

آزمون‌های میکروبی مواد غذایی

معیارهای گزینش روش‌های آزمایشگاهی

- انتخاب روش آزمون چه میکروبی و چه شیمیایی و فیزیکی به عوامل گوناگونی بستگی دارد که مهم‌ترین آنها عبارتند از :
- ✓ **دقت**^۱ : عبارت است از یکسان بودن داده‌های به دست آمده از چند اندازه‌گیری پشت سر هم که توسط یک پژوهشگر یا کارشناس انجام شده یا اندازه‌گیری‌های انجام شده توسط پژوهشگران مختلف با استفاده از یک روش یکسان یا یک ابزار یکسان
 - ✓ **تکرارپذیری یافته‌ها**^۲ : توانایی دستیابی به پاسخ‌های مشابه توسط پژوهشگران یا کارشناسان آزمایشگاه‌های مختلف با استفاده از روش آزمون ثابت
 - ✓ **صحت**^۳ : بیانگر میزان توانایی و صحت روش برای اندازه‌گیری آنچه قصد تعیین آن می‌رود می‌باشد؛
 - ✓ **سادگی**^۴ : روش به نحوی که نیازی به دستگاه‌های پیچیده و گران قیمت یا تخصص‌های بالا نداشته باشد.
 - ✓ **اقتصادی**^۵ بودن روش : و به عبارت دیگر پایین بودن هزینه آزمون شامل محیط‌های کشت و مواد شیمیایی مصرفی و نیروی انسانی
 - ✓ **سرعت عمل**^۶ : منظور زمان لازم برای انجام آزمون از ابتدا تا بدست آمدن نتیجه تجزیه و تحلیل یافته‌هاست.
 - ✓ **حساسیت**^۷ : عبارت است از تابعیت روش مورد استفاده در تشخیص و تعیین مقدار مواد یا تعداد میکروارگانیسم‌ها به مقدار کم یا تعداد کم
 - ✓ **اختصاصی بودن روش**^۸ : عبارت است از توانایی تشخیص و تعیین مواد یا باکتری‌های ویژه در مجاورت مواد یا باکتری‌های مشابه بدون مداخله منفی
 - ✓ **ایمنی**^۹ : کار با پاره‌ای از مواد شیمیایی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا یا عامل مسمومیت‌های غذایی برای هنرآموزان

۱- Precision

۲- Reproducibility

۳- Accuracy

۴- Simplicity

۵- Economy

۶- Speed

۷- Sensitivity

۸- Specificity

۹- Safety

و هنرجویان ممکن است خطرناک باشد. به همین جهت ایمنی یکی از معیارهای گزینش در روش‌های آزمون میکروبی مواد غذایی است.

✓ رسمیت داشتن^۱: عبارت است از پذیرفته شدن یا مورد تأیید بودن روش توسط سازمان‌های معتبر جهانی و ملی مهم‌ترین سازمان‌های معتبر جهانی برای این منظور عبارتند از:
الف) کمیسیون جهانی تعیین ویژگی‌های میکروبی مواد غذایی

International Commission for Microbiological Specification of Foods

ب) کمیته ملی - مشورتی معیارهای میکروبی مواد غذایی

National Advisory Committee for Microbiological Criteria for Foods, NACMCF

پ) سازمان جهانی استاندارد

International Standard Organization, ISO

ت) کمیسیون کودکس مواد غذایی (مشترک سازمان جهانی بهداشت و سازمان جهانی خواربار و کشاورزی)

و مهم‌ترین سازمان‌های ملی معتبر در این مورد:

الف) سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی وابسته به وزارت صنایع

ب) اداره کل نظارت بر صنایع غذایی وابسته به وزارت بهداشت

۱-۸ - آزمون‌های میکروبی آب

بیشتر آزمایش‌هایی که روی آب انجام می‌گیرد به منظور تعیین قابلیت شرب آن است. باکتری‌های موجود در آب به سه گروه

تقسیم می‌شوند:

- باکتری‌های آبی طبیعی

- باکتری‌های خاکزی

- باکتری‌های دستگاه گوارش انسان یا جانوران

بیشتر باکتری‌های ساکن آب، گرم منفی هستند مانند سودوموناس^۲، کروموباکتریوم^۳، پروتئوس^۴، آکروموباکتر^۵، استریتوکوکوس^۶،

آئروباکتر^۷، سائیتوفاگا^۸ و استتوباکتر^۹. البته باکتری‌های گرم مثبت مانند میکروکوکوس^{۱۰} و باسیلوس^{۱۱} نیز به تعداد کم در آب یافت

می‌شوند.

۱- Official approval

۲- Pseudomonas

۳- Chromobacterium

۴- Proteus

۵- Achromobacter

۶- Streptococcus

۷- Aerobacter

۸- Cytophaga

۹- Acenetobacter

۱۰- Micrococcus

۱۱- Bacillus

یادآوری: دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی با شرایط محیطی آبی بیشتر سازگاری دارد.

بسیاری از ارگانسیم‌های آبی در محیط‌های استاندارد معمولی مانند آگار مغذی و یا پلیت کانت آگار رشد نمی‌کنند. باکتری‌های خاکزی نیز از راه شستشوی زمین توسط آب باران وارد آب‌های سطحی می‌گردند. گرچه پس از بارندگی شدید، آبی که به رودخانه وارد می‌شود دارای تعداد زیادی باکتری خاکزی است ولی آب رودخانه‌های جاری دارای بیشینه تعداد باکتری حدود ۱۰۰ عدد در هر میلی لیتر هستند. ورود پساب‌ها و پسماندهای جامد صنعتی به آب باعث آلودگی زیاد آب‌های سطحی می‌گردد. شمارش باکتری‌ها در آب رودخانه‌های آلوده بین ۱۰۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰ باکتری در هر میلی لیتر است و آب دریاچه‌های غیر آلوده دارای حدود ۱۰۰ باکتری یا کمتر در هر میلی لیتر هستند. در بررسی‌های مواد غذایی و آب آنالیز نمونه‌ها برای باکتری‌های بیماری‌زا بسیار سخت و وقت گیر است. بنابراین جهت ارزیابی وضعیت آلودگی میکروبی آب، ارگانسیم‌های شاخص^۱ شناسایی می‌گردند.

میکروارگانسیم‌های شاخص به تعداد زیادتری نسبت به بیماری‌زها وجود دارند و تشخیص آنها راحت‌تر است. به علاوه این باکتری‌ها ویژگی‌های زیستی مشابهی با بیماری‌زها دارند. معروف‌ترین ارگانسیم‌های شاخص کلی فرم‌ها^۲ هستند که شاخص گروه ارگانسیم‌های گرم منفی روده‌ای یا خانواده آنروباکتریاسه هستند که بیشتر در روده حیوانات خون گرم یافت می‌شوند. به دلیل اینکه باکتری‌های زیادی که آلوده‌کننده مواد غذایی نیز هستند در خانواده آنروباکتریاسه قرار دارند و از دستگاه گوارش جدا شده‌اند، حضور تعداد بالای کلی فرم‌ها می‌تواند معرف حضور بیماری‌زهای روده‌ای دیگر باشد. آلودگی آب با یک منشأ مدفوعی باعث ورود میکروارگانسیم‌های روده‌ای مانند اشریشیا کلی^۳، استریتوکوکوس فکالیس^۴، کلستریدیوم پرفراژانس^۵ و نیز باکتری‌های بیماری‌زای روده‌ای مانند سالمونلا^۶ و شیگلا^۷ است که گاهی این باکتری‌ها مدت طولانی می‌توانند در آب زنده بمانند. برای تعیین قابلیت آشامیدن آب لازم است که از عدم آلودگی آب به میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا که در بالا گفته شد اطمینان حاصل شود. از آنجایی که اگر باکتری‌های بیماری‌زای روده‌ای در آب زیاد باشند، تعداد باکتری‌های گفته شده نیز که به طور طبیعی ساکن روده هستند، زیاد خواهند شد بنابراین بهتر است آب را از نظر این باکتری‌ها مورد آزمایش قرار داد. از طرفی چون تعداد استریتوکوکوس فکالیس در روده کمتر از اشریشیاکلی است، بنابراین تشخیص اشریشیاکلی ارزش بیشتری دارد و حضور آن در آب نشانه آلودگی آب به یک منشأ مدفوعی است که به تازگی رخ داده زیرا این باکتری مدت طولانی در آب زنده نمی‌ماند. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که اشریشیاکلی قادر است تا حدود ۲۸ روز در آب زنده بماند. کلستریدیوم ولشای یا پرفراژانس مدت طولانی تری در آب زنده می‌ماند و چون باکتری بی‌هوازی است نشان‌دهنده آلودگی چاه‌های عمیق است.

۱-۸- نمونه برداری: اولین مرحله، برای آزمون‌های میکروبی آب آشامیدنی نمونه برداری است. بنابراین هدف از این قسمت آشنایی با روش‌های معمول نمونه‌گیری آب است و هدف از نمونه‌گیری به دست آوردن قسمت کوچکی از آب است که باید نمایانگر ویژگی‌های واقعی منبع اصلی آن باشد و چند عامل به شرح زیر در آن دخالت دارد:

— مکان نمونه‌گیری

۱- Indicator

۲- Coliform

۳- Escherichia coli

۴- Streptococcus fecalis

۵- Clostridium perfringens

۶- Salmonella

۷- Shigella

– زمان و تناوب نمونه گیری

– حفظ و نگهداری نمونه به صورت ثابت تا زمان انجام آزمون

محل نمونه برداری باید به گونه‌ای انتخاب گردد که نمونه برداشته شده از آن محل، نشان دهنده ویژگی‌های کل آب مورد نظر باشد. برای نمونه کیفیت آب در انتهای قسمت خروجی مخازن نگهداری آب با آب قسمت ورودی متفاوت است. در هر روش نمونه‌گیری موارد زیر باید به کار رود:

– نمونه‌ها باید نمایانگر وضعیت موجود در نقطه نمونه گیری باشد.

– حجم نمونه‌ها باید در حدی باشد که تکرارهای مورد نظر آزمون میسر گردد.

– نمونه‌ها باید به گونه‌ای جمع‌آوری، بسته‌بندی و جا به جا شوند که پیش‌بینی و مراقبت‌های لازم جهت عدم تغییر در ترکیبات و ویژگی‌های آن تا مرحله اجرای آزمون‌ها صورت پذیرد.

● **ظرف‌های نمونه برداری:** برای نمونه برداری از آب باید از ظرف‌های تمیز و سترون شده استفاده شود. برای نمونه برداری به روش غوطه‌وری ظرف نمونه‌گیری در آب رود خانه‌ها و دریاچه‌ها باید از بطری‌هایی استفاده نمود که قسمت داخلی و بیرونی آن سترون باشد. برای خشک و سترون نگهداشتن ظرف‌ها پس از سترون‌سازی از کاغذ، کاغذ آلومینیومی و یا کیسه‌های پلاستیکی استفاده می‌شود. به طور کلی این ظرف‌ها باید دارای ویژگی‌های زیر باشند:

الف) بسته‌های پلاستیکی خشک (پلی اتیلنی) که به دلیل نشکن بودن نسبت به ظرف‌های شیشه‌ای برتری دارند.

نکته: کاربرد ظرف‌های با مواد غیراستاندارد به دلیل چسبندگی سطحی باعث اختلال در شناسایی میکروارگانیسم‌ها می‌شود.

ب) برای ظرف‌های شیشه‌ای درپوش‌دار باید از نوع سنباده‌ای یا پلاستیکی استفاده شود و برای ظرف‌های پلاستیکی درپوش‌های پلاستیکی فشاری مناسب است.

نکته‌ها

✓ از درپوش‌های فلزی یا پلاستیکی می‌توان برای هر دو نوع ظرف استفاده نمود.

✓ قسمت بیرونی در ظرف‌هایی که دارای درپوش سنباده‌ای یا پلاستیکی هستند باید با استفاده از کاغذ آلومینیومی از آلودگی حفظ شوند.

✓ درپوش‌های فلزی ممکن است هنگام سترون‌سازی ظرف‌ها در اتوکلاو و آون، مواد سمی ایجاد کنند.

✓ بهتر است از بطری‌هایی که دارای درپوش پلاستیکی فشاری متصل به بطری هستند استفاده شود، زیرا نسبت به نشستی شدن

مقاوم هستند و هنگام باز کردن درپوش، در متصل به بطری باقی مانده و ضمن نگهداشتن در و بطری با هم نیز از آلودگی محافظت می‌شود.

پ) ظرف‌های جابه‌جایی نمونه که جهت انجام آزمون‌های میکروبیولوژی به کار می‌روند باید ابتدا سترون شوند. در صورتی که

بطری‌ها برای بار دوم مورد استفاده قرار می‌گیرند پس از تمیز کردن بطری شیشه‌ای و درپوش آن با استفاده از مواد پاک‌کننده لازم است آن را با آب مقطر آب‌کشی و سپس سترون نمود.

نکته‌ها

✓ درپوش بطری‌ها را باید هنگام اتوکلاو کردن شل بست ولی پس از سترون‌سازی آنها را محکم نمود. بطری‌های خالی را

باید در آون با دمای خشک 170°C به مدت ۱ ساعت قرار داده و سترون نمود.

✓ در صورتی که سترون‌سازی با هیچ‌یک از روش‌های بالا امکان‌پذیر نباشد، باید ظرف‌ها و درپوش آنها را با غوطه‌وری در

آب در حال جوش به مدت ۳۰ دقیقه سالم‌سازی نمود و در کاغذ تمیز پیچید. برای ظرف‌هایی که با استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده

سالم‌سازی و نگهداری می‌شود، انجام آزمون‌های سترونی توصیه می‌شود. سترونی بطری‌ها با کنترل فرایند سترون‌سازی تضمین می‌شود در غیر این صورت آزمون سترونی ظرف‌ها باید انجام شود.

✓ بطری‌های پلی اتیلنی را می‌توان با قرار دادن در معرض گاز اتیلن سترون کرد. البته به دلیل سمی بودن این گاز کلیه کارهای سترون‌سازی باید با رعایت مسایل بهداشتی و ایمنی ویژه انجام شود و زمانی برای حذف گاز اتیلن در نظر گرفته شود.

ت) برای انجام آزمون‌های میکروبی آب گندزدایی شده با اکسید کننده‌های کلر و برم یا ازن، فعالیت این گازها را باید بلافاصله پس از نمونه برداری خنثی نمود. برای این منظور از ماده احیاء کننده تیوسولفات سدیم استفاده می‌شود.

از نظر تئوری مقدار تیوسولفات سدیم لازم برای غیر فعال سازی یک میلی گرم کلر ۷/۱ میلی گرم است. بنابراین مقدار ۰/۱ میلی لیتر (دو قطره) از محلول تیوسولفات سدیم را به ظرف با گنجایش ۱۰۰ میلی لیتر اضافه می‌کنند. این مقدار باعث خنثی سازی

حداقل ۲-۵ میلی گرم بر لیتر کلر باقی مانده می‌شود که برای بیشتر نمونه‌های آب کافی است.

نکته: تیوسولفات توسط گرمای خشک و مرطوب از بین نمی‌رود و اثر سویی نیز روی نمونه ندارد.

