

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ

عملیات میکرو بیولوژی

رشته صنایع غذایی

گروه تحصیلی کشاورزی

زمینه کشاورزی

شاخه آموزش فنی و حرفه‌ای

شماره درس ۴۶۲۹

عملیات میکروبیولوژی/ مؤلفان: جعفر شفیع آبادی... [و دیگران]. - تهران: شرکت چاپ و نشر کتاب‌های درسی ایران، ۱۳۹۴.	۵۷۶
۱۱۴ ص. - مصور (رنگی). - (آموزش فنی و حرفه‌ای؛ شماره درس ۴۶۲۹)	۹۱۶ع/
متون درسی رشته صنایع غذایی گروه تحصیلی کشاورزی، زمینه کشاورزی.	۱۳۹۴
برنامه‌ریزی و نظارت، بررسی و تصویب محتوا: کمیسیون برنامه‌ریزی و تألیف کتاب‌های درسی رشته صنایع غذایی دفتر تألیف کتاب‌های درسی فنی و حرفه‌ای و کاردانش وزارت آموزش و پرورش.	
۱. میکروب‌شناسی. الف. طباطبایی، فریده. ب. شرکت چاپ و نشر کتاب‌های درسی ایران. ج. ایران. وزارت آموزش و پرورش. دفتر تألیف کتاب‌های درسی فنی و حرفه‌ای و کاردانش. د. عنوان. ه. فروست.	

همکاران محترم و دانش‌آموزان عزیز :

پیشنهادات و نظرات خود را درباره محتوای این کتاب به نشانی
تهران - صندوق پستی شماره ۴۸۷۴/۱۵ دفتر تألیف کتاب‌های درسی
فنی و حرفه‌ای و کاردانش، ارسال فرمایند.

info@tvoccd.sch.ir

پیام‌نگار(ایمیل)

www.tvoccd.sch.ir

وب‌گاه (وب‌سایت)

این کتاب با توجه به برنامه سالی - واحدی در شهریور ماه سال ۱۳۷۹ در کارگاه ارزشیابی
توسط هنرآموزان منتخب سراسر کشور و اعضای کمیسیون تخصصی برنامه‌ریزی و تألیف
رشته صنایع غذایی براساس نتایج ارزشیابی تکوینی مورد بازسازی و تجدیدنظر قرار گرفت.

وزارت آموزش و پرورش

سازمان پژوهش و برنامه‌ریزی آموزشی

برنامه‌ریزی محتوا و نظارت بر تألیف : دفتر تألیف کتاب‌های درسی فنی و حرفه‌ای و کاردانش

نام کتاب : عملیات میکروبیولوژی - ۳۵۹/۷۱

مؤلفان : جعفر شفیع آبادی، فریده طباطبایی، محسن واعظی و مسلم زحمتکش

آماده‌سازی و نظارت بر چاپ و توزیع : اداره کل نظارت بر نشر و توزیع مواد آموزشی

تهران : خیابان ایران‌شهر شمالی - ساختمان شماره ۴ آموزش و پرورش (شهید موسوی)

تلفن : ۸۸۸۳۱۱۶۱-۹، دورنگار : ۸۸۳۰۹۲۶۶، کد پستی : ۱۵۸۴۷۴۷۳۵۹

وب‌سایت : www.chap.sch.ir

صفحه‌آرا : فاطمه ناصری

طراح جلد : علیرضا رضائی‌گر

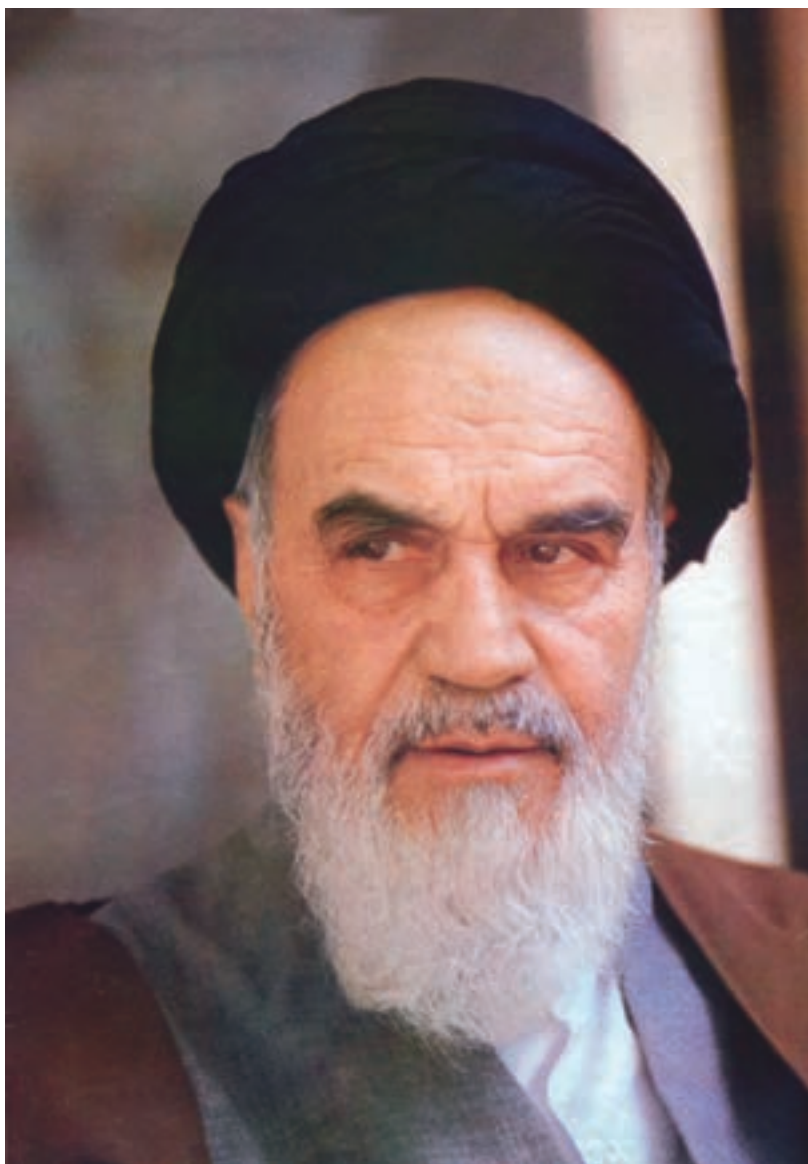
ناشر : شرکت چاپ و نشر کتاب‌های درسی ایران - تهران - کیلومتر ۱۷ جاده مخصوص کرج - خیابان ۶۱ (داروبخش)

تلفن : ۴۴۹۸۵۱۶۱-۵، دورنگار : ۴۴۹۸۵۱۶۰، صندوق پستی : ۳۷۵۱۵-۱۳۹

چاپخانه : خرمی

سال انتشار : ۱۳۹۴

حق چاپ محفوظ است.



اول باید اخلاصتان را قوی بکنید، ایمانتان را قوی بکنید، ... و این
اخلاص و ایمان، شما را تقویت می کند و روحیه شما را بالا می برد و نیروی
شما جوری می شود که هیچ قدرتی نمی تواند (با شما) مقابله کند.
امام خمینی (ره)

فهرست مطالب

۱	مقدمه
۲	فصل اوّل : مقررات کار در آزمایشگاه میکروب‌شناسی
۷	فصل دوم : وسایل و تجهیزات آزمایشگاه میکروبیولوژی
۲۵	فصل سوم : نمونه برداری
۴۰	فصل چهارم : محیط‌های کشت باکتری‌ها
۴۳	فصل پنجم : روش‌های کشت میکروارگانیسم‌ها
۵۴	فصل ششم : رنگ‌آمیزی میکروارگانیسم‌ها
۷۶	فصل هفتم : سنجش میزان رشد میکروارگانیسم‌ها
۸۵	فصل هشتم : قارچ‌ها (کپک‌ها - مخمرها)
۹۰	فصل نهم : آزمایش‌های میکروبی برخی از مواد غذایی پرمصرف
۱۱۳	منابع و مآخذ

مقدمه

در گذشته، رقابت اصلی دولت‌ها بر سر تولید سلاح مخرب و کشنده بوده است و آن که سلاح بیشتر و بهتری داشت، از قدرت و امنیت بیشتری برخوردار بود. اما با رشد افسار گسیخته جمعیت و افزایش آمار قربانی‌های ناشی از فقر غذایی، زنگ‌های خطر به صدا در آمد و مسئله تأمین غذای سالم و کافی برای مردم، در اولویت برنامه دولت‌ها قرار گرفت. لذا تحقیق و بررسی برای بهینه‌سازی و تولید بیشتر مواد غذایی شروع گردید. صنایع غذایی مورد توجه قرار گرفت و پیشرفت‌هایی در زمینه تولید و تبدیل مواد غذایی به عمل آمد و همچنین روش‌های پیشگیری از انهدام و از بین رفتن آن‌ها شناخته شد. به تدریج با افزایش سطح فرهنگ و بهداشت در جامعه، آزمایشگاه‌های کنترل کیفی به وجود آمد که در آن‌ها مواد غذایی از نظر شیمیایی و میکروبی مورد آزمایش‌های مختلف قرار گرفته، پس از اطمینان از سلامت آن‌ها، اجازه مصرف داده می‌شود. امروزه هر کشوری که بتواند غذای کافی، سالم و با کیفیت بالاتری در اختیار مردمش قرار دهد از امنیت اقتصادی و بهداشتی بالاتری برخوردار است. کتاب حاضر بر آن است تا هنرجویان گرامی را با چنین آزمایشگاه‌هایی آشنا سازد. اما به دلیل گستردگی فعالیت آن‌ها و محدودیت برنامه درسی فراگیران سعی شده فقط برخی از آزمایش‌های قابل انجام معرفی گردد به طوری که هنرجویان عزیز پس از گذراندن این واحد درسی قادر باشند برخی از مواد غذایی پیرامون خود را از نظر میکروبی مورد آزمایش قرار داده، با توجه به استانداردهای موجود، با کمک مربیان مربوطه در مورد مصرف آن‌ها اظهار نظر نمایند.

