فصل پنجم

روش‌های کشت میکروارگانیسم‌ها

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

۱ــ روش پورپلیت یا استاندارد را برای شمارش باکتری‌های فعال انجام دهد.

۲ــ سایر روش‌های شمارش باکتری‌ها را انجام داده، آن‌ها را با یکدیگر مقایسه نماید.

۳ــ وسایل و تجهیزات آزمایشگاهی لازم برای شمارش میکروارگانیسم‌ها را شناسایی نماید.

۴ــ نمونه‌ای از مواد غذایی اطراف خود مانند آب آشامیدنی را مورد آزمون قرار دهید.

۵ــ روش‌های کشت بی‌هوازی باکتری‌ها را شرح دهد.

۵ــ روش‌های کشت میکروارگانیسم‌ها

۱ــ۵ــ کشت میکروارگانیسم‌های هوازی

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

۱ــ۱ــ ۵ ــ روش کشت پورپلیت یا استاندارد پلیت‌کانت[۱]:

این روش به‌طور 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 نیافته‌اند). در روش پورپلیت با توجه به رقت‌های مختلف تهیه شده از نمونه‌ی غذایی برای هر رقت ۲

۱ــ Standard plate count (SPC)

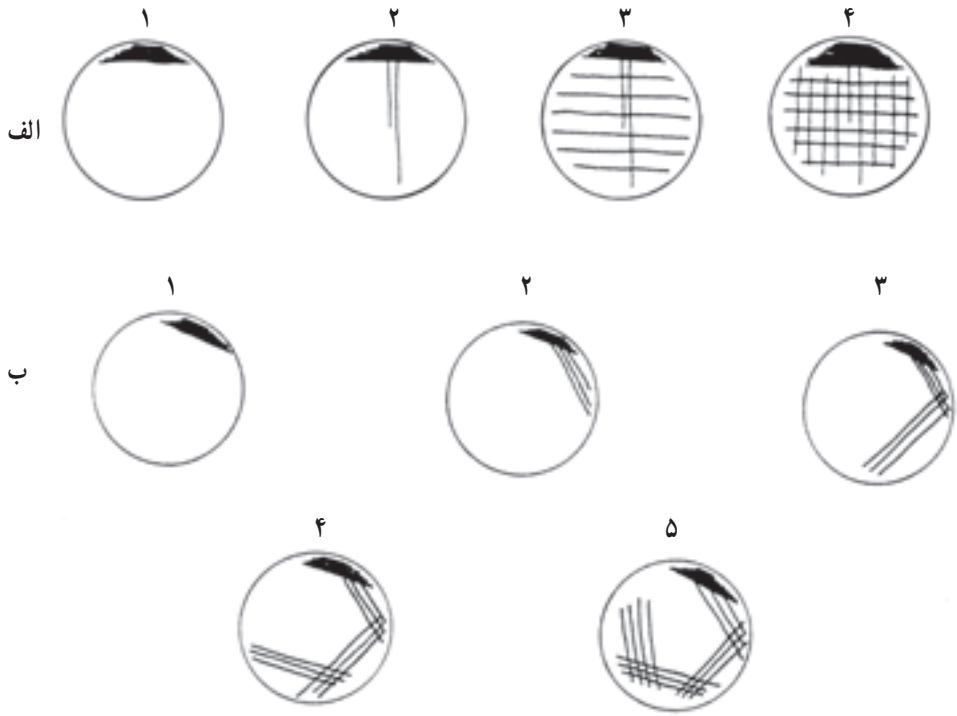
تا ۴ ظرف پتری اختصاص داده می‌شود و یک ظرف نیز به‌عنوان کنترل برای اطمینان از سترون بودن پلیت‌ها و محیط کشت درنظر گرفته می‌شود. روی ظروف پتری را با شماره‌ی نمونه، رقت و تاریخ آزمایش مشخص کرده، در هر دو یا چهار ظرف پتری از رقت مربوط، یک میلی‌لیتر قرار می‌دهند (می‌توان با یک پیپت از رقیق‌ترین لوله شروع کرده، هر بار پس از ریختن نمونه داخل ظرف پتری، پیپت را در رقت دوم خوب شستشو داد و از آن برداشت کرد) به این‌ترتیب با استفاده از یک پیپت، کلیه‌ی رقت‌ها به پلیت منتقل می‌شوند. محیط کشت مناسب ذوب و در حمام ماری ۴۵°C درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود پس از ریختن رقت‌های مختلف ماده غذایی به داخل پلیت، به هر ظرف حدود ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مذاب که دمای آن بیشتر از ۴۵°C نباشد اضافه می‌شود (در مورد باکتری‌های ترموفیل دمای محیط کشت می‌تواند بیشتر باشد) پس از آن بلافاصله در ظرف را بسته، آن را ۵ بار از عقب به جلو، ۵ بار در جهت حرکت عقربه‌های ساعت، ۵ بار از چپ به راست و بالاخره ۵ بار در جهت خلاف حرکت عقربه‌های ساعت به‌آرامی حرکت می‌دهند تا نمونه و محیط کشت بخوبی مخلوط شوند. کمی صبر کنید تا محیط ببندد. بعد، از محیط مایع که همچنان در حمام ماری نگهداری شده مقدار کمی روی هر پلیت می‌ریزند به‌طوری که لایه نازکی از محیط سطح پلیت را بپوشاند. درنتیجه‌ی این عمل از آلوده شدن سطحی جلوگیری می‌شود و همچنین تا اندازه‌ای شرایط بی‌هوازی برای نشان دادن حالات تخمیری برخی از باکتری‌ها ایجاد می‌گردد. پس از بسته شدن لایه دوم، پلیت را به‌طور واژگون در گرمخانه با توجه به درجه دما مناسب رشد باکتری مربوط قرار می‌دهند (باکتری‌های سرماگرا در ۵°C – ۰ و باکتری‌های مزوفیل ۳۷°C – ۲۵ و باکتری‌های گرمادوست در ۵۵°C) دمای انتخابی با توجه به هدفی که از شمارش باکتری مورد نظر است انتخاب می‌شود. در مورد غذاهایی که در حالت انجماد نگهداری می‌شوند دمای (۵ ــ ۰) و ۳۵°C هر دو را انتخاب می‌کنند تا ضمن شمارش باکتری‌های سرمادوست، میکروب‌های بیماری‌زا نیز مشخص گردند. ولی چنانچه هدف شمارش آلوده‌کننده‌های گرمادوست باشد که در کارخانه‌ها از راه پمپ‌ها و دستگاه‌ها وارد مواد غذایی می‌شوند باید دمای ۵۵ را انتخاب کرد. به هرحال انتخاب دما به دلیل اهمیتی که دارد باید درنتیجه آزمایش قید گردد. کشت‌ها را مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه نگهداری می‌کنند و پس از این مدت به کمک دستگاه پرگنه شمار، پرگنه‌های ظاهر شده در پلیت را که بین ۳۰۰ ــ ۰ پرگنه دارند می‌شمارند. ۲۴ ساعت دیگر ظروف را در گرمخانه قرار داده، پس از این مدت یک‌بار دیگر نیز تعداد پرگنه‌ها را می‌شمارند. میانگین تعداد پرگنه‌های شمارش شده در دو یا چهار پلیت با در نظر گرفتن رقت آن تعداد میکروارگانیسم‌های موجود در ماده‌ی غذایی را تعیین می‌کند. در ظرفی که به‌عنوان