● وسیله‌های مورد نیاز در نمونه برداری از آب

➤ شعله گاز

➤ بشر

➤ فندک، کبریت

➤ مارکر، قلم، برچسب

➤ آچار، آچار پیچ گوشتی، انبردست و چاقو

➤ ظرف یخ یا قالب یخ، کیسه یخ و بسته‌های یخ مصنوعی

➤ یخچال قابل حمل و نقل و یا وسیله نقلیه یخچال‌دار

➤ دماسنج یا ثبت کننده دما

➤ حامل بطری دارای کیسه شن با طناب یا زنجیر که حداقل در قسمت انتهایی از جنس فولاد زنگ نزن باشد.

➤ انبرک یا گیره بلند یا وسیله نمونه برداری قابل تنظیم برای عمق‌های مختلف آب

➤ نقشه محل نمونه برداری، فهرست نقاط نمونه برداری، برگه نمونه برداری

➤ چکمه ایمنی و ضد آب

➤ دستکش سترون

● روش‌های نمونه گیری:

الف) نمونه گیری از شیر آب یا پمپ آب: هدف از نمونه‌گیری از شیر آب تعیین کیفیت آب در شبکه اصلی توزیع آب، تعیین کیفیت آب در شبکه توزیع هنگام خارج شدن از شیر که ممکن است توسط شبکه داخلی ساختمان تغییر کرده باشد. نمونه برداری از مخزن‌های آب آشامیدنی به وسیله شیر در قسمت خروجی انجام می‌شود. نمونه‌هایی که برای ارزیابی کیفیت در شبکه اصلی توزیع برداشته می‌شود بهتر است از شیرهای مخصوص که بدون اتصالات و نزدیک به شبکه اصلی توزیع آب است و قابلیت گندزدایی با شعله را نیز دارد باشد.

بسته به هدف نمونه برداری، برداشتن اتصالات شیر، گندزدایی شیر و خروج آب از شیر هم ممکن است لازم باشد و هم ممکن است، نادرست باشد. (به جدول ۱-۸ مراجعه شود)

نکته‌ها

- ✓ نمونه برداری باید در شرایط استریل و با دست تمیز و ضد عفونی شده و یا دستکش سترون انجام شود.
- ✓ هنگام پر کردن بطری، قسمت داخلی درپوش نباید با انگشت، دهان و زمین تماس حاصل کند. پس از نمونه‌گیری باید به سرعت درپوش بطری را بست.
- ✓ به منظور به دست آوردن یک نمونه نمایانگر ویژگی‌های اصلی منبع آب، شیر جریان آب را باید به مدت ۱ تا ۲ دقیقه باز کرد.
- **آب در تصفیه‌خانه و مخازن ذخیره:**
- در مخازن ذخیره و تصفیه‌خانه‌ها، نمونه‌های خاص باید از شیرهای تعبیه شده در قسمت خروجی اصلی و سایر نقاط نمونه برداری شود. برای نمونه برداری از شیرهایی که قابل سترون‌سازی با شعله باشد، استفاده می‌شود.

جدول ۱-۸ - نمونه برداری از شیر برای اهداف مختلف

هدف	نوع آب	برداشت اتصالات	گندزدایی	خروج آب از شیر
الف	در شبکه توزیع	بله	بله	بله
ب	در هنگام تحویل به شیر	بله	بله	خیر
پ	در هنگام مصرف	خیر	خیر	خیر

این شیرها همچنین باید تمیز، برچسب گذاری شده و مخصوص نمونه برداری باشد. برای آگاهی بیشتر به استاندارد ملی ایران در این زمینه مراجعه شود.

ب) آب در شبکه اصلی توزیع: برای تعیین کیفیت آب در شبکه اصلی توزیع، نمونه از قسمت اصلی و یا نزدیک به آن پس از کنتور آب برداشته شود. برای این منظور باید دقت شود که آلودگی سطح خارجی شیر به نمونه منتقل نشود. در صورت امکان باید از نمونه برداری از شیرهایی که چکه می‌کنند و شیرهای مخلوط خودداری شود. همچنین هرگونه افشانک متصل به شیر باید با استفاده از آچار و انبردست خارج شود. هرگونه کثیفی مانند پوسته، لزجی و چربی یا سایر مواد خارجی نیز باید از روی شیر پاک شده و شیر را چندین بار به طور کامل باز و بسته کرد تا هرگونه کثیفی از شیر به طور کامل برطرف شود. سپس نمونه برداری انجام گیرد.

نکته‌ها

- ✓ شیر را باید به وسیله شعله گندزدایی کرد. پس از شعله دادن و باز کردن شیر، صدای ناشی از حرارت شنیده می‌شود. تنها زمانی که گرمادهی شیر امکان پذیر نیست، می‌توان از روش‌های دیگری برای گندزدایی استفاده نمود.
- ✓ برای گندزدایی دهانه شیرهای پلاستیکی، پس از تمیز کردن کامل، باید آن را به مدت ۲ تا ۳ دقیقه در بشر دارای محلول هیپوکلریت، الکل یا ایزوپروپانول فرو برد. سپس شیر را باز کرده تا آب خارج شود و درجه حرارت آب به حد ثابتی برسد. پس از آن باید با برداشتن درپوش، بطری را زیر جریان آب قرار داده و در شرایط اسپتیک آن را پر کرد.
- ✓ به عنوان روش جایگزین برای گندزدایی قسمت‌های خارجی و تا حد امکان قسمت‌های داخلی شیر باید از یک سواب یا یک بطری دارای مواد شیمیایی سترون کننده یا وسیله مشابه استفاده نمود.

پ) آب در شیر مصرف کننده: برای تعیین کیفیت آبی که به شیر مصرف کننده تحویل داده می‌شود، باید دقت شود تا آلودگی از سطح خارجی ظرف به نمونه منتقل نشود. باید هرگونه کثیفی، لزجی، پوسته، چربی و سایر مواد خارجی را که ممکن است وارد نمونه شود، از شیر برطرف کرد.

نکته‌ها

✓ از شیرهایی که چکه می‌کنند، نمونه برداری نمی‌شود.
✓ هنگام نمونه برداری هرگونه افشانک یا سایر اتصالات شیر باید از آن جدا شود.
✓ شیر باید بوسیله شعله گندزدایی شود.
✓ پس از گندزدایی، آب باید به اندازه‌ای جریان یابد تا هیچ‌گونه اثری از ماده گندزدا باقی نماند. سپس بطری‌ها را بدون بستن و باز کردن دوباره شیر آب، زیر شیر قراردادده شود.

ت) آب هنگام مصرف: برای تعیین کیفیت آبی که مصرف می‌شود و برای نمونه برداری در موارد شیوع بیماری، آلودگی آب توسط باکتری‌ها از راه قسمت‌های خارجی شیر و سایر اتصالات به شیر هم در نظر گرفته می‌شود. بنابراین در این موارد اتصالات شیر نباید پیش از نمونه برداری گندزدایی شود.

ث) آب چشمه و چاه: آزمون آب چاه با هدف‌های گوناگون انجام می‌شود:

الف) آگاهی از کیفیت سفره آب زیرزمینی

ب) آگاهی از کیفیت آب داخل چاه

پ) آگاهی از کیفیت آب به همان صورت که مصرف می‌شود.

بسته به هدف آزمون، به دلیل تفاوت‌های بین چاه‌های بدون پمپ و چاه‌های دارای پمپ دائمی، انتخاب روش‌های مختلف نمونه برداری لازم است. برای آگاهی بیشتر به استاندارد ملی ایران در این زمینه مراجعه شود.

نکته‌ها

✓ برای نمونه برداری از چاه‌هایی که در آن پمپ دائمی نصب شده و دارای شیر یا خروجی فلزی هستند. بسته به هدف نمونه برداری پمپ کردن زیاد و گندزدایی شیر به وسیله شعله لازم است.
✓ پمپ کردن زیاد دست کم ۳ بار برای آب‌های زیرزمینی بدین معناست که پمپ کردن تا زمان تثبیت درجه حرارت آب و هدایت الکتریکی انجام شود.

✓ برای نمونه برداری از آب داخل چاه فقط خروج کوتاه آب برای غلبه بر اثر گندزدایی شیر کافی است.

✓ برای نمونه برداری از آب به همان صورت که مصرف می‌شود پمپ کردن و گندزدایی شیر لازم نیست. چاه‌هایی که بدون پمپ دائمی هستند توسط پمپی که قابل فرو بردن در زیر آب باشد نمونه برداری می‌شود. این پمپ‌ها فقط برای آب‌های تمیز استفاده می‌شود.

✓ برای نمونه برداری از آب داخل چاه بهتر است از وسیله نمونه برداری سترون شامل حامل و کیسه شنی استفاده شود. به طور جایگزین یک پمپ تمیز قابل فرو بردن در زیر آب را نیز می‌توان پس از پمپ کردن کم استفاده نمود. در مواردی که آب چاه بدون دستگاه پمپ به وسیله مصرف کننده استفاده می‌شود باید نمونه برداری به وسیله سطل انجام شده و آب از سطل به بطری نمونه برداری سترون منتقل شود.

برگه‌های نمونه برداری: هریک از بطری‌ها را باید برچسب شناسایی زد و پیش از نمونه برداری و یا پس از آن برگه‌های نمونه برداری را تکمیل کرد. برگه‌ها باید دارای نام و آدرس مشتری درخواست کننده، فهرست ویژگی‌هایی که قرار است مورد آزمون

و ارزیابی قرار گیرد، تاریخ، زمان، موقعیت محل نمونه برداری و نام نمونه بردار باشد. ماهیت منشأ نمونه‌ها، چگونگی ارسال نمونه به آزمایشگاه و هدف آزمون نیز به دلیل اینکه ممکن است به انتخاب روش آزمون کمک کند باید درج شود.

جابه‌جایی و نگهداری نمونه‌ها: فاصله زمانی بین نمونه برداری و آزمون باید تا حد امکان کوتاه باشد، برای آب‌های آشامیدنی بهتر است آزمون در همان روز نمونه برداری انجام شود.

نکته‌ها

✓ بهتر است هنگام حمل و نقل، نمونه‌ها در دمای $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ نگهداری شوند. برای این منظور می‌توان از کیسه‌های یخ استفاده نمود.

✓ برای آزمون‌های میکروبی به جز آزمون ویروس‌ها باید از یخ زدن نمونه‌ها پیشگیری نمود.

✓ نمونه‌ها را باید از تابش نور خورشید محافظت کرد. برای نمونه‌هایی که جابه‌جایی آن‌ها بیش از هشت ساعت به طول می‌انجامد، پایش و ثبت دما لازم است. شرایط جابه‌جایی نیز باید مستند شود.

✓ برای پیشگیری از یخ زدن نمونه باید دقت شود تا نمونه‌ها با کیسه‌های یخ تماس مستقیم نداشته باشند. همچنین تعداد و حجم کیسه‌های یخ با تعداد، حجم و دمای نمونه تنظیم شود.

✓ روش کار در مواردی که زمان جابه‌جایی نمونه بیش از هشت ساعت است باید مستند شود.

✓ نمونه آب‌های سرد و گرم باید به طور جداگانه جابه‌جا شوند.

✓ سرد کردن نمونه‌ها در طی جابه‌جایی مهم است ولی نباید نمونه‌ها منجمد شود زیرا تشکیل یخ سبب مرگ بیشتر سلول‌ها می‌شود.

● **تعداد نمونه:** تعداد نمونه لازم برای آزمون‌های میکروبی آب بسته به تعداد افراد مصرف‌کننده، نوع و منبع آب، نوع تصفیه و نوع آزمون، متفاوت است و با یکی از روش‌های زیر تعیین می‌شود:

الف) تعداد نمونه بر حسب جمعیت مصرف‌کننده: در این مورد تعداد نمونه برای آزمون باکتری‌های نشانگر آلودگی مدفوعی در شبکه توزیع، با توجه به جمعیت مصرف‌کننده تحت پوشش مطابق با جدول ۲-۸ تعیین می‌شود.

جدول ۲-۸ - حداقل تعداد نمونه برای آزمون باکتری‌های نشانگر آلودگی مدفوعی در شبکه توزیع

ردیف	جمعیت	تعداد نمونه در سال
۱	کمتر از ۵۰۰۰	۱۲
۲	۵۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰	به ازای هر ۵۰۰۰ نفر ۱۲
۲	۱۰۰۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰۰	به ازای هر ۱۰۰۰۰۰ نفر ۱۲ به علاوه ۱۲۰ نمونه اضافی
۴	بیشتر از ۵۰۰۰۰۰	به ازای هر ۱۰۰۰۰۰ نفر ۱۲ به علاوه ۱۸۰ نمونه اضافی

گزینه‌ش روش آزمون میکروبی آب به عوامل زیادی مانند ویژگی‌های فیزیکی - شیمیایی نمونه آب و گونه میکروبی مورد جستجو در آب بستگی دارد.

نکته‌های مهم در مورد گزینش روش مناسب برای آزمون میکروبی آب

✓ در مواردی که آب دارای ذرات معلق است، استفاده از روش صافی غشایی مناسب نیست. زیرا مسدود شدن روزنه صافی‌ها توسط ذرات معلق در آب باعث کاهش عبور آب از صافی شده و در نتیجه شمارش میکروبی مختل می‌شود.

✓ در مورد آب‌های خیلی کدر روش شمارش بیشترین تعداد احتمالی MPN مناسب است.

✓ در مواردی که احتمال بیش از ۱۰۰ کلنی در روی هر صافی وجود داشته باشد، استفاده از روش صافی غشایی از حساسیت کافی برخوردار نیست.

✓ در مواردی که تعداد میکروارگانیسم‌ها در نمونه کم است (کمتر از ۱۰۰ عدد در هر میلی لیتر) استفاده از روش کشت سطحی مناسب نیست.

✓ در مورد آب‌های دارای ذرات معلق، روش کشت (پورتشتک) به دلیل شمارش ذرات به جای کلنی حساسیت لازم را نداشته و مناسب نیست.

۱-۸-۲- آزمون شمارش کلی^۱: هدف از انجام این آزمون ارزیابی وضع بهداشتی آب بوده و اگر تعداد میکروپ‌ها از حد معین تجاوز کند آب غیر قابل شرب و مصرف در صنایع غذایی خواهد بود.

وسایل و مواد مورد نیاز

➤ لوله‌های آزمایش

➤ بی‌بت

➤ تشتک‌های یکبار مصرف

➤ محلول آب بافر پیتونه

➤ تشتک کانت آگار مذاب با دمای ۴۵° C

➤ گرمخانه

روش کار

الف) ابتدا لوله‌های آزمایش را با شماره رقت‌های اعشاری از ۱۰^{-۱} تا ۱۰^{-۵} علامت گذاری کنید. سپس درون هر لوله آزمایش ۹ میلی لیتر محلول آب پیتونه ریخته و از نمونه آب مورد نظر در لوله‌های آزمایش رقت تهیه کنید.

ب) برای هر یک از رقت‌ها دو تشتک خالی در نظر گرفته و با شماره همان رقت علامت گذاری کنید. سپس از رقت مورد نظر ۱ میلی لیتر به تشتک‌ها اضافه کنید و پس از آن ۲۵ میلی لیتر محیط کشت تشتک کانت آگار ذوب شده به تشتک دارای نمونه رقیق شده اضافه نمایید و تشتک‌ها را به همان روش کشت استاندارد که در فصل پیش گفته شد دوران دهید تا مواد داخل تشتک مخلوط و یکنواخت گردد.

پ) تشتک‌های کشت شده را به حال خود در آزمایشگاه قرار دهید تا محیط درون آنها سفت شود.