لازم به ذکر است که توجه به کتاب تئوری میکروبیولوژی و نیز دقت و درایت و همکاری مدرسان ارجمند و تلاش هر چه بیشتر آن‌ها برای انجام آزمایش‌ها، علاقه و انگیزه بیشتری در فراگیران ایجاد خواهد کرد.

مؤلفان

هدف کلی کتاب

آشنایی با اصول کار در آزمایشگاه میکروپوشناسی و ایجاد توانایی لازم برای انجام آزمایش‌های میکروبی مواد غذایی

مقررات کار در آزمایشگاه میکروب‌شناسی

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

- ۱- مقررات کار در آزمایشگاه را رعایت نماید.
- ۲- به هنگام بروز حادثه در آزمایشگاه، راه‌های مقابله با آن را بکار برد.

۱- مقررات آزمایشگاه

کاربرد موازین ایمنی در آزمایشگاه میکروب‌شناسی مواد غذایی

دنیای میکروب‌ها جهانی زنده ولی غیرقابل رؤیت می‌باشد و به همین منظور، علم میکروب‌شناسی از سایر علوم متمایز است از این روی، کارکردن با میکروب مستلزم رعایت نکات خاصی است تا در ضمن این که رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌های مورد نظر صورت می‌گیرد، از آلودگی‌های ثانویه و رشد سایر میکروب‌ها جلوگیری به عمل آید. به همین منظور هر آزمایشگاه باید دارای دستورالعملی حاوی تمام نکات ایمنی کار در آزمایشگاه باشد و قبل از شروع به آزمایش با تصور این که، کلیه میکروارگانیسم‌هایی که مورد آزمایش قرار می‌گیرند می‌توانند بالفعل و بالقوه بیماری‌زا باشند، مورد مطالعه قرار گیرند. به همین منظور کلیه کشت‌های میکروبی، گسترش‌های تهیه شده و موادی که امکان تماس آن‌ها با میکروارگانیسم زنده وجود دارد باید با دقت و توجه مورد استفاده قرار گیرند تا حتی المقدور محیط کار از آلودگی دور نگه داشته شود.

۱-۱- مقررات کار در آزمایشگاه

۱- تمام افراد هنگام حضور در آزمایشگاه باید از رویوش مخصوص و تمیز استفاده کنند و در هنگام لزوم از وسایل محافظت‌کننده مانند دستکش، عینک و پیش‌بند (مخصوصاً هنگام خالی کردن

اتوکلاو، پر کردن کوره مخصوص سوزاندن زباله بهره بگیرند.

۲- روپوش و البسه مشابه باید هنگام خروج از آزمایشگاه تعویض گشته، دقت شود که موقع غذا خوردن و استراحت، روپوش و پیش‌بند و سایر البسه محافظت‌کننده آزمایشگاه بر تن نباشد.
۳- از قفسه‌های مناسب که در جوار آزمایشگاه تعبیه گردیده است برای نگهداری البسه استفاده شود.

۴- لباس‌های مورد استفاده در آزمایشگاه باید مرتباً شست و شو و در صورت لزوم قبل از شستن سترون شود.

۵- خوردن، آشامیدن و سیگار کشیدن در آزمایشگاه مجاز نیست، زیرا موجب ورود میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به بدن می‌شود.

از چشیدن مواد غذایی که به آزمایشگاه ارسال می‌شود، باید خودداری و از ورود غذا و نوشابه به آزمایشگاه و نگهداری آن‌ها در آنجا باید جلوگیری کرد. برای رفع خستگی و غذا خوردن کارکنان باید از محلی جداگانه استفاده شود، برچسب‌ها را مطلقاً نباید با آب دهان مرطوب کرد.

۶- قلم، کتاب، کاغذ، کیف دستی و سایر لوازم شخصی را باید در محل جداگانه و مخصوص قرار داد و برای نوشتن نتایج کار و یادداشت کردن بعضی از موارد از محل مخصوص استفاده شود.
۷- میزهای کار و سطوحی که روی آن‌ها آزمایش صورت می‌گیرد باید مرتباً شسته و به وسیله‌ی مواد ضدعفونی‌کننده سترون شود (می‌توان از الکل ۷۰ درصد و یا فنل استفاده نمود).

۸- نمونه‌هایی که به آزمایشگاه ارسال می‌شود، حاوی تعداد و انواع نامشخصی از میکروارگانیسم‌ها می‌باشند که باید آن‌ها را خطر بالقوه محسوب کرد، از این رو برای دریافت نمونه، بهتر است محل جداگانه‌ای در نظر گرفته شود. این محل می‌تواند قسمتی از اتاق آزمایشگاه باشد که به قدر کافی روشن و میز و وسایل مورد استفاده در آن از جنس قابل شستشو و تمیز کردن است. وجود دستشویی در محل دریافت نمونه ضروری است. در صورتی که ظروف حاوی نمونه نشت می‌کند، باید پس از سترون کردن آن‌ها را دور انداخت.

۹- وجود سرم‌ها، آنتی‌سرم‌ها، معرف‌ها و محلول‌های مورد استفاده ممکن است آلوده، سمی یا سرطان‌زا باشد و باید در کاربرد آن‌ها نکات ایمنی را رعایت کرد.

۱۰- در صورت استفاده از وسیله برای یکنواخت کردن نمونه باید ابتدا آن را کاملاً محکم کرد، سپس وسیله مربوطه را به حرکت درآورد. استفاده از ظروف مذکور در حین حرکت خطرناک است.

۱۱- چنانچه انجام آزمایشی منجر به انتشار هاگ قارچ‌ها به محیط گردد، این آزمایش را باید

در اتاق محفوظ و ایمن انجام داد. ذرات حاصل از هاگ قارچ‌ها می‌توانند از راه تنفس، کارکنان آزمایشگاه یا حیوانات آزمایشگاهی را آلوده نمایند و همچنین منبع خطرناک آلودگی ثانویه برای محیط‌های کشت و مواد مورد آزمایش باشند. در پلیت حاوی کشت قارچ را با نوار چسب محکم ببندید تا از انتشار هاگ قارچ جلوگیری به عمل آید و در هنگام استفاده از سانتریفوژ و مخلوط‌کن نهایت دقت باید مبذول گردد. در مواردی که ظروف حاوی محیط کشت به عللی شکسته، محتویات آن روی میز آزمایشگاه می‌ریزد باید فوراً نسبت به برطرف کردن آلودگی و سترون کردن محل اقدام گردد. در استفاده صحیح از پیت، سرنگ، سوزن و حلقه‌ی کشت باید سعی و دقت گردد و توجه شود که حتی با باز کردن درب لوله‌های درپیش‌دار نیز ممکن است هاگ قارچ‌ها منتشر شود.

۱۲- نفوذ میکروارگانیسم‌ها از راه پوست امکان‌پذیر است پس، در مواردی که خطر آلودگی دست‌ها مخصوصاً هنگام کار با حیوانات آزمایشگاهی وجود دارد، باید از دستکش استفاده شود، و دست‌ها قبل و بعد از استفاده از دستکش باید با محلول‌های ضدعفونی‌کننده شسته شود، چون ممکن است منافذ ریزی در دستکش وجود داشته باشد که ورود میکروارگانیسم‌ها را امکان‌پذیر سازند.

۱۳- مکیدن مایعات آلوده و عفونت‌زا به وسیله‌ی پیت از طریق دهان ممنوع است و باید از پمپ و سرنگ مخصوص برای انجام آن استفاده شود. بعد از اتمام کار باید سوزن سرنگ‌ها را سترون کرد و سپس از بین برد تا دوباره مورد استفاده قرار نگیرند.

۱۴- ظروف حاوی کشت میکروارگانیسم‌ها باید به طور روشن و واضح برچسب گذاری شوند و اگر بعد از کشت دادن در پلیت بخار آب جمع گردد، در حمل و نقل آن‌ها کمال دقت باید مبذول گردد زیرا یک منبع شدید آلودگی را به وجود می‌آورد.

۱۵- وسایلی که تحت فشار کار می‌کنند (نظیر اتوکلاو) باید مرتباً بازدید شوند و توسط افراد با تجربه و کاردان مورد بررسی قرار گرفته، صحت عمل آن‌ها به وسیله‌ی معرف‌های مناسب کنترل گردد.

۱۶- هوای آلوده محیط و هوای آلوده موجود در اتاق‌های کشت را باید به وسیله‌ی هواکش خارج نمود و در صورت امکان قبل از خروج به وسیله‌ی صافی مخصوص تصفیه کرد.