کنترل سترون بودن درنظر گرفته شده نباید هیچ پرگنه ظاهر گردد. مدت گرمخانه‌گذاری در مورد باکتری‌های گرمادوست[1] و میان‌دمادوست[2] ۲۴ تا ۴۸ ساعت و در مورد سرمادوست‌ها[3] بیشتر می‌باشد ولی برای قارچها و مخمرها ممکن است یک هفته یا بیشتر ادامه یابد.

۲ــ۱ــ۵ ــ روش کشت سطحی: در این روش باید ظروف پتری حاوی محیط کشت تهیه شده باشند و سطح محیط با قراردادن آن‌ها در گرمخانه ۵۵°C – ۵۰ 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 به‌مدت ۴ ساعت در گرمخانه ۳۷°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 پتری را با شماره‌ی نمونه رقت و تاریخ کشت مشخص می‌کنند و پس از تهیه رقت‌ها، از رقیق‌ترین آن‌ها به کمک پیپت ۰/۱ میلی‌لیتری برداشت کرده، در سطح محیط می‌ریزند و بعد همان پیپت را در رقت بعدی که ۱۰ برابر بیشتر است سه بار شسته و ۰/۱ 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 ۹۰ درجه خم کرده، سترون می‌کنند). نحوه حرکت میله شیشه‌ای یا آنس پلاتین روی سطح محیط کشت باید به‌گونه‌ای 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 ۳۵±۱°C قرار داده، پس از ۲۴ ساعت ظروفی را که بین ۳۰۰ ــ ۰ 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.