ت) پس از سفت شدن محیط‌ها تشتک‌ها را در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت قرار دهید.

ث) پس از این زمان تشتک‌هایی که دارای بیش از ۳۰۰ عدد کلنی هستند را غیر قابل شمارش گزارش کنید و تشتک‌های دیگر را با استفاده از رقت کشت شده و شمارش کلنی‌ها در دو تشتک مانند آنچه در فصل پیش گفته شد شمارش تعداد باکتری‌ها را در هر میلی لیتر محاسبه کنید.

۳-۱-۸ - آزمون جستجو و شمارش کلی فرم‌ها در آب به روش چند لوله‌ای (آزمایش بیشترین تعداد احتمالی باکتری‌ها)^۱: همانطور که گفته شد گونه‌هایی آنتروباکتریاسه باکتری‌های گرم منفی روده‌ای هستند که به عنوان شاخص آلودگی در نظر گرفته می‌شوند. کلی فرم‌ها یکی از مهم‌ترین جنس‌های این خانواده باکتریایی هستند که قادرند قند لاکتوز را تخمیر کرده، اسید و گاز تولید کنند. به طور کلی همه باکتری‌های گرم منفی میله‌ای شکل، هوازی و بی‌هوازی اختیاری که قادر به تخمیر قند لاکتوز در دمای ۳۷°C در مدت ۴۸ ساعت هستند کلی فرم نامیده می‌شوند. محل طبیعی زندگی این باکتری‌ها در روده انسان و دام، خاک و آب است. محیط کشت مورد استفاده کلی فرم باید دارای قند لاکتوز باشد.

آزمون جستجو و شمارش کلی فرم‌ها در سه مرحله انجام می‌شود:

● روش شمارش بیشترین تعداد احتمالی باکتری‌ها: این روش یکی از راه‌های شمارش میکروارگانیسم‌های زنده موجود در مواد غذایی است. با این روش می‌توان گفت تعداد و تراکم میکروارگانیسم‌ها در یک ماده غذایی چه میزان است. روش MPN بر پایه نظریه احتمالات بوده و فرض بر این است که میکروارگانیسم‌ها با یک توزیع یکنواخت و به‌طور اتفاقی در نمونه ماده غذایی پخش شده‌اند. این روش به ویژه برای آن گروه از مواد غذایی به کار می‌رود که احتمال وجود تعداد کمی میکروارگانیسم (کمتر از ۱۰ عدد در هر گرم) در آنها تخمین زده می‌شود. روش MPN بیشتر برای شمارش کلی فرم‌های آب، شیر و فرآورده‌های آن به کار می‌رود. به دلیل این که در مواد غذایی جامد امکان توزیع یکنواخت ارگانیسم‌ها بعید است، این روش کاربرد چندانی ندارد. به طور کلی روش MPN نسبت به روش‌های کشت که در فصل پیش گفته شد دقت کمتری دارد. در روش شمارش بیشترین تعداد احتمالی باکتری‌ها، حجم‌هایی از ماده غذایی به ۳ تا ۱۰ لوله آزمایش دارای محیط مایع منتقل می‌گردد. لوله‌ها در دمای ۳۷-۳۵°C گرمخانه گذاری شده و پس از ۲۴-۴۸ ساعت نتیجه بررسی می‌شود. پس از تشخیص لوله‌های مثبت از روی کدورت یا تولید اسید و گاز در لوله‌ها، تعداد اولیه باکتری‌ها از روی جدول استاندارد MPN تعیین می‌شود.

هرچه تعداد لوله‌های آزمایش بیشتر باشد دقت روش بیشتر خواهد شد. بنابراین روش MPN ۱۰ لوله‌ای بسیار دقیق‌تر از MPN ۵ لوله‌ای یا ۳ لوله‌ای است اما از نظر صرف هزینه و زمان مناسب نیست و بیشتر از روش ۳ یا ۵ لوله‌ای استفاده می‌شود.

محیط‌های کشت مورد استفاده در این آزمون:

الف) لوریل سولفات تریپتوز برات^۲: این محیط کشت دارای تریپتوز به عنوان منبع نیتروژن، لاکتوز منبع کربوهیدرات و انرژی، بافر فسفات و نمک NaCl و لوریل سولفات است. محیط LST یک محیط کشت انتخابی و افتراقی است (براساس تعریف محیط‌های کشت در فصل سوم). واژه انتخابی به دلیل وجود لوریل سولفات است که از رشد باکتری‌های گرم مثبت جلوگیری می‌کند و واژه افتراقی به این دلیل برای محیط LST به کار می‌رود که تولید گاز در آن قابل تشخیص است (با لوله‌های دوره‌ام).

ب) بریلیانت گرین بایل برات^۳: یا آبگوشت سبز درخشان این محیط دارای پپتن منبع ازت، لاکتوز منبع انرژی و بریلیانت گرین است و نوعی محیط کشت انتخابی و افتراقی است. انتخابی به دلیل وجود بریلیانت گرین که از رشد باکتری‌های گرم مثبت جلوگیری می‌کند و افتراقی به دلیل تشخیص تولید گاز توسط لوله‌های دوره‌ام و تشخیص تولید اسید با تغییر رنگ محیط آبگوشت سبز درخشان (pH این محیط ۴ و رنگ آن سبز مایل به زرد است).

برای آزمون شمارش کلی فرم‌ها از روش MPN سه لوله‌ای استفاده کنید.

۱- Most probable number (MPN)

۲- Lauryl sulfate tryptose broth (LST)

۳- Brilliant green bile broth(BGB)

مواد و وسایل مورد نیاز

- لوله‌های آزمایش در پیچ دار با گنجایش ۱۰ میلی لیتر
- لوله‌های دورهام برای جمع آوری حباب گاز ایجاد شده در لوله آزمایش
- جا لوله‌ای
- بی‌پت‌های سترون شده ۱ یا ۱۰ میلی لیتری
- یکی از محیط کشت‌های LST یا BGB
- گرمخانه با دمای 37°C

روش کار

- (الف) برای نمونه برداری باید به میزان ۱۰۰ میلی لیتر از آب مورد نظر برداشته و در بطری سترون شده نگهداری کنید (به روش‌های نمونه برداری از آب در ابتدای همین فصل مراجعه شود).
- (ب) برای هر یک از رقت‌های 10^{-1} ، 10^{-2} ، 10^{-3} تعداد ۳ لوله انتخاب کنید و درون همه لوله‌های آزمایش یک لوله دورهام به صورت وارونه قرار دهید (۳ لوله برای رقت 10^{-1} ، ۳ لوله برای رقت 10^{-2} و ...). و روی هر لوله برچسب زده و شماره رقت مورد نظر را یادداشت کنید.

- (پ) رقت‌ها را با استفاده از محیط کشت مایع مناسب LST یا BGB در لوله‌های علامت گذاری شده با شماره هر رقت توسط حجم معینی از آب مورد آزمون (۱ میلی لیتر) تهیه کنید. (مانند شکل ۱-۸)

نکته‌ها

- ✓ برای رقت‌های بالاتر 10^{-1} و 10^{-2} غلظت محیط کشت باید دو برابر تهیه شود. یعنی اگر روش تهیه محیط کشت ۲۴ گرم در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر است برای این دو رقت باید ۴۸ گرم در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شود.
- ✓ برای هر سری رقت از یک بی‌پت مجزا و سترون شده استفاده کنید.
- ✓ همه مراحل آزمون باید در کنار شعله و با فاصله ۳۰ سانتی متری از آن انجام شود.
- (ت) لوله‌های آماده شده با رقت‌های مورد نظر و حجم تلقیح شده نمونه آب را به صورت در بسته درون جا لوله‌ای قرار داده و در گرمخانه با دمای 37°C - 35°C به مدت ۲۴-۴۸ ساعت نگهداری کنید.
- (ث) پس از ۴۸ ساعت لوله‌ها را بررسی کرده و لوله‌هایی را که دارای کدورت (تیرگی در محیط کشت مایع درون لوله آزمایش) هستند، لوله‌هایی که دارای کدورت و همراه با تولید گاز در لوله‌های دورهام هستند و لوله‌هایی را که همراه با تولید اسید (به ویژه در محیط‌هایی که دارای معرف pH می‌باشند) از روی تغییر رنگ تشخیص داده و به عنوان نتیجه مثبت برای وجود کلی فرم‌های احتمالی در نظر بگیرید.

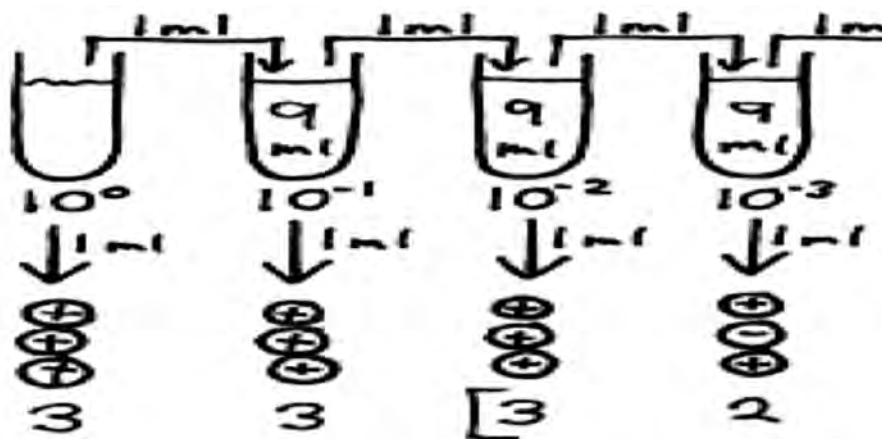
- نکته: واکنش مثبت در لوله‌های آزمایش دارای محیط‌های کشت انتخابی افتراقی ذکر شده، کلی فرم‌های فرضی به حساب می‌آید. بنابراین انجام آزمون تأییدی روی محیط کشت انتخابی ضروری است.

- (ج) تعداد لوله‌های مثبت در هر سری رقت یادداشت می‌شود. (بر طبق شکل ۱-۶)

یافته‌های آزمون MPN سه لوله‌ای باید با استفاده از جدول MPN سه لوله‌ای مربوطه انجام شود. (جدول ۴-۶)

- نکته: جدول MPN براساس استاندارد سازمان FDA^۱ یا سازمان غذا و داروی امریکا ارائه شده است و این جدول برای

لوله‌هایی با مقادیر تلقیح شده $1/10$ و $1/100$ و $1/1000$ تنظیم شده است.



شکل ۸-۱- روش MPN سه لوله‌ای (برای هر رقت سه لوله در نظر گرفته شده است). نتیجه آزمایش بر اساس کدورت و تولید گاز به صورت مثبت علامت گذاری شده و تعداد لوله‌های مثبت در هر سری از رقت‌ها نیز ثبت می‌شود.

استفاده از جدول MPN سه لوله‌ای برای تعیین تعداد کلی فرم‌های احتمالی : مهم‌ترین مرحله پیش از استفاده از جدول MPN انتخاب سه رقت مناسب برای فهرست جدول است. برای این منظور از راهنمای زیر استفاده کنید.

راهنمای انتخاب سه رقت مناسب : برای این منظور بالاترین رقت در تمام لوله‌های مثبت و دو رقت بالاتر بعدی انتخاب می‌شود. برای نمونه اگر تعداد لوله‌های مثبت از رقت 10^0 (هر سه مثبت)، رقت 10^{-1} (هر سه مثبت)، رقت 10^{-2} (یکی از سه لوله مثبت) و رقت 10^{-3} (یکی از سه لوله مثبت) بود باید ترتیب ۱-۱-۳ در جدول MPN انتخاب شود.

➤ اگر دو رقت بالاتر در دسترس نباشد باید سه رقت پشت سرهم انتخاب شود. برای نمونه اگر در رقت‌های 10^0 ، 10^{-1} و 10^{-2} هر سه لوله مثبت باشد و در رقت 10^{-3} یک لوله مثبت باشد باید ترتیب ۱-۳-۳ از جدول انتخاب شود.

➤ اگر هیچ رقتی مثبت نبود باید سه رقت پایین را به عنوان نتیجه مثبت در نظر گرفت. برای نمونه اگر در رقت 10^0 (همه منفی)، رقت 10^{-1} (یکی از سه لوله مثبت) و رقت 10^{-2} و 10^{-3} (همه لوله‌ها منفی) بود باید ترتیب $10^0-10^0-10^0$ از جدول انتخاب شود.

نکته : زمانی که تنها از رقت 10^0 ، 10^{-1} و 10^{-2} برای ترتیب جدول استفاده شود چون سری جدول بر اساس $1/10$ و $1/100$ است، تعداد MPN را در نهایت باید به عدد 10^0 تقسیم نمود. ولی اگر از رقت‌های 10^{-1} و 10^{-2} و 10^{-3} برای ترتیب جدول استفاده شود خود عدد MPN به تنهایی به عنوان نتیجه استفاده می‌شود.

جدول ۳-۸ - MPN سه لوله‌ای

NUMBER OF TUBES GIVING POSITIVE REACTION OUT OF			MPN INDEX per 100 ml	95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS	
3 of 10 ml each	3 of 1 ml each	3 of 0.1 ml each		LOWER	UPPER
0	0	1	3	<0.5	9
0	1	0	3	<0.5	13
1	0	0	4	<0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

۴-۱-۸ - آزمون تأیید وجود کلی فرم‌ها در آب: محیط کشت مورد استفاده در این آزمون محیط کشت لاکتوز برات^۱

است.

مواد و وسایل مورد نیاز

➤ حلقه کشت

➤ گرمخانه

^۱ - Lactose broth

➤ لوله آزمایش دارای محیط مایع لاکتوز برات

روش کار

(الف) با استفاده از حلقه کشت سترون شده، از یکی از لوله‌های مثبت در آزمایش MPN یک حلقه پر مایع برداشت کرده و به لوله آزمایش دارای محیط لاکتوز برات منتقل کنید.

نکته: بهتر است از لوله‌هایی استفاده شود که در آن همزمان گاز و کدورت مشاهده می‌شود.

(ب) لوله‌های تلقیح شده را با استفاده از تکان دهنده مخلوط کرده و در گرمخانه با دمای $37-35^{\circ}\text{C}$ به مدت ۲۴-۴۸ ساعت قرار دهید.

(پ) پس از ۴۸ ساعت، وجود گاز و حباب در محیط لاکتوز برات نشانه وجود کلی فرم‌ها در نمونه مورد آزمون است.

(ت) یافته‌ها را به صورت تعداد کلی فرم‌ها در 10° میلی لیتر نمونه آب و یا عدم آلودگی آب به کلی فرم در 10° میلی لیتر نمونه آب ارائه دهید.

● مشاهده و تشخیص کلنی کلی فرم‌های موجود در نمونه آب: محیط‌های کشت مورد استفاده در این آزمون عبارتند از:

(الف) محیط مک کانکی آگار^۲ این محیط دارای رنگ کریستال ویوله برای جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم مثبت و املاح صفراوی برای جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم منفی غیر رودهای و یک محیط انتخابی و افتراقی است.

(ب) محیط ویولت رد بایل آگار^۳ این محیط دارای عصاره مخمر، پپتون، نمک‌های صفراوی، کلرید سدیم، لاکتوز و معرف قرمز خنثی و کریستال ویوله بوده و یک محیط انتخابی افتراقی محسوب می‌شود.