۱۷- پیش از کاربرد سوزن کشت و پس از کاربرد نیز لازم است سوزن را به وسیله شعله یا مواد سترون‌کننده مناسب ضدعفونی نمود.

۱۸- برای حمل مواد دور انداختنی و ظروف مصرف شده، حتماً باید از سینی و ظروف مخصوص استفاده کرد. ظروف و محتویات آلوده‌ی آن قبل از شستن باید سترون شوند (دقت شود که

درب این ظروف قبل از ورود به اتوکلاو کمی شل گردد).

۱۹- هنگام حمل مواد و وسایل آلوده به عوامل عفونت‌زا دقت شود که از شکستن ظروف جلوگیری به عمل آید. چنانچه در مورد ارسال این مواد مقررات پستی خاصی وجود دارد رعایت آن مقررات الزامی است و بهتر است قبل از ارسال آن، با سازمان مسئول مشورت کرده، از راهنمایی‌های آن‌ها استفاده نمود. هر نمونه باید برحسب و فرم مخصوص درخواست آزمایش را که حاوی اطلاعات مربوط به منشأ، محتوی و زمان نمونه‌برداری است همراه داشته باشد.

۲۰- از ورود بی‌رویه و مکرر افراد متفرقه به آزمایشگاه باید جلوگیری به عمل آید.

۱-۲- مقررات ایمنی

در موقع وقوع هر حادثه‌ای در وهله اول باید حفظ سلامتی فرد یا افراد مصدوم یا در معرض خطر، نخستین هدف باشد. کمک‌های اولیه و اختصاصی پزشکی را باید در نظر داشت و از حرکت دادن شخص مصدوم حتی‌الامکان جلوگیری کرد، مگر این که فرد مصدوم در معرض خطر دیگری مانند آتش گرفتگی یا خفگی به وسیله‌ی گازهای سمی باشد، یا این که مطمئن باشید که حرکت دادن، صدمه بیشتری به فرد نمی‌زند.

چنانچه ذرات آئروسول ایجاد و در فضا منتشر شد منطقه آلوده را ترک و تا زمان فرونشستن ذرات روی زمین یا هر سطح دیگر و ضد عفونی محل از رفتن به آنجا خودداری کنید. در صورت ریختن ماده آلوده‌ای در روی سطح میز کار سریعاً و با دقت محل آلوده را ضد عفونی کنید. در مورد ذرات و قطراتی که به طور اتفاقی از کشت مایع به خارج پراکنده می‌گردند می‌توان از محلول ۵ درصد فنل استفاده کرد. برای این کار باید دستکش به دست کرده و محلول فنل را در اطراف قطره و محل آلوده ریخته و بگذارید با آن مخلوط شود. از ریختن محلول ضد عفونی کننده به طور مستقیم بر روی محل آلوده پرهیز کنید، زیرا این عمل باعث ایجاد آئروسول می‌گردد.

می‌توان از حوله یا پارچه‌ای که در محلول ضد عفونی کننده خیسانده شده است به مدت ۳۰ دقیقه روی محل آلوده استفاده کرد. سپس اطراف آن را با محلول ضد عفونی کننده پاک و بعد از اتمام کار تمام وسایل و مواد آلوده را در یک سینی گذاشته و در اتوکلاو سترون نمود.

پس از وقوع هر حادثه‌ای گزارشی کامل و جامع حاوی تمام جزئیات واقعه تهیه کرده و به مسئول مربوطه ارائه نمایید.

خودآزمایی

- ۱- چرا رعایت مقررات در آزمایشگاه میکروبیولوژی الزامی است؟
- ۲- آیا سیگار کشیدن در آزمایشگاه مجاز است؟ چرا؟
- ۳- برای دریافت نمونه‌های ارسالی به آزمایشگاه چه باید کرد؟
- ۴- برای جلوگیری از انتشار هاگ قارچ‌ها در محیط آزمایشگاه، رعایت چه نکاتی لازم است؟
- ۵- آیا شست‌وشوی دست‌ها پس از کار با دستکش لازم است؟ چرا؟
- ۶- مقررات ایمنی را در برخورد با حوادث ناگوار در آزمایشگاه شرح دهید.
- ۷- در صورت آلوده شدن قسمتی از پوست بدن به میکروب‌ها چه اقداماتی را انجام می‌دهید؟

وسایل و تجهیزات آزمایشگاه میکروبیولوژی

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

- ۱- ظروف مورد استفاده در آزمایشگاه را شناخته، نام ببرد.
- ۲- تجهیزات موجود در آزمایشگاه را شناخته، بتواند از آن‌ها استفاده نماید.
- ۳- طرز کار با اتوکلاو را شرح داده، از آن استفاده نماید.
- ۴- قسمت‌های مختلف یک میکروسکوپ را تشریح نماید.
- ۵- بتواند با تنظیم میکروسکوپ، تصویری واضح بدست آورد.

۲- وسایل و تجهیزات آزمایشگاه میکروبیولوژی

۱-۲- ظروف آزمایشگاه

۱-۱-۲- پیپت

— پیپت‌های شیشه‌ای و پلاستیکی: این پیپت‌ها از مواد غیرسمی تهیه شده‌اند و دارای دیواره مستقیم، نوک گرد هستند و برای استفاده در آزمایشگاه میکروبی‌شناسی بکار می‌روند. حداکثر حجمی را که پیپت در مدت ۴ ثانیه خارج می‌کند مقدار یک میلی‌لیتر با اختلاف ± 0.025 میلی‌لیتر است، این در صورتی است که آخرین قطره‌ی شیر رقیق نشده موجود در پیپت را با دمیدن در پیپت خارج کنید. پیپت باید طوری درجه‌بندی شده باشد که در خط نشانه 20° دارای $1/0.75$ میلی‌لیتر آب باشد، در مورد پیپت‌هایی که از جنس پلاستیک^۱ می‌باشند درجه‌بندی طوری است که در خط نشانه 20° حاوی $1/0.55$ میلی‌لیتر آب هستند. فقط پیپت‌هایی را باید به کار گرفت که نوک آن‌ها سالم و دارای درجه‌بندی‌های با علامت واضح هستند و با رنگ مایع در رقت‌های مورد استفاده، تضاد

^۱— Styrene Plastic

داشته باشند. پیپت‌هایی را که به علل مختلف آسیب دیده‌اند از رده خارج کنید.
جای مخصوص پیپت: از جنس فولاد زنگ‌زن یا آلومینیوم است برای این منظور، از لوازمی که با مس ساخته می‌شوند نباید استفاده نمود.

توجه: پس از کاربرد هر نوع پیپت بایستی آن را از طرف نوک در داخل یک محلول سترون‌کننده قرار داد.
۲-۱-۲- پتری دیش (پلیت^۱): این ظروف دارای حداقل ۸۵ میلی‌متر قطر داخلی و ۱۲ میلی‌متر عمق هستند. سطوح داخلی و خارجی این ظروف باید بدون ضایعه یا خراش و حباب باشند. ظروف پتری از شیشه و یا پلاستیک مناسب ساخته می‌شوند و باید دارای کف صاف باشند.

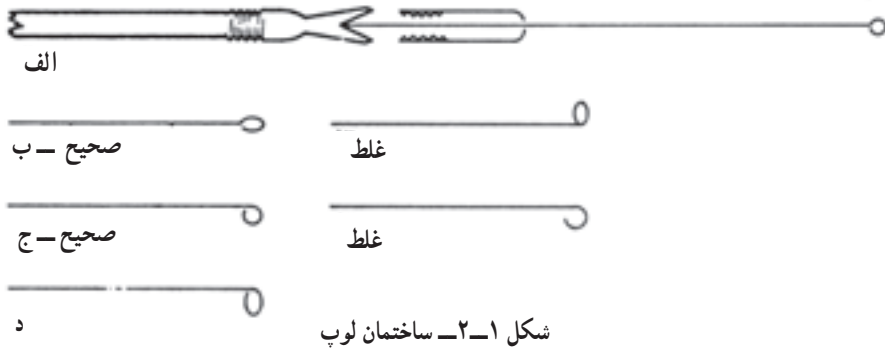
۲-۱-۳- سرنگ فلزی: به منظور انتقال سریع و صحیح مقدار ۱/۰ میلی‌لیتر از مواد غذایی مایع می‌توان از سرنگ‌های فلزی استفاده کرد. این سرنگ‌ها دارای یک میله فتری حساس نیمه‌خودکار و یک پیستون مناسب از جنس فولاد زنگ‌زن برای لوله‌ای از همین جنس و مدرج می‌باشند. سرنگ‌ها دارای یک سری پیچ هستند که برای نمونه‌برداری مقادیر مختلف مواد غذایی مایع تنظیم می‌گردند. قبل از استفاده باید دقت سرنگ را آزمایش کرد و به طور متناوب دقت و صحت کار آن را بررسی نمود.

تبصره: با این نوع سرنگ‌ها میزان ۱/۰ میلی‌لیتر نمونه مایع به طور دقیق برداشته می‌شود. در مورد شیر و خامه‌های سرد و غلیظ هم می‌توان از این سرنگ استفاده کرد.