۳ــ۱ــ۵ ــ روش کشت قطره‌ای: در این روش از پیپت‌های پاستور کالیبره که حجم قطرات آن‌ها مشخص می‌باشد استفاده می‌شود (پیپت‌هایی که ۲۰، ۲۵ یا ۴۰ قطره آن‌ها یک میلی‌لیتر است) ظروف پتری حاوی محیط کشت به‌همان ترتیب روش شمارش سطحی تهیه و سطح آن‌ها خشک می‌شود. سپس با ماژیک یا مداد روغنی ظروف پتری 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

۱ــ Termophylic ۲ــ Mesophylic ۳ــ Psychrophylic



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

اختصاص می‌دهند. (رقت 10^{-1}، 10^{-2} و 10^{-3} که نماینده‌ی رقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ می‌باشد) بدین‌ترتیب برای هر رقت دو تا چهار ظرف درنظر 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 نمونه‌ی ۱۰ 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 کم‌ترین رقت (10^{-1}) عمل می‌شود. پلیت را درحالی که درشان بسته است به همان وضعیت در گرمخانه قرار می‌دهند تا قطره‌های موجود در سطح محیط کشت خشک شوند. بعد آن‌ها را به‌طور واژگون (به منظور جلوگیری از تداخل قطرات در یکدیگر) مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه در حرارت مناسب با نوع آزمایش قرار می‌دهند. پس از این مدت پلیت را که حاوی حداکثر ۲۰ 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 بی‌هوازی اختیاری مانند کلستریدیوم پرفرنژانس 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 ژلوزخون‌دار که سطح آن با نئومایسین آغشته شده برای کلستریدیوم پرفرنژانس استفاده نمود.

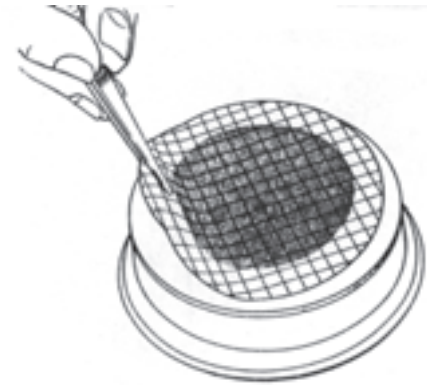
۴ــ۱ــ ۵ ــ روش اتوماتیک: برخی کارخانجات محیط‌های کشت آماده را، در ظروف مخصوص تهیه کرده‌اند که با فرو بردن آن‌ها در رقت معینی از نمونه و سپس قرار دادن در گرمخانه می‌توان با شمارش پرگنه‌های ظاهر شده، تعداد باکتری‌ها و حتی بعضی از انواع آن‌ها را تشخیص داد. همچنین دستگاه‌های خودکاری ساخته شده که از نمونه‌ی ماده غذایی رقت‌های مختلف (یک یا چند رقت) تهیه می‌کند و به وسیله‌ی سوزن مخصوص رقت تهیه شده را در سطح پلیت با روندِ 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 پزشکی برای شمارش گلبول‌های خون بکار می‌رود برای شمارش باکتری‌ها در مواد غذایی مانند شیر استفاده می‌شود.

۵ــ۱ــ ۵ ــ 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 کاغذها با قیف‌های 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 قطر 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 صحرایی 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

۱ــ Coulter Counter

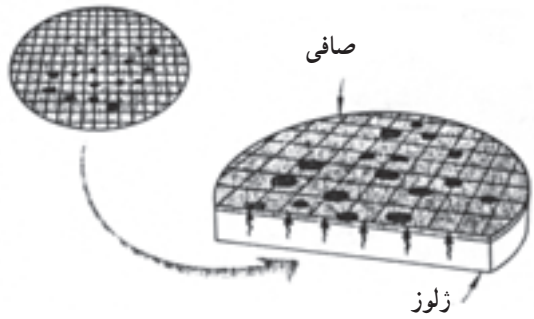
۲ــ کارخانه میلی‌پور آمریکا و سوتر آلمان

از صافی عبور داده می‌شود تا کلیه باکتری‌های موجود در آن حجم در منافذ کاغذ به دام بیفتند 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 $45^{\circ}C$ است پوشانده شود. سپس این ظرف گرمخانه‌گذاری شده پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تعداد پرگنه‌های 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 گذرانید سپس کاغذ صافی را در محیط کشت مایع قرار داد و پس از گرمخانه‌گذاری 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.