مواد و وسایل مورد نیاز

➤ تشتک‌های دارای یکی از محیط‌های کشت جامد بالا

➤ حلقه کشت

➤ گرمخانه با دمای 37°C

روش کار

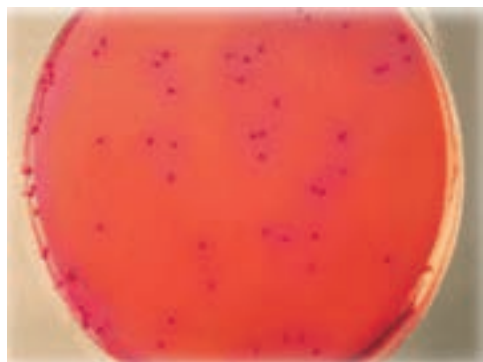
(الف) از یکی از لوله‌های دارای محیط لاکتوز برات که در آنها تولید گاز مشاهده شده، توسط حلقه کشت برداشت کرده و در محیط کشت جامد مک کانکی آگار یا ویولت رد بایل آگار کشت دهید.

(ب) تشتک‌های کشت داده شده را در گرمخانه با دمای 37°C به مدت ۴۸ ساعت نگهداری کنید.

(پ) پس از ۴۸ ساعت کلنی کلی فرم‌ها را بررسی نمایید.

مشخصات کلنی کلی فرم‌ها در محیط کشت‌های مک کانکی آگار

و ویولت رد بایل آگار: کلی فرم‌ها به دلیل تخمیر قند لاکتوز، اسید تولید کرده که در حضور معرف قرمز خنثی کلنی آنها به همان رنگ قرمز مشاهده می‌شود. به علاوه کلنی کلی فرم‌ها مسطح با قطر ۲-۱ میلی متر است که معمولاً توسط هاله روشن ناشی از تجزیه و رسوب نمک‌های صفراوی احاطه شده است. (شکل ۲-۸)



شکل ۲-۸- کلنی‌های سطحی، قرمز همراه با هاله روشن

کلی فرم‌ها در محیط ویولت رد بایل آگار

۵-۱-۸- آزمون جستجو و شمارش کلی فرم‌های مدفوعی^۱ در آب: کلی فرم‌هایی هستند که در مدت ۲۴ ساعت در دمای $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ رشد کرده و اسید و گاز تولید می‌کنند. بنابراین دمای بالا برای جدا کردن کلی فرم‌هایی که منشأ مدفوعی دارند از آنهایی که منشأ مدفوعی ندارند به کار برده می‌شود.

محیط کشت‌های مورد استفاده در این آزمون: لوریل تریپتوز مانیتول برات^۲ دارای تریپتوفان
روش کار

برای این آزمون پس از انجام آزمایش MPN که در پیش گفته شد، توسط حلقه کشت از لوله‌های واکنش مثبت در آزمون MPN برداشت کرده و به لوله دارای محیط کشت لوریل تریپتوز برات همراه با مانیتول و تریپتوفان منتقل کنید. سپس لوله‌های تلقیح شده را در گرمخانه با دمای 44°C قرار داده و پس از ۲۴ ساعت از نظر تولید گاز بررسی و گزارش نمایید.



شکل ۳-۸- اشیریشیا کلی

۶-۱-۸- آزمون جستجو و شمارش اشیریشیاکلی در آب: محل طبیعی

این باکتری در قسمت انتهایی روده حیوانات خون گرم است. باکتری میله‌ای شکل دارای تازه که وجودش در آب نشانه آلودگی مدفوعی است.

محیط‌های کشت استفاده شده در این آزمون:

- لوریل تریپتوز مانیتول برات دارای تریپتوفان

- محیط مایع MRVP

- محیط سیمون سیترات

روش کار

برای این آزمون با استفاده از حلقه کشت از لوله‌های مثبت آزمایش MPN

نمونه برداشت کرده و به لوله‌های دارای محیط‌های کشت ذکر شده در این آزمون منتقل کنید. لوله‌های تلقیح شده را در گرمخانه با دمای 44°C به مدت ۲۴ ساعت قرار داده و تولید گاز، اندول و نتیجه واکنش سیترات و MRVP را نیز بررسی و شمارش نمایید.

نتیجه کشت در محیط دارای تریپتوفان: کلی فرم‌هایی که تا حدودی مقاوم به گرما هستند و در مدت ۲۴ ساعت در دمای 44°C گاز تولید کرده و با استفاده از تریپتوفان محیط، اندول تولید می‌کند که با معرف کواکس قابل مشاهده باشند اشیریشیاکلی هستند. (به فصل پنجم مراجعه شود.)

نتیجه کشت در محیط سیمون سیترات: اشیریشیاکلی قادر به استفاده از سیترات محیط به عنوان منبع کربن نبوده و واکنش سیترات منفی است (به فصل پنجم مراجعه شود).

نتیجه کشت در محیط MRVP: پس از افزودن معرف متیل رد واکنش MR برای اشیریشیاکلی مثبت ولی VP منفی است.

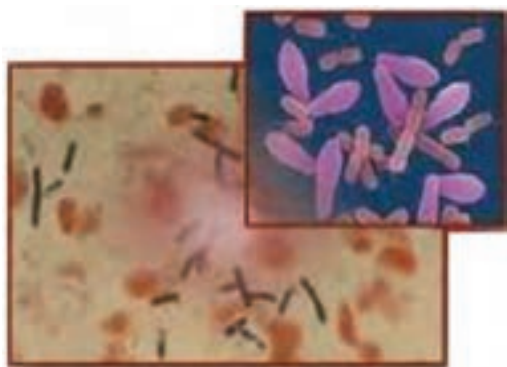
نکته: از روش‌های سریع نیز می‌توان برای تشخیص اشیریشیا کلی در نمونه آب استفاده نمود.

۷-۱-۸- آزمون جستجو و شمارش کلستریدیوم پرفرانژانس (ولشای) در آب: کلستریدیوم ولشای باکتری

میله‌ای، گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری، اسپوردار و بدون حرکت است که بومی لوله گوارش انسان و حیوانات بوده و در خاک و گرد و غبار نیز یافت می‌شود. در مشاهده میکروسکوپی اسپور این باکتری در مرکز یا نزدیک به انتهای سلول رویشی باکتری قرار دارد ولی باعث تورم در سلول باکتری نمی‌شود. اسپور باکتری دمای مرطوب 100°C را حدود ۵ ساعت یا بیشتر تحمل

۱- Faecal coliform

۲- Lauryl Triptose Manitol Broth



شکل ۴-۸ - کلوستریدیوم پرفرانزاس و اسپور نزدیک به انتهایی آن

می‌کند. تاکنون ۶ تیپ از این باکتری شناخته شده که با حروف A تا F نامگذاری شده‌اند. کلوستریدیوم پرفرانزاس تیپ A و F برای انسان بیماری‌زا هستند. تیپ A نقش مهمی در ایجاد مسمومیت‌های غذایی دارد. از آنجایی که نسبت کلوستریدیوم پرفرانزاس به اشریشیاکلی در مدفوع بسیار کم است، بنابراین جستجوی این باکتری در آب روشی دقیق برای پی بردن به آلودگی آن به یک منشأ مدفوعی که به تازگی رخ داده نمی‌باشد. زیرا اسپور کلوستریدیوم و لشای زمان زیادی در آب زنده می‌ماند بنابراین وجود آن در آبی که از نظر آلودگی به اشریشیاکلی منفی باشد نشانه آلودگی جزئی آن با یک منشأ مدفوعی است.

مواد و وسایل مورد نیاز

- ظرف‌های سترون با گنجایش ۱ لیتر
- استوانه مدرج سترون شده
- حمام آب $80^{\circ}C$
- دماسنج
- شیر لیتموس دار^۱
- وازپار ذوب و سترون شده
- گرمخانه با دمای $37^{\circ}C$

نکته: وازپار مخلوط مساوی وازلین و پارافین مایع است.

روش کار

الف) ۲۰۰ میلی لیتر نمونه آب مورد نظر را به درون ظرف سترون شده با گنجایش ۱۰۰۰ میلی لیتر منتقل کنید.

ب) به ظرف دارای ۲۰۰ میلی لیتر آب، ۴۰۰ میلی لیتر شیر لیتموس دار سترون اضافه کنید.

نکته: باید توجه کرد که شیر لیتموس دار باید در دمای $100^{\circ}C$ بخار داده شده و هوای آن خارج شود و به سرعت سرد و به ظرف افزوده شود.

پ) ظرف دارای نمونه آب و شیر لیتموس دار را به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب $80^{\circ}C$ قرار دهید.

نکته‌ها

✓ با این کار همه سلول‌های رویشی باکتری‌ها از بین می‌روند و اسپورها باقی می‌مانند سپس با تبدیل اسپور به سلول رویشی با شوک گرمایی می‌توان نسبت به شمارش و شناسایی آنها اقدام نمود.

✓ همزمان می‌توان ظرف مشابهی را که دارای $60^{\circ}C$ میلی لیتر آب است همراه با یک دماسنج در حمام آب قرار داد تا دما کنترل شود.

ت) ظرف دارای نمونه آب و شیر لیتموس دار را سرد کرده و سطح مایع درون ظرف را با مخلوط وازپار ذوب و سترون شده پوشانید و به مدت ۵ روز در دمای $37^{\circ}C$ گرمخانه گذاری کنید.

^۱ - Litmus milk

ث) هر ۲۴ ساعت پس از کشت، زیر مخلوط وازپار را از نظر تولید اسید، لخته و تولید گاز بررسی کنید. در واقع نمونه را از لحاظ وجود واکنش لخته طوفانی^۱ بررسی می‌شود.

بیشتر بدانیم

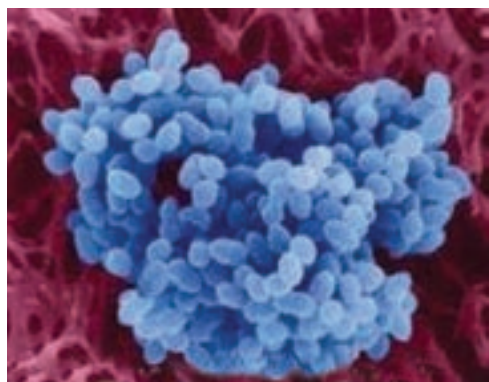


لخته طوفانی حالتی است که در محیط کشت و در اثر اسیدیته، لخته و گاز به وجود می‌آید (شکل ۵-۸).

شکل ۵-۸ - واکنش لخته طوفانی در شیر لیتموس دار

برای شمارش کلستریدیوم ولشای در آب می‌توان یک سری لوله‌های دارای حجم‌های مختلف نمونه آب را آماده کرده و با استفاده از آزمایش MPN یافته‌ها را به صورت نیمه کمی ارائه نمود.

نکته: کلستریدیوم پرفرانژانس در نمونه‌های کمتر از ۱۰۰ میلی لیتر آب ممکن است قابل تشخیص نباشد بنابراین باید مقادیر نمونه بیشتری را انتخاب کرد (۲۰۰ میلی لیتر) در نتیجه ممکن است جدول MPN ویژه‌ای مورد نیاز باشد.



شکل ۶-۸ - استرپتوکوکوس فکالیس

۸-۱-۸ - آزمون جستجو و شمارش استرپتوکوک‌های مدفوعی (فکالیس)^۲ در آب با روش MPN: استرپتوکوک‌های گروه لانسیفیلد D یکی از بخش‌های فلور میکروبی طبیعی در روده انسان و حیوانات را تشکیل می‌دهند و ممکن است به عنوان یک شاخص آلودگی مدفوعی مورد استفاده قرار گیرند. این باکتری‌ها به شکل گرد و زنجیره‌ای و هوازی هستند. انجام آزمون جستجو و شمارش استرپتوکوک مدفوعی مشابه کلی فرم‌ها است با این تفاوت که در آن محیط‌های کشت متفاوتی استفاده می‌شود و چون این باکتری گاز تولید نمی‌کند نیازی به استفاده از لوله دورهام برای جمع آوری گاز نمی‌باشد (شکل ۶-۸).

محیط‌های کشت مورد استفاده در آزمون:

- محیط مایع گلوکز آزیدبراث^۳

- محیط جامد اسکولین آزید آگار^۴

۱- Stormy clot

۲- Streptococcus faecalis

۳- Glucose Azide broth

۴- Aesculin Azide agar

مواد و وسایل مورد نیاز

- لوله‌های آزمایش سترون شده و در پیچ دار
- پی‌پت‌های سترون شده ۱ و ۱۰ میلی لیتری
- گرمخانه با دمای $37^{\circ}C$

روش کار

- الف) مانند روش تهیه رقت‌های متوالی گفته شده، برای هر یک از رقت‌های 10^{-1} ، 10^{-2} و 10^{-3} تعداد ۳ لوله انتخاب کنید. این رقت‌ها باید درون لوله‌های آزمایش دارای محیط کشت مایع گلوکز آزید تهیه شوند.
- نکته: برای مقادیر بیشتر از ۱ میلی لیتر (۳ رقت بالاتر) غلظت محیط باید دو برابر باشد.
- ب) لوله‌های تلقیح شده با نمونه آب را در دمای $37^{\circ}C$ به مدت ۷۲ ساعت در گرمخانه بگذارید.
- پ) پس از این مدت هر ۲۴ ساعت یک بار لوله‌های مثبت را از نظر تغییر رنگ محیط مورد بررسی قرار دهید.

نکته‌ها

✓ استریتوکوک‌های مدفوعی با تخمیر قند، گلوکز و اسید تولید می‌کنند که با تغییر رنگ محیط از ارغوانی به زرد مشخص می‌شود.

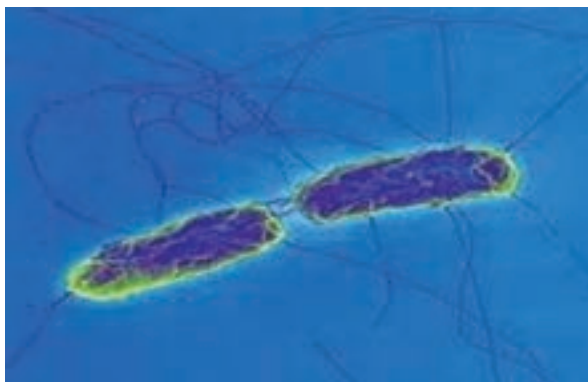
✓ تغییر رنگ می‌تواند در سراسر لوله یا فقط در قسمت انتهایی لوله ایجاد شود.

✓ برای دقت بیشتر می‌توان لوله‌های واکنش منفی را برای مدت ۲۴ ساعت دیگر در دمای $37^{\circ}C$ قرار داده و پس از پایان این مدت حتی اگر تغییر رنگ ضعیفی مشاهده شود واکنش را باید مثبت در نظر گرفت.

✓ برای تفسیر یافته‌ها بهتر است از یک لوله شاهد استفاده شود.

ث) پس از مشخص کردن تعداد لوله‌های مثبت، با استفاده از جدول MPN مربوطه شمارش انجام می‌شود.

مرحله تأیید: برای تأیید وجود استریتوکوکوس فکالیس از لوله‌های مثبت پس از تکان دادن و یکنواخت کردن محتوی آنها یک حلقه کشت کامل برداشت کرده و روی محیط کشت جامد اسکولین آزید آگار به صورت خطی کشت دهید. تشتک‌های کشت شده را به مدت ۴۸ ساعت در دمای $44^{\circ}C$ گرمخانه گذاری کنید.