۲-۱-۴- سیم کشت: این وسیله از یک قطعه سیم که یک طرف آن آزاد و طرف دیگر آن در داخل دستگیره‌ی از جنس شیشه و یا فلز است، ساخته شده است (شکل ۲-۱-الف). برحسب نوع آزمایش قسمت آزاد ممکن است به صورت حلقه (Loop) و یا بدون حلقه (شکل ۲-۱-د) باشد. جنس سیم مورد استفاده، معمولاً از لاتین است ولی می‌توان از انواع دیگر نیز استفاده کرد. طول تمام قسمت (دسته و سیم) معمولاً ۲۵ سانتی‌متر و طول سیم حدود ۸ سانتی‌متر است. در شرایطی که انتهای سیم به صورت حلقه است، مطابق (شکل ۲-۱-ب و ج)، باید آن را به طریق صحیح خم کرد. این وسیله برای انتقال مقدار کمی از محیط جامد یا مایع واجد باکتری به محیط دیگر به کار می‌رود. این وسیله یکی از مهم‌ترین وسایل مورد نیاز در آزمایشگاه میکروبیولوژی است.

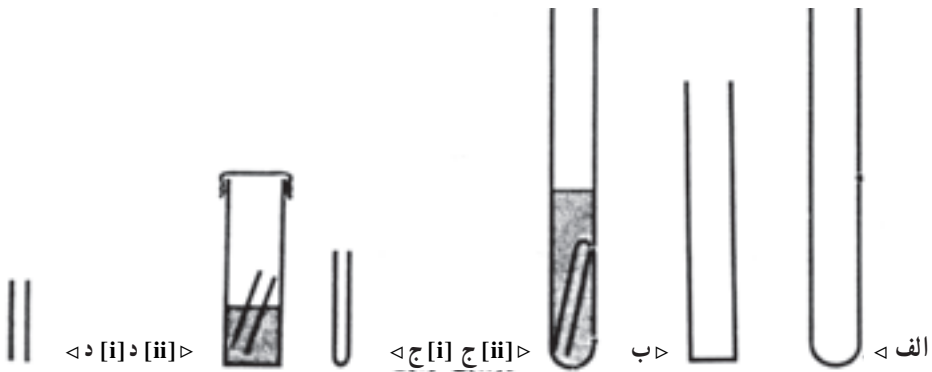
۲-۱-۵- لوله‌ها: لوله‌ی آزمایش‌گرد - انواع متفاوتی از لوله‌های آزمایش تاکنون ساخته شده است. انواعی که در آزمایشگاه باکتریولوژی بیش‌تر مورد استفاده قرار می‌گیرند، باید در مقابل درجه‌ی حرارت زیاد به هنگام استریل کردن محیط کشت مقاوم باشند. قسمت پایین این لوله‌ها مدور

^۱ - Petri Dishe "Plate"



و سر آن‌ها صاف است (شکل ۲-۲- الف). این لوله‌ها برای حفظ محیط کشت، رشد میکروارگانیسم‌ها و مشاهده‌ی پدیده‌های شیمیایی به کار می‌روند.

لوله‌ی آزمایش ته صاف، این نوع لوله‌های آزمایش از هر جهت شبیه به نوع قبلی بوده و فقط ته آن‌ها صاف است و به همین علت می‌توان آن‌ها را به آسانی روی میز کار قرار داد (شکل ۲-۲- ب). لوله‌ی دورهام - این لوله‌ها کوچک و در قسمت پایین مدوراند. قطر داخلی آن‌ها معمولاً ۷/۰ سانتی‌متر و طول آن‌ها حدود ۵/۲ سانتی‌متر است. این لوله برای بی بردن به وجود گازهای تولید شده توسط برخی از میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (شکل ۲-۲- ج).



شکل ۲-۲- انواع مختلف لوله‌های مورد استفاده در آزمایشگاه میکروبیولوژی.
الف- لوله‌ی گرد؛ ب- لوله‌ی پهن؛ ج- لوله‌ی دورهام؛ د- لوله‌ی کاریجی

لوله‌ی کاریجی - این لوله‌ها در دو انتها باز بوده و قطر آن‌ها حدود ۷/۰ سانتی‌متر و طول آن‌ها ۵ سانتی‌متر است و برای مشاهده‌ی حرکت باکتری‌ها از این لوله‌ها استفاده می‌شود (شکل ۲-۲- د).

لوله‌های ته‌گرد معمولاً در جا لوله‌ای فلزی و یا در زنبیل‌های سیمی (شکل ۲-۳) نگهداری می‌شود.



شکل ۲-۳- زنبیل سیمی مخصوص نگهداری لوله‌های واجد محیط کشت

۲-۱-۶- بطری‌های رقیق‌کننده: بطری‌هایی از جنس بور و سیلیکات با درپوش‌های پیچ‌دار یا سربطری‌های لاستیکی به گنجایش 150 میلی‌لیتر مورد استفاده قرار می‌گیرند. برای جلوگیری از تراوش مایع از درپوش‌های پیچ‌دار می‌توان از واشرهای مناسب و غیر قابل نفوذ استفاده کرد. بطری‌های تهیه رقت را در حجم 99 ± 1 میلی‌لیتر می‌توان با مواد مناسب یا وسیله‌ای که پاک نشود علامت‌گذاری کرد. برای از بین بردن باقیمانده‌ی مواد و مایعات از درب‌های لاستیکی مخصوص بطری، لوله یا سایر ظروف، باید ابتدا آن‌ها را در آب معمولی با حرارت 82°C و یک ماده پاک‌کننده تمیز کرد.

وسایل شیشه‌ای دیگر نظیر ارلن‌مایر درب پیچ‌دار، بشر، لوله آزمایش درب پیچ‌دار، لام و لامل شیشه‌ای، فاشتک نمونه‌برداری، آنس فلزی برای کشت میکروبی، همگی جزو ظروف مورد استفاده در آزمایشگاه میکروبی‌شناسی می‌باشند.

۲-۲- تجهیزات آزمایشگاه

۲-۲-۱- گرمخانه (اینکوباتور)^۱: دستگاهی است که برای رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌ها در دمای ثابت مورد استفاده قرار می‌گیرد. ساختمان گرمخانه باید صحیح باشد و مرتباً کنترل شود، دمای داخل گرمخانه نباید از حد تنظیم شده بیش از 1°C \pm تغییر نماید. اختلافات دمای داخل گرمخانه را در زمانی که ظرفیت آن پر شده است تعیین و مشخص کنید. گرمخانه باید به صورتی پر شود که فاصله بین

ردیف پتری دیش‌ها و بین آن‌ها و دیواره‌ی گرمخانه از ۲/۵ سانتی‌متر کمتر نباشد، ظروف قرار داده شده در گرمخانه باید در مدت ۲ ساعت به دمای مورد نظر برسند. اتاق‌های گرم باید به خوبی عایق و مجهز به سیستم‌های مناسب پخش حرارت و گردش هوا (پنکه) باشند. میزان رطوبت داخل آن‌ها باید به نحوی باشد که باعث جمع شدن قطرات آب در روی ظروف و گسترش سریع کشت نگردد. از طرف دیگر رطوبت باید به میزانی باشد که ظروف حاوی آگار بیش از ۱۵ درصد رطوبت خود را در مدت ۴۸ ساعت از دست ندهد. گرمخانه باید در مکانی قرار گیرد که دمای آن در مواقع مختلف سال بین $16-27^{\circ}\text{C}$ باشد برای استفاده بهتر از گرمخانه، کارکنان آزمایشگاه موظف به انجام موارد زیر هستند.



شکل ۴-۲ - نمونه‌ای از اینکوباتور یا اتاقک کشت موجود در آزمایشگاه

الف) ثبت دمای قسمت‌های بالایی و پایینی گرمخانه و اتاق‌های گرم به تعداد دوبار در روز یک مرتبه صبح، بعد از این که تمام مدت شب در گرمخانه بسته بوده است و یک مرتبه بعد از پایان کار روزانه.
 ب) تنظیم دستگاه تنظیم‌کننده‌ی گرما: گرماسنج‌ها را در طبقه‌های پایین و بالا و در صورت لزوم در وسط قرار دهید. قسمت حباب مدور گرماسنج‌ها را در داخل یک آمپول به صورت کاملاً بسته قرار دهید و در آب شناور کنید، زیرا درجه گرمای هوا شاخص مطمئنی برای تعیین درجه گرمای آگار به شمار نمی‌آید در صورت تمایل می‌توان برای کنترل و ثبت حرارت گرمخانه و اتاق‌های گرم از ادوات خودکار تنظیم درجه گرما که رقت آن‌ها قبلاً تعیین شده است استفاده کرد. در فواصل زمانی معین می‌توان دقت این ادوات را با درجات گرماسنج‌های استاندارد کنترل نمود. زمانی که از گرماسنج‌های

استاندارد استفاده می‌شود ممکن است در هر گرمخانه، گرماسنج‌هایی که حداقل و حداکثر درجه گرما را نشان می‌دهند قرار داد تا انحرافات نامعلوم و درجه آن‌ها تعیین شود. برای ثبت روزانه درجه گرما از قرائت این گرماسنج‌های اختصاصی خودداری کنید. زمانی که برای کنترل و ثبت درجات گرما از ادوات خودکار که دقت آن‌ها قبلاً تعیین شده است و به طور مرتب کار می‌کنند استفاده می‌گردد، احتیاجی به کاربرد گرماسنج‌هایی که حداقل و حداکثر درجه حرارت را نشان می‌دهند نیست.



