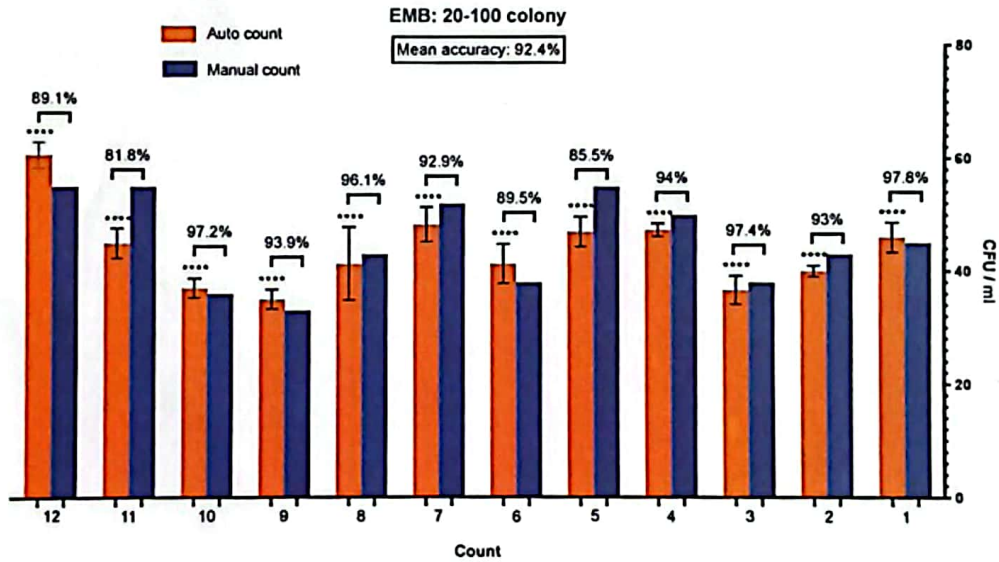
اصفهان - کدپستی ۸۳۱۱۱-۸۴۱۵۶ - تلفن ۲۳۹۱۲۲۵۵ - دورنویس ۲۳۹۱۲۲۵۴

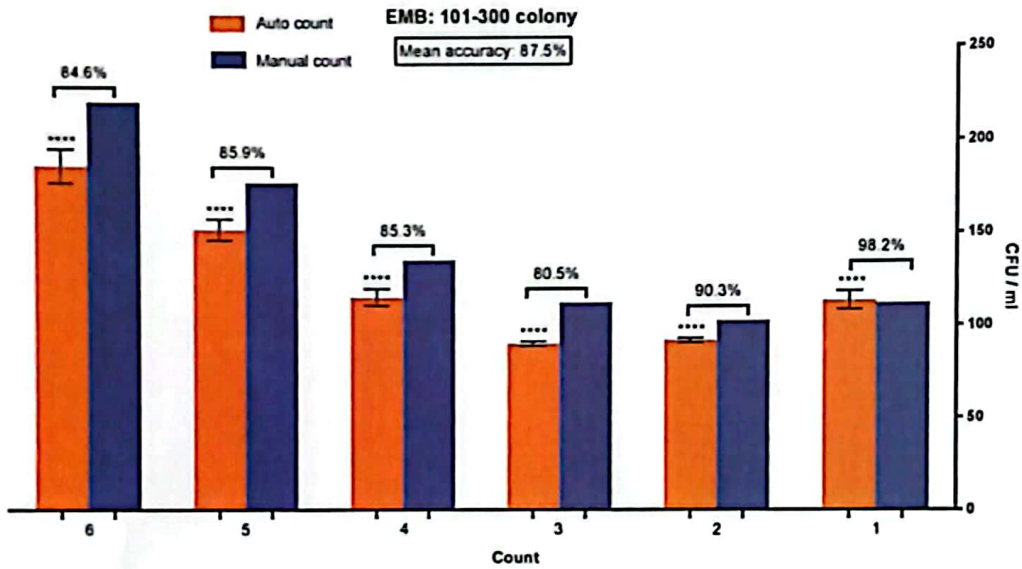




جدول ۳. میانگین دقت دستگاه در محیط کشت EMB

تعداد کل	تعداد بین ۱۰۱ تا ۳۰۰ عدد	تعداد بین ۲۰ تا ۱۰۰ عدد
دقت دستگاه	۸۷,۵٪	۹۲,۴٪
دقت کل	۸۹,۹٪	





با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت که در مجموع برای دستگاه فوق می‌توان دقت شمارش را ۸۸٪ در نظر گرفت. لازم به ذکر است که دستگاه قابلیت اصلاح شمارش خودکار (اضافه کردن کلونی‌های شمارش نشده و حذف موارد به اشتباه شمارش شده) را در اختیار کاربر قرار می‌دهد. بنابراین کاربر می‌تواند در صورت لزوم و با توجه به حساسیت کار، دقت شمارش با دستگاه را به ۱۰۰٪ برساند.





نمونه‌هایی از پتری‌های شمارش شده با دستگاه