شکل ۸-۷ - سالمونلا

۹-۱-۸ - آزمون جستجو و شمارش سالمونلا در

آب: گونه‌های سالمونلا باکتری‌هایی هستند که به طور گسترده در تمام دنیا پراکنده می‌باشند. این میکروارگانیسم‌ها در گروه باکتری‌های بیماری‌زا طبقه‌بندی می‌شوند و گونه‌های مختلف آن، توانایی بیماری‌زایی متفاوتی دارند. میزبان طبیعی گونه‌های سالمونلا انسان، دام، حیوانات وحشی بویژه پرندگان می‌باشند. افراد آلوده به سالمونلا ممکن است بدون این که علائم بیماری را داشته باشند، این باکتری را به دیگران منتقل کنند، بنابراین حذف آنها از طبیعت در عمل غیر ممکن است. برخی از گونه‌های سالمونلا مانند سالمونلا تاییفی می‌توانند در انسان بیماری حصبه ایجاد کنند. با در نظر گرفتن

این که آب یکی از راه‌های انتقال این باکتری به انسان است، بنابر این وجود یا عدم وجود آنها در آب به طور منظم باید بررسی شود. گونه‌های سالمونلا ممکن است در آب‌های شیرین، آب‌های زیرزمینی، آب دریا و همچنین پساب وجود داشته باشند.

باکتری‌های گرم منفی، از خانواده آنتروباکتریاسه هستند، که در محیط‌های غنی‌کننده و انتخابی رشد کرده و در محیط‌های انتخابی جامد کلنی‌های مشخص به قطر ۳ تا ۴ میلی‌متر ایجاد می‌کنند.

روش شناسایی سالمونلا بر اساس مراحل پی در پی زیر می‌باشد:

– پیش‌سازی نمونه در محیط‌های کشت غنی‌کننده غیرانتخابی مایع

– غنی‌سازی در محیط‌های کشت غنی‌کننده انتخابی مایع

– شناسایی سالمونلا با استفاده از محیط‌های کشت جامد انتخابی

– تأیید سالمونلا با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی مناسب

در مورد نمونه‌هایی مانند پساب که باید رقیق‌سازی انجام شود، بر اساس آزمون تهیه رقت‌های اعشاری که در پیش گفته شد نمونه رقیق‌سازی می‌شود.

محیط‌های کشت مورد استفاده در آزمون:

– آب پیتونه بافردار به عنوان محیط غنی‌کننده برای رشد اغلب سالمونلاها

– محیط کشت آبگوشت راپاپورت^۱. این محیط دارای سویا، کلرید سدیم و پتاسیم هیدروژن فسفات و یک محیط مایع غنی‌کننده انتخابی برای گونه‌های سالمونلا است.

– محیط کشت انتخابی گزیلوز – لیزین – دزوکسی کولات آگار^۲ دارای گزیلوز، عصاره مخمر به عنوان منبع ازت، قندهای لاکتوز و ساکارز به عنوان منبع انرژی، کلرید سدیم و تیوسولفات سدیم و سیترات آمونیوم آهن سه ظرفیتی است.

– محیط کشت‌های بیوشیمیایی *SIM MRVP*، *TSI* و *سیمون سیترات*

مواد و وسایل مورد نیاز

➤ لوله‌های آزمایش دارای ۱۰ میلی‌لیتر محیط مایع راپاپورت سترون شده

➤ لوب

➤ ظرف‌های سترون شده

➤ بی‌پت‌های سترون شده ۱ میلی‌لیتری

➤ تشتک‌های دارای محیط کشت جامد انتخابی

➤ گرمخانه قابل تنظیم در دمای ۳۷°C و ۴۲°C

نکته: به منظور رعایت نکات ایمنی و سلامت کارکنان آزمایشگاه، توصیه می‌شود آزمون‌های شناسایی سالمونلا در آزمایشگاه‌های مجهز به اتاقک میکروبیولوژی و با استفاده از کارکنان با تجربه و متخصص انجام پذیرد.

روش کار

الف) مرحله پیش‌غنی‌سازی: مقدار ۱۰ میلی‌لیتر نمونه آب مورد آزمون را به ۵۰ میلی‌لیتر محلول آب پیتونه بافردار با غلظت دو برابر تلقیح کنید. سپس نمونه را در گرمخانه با دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت قرار دهید.

نکته: برای انجام این مرحله می‌توان از محیط لاکتوز برات به عنوان محیط غنی‌کننده سالمونلا استفاده نمود.

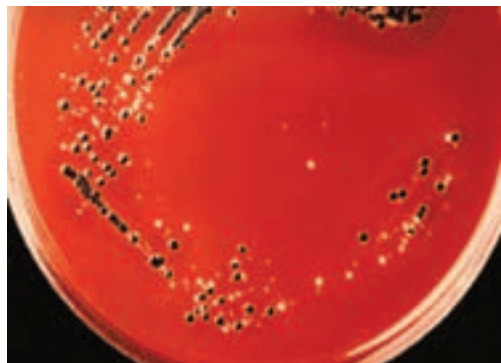
ب) مرحله غنی‌سازی انتخابی: پس از پایان گرمخانه‌گذاری نمونه در مرحله پیش، ۱/۱ میلی‌لیتر از آن را در شرایط سترون به لوله دارای ۱۰ میلی‌لیتر محیط راپاپورت اضافه کنید. سپس لوله تلقیح شده را در گرمخانه با دمای ۴۲°C به مدت ۲۴ ساعت قرار دهید.

۱- Rapaport broth

۲- Xylose – Lysine – Deoxycholate Agar (XLD)

نکته: برای گونه‌های سالمونلا که رشدشان کند است، گرمخانه‌گذاری را می‌توان تا ۴۸ ساعت ادامه داد.

پ) مرحله کشت در محیط جامد انتخابی: با استفاده از حلقه کشت سترون، از نمونه گرمخانه‌گذاری شده در قسمت (ب) به‌طور همزمان بر روی محیط‌های کشت جامد انتخابی گزیلوز-لیزین-دزوکسی کولات آگار بصورت خطی کشت دهید. سپس تشتک‌ها را در گرمخانه با دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت قرار دهید.



شکل ۸-۸- کلنی‌های سالمونلا در محیط XLD agar

نکته: برای این مرحله می‌توان از محیط‌های کشت انتخابی دیگر مانند بیسموت سولفیت آگار و یا بریلیانت گرین آگار نیز استفاده نمود و همزمان بر روی این محیط‌ها نیز از نمونه مرحله پیش کشت خطی انجام داد. پس از مدت زمان گرمخانه‌گذاری تشتک‌ها را از نظر ویژگی‌های کلنی سالمونلا بررسی کنید.

نتیجه: کلنی‌های سالمونلا در محیط کشت گزیلوز-لیزین-دزوکسی کولات آگار بی‌رنگ هستند ولی به دلیل قرمز بودن زمینه محیط کشت، متمایل به قرمز به نظر می‌رسند. این کلنی‌ها بیشتر دارای حاشیه زرد رنگ یا بی‌رنگ و مرکز سیاه می‌باشند.

ت) مرحله تأیید بیوشیمیایی: برای انجام آزمون‌های تأییدی

سالمونلا، از کلنی‌های مشخص محیط کشت XLD agar انتخاب کنید و در محیط‌های TSI، SIM، سیمون سترات و MRVP کشت دهید (روش‌های کشت در فصل ۴ به‌طور کامل شرح داده شده است).

محیط‌های تلقیح شده را در گرمخانه با دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت قرار دهید و پس از این مدت محیط‌ها را بررسی کرده و یافته‌ها را ثبت کنید و در آخر با جدول تست‌های بیوشیمیایی باکتری‌های گرم منفی مقایسه نموده و وجود یا عدم وجود سالمونلا را گزارش کنید.

۱-۱-۸- آزمون جستجو و شمارش قارچ‌ها در آب: قارچ‌ها که شامل مخمرها و گونه‌های رشته‌ای یا کپک‌ها هستند، ارگانیزم‌هایی هتروتروف و بدون کلروفیل می‌باشند که دارای دیواره سلولی سخت و هسته حقیقی بوده و بیشتر هوازی و یا میکروآئروفیل هستند. قارچ‌ها در همه‌جا پراکنده‌اند و در هر جایی که ماده آلی غیرزنده وجود دارد یافت می‌شوند. با توجه به ارتباط بین میزان توده قارچ و مواد آلی می‌توان قارچ‌ها را شاخص خوبی برای آلودگی آب در نظر گرفت ولی متأسفانه تاکنون هیچ گونه یا گونه‌هایی از قارچ‌ها که از این نظر اهمیت داشته باشند، شناخته نشده‌اند. وجود تعداد زیادی قارچ، نشانه وجود مقدار زیاد مواد آلی می‌باشد. در بررسی‌های انجام شده قارچ‌ها از آب آشامیدنی و نیز از سطح داخلی لوله‌های توزیع آب جدا شده‌اند. آنها در آب تصفیه شده باقی مانده و یا پس از فرآیند تصفیه وارد سیستم شده، در هر صورت اسپور قارچ‌ها قادرند مدت زمان طولانی زنده باقی بمانند. قارچ‌های بیماری‌زا در آب مقطر استریل برای مدت زمان زیادی زنده می‌مانند. گرچه مزه و بوی آب‌های آشامیدنی مربوط به وجود ارگانیزم‌های پروکاریوت مثل باکتری‌ها، اکتینومیسیت‌ها و سیانوباکترها است، ولی قارچ‌ها نیز باعث تغییر بو و مزه آب می‌شوند.

محیط‌های مورد استفاده در این آزمون :

— سابرو دکستروز/آگار^۱ دارای پیتون و گلوکز است و برای جداسازی و شمارش کپک‌ها به کار می‌رود و فاقد آنتی بیوتیک است.

— عصاره مخمر مالت گلوکز/آگار^۲ این محیط دارای عصاره مخمر، مالت، گلوکز و پیتون است و برای جداسازی مخمرها به کار می‌رود.

الف) آزمون جداسازی و شمارش قارچ‌ها به روش پورپلیت

مواد و وسایل مورد نیاز

➤ ارلن با گنجایش ۲۵۰ میلی لیتر

➤ پی‌پت‌های سترون ۱ و ۱۰ میلی لیتری

➤ استوانه مدرج سترون شده

➤ تشتک‌های سترون

➤ یکی از محیط‌های کشت بالا به صورت ذوب شده

➤ گرمخانه

روش کار

الف) در یک ارلن‌مایر ۲۵۰ میلی لیتری سترون، ۱۳۵ میلی لیتر آب مقطر سترون و ۱۵ میلی لیتر از نمونه آب مورد آزمون را اضافه کنید تا رقت ۱:۱۰ بدست آید.

نکته‌ها

✓ گرچه با تعداد ۲۰ نمونه می‌توان شمارش مطلوبی بدست آورد، اما بهتر است هر بار با ۴۰ نمونه با روش زیر بررسی را انجام داد.

✓ از استوانه مدرج سترون برای هر یک از نمونه‌ها استفاده کنید و یا پس از هر بار استفاده آن را با آب مقطر سترون شستشو دهید.

✓ پیش از برداشتن ۱۵ میلی لیتر نمونه، بایستی آن را بخوبی هم بزنید.

ب) ارلن حاوی نمونه را روی هم زن با ۱۵۰-۱۲۰ دور در دقیقه به مدت نیم ساعت قرار دهید و یا محتویات آن را به یک مخلوط‌کن منتقل کرده و درپوش مخلوط‌کن را گذاشته و با سرعت کم به مدت یک دقیقه یا با سرعت زیاد به مدت ۳۰ ثانیه مخلوط کنید.

نکته : مخلوط‌کن باید برای هر نمونه سترون شده باشد ظرف‌های مورد استفاده پیش از کاربری برای هر یک از نمونه‌ها باید با آب مقطر سترون شسته شوند.

پ) رقت‌های اعشاری پی‌درپی را می‌توانید با افزودن حدود ۵ میلی لیتر از سوسپانسیون با رقت ۱:۱۰ به ۴۵ میلی لیتر آب مقطر سترون، تهیه کنید.

ت) پنج تشتک سترون برای هر رقت مورد آزمایش تهیه کرده و ۱۰ میلی لیتر از یکی از محیط‌های بالا (بسته به نوع آزمون کپک یا مخمر) با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد را در تشتک با قطر ۹ سانتی متر بریزید.

ث) یک میلی لیتر از نمونه رقیق شده را با پی‌پت سترون به تشتک دارای محیط کشت ذوب شده منتقل کنید و با حرکات دورانی

۱- Sabraudextrose agar

۲- Malt glucose agar

تشتک را در جهات مختلف بچرخانید تا به خوبی مخلوط شوند سپس بگذارید تا محیط جامد شود.
(ج) تشتک‌ها را در دمای محیط (۲۴-۲۰ درجه سانتی‌گراد) قرار دهید و از تابش مستقیم نور خورشید به آنها جلوگیری نمایید.
پس از مدت ۳ الی ۷ روز برگنه‌ها را شمارش کنید.

نکته‌ها

✓ برای جلوگیری از خشک شدن محیط هنگام گرمخانه‌گذاری می‌توان مقدار بیشتری محیط کشت ذوب شده در تشتک‌ها ریخت.

✓ دمای مورد نیاز قارچ‌ها بر خلاف باکتری‌ها پایین‌تر و حدود 30°C - 20°C است.

✓ سرعت رشد قارچ‌ها بسیار آهسته‌تر از باکتری‌ها است در نتیجه مدت زمان بیشتری برای رشد نیاز دارند. (۵ تا ۷ روز)

(ج) پس از مدت زمان مورد نظر رقتی را که حدود 15° - 2° برگنه ایجاد می‌کند، انتخاب کنید.

یادآوری: شمارش قارچ‌ها مانند شمارش باکتری‌های تک سلولی نمی‌باشد زیرا که یک کلنی قارچی ممکن است از یک سلول، اسپور، توده سلولی (خوشه‌ای از اسپورها یا از یک اسپور چند سلولی)، یک میسیلیوم و یا از قطعات میسیلیوم کاذب (شامل بیش از یک سلول زنده) تشکیل شود. با وجود این به نظر می‌رسد که هر کلنی قارچی در محیط کشت آزمایشگاهی از یک واحد تشکیل‌دهنده کلنی منشأ گیرد که آن واحد تشکیل‌دهنده کلنی ممکن است تنها یک سلول و یا بیش از آن باشد.

(ح) تعداد برگنه‌ها در هر میلی‌لیتر نمونه آب را از فرمول زیر به دست آورید.

ضریب رقت \times میانگین تعداد برگنه‌ها در ۵ تشتک = تعداد برگنه

ب) آزمون جستجو و شمارش قارچ‌ها به روش کشت سطحی

مواد و وسایل مورد نیاز

➤ ارلن با گنجایش 250 میلی‌لیتر

➤ استوانه مدرج

➤ بی‌پت‌های سترون ۱ میلی‌لیتری

➤ تشتک‌های دارای یکی از محیط‌های کشت ارائه شده در آزمون

➤ میله شیشه‌ای سر کج

➤ گرمخانه با دمای 20°C

روش کار

الف) مانند آنچه برای روش پورپلیت انجام شد نمونه اولیه را آماده کرده و رقت‌های اعشاری بعدی را نیز به همان صورت که گفته شد تهیه کنید.