شکل ۲-۵- نمونه‌ای از ترازوی دیجیتال مخصوص وزن کردن مواد در آزمایشگاه

۲-۲-۲- ترازو: ترازوی با حساسیت 0.1 تا 0.01 گرم و با مقدار 200 گرم وزنه مورد

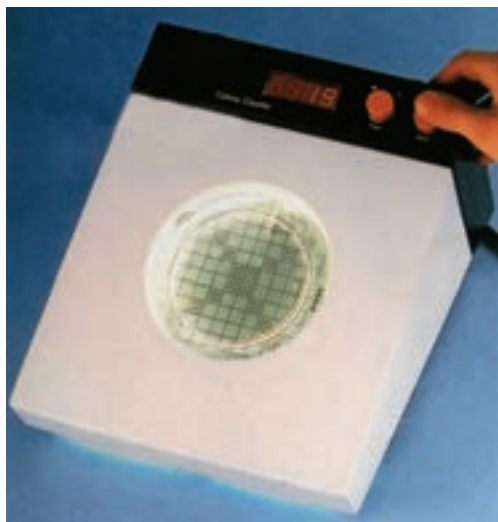
نیاز است برای این منظور، ترازوی یک کفه‌ای با ظرفیت 2 کیلوگرم مناسب‌تر است.

۲-۲-۳- دستگاه کلنی کانتر یا دستگاه پرگنه‌شمار: در مرحله بعد از کشت و طی

دوره‌ی رشد و تکثیر، پرگنه (کلنی)‌های حاصل شده در محیط کشت نشان‌دهنده‌ی تقریبی میزان آلودگی کلی در مقدار کشت داده شده از نمونه می‌باشد و به این صورت که هر یک پرگنه (کلنی) کوچک و یا بزرگ، نمایانگر حداقل یک میکروارگانیسم فعال اولیه در نمونه به‌شمار می‌آید و تعداد کل میکروارگانیسم‌ها براساس تعداد پرگنه (کلنی)‌ها بر مبنای درجه‌ی دقت نمونه تعیین و محاسبه می‌گردد. برای شمارش تعداد پرگنه (کلنی)‌ها در محیط کشت معمولاً از دستگاهی به نام کلنی کانتر^۱

^۱- Colony Counter

استفاده می‌شود. این دستگاه از چند قسمت مشخص تشکیل شده است: ذره‌بین، صفحه مدور تقسیم‌بندی شده به اشکال مربع شکل، نمراتور و لامپ برق برای انجام کار، پلیت دارای پرگنه روی صفحه‌ی مدور قرارگرفته، نور چراغ، صفحه را روشن می‌کند فرد شمارش‌کننده با فشار انگشت روی دگمه نمراتور موجب ثبت تعداد پرگنه (کلنی)ها روی قسمت نمراتور می‌گردد. وجود اشکال مربع شکل موجب دقت بیشتر و جلوگیری از خطا در شمردن پرگنه (کلنی)ها می‌گردد.



شکل ۲-۶- دو نمونه از پرگنه‌شمار یا کلنی‌کانتر آزمایشگاه میکروبیولوژی

۲-۲-۴- بن ماری: در اندازه‌های مختلف و مناسب برای مقاصد آزمایشگاه طرح‌ریزی و از آن‌ها برای نگهداری محیط‌های ذوب شده در $44-46^{\circ}\text{C}$ استفاده می‌گردد. در مواقع عدم استفاده از حمام آب، در آن باید بسته باشد. سطح آب داخل آن باید به اندازه‌ای باشد که کاملاً سطح آگار موجود در ارلن یا ظروف دیگر را بپوشاند.

۲-۲-۵- یخچال: برای خنک نگه‌داشتن نمونه‌ها از یخچال با دمای 4°C استفاده می‌شود. این دستگاه، در صورت تمایل برای نگهداری محیط‌های کشت نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد.



شکل ۷-۲- نمونه‌ای از بن‌ماری یا حمام آب گرم



شکل ۸-۲- نمونه‌ای از شیکر مخصوص پتری دیش و ارلن آزمایشگاهی



شکل ۹-۲- نمونه‌ای از همزن مجهز به هیتر در آزمایشگاه

۶-۲-۲- تکان دهنده‌ی مکانیکی^۱: تکان دهنده‌های مکانیکی برای یکنواخت کردن محتوای ظروف مناسب می‌باشند و کار آن‌ها شکستن مجموعه‌های میکروبی در لوله و ارلن است. برای این منظور دستگاه باید دارای حرکت چرخشی باشد.

۷-۲-۲- سانتریفوژ: این دستگاه‌ها دارای انواع مختلف می‌باشند که براساس نیروی گریز از مرکز، موادی را که دارای جرم‌های مخصوص متفاوت هستند از یکدیگر تفکیک می‌کنند.



شکل ۱۰-۲- نمونه‌ای از دستگاه سانتریفوژ آزمایشگاهی

۸-۲-۲- دماسنج‌ها: با درجه‌بندی مناسب (بالا و پایین صفر)، پر شده از جیوه با فاصله درجه بندی حداقل یک درجه سانتی‌گراد هستند. دقت آن‌ها حداقل هر دو سال یک بار با یک گرماسنج تأیید شده از سوی مؤسسه ملی استاندارد (یا نوع دیگر با دقت مشابه) کنترل شود در مواقعی که ثبت درجه‌ای در یخچال، اتوکلاو، کوره یا هوای داغ یا گرمخانه مورد نظر است می‌توان از ادوات ثبت درجه گرمای خودکار استفاده کرد. معمولاً دو نوع گرماسنج جیوه‌ای در آزمایشگاه مورد استفاده قرار می‌گیرد: نوعی که به طور کامل در محیط (مثل گرم‌خانه یا یخچال) قرار می‌گیرد تا گرمای محیط را تعیین کند، نوع دیگر که قسمتی از آن در محیط مورد نظر قرار می‌گیرد (حمام آب)

^۱ - Mechanical Shaker



شکل ۱۱-۲- نمونه‌ای از دماسنج‌های آزمایشگاهی

در نوع دوم در نقطه‌ای که گرماسنج در آب قرار دارد خطی مشخص دور تا دور بدنه گرماسنج کشیده شده است. ساده‌ترین راه برای امتحان گرماسنج‌های آزمایشگاه، مقایسه‌ی آن‌ها با گرماسنج‌های استاندارد در شرایط مشابه مانند حمام آب است.

۹-۲-۲- چراغ الکلی - آون و اتوکلاو برای استریل کردن

استریل کردن^۱: استریل کردن یعنی عقیم کردن و بی‌حاصل نمودن و در اینجا منظور کشتن و از بین بردن کلیه موجودات ذره‌بینی است.

۳-۲- روش‌های سترون کردن

روش‌های معمول سترون کردن شامل، سترون کردن با دما، صاف کردن^۲، گاز دادن^۳ و تابش اشعه^۴ می‌باشد.

۱- Sterilization

۲- Filtration

۳- Fumigation

۴- Irradiation

الف - سترون کردن به وسیله دما



۱- سوزاندن: میکروارگانیسم‌های موجود روی اجسام را (مانند حلقه کشت) بر روی شعله قرار می‌دهند تا زمانی که جسم کاملاً سرخ شود. اگر میکروارگانیسم موجود بر روی حلقه کشت مخصوص انتقال میکروب فوق‌العاده بیماری‌زا باشد، عمل انتقال و سترون کردن حلقه محیط کشت بهتر است در محفظه به خصوصی صورت گیرد. از سوزاندن برای مواد آلوده‌ای را که قابل مصرف دوباره نیستند، استفاده می‌شود.

۲- دمای خشک: برای وسایلی مانند پیت‌ها و تشتک‌های

پتری سترون کردن با حرارت خشک انجام می‌شود. همه‌ی وسایلی را می‌توان در هوای گرم دستگاه سترون کننده گذاشت و درجه حرارت را به مدت یک ساعت در 170° درجه سانتی‌گراد نگه داشت. برای موادی که به وسیله‌ی حرارت خشک یا حرارت مرطوب بالا خراب می‌شوند سترون کردن متناوب (تیندالیزاسیون^۱) به کار می‌رود. مواد را به مدت 30° دقیقه در سه روز متوالی با جریان بخار آب (100°

شکل ۱۲-۲- طریقه‌ی صحیح

سترون کردن حلقه محیط کشت

درجه سانتی‌گراد) حرارت داده، بین مراحل حرارت دادن، بگذارید درجه حرارت آن برابر درجه حرارت آزمایشگاه باشد. این روش سترون کردن به دلیل اشکالات آن در بیشتر موارد رضایت‌بخش نیست.

۳- دمای مرطوب: برای بیشتر انواع محیط‌های کشت، لباس‌ها، مواد لاستیکی، و سایر موادی که

با حرارت خشک خراب می‌شوند، روش سترون کردن به وسیله‌ی حرارت مرطوب و زیر فشار بکار می‌رود. چنین موادی را در حرارت 121° درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ الی 30° دقیقه با بکار بردن بخار آب با ۱۵ پوند فشار اتوکلاو می‌کنند. گاهی زمان لازم برای سترون کردن کامل، برحسب نوع و مقدار مواد به کار رفته تغییر می‌کند.