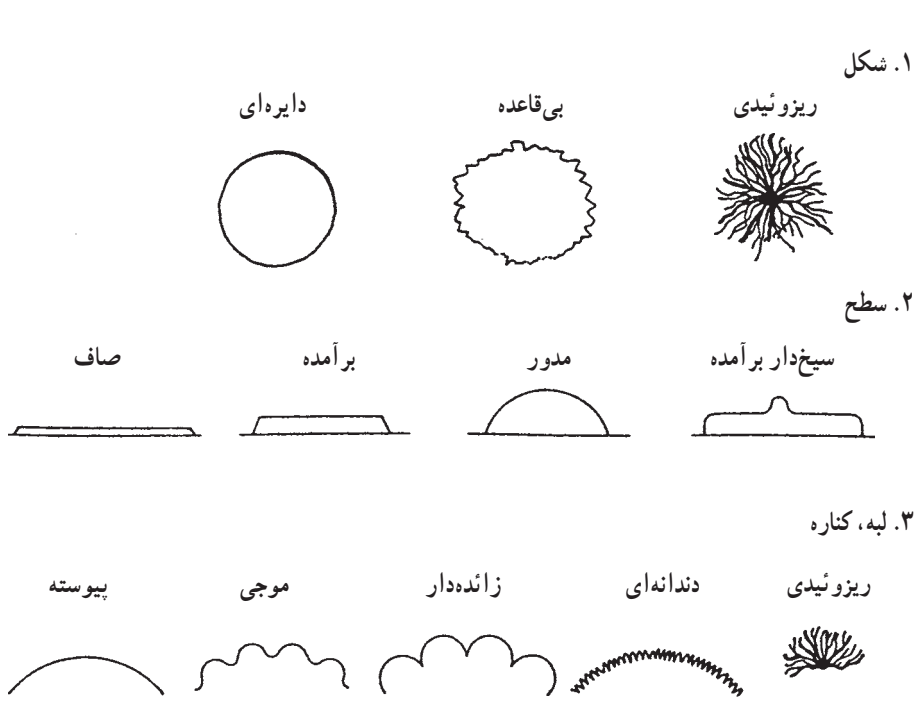
۱ــ برداشتن صافی از روی دستگاه صاف‌کننده

۲ــ گذاشتن صافی روی تشتک ژلوزدار



۳ــ انتشار مایع به‌طرف صافی

شکل ۲ــ۵ــ نمایش شمارش میکرو ارگانیسم‌ها به کمک صافی



شکل ۳ــ ۵ ــ شکل کلنی‌ها روی محیط جامد

۲ــ ۵ ــ روش‌های تأمین شرایط بی‌هوازی

۱ــ 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 خلأ خارج کرده و به جای آن گاز کربنیک یا ازت وارد می‌کنند.

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

برای ایجاد شرایط بی‌هوازی در این جار از بسته‌های تولید کننده‌گاز[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.

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

۱ــ Gaspak

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

مصرف بی‌هوازی شدن این نوع محیط‌های کشت متیلن‌بلو یا رزازورین[1] می‌باشد.

۴ــ استفاده از دسیکاتور و شمع : در مواردی که به روش‌های یاد شده دسترسی نباشد می‌توان از یک دسیکاتور و شمع یا گازپک برای ایجاد شرایط بی‌هوازی 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 بی‌هوازی مطلق ایجاد شود لازم است از گاز پک استفاده شود.

شکل ۴ــ۵ــ جار بی‌هوازی

۱ــ Resozurin

۳ــ۵ــ روش کشت بی‌هوازی

۱ــ لوله‌های حاوی تیوگلیکولات جوشانده و سردکرده را با میکروب بی‌هوازی تلقیح کنید.

۲ــ تمام کشت‌ها را در گرمخانه $37^{\circ}C$ بگذارید. در وقت بعدی آزمایشگاه آن‌ها را ملاحظه کنید. از روش گلوکز شیک 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 ۵ــ۵ــ رابطه بین تراکم اکسیژن و رشد میکروب‌ها در محیط جامد

فکر کنید و پاسخ دهید:

۱ ــ چرا اکسیژن محلول در آبگوشت تیوگلیکولات‌دار باعث وقفه در رشد میکروب‌های بی‌هوازی می‌شود؟

۲ ــ آیا دو نوع از کلستریدیوم‌های مختلف، در یک محیط یکسان، به یک شکل رشد می‌کنند؟