ب) تشتک‌های دارای محیط کشت آزمون را به مدت ۱-۱/۵ ساعت زیر هود، بصورت در باز قرار دهید تا رطوبت اضافی آنها گرفته شود. سپس یک میلی‌لیتر از نمونه یا از رقت تهیه شده را توسط بی‌پت سترون به محیط انتقال داده و با میله شیشه‌ای سر کج یا L شکل سترون بطور یکنواخت روی محیط کشت پخش کنید.

پ) پس از تلقیح بگذارید محیط کشت خشک شود، سپس آنها را بطور وارونه در گرمخانه با دمای 20°C و رطوبت هوای بالا (۹۵٪ - ۹۰٪) به مدت ۷-۵ روز قرار دهید.

نکته: قارچ‌های کند رشد ممکن است در عرض ۶-۷ روز برگنه ایجاد نکنند و به زمان بیشتری نیاز داشته باشند.

ت) بر اساس اندازه پرگنه در هر تشتک تا ۱۵۰ پرگنه را هم می‌توان شمرد، اما تعداد مناسب پرگنه ۱۰۰ عدد خواهد بود.

نکته‌ها

✓ اگر سه یا تعداد بیشتری تشتک برای هر نمونه داشته باشید، تعداد متوسط پرگنه‌ها را بدست آورید و در ضریب رقت ضرب کنید.

✓ اگر در هیچ کدام از تشتک‌ها پرگنه رشد نکند، تعداد آنها را در رقیق‌ترین نمونه، کمتر از یک گزارش کنید.

✓ اگر تعداد آنها بیش از ۱۵۰ بود، باید تعداد قارچ را به صورت بی‌شمار گزارش کرد.

✓ اگر پرگنه‌ها روی هم افتاده باشند، نتیجه را غیر قابل مشاهده ثبت کرده و آزمایش را تکرار کنید. این بار رقت را بیشتر کرده و یا مدت کمتری در گرماخانه قرار دهید.

۲-۸- آزمون‌های میکروبی شیر

شیر و فرآورده‌های آن از اجزای مهم تشکیل دهنده رژیم غذایی است که دارای پروتئین، چربی، لاکتوز، ویتامین‌ها و مواد معدنی همراه با آنزیم‌های طبیعی و دارای ارزش تغذیه‌ای بالایی است به همین دلیل محیط مناسبی برای رشد همه عوامل معمولی فساد می‌باشد. شیر خام به صورت طبیعی حتی با در نظر گرفتن میزان مراقبتی که در تهیه، نظافت دستگاه‌ها و وسایل حمل و نقل آن می‌شود دارای انواع میکروارگانیسم‌ها است. برای از بین بردن میکروب‌های عامل فساد و بیماری‌زا در شیر از روش‌های گرمایی مانند پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون استفاده می‌شود. تعیین بار میکروبی شیر مایع چه به صورت خام و چه به صورت پاستوریزه شده اهمیت زیادی دارد. مقدار زیادی از شیر به صورت فرایند شده مانند ماست و پنیر تهیه می‌شود و بار میکروبی اولیه شیر روی این محصولات نیز تأثیر می‌گذارد. به علاوه هر چه بار میکروبی شیر پس از مراحل پاستوریزاسیون کمتر باشد زمان نگهداری آن زیاد می‌شود و حتی به حدود ۶ ماه هم می‌رسد. روش‌های آزمون میکروبی شیر شامل آزمون‌هایی است که اطلاعات کلی را از نظر تعداد و فعالیت‌های میکروارگانیسم‌های موجود فراهم می‌کند. واضح است که شمارش میکروبی مورد انتظار یا مطلوب نمونه‌های شیر بستگی به میزان و نوع فرایند دارد. برای نمونه پس از پاستوریزاسیون شیر، شمارش کلی میکروبی نباید از ۱۰^۵ عدد در هر میلی لیتر بیشتر باشد و تعداد کلی فرم‌ها نیز باید کمتر از ۱۰ عدد در هر میلی لیتر باشد. برای کسب اطلاعات بیشتر به استانداردهای ملی مربوطه مراجعه شود.

واژه‌ها و تعریف عملی آنها:

● شیر خام: مایعی است حاصل از دوشیدن کامل پستان دام سالم حداقل ۴ روز پس از زایمان که در شرایط بهداشتی دوشیده شده و با اصول صحیح نگهداری شده باشد و آب یا ماده دیگری به آن اضافه یا از آن کسر نشده باشد. همچنین شیر خام باید فاقد آغوز باشد و هیچ گونه عملیات فرآوری روی آن انجام نشده باشد. آغوز اولین مایع مترشحه از پستان گاو شیرده حداقل ۴ روز پس از زایمان است.

نکته‌ها

✓ شیر خام بلافاصله پس از دوشیدن باید خنک شود و در شرایط مناسب و دمای C ۴ نگهداری شود.

✓ شیر خام باید با دمای کمتر از C ۸ تحویل گرفته شود و یخ نزده باشد.

✓ شیر دام‌هایی که با آنتی بیوتیک یا مواد هورمونی یا داروی دیگر درمان می‌شوند باید حداقل تا پایان مدت زمان تعیین شده در دستورالعمل دارو و بر طبق توصیه پزشک با سایر شیرها مخلوط و مصرف نشود.

● شیر پاستوریزه: فرآورده‌ای است که با یکی از روش‌های سالم‌سازی از شیر خام تهیه شده به طوری که کلیه میکروب‌های بیماری‌زای غیر اسپوردار آن از بین رود و تعداد میکروب‌های غیر بیماری‌زا در آن به حداقل رسیده و کمترین تغییر در ترکیب آن حاصل شده باشد.

کیفیت شیر خامی که تحویل کارخانه‌های تهیه شیر پاستوریزه و فرآورده‌های شیر می‌شود باید از نظر میکروبی با ویژگی‌های استانداردهای زیر برابری داشته باشد.

حد مجاز در میلی لیتر..... نوع میکروارگانیسم
 5×10^5 باکتری‌های هوازی مزوفیل
 کمتر از 10^6 کلی فرم‌ها
 منفی..... اشربشیاکلی

روش‌های ارزیابی آلودگی میکروبی شیر عبارتند از:

۱-۲-۸ - آزمون احیای متیلن بلو: یکی از آزمایش‌های تعیین کیفیت شیر که با آن تعداد باکتری‌های موجود در شیر خام تخمین زده می‌شود، آزمایش احیای متیلن بلو است. اساس این آزمون بر این است که باکتری‌های موجود در شیر در دمای مناسب به سرعت رشد کرده و اکسیژن محیط را مصرف کنند. در اثر مصرف اکسیژن، حالت شیمیایی محیط تغییر کرده و پتانسیل اکسیداسیون و احیاء پایین می‌آید. برای تخمین زدن میزان فعالیت باکتری‌ها، می‌توان رنگ متیلن بلو (شناساگر حالت اکسیداسیون و احیاء) به شیر اضافه کرد. این شناساگر در ابتدا رنگ آبی دارد. اما پس از مصرف شدن اکسیژن محیط توسط باکتری‌های موجود در شیر رنگ خود را از دست داده و بی‌رنگ می‌شود. به طور کلی، طول مدت احیاء با تعداد باکتری‌های موجود در شیر نسبت عکس دارد. یعنی هر چه تعداد باکتری‌ها زیاد تر باشد زمان کمتری برای تغییر رنگ متیلن بلو لازم است. برای تسریع رشد باکتری‌های موجود در شیر و کاهش طول مدت آزمون، پس از افزودن شناساگر، باید نمونه شیر را در دمای کنترل شده قرار داد.

مواد و وسایل مورد نیاز

الف) رنگ متیلن بلو- قرص‌های این ماده رنگی هر کدام دارای ۱۹ میلی گرم متیلن بلو استاندارد است و لازم است هر قرص را در ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر سترون و سرد شده حل کرده و به حجم ۸۰۰ میلی لیتر رساند. این محلول در یخچال تا ۲ ماه قابل نگهداری و مصرف است.

ب) گرمخانه با دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی گراد

پ) لوله آزمایش حدود ۲۵-۲۰ میلی لیتری با در لاستیکی

ت) نمونه شیر و نمونه شاهد برای مقایسه رنگ

روش کار

حدود ۱ سانتی متر مکعب از محلول استاندارد رنگ آبی متیلن را با ۱۰ میلی لیتر از نمونه شیر مورد آزمون از پیش یکنواخت شده در لوله آزمایش دردار ریخته و به خوبی مخلوط نمایید. سپس آن را بدون فاصله در حمام آب گرم با دمای ۳۷/۵ درجه سانتی گراد قرار داده تغییر رنگ را مشاهده کنید و زمانی که رنگ شیر به خوبی سفید شد زمان را یادداشت کنید. در شرایط عادی نمونه ظرف مدت ۳ تا ۵ ساعت بی‌رنگ می‌شود.

مزایای روش احیاء رنگ

- سرعت زیاد در رسیدن به پاسخ

– نیاز به کمترین فضا و امکانات

– امکان انجام آزمون برای تعداد زیادی نمونه به صورت همزمان

عیب‌های روش احیای رنگ

– در این روش نوع میکروب و بیماری‌زا بودن باکتری‌ها مشخص نمی‌باشد.

– یافته‌های آزمون تاحدی تابع دما، نور، نوع باکتری و مواد طبیعی احیاء کننده موجود در شیر می‌باشد.

نکته: به جای آزمون احیای متیلن بلو می‌توان از رنگ‌های دیگر مانند رزازورین و ۲،۳،۵ تری فنیل تترازولیم کلراید هم استفاده نمود.

۲-۲-۸ – آزمون شمارش باکتری‌های مقاوم به گرما در شیر (ترمودوریک^۱): در شیر خامی که چند روز در

دمای یخچال نگهداری شود یک یا چند نوع از باکتری‌های زیر یافت می‌شود، استرپتوکوکوس^۲، لاکتوباسیلوس^۴، میکروباکتریوم^۵، پروپیونی باکتریوم^۶، میکروکوکوس، کلی فرم، پروتئوس، سودوموناس، باسیلوس. باکتری‌هایی که در دمای پایین قادر به رشد نیستند از نظر تعداد کم هستند. عمل پاستوریزاسیون تعداد همه باکتری‌های بالا غیر از ترمودوریک‌ها (از جمله استرپتوکوک‌ها و لاکتوباسیل‌ها) را کاهش می‌دهد.

باکتری‌های اسپوردار جنس باسیلوس و کلسترییدیوم نیز در صورت حضور در شیر خام پس از فرایند پاستوریزاسیون باقی می‌مانند. فساد شیر پاستوریزه ناشی از رشد استرپتوکوک‌های مقاوم به حرارت (ترمودوریک) و عمل تجزیه لاکتوز و تولید اسید لاکتیک توسط آنهاست. این امر باعث کاهش pH به نقطه ایجاد لخته (به pH حدود ۴/۵) می‌گردد. سپس استرپتوکوک لاکتیس با ادامه فعالیت‌های تخمیری و کاهش بیشتر pH تا حد ۴ یا پایین‌تر زمینه را برای رشد سایر لاکتوباسیل‌ها فراهم کند.

باکتری‌های مقاوم به گرما: باکتری‌هایی هستند که پس از پاستوریزاسیون در دمای C ۶۳/۵ به مدت ۳ دقیقه زنده می‌مانند و در شرایط مناسب رشد می‌کنند و پرگنه‌های قابل شمارش تشکیل می‌دهند.

مواد و وسایل مورد نیاز

➤ ظرف‌های شیشه‌ای درپوش دار سترون شده

➤ پی‌پت‌های سترون شده

➤ حمام بخار آب قابل تنظیم با دمای C ۶۳/۵

➤ گرمخانه با دمای C ۳۰

➤ تشتک‌های خالی

➤ رقیق کننده پیتون نمک‌دار

➤ محیط کشت ذوب شده آگار شیردار^۷

۱- Thermoduric

۲- Streptococcus

۳- Leuconostoc

۴- Lactobacillus

۵- Microbacterium

۶- Propionibacterium

۷- Litmus Milk Agar

روش کار

الف) ۱۰ میلی لیتر نمونه شیر مورد آزمون را وارد یک ظرف شیشه ای سترون شده کنید و در پیچ آن را محکم ببندید.
ب) ظرف شیشه ای را به طور کامل در حمام آب با دمای $63/5^{\circ}\text{C}$ غوطه ور کنید. بعد از ۳۵ دقیقه آن را خارج کرده و بلافاصله در آب با دمای 2°C خنک کنید. نمونه های لخته شده را جدا و از مراحل آزمون خارج کنید. این امر را در گزارش آزمون وارد نمایید.

نکته ها

✓ برای اطمینان از این که تمام شیشه ها حداکثر به مدت ۵ دقیقه به دمای $63/5^{\circ}\text{C}$ رسیده اند. روش زیر را به کار بگیرید.
✓ داماسنجی با درجه بندی 1°C را از یک دریچ سوراخ دار عبور دهید به نحوی که مخزن آن در نمونه غوطه ور شود و نشتی نداشته باشد. ده میلی لیتر آزمون را به شیشه منتقل کنید و دریچ حامل داماسنج را ببندید. سپس در حین انجام آزمون این شیشه را نیز در حمام آب غوطه ور سازید. به مدت رسیدن دما تا 63°C توجه نمایید.
✓ اگر در مدت ۵ دقیقه دمای داخل شیشه ها به 63°C نرسیده ممکن است به دلیل جابجایی ضعیف گرما در آنها باشد که در این صورت باید تعداد آنها را کم کرد، یا سرعت گردش و یا هم زدن آب را بیشتر کرد.
پ) بلافاصله بعد از خنک کردن نمونه، کشت پورپلیت (روش استاندارد) را انجام دهید. برای این منظور با پی پت سترون شده، ۱ میلی لیتر از نمونه خنک شده را به تشتک اضافه کنید و محیط کشت ذوب شده آگار شیردار را روی آن بریزید. سپس تشتک های دارای نمونه و محیط ذوب شده را دوران دهید تا به خوبی مخلوط شود، سپس به حال خود بگذارید تا سفت شوند.
ت) تشتک های آماده شده را به مدت دو روز در دمای 3°C گرمخانه گذاری کنید به مدت دو روز نگهداری کنید.
ث) پس از این مدت تعداد باکتری ها را با استفاده از فرمول CFU محاسبه نمایید و نتیجه را به عنوان تعداد باکتری های ترمودوریک به ازای هر گرم یا هر میلی لیتر نمونه گزارش کنید.

۳-۲-۸ — آزمون شمارش کلی میکروبی شیر: از این آزمون برای تعیین بار میکروبی شیر استفاده می شود.

محیط های کشت مورد استفاده در آزمون:

— تشتک پلیت کانت آگار

— آگار مغذی

مواد و وسایل مورد نیاز

➤ تشتک های یکبار مصرف

➤ پی پت های سترون ۱ میلی لیتری

➤ لوله های آزمایش برای تهیه رقت های پی در پی

➤ رقیق کننده رینگر

➤ یکی از محیط کشت های مورد استفاده در آزمون به حالت ذوب شده

➤ گرمخانه قابل تنظیم با دمای 3°C

روش کار

الف) ابتدا رقت های 10^{-1} تا 10^{-5} از نمونه شیر مورد آزمون را در لوله های دارای ۹ میلی لیتر رقیق کننده رینگر تهیه کنید.