روش کار با اتوکلاو

هدف: آشنایی با روش کار دستگاه اتوکلاو و طرز تهیه ظروف، وسایلی آزمایشگاهی و محیط

کشت استریل

طرز کار دستگاه سترون کننده فشار – بخار یا اتوکلاو

۱- فلاسک‌های حاوی محیط کشت میکروبی را که قبلاً تهیه کرده‌اید در دستگاه سترون کننده قرار دهید.

۲- در دستگاه را بسته، آن را قفل کنید.

۳- شیر دستگاه (دریچه‌ی خروج هوا) را باز کنید تا بخاری که تشکیل می‌شود جانشین هوای داخل دستگاه گردد (تا زمانی که بخار بدون هوا خارج می‌شود).

۴- شیر مربوط به قسمت بخار را ببندید. این کار باعث می‌شود که بخار در داخل اتوکلاو جمع شده، فشار آن افزایش یافته و دما به حد مورد نظر برسد.

توجه: در بعضی از دستگاه‌ها، شیر خروج هوا به طور خودکار به وسیله‌ی تنظیم ترمواستاتیکی^۱ بسته می‌شود.

اتوکلاوهایی که برای سترون کردن در آزمایشگاه‌های معمولی به کار می‌روند اغلب برای ۱۵ پوند بر اینچ مربع^۲ فشار تنظیم شده‌اند که ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد (۲۵۰ درجه فارنهایت) گرما تولید می‌کنند. زمان مناسب برای حرارت دهی در این حد (سترون کردن) بستگی به عوامل مختلف دارد. هنگامی که درجه حرارت به ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد رسید، زمان شروع سترون کردن به حساب می‌آید. توجه داشته باشید که حرارت‌سنج، درجه حرارت بخار را در لوله‌ی خروج بخار اندازه‌گیری می‌کند. اگر هوا به طور کامل از اتوکلاو خارج نشده باشد گرچه فشارسنج ۱۵ پوند بر اینچ مربع فشار را نشان دهد، درجه حرارت به ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد نخواهد رسید. بنابراین شروع سترون کردن را باید لحظه‌ای دانست که حرارت‌سنج به ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد برسد، نه از زمانی که فشارسنج ۱۵ پوند بر اینچ مربع فشار را نشان می‌دهد.

۵- با خاتمه‌ی سترون کردن، برای باز کردن اتوکلاو، کاری را که باید انجام دهید عبارتست از ۱- بستن دریچه ورودی؛ ۲- بسته نگه داشتن شیر خروج بخار دستگاه تا هنگامی که فشار به صفر نزدیک شود. اگر موادی که سترون می‌شوند حاوی مایعات نباشند می‌توانید برای کاهش دادن سریعتر فشار، شیر خروج بخار را باز کنید. اگر در اتافک اتوکلاو مایعات وجود داشته باشند، چنین کاهش فشاری، باعث جوش آمدن آن‌ها در ظروف خود شده، پنبه سر درب آن‌ها را خیس کرده، آن‌ها را به خارج پرتاب می‌کند. از این رو در مواقعی که مایعات سترون می‌شوند، همیشه لازم است فشار را به تدریج کاهش داد. بیشتر اتوکلاوهای جدید، که خیلی از آن‌ها کاملاً اتوماتیک هستند دارای قفل‌های

۱- Thermostatic

۲- PSI

خودکار بر روی در خود می‌باشند، تا وقتی که فشار کاهش نیافته به در اجازه باز شدن نمی‌دهند.

۶- بعد از آن که فشارسنج نشان داد که دیگر هیچگونه فشار مربوط به بخار وجود ندارد می‌توانید در اتوکلاو را باز کرده، مواد و وسایل داخل آن را خارج کنید. اگر مواد سترون کردن در اثر حرارت طولانی یا در اثر بخار آب امکان فاسد شدن دارند، آن‌ها را بدون وقفه خنک کنید.

بعضی از عوامل مؤثر در سترون کردن به وسیله‌ی فشار و بخار در دستگاه اتوکلاو

الف- درجه حرارت: آندوسپور باکتری‌ها در برابر مرگ در اثر حرارت بیشترین مقاومت را دارند و درجه حرارت کشنده برای آن‌ها فقط هنگامی حاصل می‌شود که بخار آب دارای فشار زیاد باشد. درجه حرارت ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد هنگامی که برای مدت مناسبی ادامه یابد شرایط خوبی را برای سترون کردن ایجاد می‌کند.

ب- رطوبت: انعقاد ترکیبات پروتوپلاسم باکتری‌ها (پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و غیره) در دمای اتوکلاو، به رطوبت نیاز دارد و هنگامی که رطوبت در محیط نباشد، دمایی که برای انعقاد ضروری است به سرعت افزایش می‌یابد. اگر بخار خیلی گرم شود، خشک‌تر می‌شود، بنابراین درجه حرارت و مدت لازم برای سترون کردن باید افزوده شده، به میزان سترون کردن در هوای خشک (۱۷۰ درجه

سانتی‌گراد به مدت یک ساعت) برسد. بنابراین حرارت دادن زیاد بخار می‌تواند مقداری از اثر آن را به عنوان عامل کشنده از بین ببرد. علاوه بر این، افزایش درجه حرارت می‌تواند روی موادی که سترون می‌شوند اثر تخریب‌کننده داشته باشد.



شکل ۱۳-۲- نمونه‌ای از دستگاه اتوکلاو مخصوص استریل کردن با بخار تحت فشار

ج — فشار: فشار به میزانی که در اتوکلاو به کار می‌رود، هیچ‌گونه اثری در سترون کردن ندارد. فشار فقط برای رساندن درجه حرارت بخار به بالاتر از 100° درجه سانتی‌گراد لازم است.

د — زمان: زمان برای نفوذ بخار آب و گرم کردن مواد تا درجه حرارت سترون کردن ضروری است. حتی، هنگامی که چنین درجه حرارتی حاصل شود، اسپورها و سلول‌های جوان همه یک باره کشته نمی‌شوند. میزان مرگ و میر در یک درجه حرارت مشخص ثابت است و در مقابل یک عامل کشته‌ده، در هر واحد زمانی، نسبت ثابتی از یک تعداد معین میکروبی کشته می‌شوند. (به طور طبیعی در 121 درجه سانتی‌گراد و گرمای مرطوب) $2/5$ دقیقه وقت لازم است تا آندوسپور باکتری‌های گرمادوست کشته شوند.

ه — مزاحمت هوا: هوای داخل اتوکلاو در درجه حرارت سترون کردن بیش از دو برابر بخار سنگینی دارد. اگر این هوا خارج نشود، در داخل اتوکلاو چند طبقه تشکیل می‌شود. از آنجا که بخار و هوا به کندی مخلوط می‌شوند تفاوت درجه حرارت لایه بالایی و لایه پایینی ممکن است خیلی زیاد باشد از این رو خارج کردن تمام هوا لازم است. گرماسنجی که در شیر تخلیه قرار دارد وقتی که 100° درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد، مشخص می‌کند که تمام هوای داخل اتوکلاو خارج شده است.

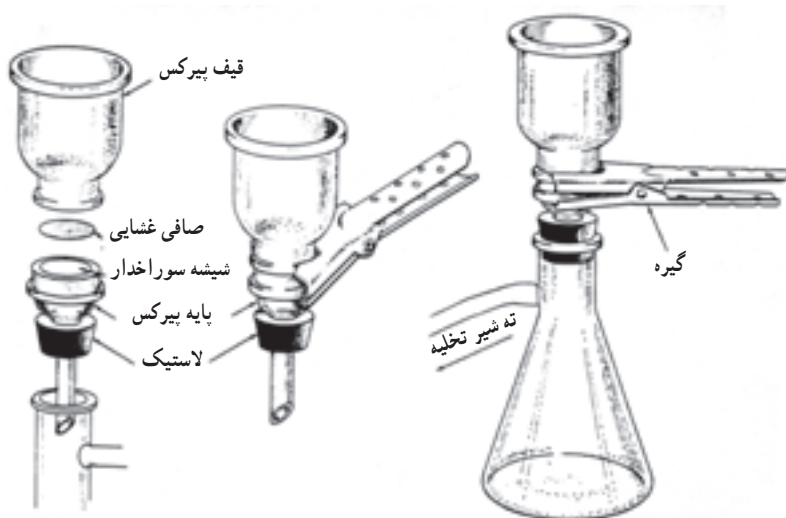
و — ماهیت بار اتوکلاو: معمولاً مواد حجیم و تقریباً غیر قابل نفوذ احتیاج به زمان بیشتری برای سترون شدن دارند. بنابراین بهتر است آن‌ها را در واحدهای کوچکتر سترون کرد یا برای مثال به جای یک فلاسک ۵ لیتری بهتر است آن‌ها را در ۵ فلاسک یک لیتری قرار داد. موادی که در برابر بخار قابلیت نفوذ کم دارند و مواد خیلی حجیمی که نمی‌توان از راه تماس آن‌ها را حرارت داد، احتیاج به زمان طولانی‌تری دارند. سر فلاسک‌ها را باید به وسیله‌ی پنبه یا کاغذ پوشاند. اگر به کار بردن درب لاستیکی، درب پیچی، یا درب پلاستیکی ضرورت دارد، برای این که هوا براحتی خارج شود، همین‌طور برای جلوگیری از شکستن و پرتاب شدن درب و ظروف در اثر خروج بخار، و برای داخل شدن و نفوذ بهتر بخار به داخل ظروف نباید سر آن‌ها را محکم بست.