۳ــ چه ماده‌ای را اکسیدکننده‌ی قوی و چه ماده‌ای را احیاکننده قوی می‌نامند؟

۴ــ شرایط رشد باکتری‌های بی‌هوازی از نظر نیروی اکسیدوردوکسیون محیط چگونه است؟

۴ــ ۵ ــ 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 نئوبار[1] و یا لام توما[2] که برای شمارش گلبول‌های خون بکار می‌رود استفاده نمود. بدین‌ترتیب که نمونه مورد آزمایش به نسبت‌های

۱ــ Neubar ۲ــ Thoma

معین با آب مقطر و یا سرم فیزیولوژی و یا هر رقیق کننده‌ی مناسب دیگر، رقیق می‌شود (برای واضح‌تر دیدن میکروارگانیسم‌ها به مایع رقیق‌کننده 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 ۴۰ میکروارگانیسم‌ها را در حجم معینی (۰/۱ میلی‌متر مکعب یا بیش‌تر) شمارش می‌کنند و با توجه به رقت نمونه ــ تعداد میکروارگانیسم‌ها در هر گرم و یا سانتی‌مترمکعب ــ بدست می‌آید.

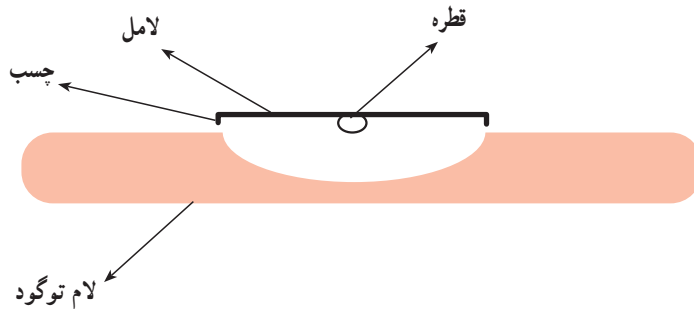
ب) سوسپانسیونی از مخمر که در زیر میکروسکوپ به وضوح قابل تشخیص‌اند و در محلول‌ها به‌خوبی به حالت تعلیق درمی‌آیند تهیه می‌شود و به روش فوق تعداد مخمرهای آن در میلی‌لیتر تعیین می‌گردد. سپس از این تعلیق با حجم مساوی به رقت‌های تهیه شده از نمونه غذایی می‌افزایند بنابراین در محلول به دست آمده تعداد مخمر یا دیاتمه به $\frac{۱}{۲}$ 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 به‌دست آورند تعداد باکتری‌ها در ماده‌ی غذایی به‌دست می‌آید.

۵ــ۵ ــ آزمون حرکت در باکتری

جهت آزمایش حرکت در باکتری‌ها بهتر است از کشت روی محیط نوترین برات یا آگار خوابیده 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 وازلین 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 درشت‌نمایی ۱۰۰

۱ــ Cavity slide



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

خودآزمایی

۱ــ روش مناسب برای شمارش میکروارگانیسم‌ها کدام است؟ توضیح دهید.

۲ــ چگونه می‌توان با یک پیپت از کلیه‌ی رقت‌ها، نمونه را به ظروف کشت منتقل کرد؟

۳ــ در روش شمارش استاندارد، درجه حرارت گرمخانه چگونه انتخاب می‌شود؟

۴ــ مدت گرمخانه‌گذاری برای باکتری‌ها و قارچ‌ها، پس از کشت، چگونه است؟ (در روش استاندارد)

۵ ــ تفاوت روش شمارش سطحی و استاندارد را بیان کنید.

۶ ــ مزایای روش شمارش قطره‌ای میکروارگانیسم‌ها چیست؟

۷ــ روش شمارش باکتری‌ها با کاغذ صافی چه مزایایی دارد و بیشتر در چه مواردی به‌کار می‌رود؟

۸ ــ روش مستقیم شمارش میکروارگانیسم‌ها را در مورد باکتری‌ها و مخمرها شرح دهید.

۹ــ کلیه‌ی روش‌های شمارش میکروارگانیسم‌ها را نام ببرید.

۱۰ــ چگونه می‌توان با جوشاندن محیط کشت اکسیژن آن را خارج نمود؟

۱۱ــ آیا می‌توانید به کمک یک شمع محیط بسته‌ای را فاقد اکسیژن نمایید؟ چگونه؟

۱۲ــ مراحل کشت بی‌هوازی باکتری‌ها را شرح دهید.