(بر اساس روش تهیه رقت های بعدی یا متوالی در فصل چهارم)

ب) برای هر رقت آماده شده دو کشت پورپلیت یا استاندارد با یکی از محیط کشت های بالا انجام دهید. (مانند روش کشت

استاندارد در فصل چهارم)

پ) تستک‌های کشت شده را به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در دمای 3°C قرار دهید.

نکته: برای شمارش باکتری‌های سرماگرا و مقاوم به گرما می‌توان کشت‌ها را به ترتیب به مدت ۷ و ۲ روز در دمای 6°C و 55°C قرار داد.

ت) پس از این زمان شمارش کلنی‌ها را انجام دهید و با استفاده از راهنماهای ارائه شده در فصل چهارم CFU/gr را برای هر گروه از باکتری‌های بالا محاسبه کنید.

۲-۴-۸- آزمون شمارش مستقیم میکروسکوپی در شیر: این روش در فصل ششم شرح داده شده است.

۲-۵-۸- آزمون شمارش کلی فرم‌ها: برای انجام این آزمون از روش ارائه شده در آزمون میکروبی آب استفاده کنید.

۲-۶-۸- شمارش اسپور مقاوم باکتری‌های هوایی (مزوفیل و مقاوم به گرما):

الف) ۱ میلی لیتر از محلول تورنسل را به 100 میلی لیتر آزمايه (نمونه مورد آزمون) اضافه کنید.

ب) ۹ شیشه در پیچ دار دارای ۹ میلی لیتر شیر تورنسل دار آماده کنید و به هر یک از سه شیشه در پیچ دار سترون 10 میلی لیتر

و به سه شیشه دیگر ۱ میلی لیتر و به سه شیشه آخر $1/10$ میلی لیتر از نمونه آماده شده بند الف را بیافزایید.

نکته: برای هر گروه از میکروارگانیسم‌های بالا یک سری ۹ تایی آزمون باید انجام گیرد.

پ) در پیچ شیشه‌ها را محکم بسته و آنها را در اتوکلاو با دمای 100°C یا آب در حال جوش به مدت ۳ دقیقه قرار دهید و

سپس بگذارید خنک شوند.

ت) پس از خنک شدن، شیشه‌ها را به مدت ۱۴ روز در دمای 3°C و به مدت ۷ روز در دمای 55°C (برای مزوفیل‌ها)

گرمخانه‌گذاری کنید.

ث) پس از این زمان‌ها شیشه‌ها را از نظر ایجاد کدورت و رشد باکتری‌ها بررسی کنید.

نکته: بهتر است برای بررسی دقیق‌تر رشد باکتری‌ها از رنگ‌آمیزی نمونه‌ها با رنگ نیومن استفاده کنید.

روش رنگ‌آمیزی نیومن^۱: ابتدا یک قطره سرم فیزیولوژی بر روی لام قرار دهید و یک پرگنه را در آن پخش کرده و یک

گستره میکروبی تهیه کنید و آن را در دمای 50° درجه سانتی‌گراد در گرمخانه به مدت حدود ۵ دقیقه خشک کنید. سپس به مدت دو

دقیقه گسترش‌ها را با رنگ نیومن رنگ‌آمیزی کنید. رنگ نیومن دارای متیلن بلو و تتراکلرواتان به عنوان حلال چربی است. پس از

خنک شدن گستره‌ها در معرض هوا به ملایمت آنها را با آب شستشو دهید و آب اضافی را از روی لام خارج کنید، در هوا خشک

کنید. سپس زیر میکروسکوپ مشاهده کنید.

ج) پس از بررسی شیشه‌ها از نظر کدورت و تعیین نمونه‌های مثبت با استفاده از جدول MPN اسپور باکتری‌ها (جدول ۴-۸،

MPN) را برای شمارش تعداد اسپور هر گروه باکتری (مزوفیل و مقاوم به گرما) محاسبه کنید.

جدول ۴-۸ - جدول استاندارد MPN اسپورها

تعداد لوله‌های واکنش مثبت			حداکثر تعداد احتمالی در گرم / میلی لیتر	تعداد لوله‌های واکنش مثبت			حداکثر تعداد احتمالی در گرم / میلی لیتر
۳ لوله هریک ۱۰ میلی لیتر	۳ لوله هریک ۱ میلی لیتر	۳ لوله هریک ۰/۱ میلی لیتر		۳ لوله هریک ۱۰ میلی لیتر	۳ لوله هریک ۱ میلی لیتر	۳ لوله هریک ۰/۱ میلی لیتر	
۱۰	۱	۰/۱		۱۰	۱	۰/۱	
۰	۰	۰	۰	۲	۰	۰	۹
۰	۰	۱	۳	۲	۰	۱	۱۴
۰	۰	۲	۶	۲	۰	۲	۲۰
۰	۰	۳	۹	۲	۰	۳	۲۶
۰	۱	۰	۳	۲	۱	۰	۱۵
۰	۱	۱	۶	۲	۱	۱	۲۰
۰	۱	۲	۹	۲	۱	۲	۲۷
۰	۱	۳	۱۲	۲	۱	۳	۳۴
۰	۲	۰	۶	۲	۲	۰	۲۱
۰	۲	۱	۹	۲	۲	۱	۲۸
۰	۲	۲	۱۲	۲	۲	۲	۳۵
۰	۲	۳	۱۶	۲	۲	۳	۴۲
۰	۳	۰	۹	۲	۳	۰	۲۹
۰	۳	۱	۱۳	۲	۳	۱	۳۶
۰	۳	۲	۱۶	۲	۳	۲	۴۴
۰	۳	۳	۱۹	۲	۳	۳	۵۳
۱	۰	۳	۱۵	۲	۰	۰	۲۳
۱	۱	۰	۷	۳	۰	۱	۳۹
۱	۱	۱	۱۱	۳	۰	۲	۶۴
۱	۱	۲	۱۵	۳	۰	۳	۹۵
۱	۱	۳	۱۹	۳	۱	۰	۴۳
۱	۲	۰	۱۱	۳	۱	۱	۷۵
۱	۲	۱	۱۵	۳	۱	۲	۱۲۰
۱	۲	۲	۲۰	۳	۱	۳	۱۶۰
۱	۲	۳	۲۲	۳	۲	۰	۹۳
۱	۳	۰	۱۶	۳	۲	۱	۱۵۰
۱	۳	۱	۲۶	۳	۲	۲	۲۱۰
۱	۳	۲	۲۴	۳	۲	۳	۲۶۰
۱	۳	۳	۲۹	۳	۳	۰	۲۴۰
				۲	۲	۱	۲۶۰
				۲	۲	۲	۱۱۰۰
				۳	۲	۳	۱۱۰۰



شکل ۸-۹- لیستریا مونوسایتوجنز

۷-۲-۸- آزمون جستجوی لیستریا مونوسایتوجنز^۱ در شیر: باکتری‌های جنس لیستریا شکل میله‌ای کوتاه به طول ۴/۵ تا ۵/۵ و قطر ۵-۲ میکرون با دو انتهای گرد و در بعضی موارد به صورت سلول‌های خمیده تکی یا زنجیره کوتاه و یا به شکل ۷ دیده می‌شوند. طول رشته‌های آنها گاه ۲۰-۶ میکرون یا بیشتر می‌رسد. این باکتری‌ها قادر به رشد در دمای ۳۳°C - ۳°C می‌باشند و pH مناسب رشد آنها نزدیک به خنثی است. باکتری میکروآئروفیل بوده و در شرایط هوازی نیز به خوبی رشد می‌کنند. گرم مثبت هستند اما در کشت‌های کهنه ممکن است تغییر رنگ دهند. پرگنه‌های این جنس در شرایط تابش نور به طور مایل به رنگ خاکستری مایل به آبی با درخشندگی عادی و جلای سبزابی دیده می‌شوند.

باکتری‌های این جنس به‌طور فراوان در طبیعت، آب، گل، لجن، رستنی‌ها و مدفوع انسان و حیوان پراکنده است و در کشورهای پیشرفته مهم‌ترین باکتری بیماری‌زا برای انسان و حیوان است. عامل بیماری می‌تواند از حیوان و افرادی که با حیوانات سروکار دارند به انسان منتقل گردد.

در سال‌های اخیر این باکتری به عنوان عامل بیماری‌های ناشی از مواد غذایی بخصوص در فرآورده‌های شیری شناخته شده است. بیماری ممکن است با علائم آنفلونزا ظاهر شده و گاه ناشناخته بماند.

با وجود گزارش‌های بحث‌انگیز در مورد مقاومت این باکتری به حرارت پاستوریزاسیون به نظر می‌رسد که این باکتری به طور عادی نمی‌تواند در فرایند پاستوریزاسیون (۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه) زنده بماند. جداسازی لیستریا از نمونه‌های غذایی نیاز به مراحل غنی‌سازی دارد.

محیط کشت‌های مورد استفاده در آزمون:

۱- آبگوشت غنی‌کننده لیستریا^۲

۲- آگار لیستریا مک براید^۳

۳- آگار تریپتیکاز سوی

مواد و وسایل مورد نیاز

➤ ظروف شیشه‌ای سترون شده با گنجایش ۳۰۰ میلی‌لیتر

➤ همزن یا مخلوط‌کن

➤ لوپ یا حلقه کشت

➤ لوله آزمایش برای تهیه رقت

➤ محیط‌های کشت گفته شده در بالا

➤ محلول ۵/۵ درصد هیدروکسید پتاسیم (رقیق‌کننده)

➤ گرمخانه قابل تنظیم با دمای ۳۰°C و ۳۵°C

۱- Listeria monocytogenesis

۲- Listeria enrichment broth

۳- Listeria Mc Bride agar

روش کار

الف) ابتدا ۲۵ گرم نمونه مورد آزمون را به ۲۲۵ میلی لیتر آبگوشت غنی کننده لیستریا افزوده و با دقت مخلوط و یکنواخت کنید.

ب) مخلوط آماده شده را به مدت ۷ روز در گرمخانه با دمای 30°C قرار دهید.

پ) یکبار پس از ۲۴ ساعت و بار دیگر پس از ۷ روز با استفاده از رقیق کننده ۵/۵ در صد هیدروکسید پتاسیم و نمونه غنی شده در مرحله پیش رقت 10^{-1} را تهیه کنید.

ت) از رقت تهیه شده با لوپ یک حلقه کامل برداشته و روی سطح مک براید آگار کشت دهید.
نکته: نمونه رقیق شده باید به سرعت کشت داده شود.

ث) تشتک‌های دارای محیط، کشت شده را در شرایط هوازی به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه با دمای 35°C قرار دهید.

ج) پرگنه‌های تشکیل شده را از نظر وجود لیستریا بررسی کنید.

نکته: پرگنه‌های لیستریا به رنگ آبی مایل به خاکستری ظاهر می‌شوند و باید در زیر نور مناسب مشاهده شوند.

چ) از پرگنه‌های مورد نظر برداشت کرده و در محیط تریپتیکازسوی آگار کشت خطی دهید و تشتک‌های کشت شده را در گرمخانه با دمای 30°C به مدت ۲۴ ساعت قرار دهید.

ح) پس از ۲۴ ساعت از پرگنه‌های مجزا برداشته و برای رنگ‌آمیزی گرم استفاده نمایید.

۸-۲-۸- آزمون جستجو و شمارش کپک‌ها و مخمرها در

شیر: این آزمون را مانند آنچه در مورد آب گفته شد، انجام دهید.

۸-۳- آزمون‌های میکروبی پنیر

پنیر نوعی فرآوردهٔ لخته شده و تخمیر شده است که در اثر فعالیت پروتئولیتیک (تجزیه پروتئین) برخی از باکتری‌ها مانند گونه‌های لاکتوباسیلوس در شیر تولید می‌شود و دارای تعداد زیادی از باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک است. نمونه برداری از پنیر باید در شرایط سترون و با دستگاه‌های سترون شده انجام گیرد.

نکته: وزن نمونه برداشت شده نباید از 50°g گرم کمتر باشد.

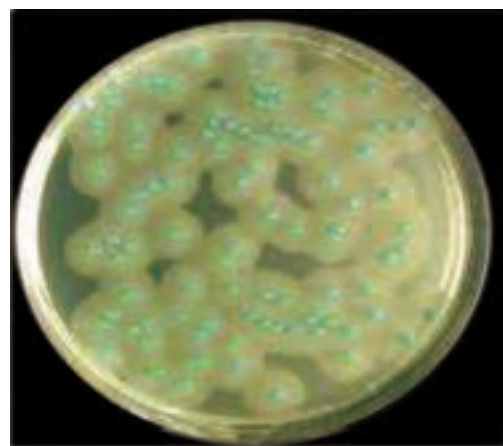
رقیق کردن نمونه پنیر: مهم‌ترین قسمت در انجام آزمون میکروبی پنیر آماده‌سازی آزمايه و تهیه رقت‌های متوالی است که باید به صورت خاص و با رقیق‌کننده‌های خاصی انجام شود.

● رقیق‌کننده‌ها:

– محلول شیر لیتموس دار

– محلول سترات سدیم ۲٪: رقیق‌کننده مناسب‌تری است.

نکته: دمای این دو رقیق‌کننده هنگام رقیق کردن نمونه پنیر باید 45°C باشد.



شکل ۱۰-۸- پرگنه‌های لیستریا مونوسایتوجنز در محیط آگار غنی کننده لیستریا

● یکنواخت کردن :

– همگن کردن یا یکنواخت کردن نمونه پنیر رقیق شده در دو رقیق کننده بالا با روش امولسیون کردن با دست یا استفاده از مخلوط کن الکتریکی انجام می شود.

نکته: ابتدا نمونه باید در شرایط سترون و با وسیله مخصوص، به خوبی خرد شود.

● رقت های پی در پی: برای تهیه رقت های مورد نظر می توان از رقیق کننده آب پیتونه استفاده کرد.

آزمایش های میکروبی پنیر اغلب همانند آزمون های میکروبی در شیر است که به همان روش ها نیز انجام می شود مانند آزمون های :

– جستجو و شمارش کلی فرم ها

– جستجو و شمارش اشیریشیا کلی

– جستجو و شمارش کپک ها و مخمرها

– جستجو و شمارش باکتری های مقاوم به گرما (باسیلوس ها)

– جستجو و شمارش کلستریدیوم و لشای های مقاوم به گرما

۴-۸ – آزمون های میکروبی شیر خشک

عوامل مهمی بر روی میکروفلور شیر خشک تأثیر می گذارد که مهم ترین آنها عبارتند از :

۱- فرآیند حرارتی که پیش از خشک کردن به شیر داده می شود.

۲- روش خشک کردن شیر

۳- آلودگی هایی که شیر از کارخانه کسب می کند.

در میان این میکروارگانیسم ها استافیلوکوکوس اورئوس مهم ترین باکتری از نظر بهداشت عمومی است که می تواند رشد کند و سمومی به نام های آنتروتوکسین و اگزوتوکسین تولید کند که دمای 110° درجه سانتی گراد را برای مدت بیش از یک ساعت تحمل می کند. بنابراین در روش های پاستوریزاسیون و گرم کردن از بین نرفته و حدود ۱۲ ساعت بعد از مصرف موجب مسمومیت مصرف کننده با نشانه های اسهال، تهوع و بدون تب می شود، گرچه به صفر رساندن آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در غذاها مطلوب است اما در عمل این کار مقدور نیست و در بیشتر موارد تعدادی از آن در غذا وجود دارد.