فکر کنید و پاسخ دهید:

- ۱- فرضیه‌ای که براساس آن سترون کردن متناوب پایه‌گذاری شده است چیست؟
- ۲- به عنوان یک عامل سترون‌کننده، دمای خشک مؤثرتر است یا دمای مرطوب؟ چرا؟

ب - صافی‌ها: خیلی از مواد (مثلاً بعضی قندها و سرم‌های خون) در درجه حرارتی که معمولاً برای سترون کردن به کار می‌رود، خراب می‌شوند. برای سترون کردن این مواد حساس به گرما که ممکن است مایع و یا به صورت محلول باشند می‌توان از صاف کردن^۱ استفاده کرد. در این روش صافی‌ها به دو طریق باکتری‌ها را می‌گیرند. یکی به وسیله‌ی عمل مکانیکی غربال مانند سوراخ‌های کوچک صافی و دیگری با جذب میکروب‌ها توسط صافی به دلیل تفاوت بار الکتریکی آن‌ها.

صافی‌ای که به طور گسترده در میکروبیولوژی به کار می‌رود صافی غشایی است. صافی غشایی، یک غشای سلولز و یا پلاستیکی است که سوراخ‌های کوچکی دارد (معمولاً ۰/۴۵ میکرون) و می‌تواند باکتری‌ها را از یک مایع گرفته، جدا کند. سایر صافی‌هایی که در سترون کردن به کار می‌روند عبارتند از صافی شیشه‌ای؛ صافی ساتیز^۲ که از پنبه نسوز است؛ صافی‌های شمعی شکل شامیرلان و سلاس^۳ و صافی مندلر^۴. صافی شیشه‌ای را معمولاً از شیشه پیرکس گداخته به تریبی تهیه می‌کنند که سوراخ‌دار باشد و اندازه و بار الکتریکی جاذب سوراخ‌ها به اندازه‌ای است که برای گرفتن باکتری‌ها کافی است. صافی‌های ساتیز صفحات گرد فشرده پنبه نسوز هستند که دارای سوراخ‌های کوچک مناسب برای گرفتن باکتری‌ها می‌باشند. صافی‌های شامیرلان و سلاس از سفال بدون لعاب و صافی مندلر از خاک دیاتومه ساخته شده‌اند. سه صافی اخیر، به شکل استوانه‌های دراز



شکل ۱۴-۲- دستگاه صافی غشایی

۱ - filtration

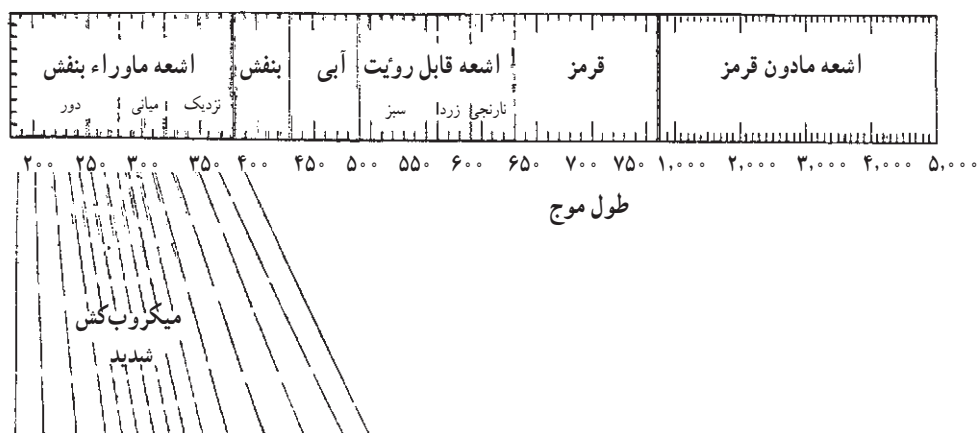
۲ - Seitz

۳ - Selas

۴ - Mandler

و توخالی شبیه شمع هستند که یک طرف آن‌ها باز است. تمام این صافی‌ها را به یک فلاسک مکنده وصل کرده، با به کار بردن نیروی مکش مواد مایع را از درون آن‌ها می‌گذرانند و بدین طریق کلیه میکروب‌های آلوده‌کننده را گرفته، از محیط خارج می‌کنند. در شکل زیر نمایش صاف کردن را که یکی از روش‌های سترون کردن است ملاحظه کنید.

ج — لامپ اشعه U.V: برای سترون سازی محیط آزمایشگاه کاربرد دارد. این لامپ باید زمانی روشن باشد که کارکنان در محل کار حضور ندارند.



شکل ۱۵-۲- طیف نور در منطقه مؤثر در استریل کردن

خودآزمایی

- ۱- مشخصات ظروف پتری دیش را بنویسید.
- ۲- استریل کردن را تعریف نموده، انواع روش‌های آن را نام ببرید.
- ۳- تیندالیزاسیون چیست؟
- ۴- طرز سترون کردن با صافی را شرح دهید.
- ۵- روش کار با اتوکلاو را شرح دهید.
- ۶- نقش فشار بخار در اتوکلاو برای سترون کردن چیست؟
- ۷- وسیله‌ی شمارش تعداد پرگنه‌ها چه نامیده می‌شود و از چه قسمت‌هایی تشکیل شده است؟
- ۸- کار تکان دهنده‌ی مکانیکی در آزمایشگاه چیست؟

نمونه برداری

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

- ۱- ارزش نمونه برداری صحیح را بیان نماید.
- ۲- وسایل نمونه برداری را شناسایی نماید.
- ۳- بتواند در شرایط متفاوت از آب نمونه برداری نماید.
- ۴- بتواند از مواد غذایی نمونه برداری نموده، به آزمایشگاه تحویل دهد.
- ۵- طرز آماده نمودن نمونه‌های رسیده به آزمایشگاه را بیان کند.
- ۶- بتواند نمونه‌ای ارسالی به آزمایشگاه را رقیق کرده، برای کشت آماده نماید.

۳- نمونه برداری

نمونه برداری صحیح یا به عبارتی جمع‌آوری تعداد کافی و مناسب نمونه‌های مختلف مواد غذایی اساس کار بررسی‌های میکروبیولوژیکی است که برای بازرسی و نظارت مواد غذایی ضرورت دارند. تصمیم در انتخاب نمونه، تعداد نمونه‌هایی که می‌باید انتخاب شوند، روش نمونه برداری و چگونگی راه‌های حمل آن‌ها به طوری که تغییر فاحشی در تعداد و کیفیت باکتری‌ها ایجاد نشود حایز اهمیت است. دقت، صحت و کفایت نمونه برداری به اندازه‌ی سرعت در رساندن آن‌ها به آزمایشگاه و روش‌های آماده کردن و آزمون نمونه‌ها اهمیت دارد و حاصل تمام این کوشش‌ها است که قابل مصرف بودن فرآورده را نشان می‌دهد.

۱-۳-۱- واژه‌های نمونه برداری

نمونه: یک نمونه باید دارای تمام ویژگی‌های ماده‌ای باشد که از آن برداشته می‌شود.

نمونه اولیه: عبارتست از ماده جمع آوری شده در نمونه برداری، که حداقل باید دو برابر مقدار ماده غذایی لازم برای آزمایش باشد. مقدار مازاد آن برای مواقعی که نیاز دوباره به نمونه است نگهداری شود.

۲-۳- تهیهی نمونه‌های اولیه

– برای تهیه نمونه‌های اولیه، نمونه برداری باید به دست شخص صلاحیت دار صورت گیرد.
– در صورت امکان، نمونه‌ها در حین تخلیه مواد غذایی (کشتی، کامیون، هواپیما) از تمام قسمت‌های محموله برداشته شوند. چنانچه نمونه برداری از تمامی قسمت‌های محموله امکان پذیر نیست، از بسته‌هایی که در دسترس هستند نمونه برداری شود که در این صورت نتایج فقط برای بسته‌های آن چهارچوب قابل تفسیر می‌باشند و نماینده کل محموله نیستند. امکان طبقه بندی محموله باید در نظر گرفته شود و چندین برابر مقدار واقعی لازم برای تجزیه در آزمایشگاه برداشته شود. مقدار اضافی نمونه در شرایطی که به سبب تغییر شرایط میکروبی ماده غذایی نگردد نگهداری شود. تا جای ممکن نمونه‌ها باید از ظرف باز نشده و اصلی به آزمایشگاه فرستاده شود، اگر تمام بسته‌ها در دسترس باشند از آن‌ها به روش تصادفی نمونه برداری شود.

– در نمونه برداری از کارتن‌های بزرگ حاوی بسته‌های کوچک، ابتدا به روش تصادفی چند کارتن را انتخاب کرده، سپس از هر یک از کارتن‌ها به طور تصادفی به تعداد مورد نیاز از بسته‌های کوچک برداشته شود و در تمام مراحل از جداول ارقام تصادفی استفاده گردد. بهتر است از هر کارتن فقط یک بسته برداشته شود، با این روش بهترین نمونه معرف از محموله بدست خواهد آمد (البته این روش همیشه عملی نیست).