نکته ها

✓ در طول نگهداری شیر خشک بار میکروبی آن کاهش می یابد به طوری که پس از یک سال بیشترین میزان رشد مربوط به باکتری های اسپوردار بی هوازی مانند کلستریدیوم ها است.

✓ بازسازی شیر خشک یعنی خارج کردن آن از حالت خشک و تبدیل آن به شیر مایع رقیق در انجام آزمون های میکروبی مهم است زیرا زمانی که شیر باز سازی می شود همه میکروب های زنده آن قادر به رشد می شوند.

نمونه برداری : روش نمونه برداری از شیر خشک در فصل چهارم به طور کامل شرح داده شده است.

● رقیق کننده ها :

– محلول رینگر $\frac{1}{4}$ غلظت

– محلول آب پیتونه ۱۸٪

روش رقیق کردن شیر خشک برای آزمون‌های میکروبی

الف) در شرایط سترون مقدار ۱۰ گرم شیر خشک را وزن کرده و به یک ظرف دهان گشاد که دارای ۹۰ میلی لیتر آب مقطر سترون با دمای 50°C است اضافه کنید تا همگن شود.

ب) ظرف دارای شیر خشک و آب مقطر را به مدت ۱۲ ثانیه ۲۵ مرتبه تکان دهید.

● روش آزمون‌های میکروبی شیر خشک: بیشتر آزمون‌های میکروبی شیر خشک مانند آزمون‌های میکروبی شیر است و

مهم‌ترین آنها عبارتند از:

– آزمون مستقیم میکروسکوپی

– شمارش کلی میکروب‌ها

– شناسایی و شمارش کلی فرم‌ها و اشریشیاکلی

– شناسایی آلودگی‌های قارچی (کپک‌ها و مخمرها)

– جستجو، شناسایی و شمارش سالمونلاها

شناسایی و شمارش استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت در شیر خشک

محیط کشت‌های مورد استفاده در آزمون:

– برد پارکر آگار همراه با زرده تخم مرغ: محیط کشت افتراقی – انتخابی برای تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس است

که دارای تریپتون و عصاره گوشت به عنوان مواد مغذی، لیتیم کلرید و نمک تلوریت پتاسیم برای جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم منفی و زرده تخم مرغ برای شناسایی آنزیم لسیتیناز تولید شده توسط این باکتری است.

– مانیتول سالت آگار^۱: محیط کشت انتخابی است که دارای پیتون و عصاره گوشت به عنوان مواد مغذی، نمک طعام برای

جلوگیری از رشد سایر میکروارگانیسم‌ها و قند مانیتول است.

نکته: تنها کربوهیدرات قابل تخمیر توسط این باکتری مانیتول است.

– پلاسما کوآگولاز با تیلین دی آمین تتر / استیک اسید^۲: افزودن اتیلن دی آمین تتر استیک اسید (EDTA) به عنوان

آنتی کوآگولانت (ضد انعقاد) است.

نکته: پلاسما خون خرگوش برای ساخت این محیط و برای تعیین قدرت تولید آنزیم کوآگولاز و ایجاد لخته در پلاسما

خون استفاده می‌شود.

مواد و وسایل مورد نیاز

➤ لوله‌های آزمایش برای تهیه رقت‌های اعشاری

➤ بی‌پت‌های سترون ۱ میلی لیتری

➤ تستک‌های دارای یکی از دو محیط کشت برد پارکر آگار یا مانیتول سالت آگار

➤ گرمخانه قابل تنظیم با دمای 37°C

روش کار

الف) از نمونه بازسازی شده شیر خشک که از پیش شرح داده شد، رقت‌های مورد نظر را در لوله‌های سترون شده دارای

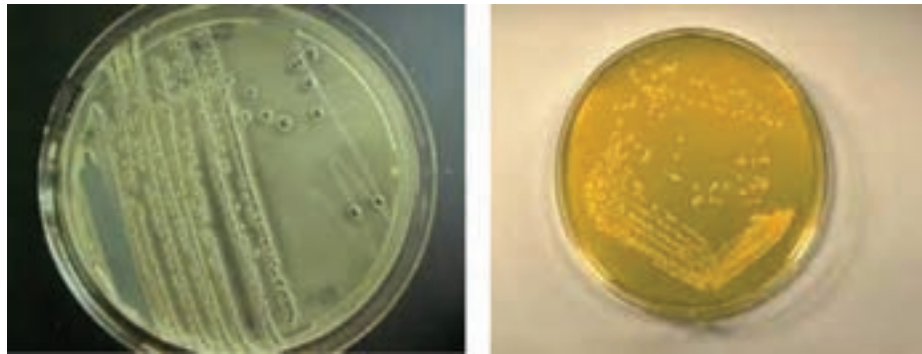
۱- Baird Parker Agar

۲- Mannitol Salt Agar

۳- Coagulase Plasma With EDTA

۹ میلی لیتر آب مقطر تهیه کنید. (۱۰-۵ تا ۱۰-۱)

(ب) برای هر رقت کشت سطحی بر روی دو پلیت انجام دهید (یکی از محیط کشت‌های گفته شده)
(پ) تشتک‌های کشت شده را به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در گرمخانه با دمای 37°C قرار دهید.
(ت) پس از این مدت کلنی‌های تشکیل شده را از نظر وجود استافیلوکوکوس اورئوس بررسی نمایید.
نتیجه: کلنی‌های استافیلوکوکوس اورئوس در محیط برد پارکر آگار به دلیل تجزیه نمک تلوریت پتاسیم و تولید ماده سیاه رنگ تلوریم و همراه با هاله رسوبی دور هر کلنی به دلیل تجزیه زرده تخم مرغ با آنزیم لیستیناز می‌باشند.



شکل ۱۱-۸- کلنی‌های استافیلوکوکوس. (الف) در محیط مانیتول سالت آگار، (ب) در محیط برد پارکر

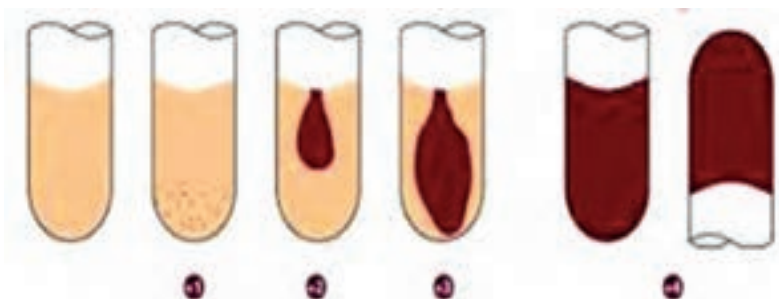
● **تأیید استافیلوکوکوس اورئوس (تست کوآگولاز):** برای تأیید استافیلوکوکوس اورئوس از آزمایش کوآگولاز استفاده می‌شود که به یکی از دو روش زیر انجام می‌گردد:

الف) روش سریع: در هر انتهای یک لام، یک قطره محلول $\frac{1}{4}$ رینگر ریخته و مقداری از پرگنه مورد آزمایش به آن اضافه کنید. سپس یک قطره را به عنوان شاهد منظور کنید و به دیگری یک قطره پلاسما رقیق نشده خرگوش یا انسان اضافه کنید. مدت ۵ ثانیه توسط سوزن کشت، پلاسما و پرگنه را هم بزینید. در صورت وجود آنزیم کوآگولاز، قطره حاوی پلاسما بصورت گلوله‌ای در می‌آید که نشانه مثبت بودن آزمایش است.

ب) روش آهسته:

– در یک لوله آزمایش $5/5$ میلی لیتر از پلاسما سیتراته خرگوش را که چهار بار رقیق شده اضافه کنید. سپس با حجم مساوی از محیط آبگوشت غذایی دارای کشت ۲۴ تا ۳۰ ساعته استافیلوکوکوس مورد آزمایش مخلوط کنید.

– در لوله دیگر $5/5$ میلی لیتر پلاسما سیتراته را به $5/5$ میلی لیتر آبگوشت غذایی سترون بیفزایید (کنترل پلاسما به عنوان شاهد منفی) و تا ۴ ساعت در دمای 37°C قرار دهید.



شکل ۱۲-۸- نمونه‌های تست مثبت و منفی کوآگولاز در سرم سیتراته خون خرگوش

نکته: لوله‌های منفی را تا ۲۴ ساعت در گرمخانه نگه داشته و سپس دوباره بررسی کنید.
– چنانچه اسه تافیلوکوکوس کوآگولاز مثبت بوده و آزمایش درست انجام شده باشد پلاسما در لوله محتوی میکروارگانیسم منعقد می‌شود ولی در لوله شاهد منفی پلاسما نباید منعقد گردد. وجود لخته‌های کوچک جدا از

هم (+۱) مثبت به حساب نیامده و با مراجعه به شکل ۱۲-۸ حالات ۲+۳+۴ و مثبت بشمار می‌آیند.

۵-۸ - آزمون‌های میکروبی فراورده‌های غلات

آرد غلات: عبارت است از غلات آسیاب شده (گندم - جو - ذرت - برنج) که بسته به مورد تمام یا بخشی از پوسته و جوانه آن جدا شده و به ذراتی با اندازه مورد نظر تبدیل شده باشد.

ویژگی‌های میکروبیولوژی آرد غلات

ویژگی	نوع فرآورده	گندم آرد، پوست‌کنده، بلغور	جو آرد، پوست‌کنده، بلغور	ذرت آرد، بلغور	آرد برنج
شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در گرم		حداکثر ۱۰ ^۵	حداکثر ۵ × ۱۰ ^۵	حداکثر ۱۰ ^۴	حداکثر ۱۰ ^۵
کلی فرم‌ها در گرم		-	-	-	-
اشریشیاکلی در گرم		-	-	-	-
کلستریدیوم پرفرانزانس در گرم		حداکثر ۱۰ ^۲	حداکثر ۱۰ ^۳	حداکثر ۱۰ ^۲	حداکثر ۱۰ ^۲
باسیلوس سرئوس در گرم		-	-	-	حداکثر ۱۰ ^۲
کپک‌ها در گرم		حداکثر ۵ × ۱۰ ^۳	حداکثر ۵ × ۱۰ ^۲	حداکثر ۵ × ۱۰ ^۳	حداکثر ۵ × ۱۰ ^۳

* برای مواردی که به صورت - مشخص شده عدد نداریم.

۱-۵-۸ - آزمون جستجو و شمارش باسیلوس سرئوس در برنج: باکتری میله‌ای شکل گرم مثبت،

اسپورزا، هوازی، بی‌هوازی اختیاری و مقاوم به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین می‌باشد. این باکتری در طبیعت بطور گسترده‌ای پراکنده است. و از مواد غذایی گوناگون جدا می‌شود. باسیلوس سرئوس تا دمای ۴۸°C قادر به رشد بوده و دمای مناسب رشد آن ۳۰ تا



شکل ۱۳-۸ - باسیلوس سرئوس

۳۵°C است. این باکتری آنروتوکسین و آنزیم لستیناز تولید می‌کند و یکی از عوامل مسمومیت غذایی می‌باشد. مسمومیت غذایی ناشی از باسیلوس سرئوس هنگامی روی می‌دهد که مواد غذایی پخته شده پیش از مصرف چند ساعت خارج از یخچال نگهداری شوند. مواد غذایی که تا به حال سبب مسمومیت با این باکتری شده‌اند، شامل گوشت پخته، سبزی‌ها، برنج پخته و سرخ شده، سس وانیل، سوپ‌ها و جوانه گیاهان خام می‌باشند. دو نوع بیماری در رابطه با مصرف مواد غذایی آلوده به باسیلوس سرئوس نسبت داده می‌شود. نوع اول و شناخته شده تر آن که با دردهای شکمی، اسهال و دوره

نهفتگی ۴ تا ۶ ساعته مشخص می‌گردد و علائم آن ۱۲ تا ۲۴ ساعت به طول می‌انجامد و ناشی از مصرف شیر و لبنیات آلوده است نوع دوم با حملات حاد تهوع و استفراغ مشخص می‌گردد در زمان بین ۱ تا ۵ ساعت پس از مصرف غلات و برنج پخته آلوده رخ می‌دهد. محیط‌های کشت مورد استفاده در آزمون محیط کشت کامل MYP آگار^۱: دارای محیط پایه مانیتول همراه با زرده

تخم مرغ و آنتی بیوتیک پلی میکسین

مواد و وسایل مورد نیاز

- بی‌پت‌های ۱ میلی لیتری سترون شده
- لوله‌های شیشه‌ای سترون شده برای تهیه رقت‌های اعشاری
- تشتک‌های دارای محیط کشت MYP Agar
- رقیق کننده آب بافر پیتونه
- گرمخانه قابل تنظیم با دمای 30°C
- میله شیشه‌ای سرکج

روش کار

الف) ابتدا سوسپانسیون اولیه و آزمایش را تهیه کنید.

ب) در لوله‌های آزمایش دارای ۹ میلی لیتر رقیق کننده آب پیتونه با استفاده از نمونه آزمایش رقت‌های اعشاری آماده کنید. (۱- تا ۱۰-۵)

پ) با استفاده از بی‌پت سترون ۱/۸ میلی لیتر از هر رقت به دو پلیت محیط کشت MYP agar منتقل کنید و با میله شیشه‌ای سرکج آن را روی سطح محیط به خوبی پخش نمایید. (کشت سطحی)

ت) پلیت‌های کشت شده را چند دقیقه در شرایط آزمایشگاه قرار دهید تا نمونه تلقیح شده جذب محیط کشت شود.

ث) سپس پلیت‌های کشت شده را در گرمخانه با دمای 30°C به مدت ۲۴-۴۸ ساعت قرار دهید.

ج) پس از این مدت پرگنه‌های تشکیل شده را از نظر وجود باسیلوس سرئوس بررسی کنید و با شمارش کلنی‌ها، CFU/g باکتری را محاسبه نمایید.

ویژگی‌های پرگنه باسیلوس سرئوس در محیط MYP Agar:

– باسیلوس سرئوس تنها باسیل مقاوم به آنتی بیوتیک پلی میکسین B می‌باشد و قادر است در این محیط کشت رشد کند.

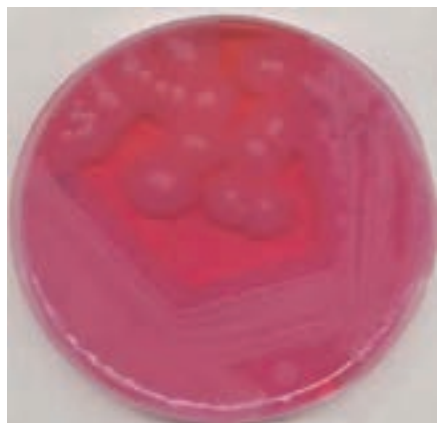
– به دلیل عدم تخمیر قند مانیتول پرگنه‌ها به رنگ صورتی دیده می‌شوند.

– به دلیل تجزیه لسیتین زرده تخم مرغ با آنزیم لسیتیناز اطراف هر کلنی هاله

رسوبی مشاهده می‌شود.

نکته: برای شمارش کلنی‌ها پلیت‌های دو رقت متوالی را که تعداد پرگنه‌های

آنها 15° - 15° باشد شمارش کنید.



شکل ۱۴-۸- پرگنه‌های صورتی همراه با هاله رسوبی

باسیلوس سرئوس در محیط MYP Agar