– چنانچه فرآورده در ظروف خیلی بزرگ قرار دارد که به آسانی قابل حمل به آزمایشگاه نمی‌باشند البته باید آلودگی سطحی روی بسته‌های غذایی و ظرف نمونه را با مواد پاک کننده تمیز کرده سپس با الکل ۷۰ درصد سترون کنند سپس تحت شرایط اسپتیک نمونه‌های معرف را انتخاب و به ظروف سترون جداگانه منتقل نمایند.

– در مورد بسته‌های کاغذی لازم است لایه خارجی آن را برداشته، سپس لاک و مهر بسته‌ها را بدقت با کارد یا قیچی برید. به منظور جلوگیری از آلودگی ثانویه، بخصوص در مورد بسته‌های حاوی مواد پودری و مواد تحت فشار باید برای هر بسته از وسیله نمونه برداری سترون جداگانه استفاده شود. مواد غذایی کنسرو شده را به همان صورت به عنوان نمونه اولیه به آزمایشگاه ارسال کنند. چنانچه نمونه

غذایی حجم زیادی دارد باید از قسمت‌های مختلف آن نمونه برداری شود. مگر از مخلوط شدن آن اطمینان حاصل شود و یا به تجربه ثابت شده باشد که نمونه برداری از عمق بخصوص قابل قبول است. پیش از نمونه برداری از دهانه یا سوراخ ظروف، باید مقداری از ماده از آن خارج شود. در هنگام نمونه برداری از ظروف یا تانک‌های بزرگ یا بسته‌های غذایی، همچنین انتقال آن‌ها به ظرف نمونه باید سعی شود آلودگی پیش نیاید. برای تهیه نمونه اولیه متناسب با حالت فیزیکی مواد غذایی از وسایل مخصوص استفاده شود. از مته‌های مخصوص برای نمونه برداری از پنی‌های سخت و یا پیست برای مایعات. سعی بر این باشد که همیشه برای تهیه نمونه‌ی معرف، در صورت امکان مواد غذایی مایع یا به حالت سوسپانسیون و یا موادی با گرانی بالایی را تا یکنواخت شدن هم بزنند.

– موادی نظیر مایعات منجمد را باید در یک ظرف سترون بزرگ قرار داد و سپس تحت شرایط سترونی به قطعات کوچک تر شکست. (در کیسه پلاستیکی محکم) پس از آن از خرد شده‌ها نمونه برداری نمود. با وجود نکته‌های گفته شده گاهی ممکن است بازرسان نمونه‌ای را بدون رعایت شرایط سترونی با حجم بزرگ به آزمایشگاه بفرستند مانند یک تکه گوشت منجمد بدون استخوان. در هر حال میکروبی‌شناسان می‌توانند یک نمونه سترون از لایه‌های داخلی به‌عنوان نمونه مورد آزمایش بردارند و رئیس آزمایشگاه را از این مطلب آگاه سازند. دمای هوای اتاق نگهداری و یا وسیله‌ی حمل نمونه، همچنین دمای ماده غذایی در هنگام نمونه برداری باید یادداشت شود.

– دماسنج نباید هیچ‌گاه پیش از نمونه برداری وارد ظروف نمونه شود.

– در مواردی که بسته‌های کوچک باز نشده به آزمایشگاه فرستاده می‌شود، باید درجه حرارت غذای موجود در بسته یادداشت شود.

یادآوری ۱– نمونه برداری باید در محیطی دور از گرد و خاک و جریان هوا و رطوبت انجام گیرد.
یادآوری ۲– در صورتی که قسمتی از محموله وضع خاص و غیر مشابهی با سایر قسمت‌های محموله دارد نظیر جعبه و یا کارتن‌های شکسته، له شده و رطوبت دیده نمونه برداری باید به‌طور انتخابی صورت گیرد.
یادآوری ۳– در مورد برداشت نمونه از کالاهای بسته‌بندی شده موجود در انبار و یا نمونه برداری از کالا در محل فروش و یا توزیع که بیشتر به سبب مشکوک بودن صورت می‌گیرد، باید به شرایط نگهداری و تاریخ ساخت آن بیشتر توجه گردد و در صورتی که نقایصی درباره‌ی نگهداری وجود نداشته باشد بررسی بیشتر در مورد تاریخ تهیه، شماره بھر و یا توزیع آن کالا ضرورت خواهد داشت.

۳-۳- وسایل نمونه برداری

ظروف نمونه برداری باید خشک، تمیز و سترون باشند. برای این منظور می توان از ظروف شیشه ای دهان گشاد و دریچ دار (در مورد مایعات از بطری و یا شیشه ای در سمباده ای) همچنین از ظروف فلزی زنگ نزن و کیسه های پلاستیکی یکبار مصرف محکم با گنجایش کافی، به طوری که بتوان ۲۵۰ گرم نمونه را در آن جای داد، استفاده کرد. در مورد ظروفی که بیش از یکبار مورد مصرف قرار می گیرند باید جنس آن ها طوری باشد که تحمل چندین بار شستشو و سترون شدن را دارا باشند. در صورت استفاده از چوب پنبه و پوشش پلاستیکی برای بستن در ظروف، باید آن ها را در ورقه های غیر قابل نفوذ (ورقه های آلومینیوم و یا ورقه های پلاستیکی) مناسب پوشانده، سپس سترون نموده و مصرف کرد. در صورتی که از کیسه های پلاستیکی یکبار مصرف سترون شده استفاده می شود باید پس از نمونه برداری آن ها را محکم با نخ و سیم طوری بست که هیچ گونه منفذی برای ورود و خروج مایعات در آن نباشد. سایر وسایل نمونه برداری عبارت اند از: چنگال، قاشق، انبرک، گیره، کارد، کاردک، مته های مخصوص، سینی، پیپت، در باز کن، قیچی و ... و چراغ الکلی، چراغ گاز کوچک دماسنج که از ۲۰°C تا ۱۰۰ درجه را نشان دهد و حساسیت آن حدود ۲ درجه تنظیم شده باشد (کلیه این وسایل باید قبل از مصرف با روش مناسب سترون شده باشند).

۳-۴- نمونه برداری از آب

برای این منظور از شیشه های ۱۰۰ میلی لیتر در سمباده ای یا فلزی استفاده می شود. شیشه ها را پس از سترون نمودن در کاغذ پیچیده، در موقع برداشت نمونه کاغذ را از سر شیشه باز می کنند و با دست چپ شیشه را نگاه داشته، با انگشت کوچک و کف دست راست در شیشه را برمی دارند. پس از آنکه دهانه ی شیشه را چند لحظه روی شعله نگاه داشتند آن را از آب پر کرده، سپس در شرایط سترون در آن بسته می شود. اگر برداشت آب از شیر صورت می گیرد باید دور دهانه شیر را چند لحظه شعله داده، پس از آن شیر را باز کنند تا آب از شیر برای چند دقیقه جاری شود سپس نمونه برداری را انجام دهند. برای برداشت نمونه آب از آب های ساکن (استخر، حوض، آب انبار و ...) ابتدا ته شیشه را با دست گرفته و آن را طوری به زیر آب فرو می برند که دهانه ی آن روبه پایین باشد. در ضمن شیشه در عمق ۱۵ تا ۳۰ سانتی متری سطح آب قرار گیرد. آنگاه شیشه را کمی کج کرده، از آب پر می کنند، هنگام برداشت آب و آب های جاری باید دهانه شیشه در جهت مخالف مسیر آب قرار گیرد تا آبی که در نتیجه ی تماس با دست، آلوده می شود وارد شیشه نگردد و در مواقعی که می خواهند از یک چاه نیمه



شکل ۱-۳- نمونه‌ای از میکروپیپت مخصوص نمونه برداری

عمیق که با وسایل دستی آب از آن می‌کشند نمونه برداری کنند. با رعایت نکات بهداشتی ریسمانی به گردن یک بطری بسته، پس از برداشتن در بطری آن را داخل چاه می‌کنند. وقتی که شیشه از آب پر شد آن را به کمک ریسمان بالا می‌کشند. پس از برداشت نمونه و بستن و مهر و موم کردن، ذکر مشخصات نمونه روی برجسب شیشه الزامی است و شیشه‌های حاوی نمونه را از آب پر نمی‌کنند بلکه $\frac{3}{4}$ شیشه را از آب پر می‌کنند تا در موقع آزمایش بتوان آن را مخلوط کرد.

۵-۳- نمونه برداری از مواد غذایی

نمونه‌های غذایی باید با وسایل مناسب برداشته شود و به ظروف شیشه‌ای سترون دهان گشاد مجهز به در مناسب با اندازه‌های مختلف و یا کیسه‌های پلی اتیلنی دو جداره که بخوبی بسته می‌شوند منتقل گردد. مقدار لازم حدود 25° گرم است. وسایل مورد نیاز برای نمونه برداری از مواد غذایی

شامل چاقو، قیچی، گیره، قاشق، انبرک (پنس)، قوطی بازکن، چکش برای غذاهای سخت و منجمد، ساطور، مته، اره، سینی، ظروف شیشه‌ای دهانه گشاد با ابعاد مختلف، کیسه‌های پلی اتیلن در ابعاد و اندازه‌های متفاوت می‌باشند. از آنجا که وسایل نمونه‌برداری باید به‌طور مرتب تمیز و سترون شوند بدین جهت باید جنس آن‌ها از موادی با کیفیت خوب و دارای طراحی ساده باشند، تا به راحتی قابل تمیز کردن باشند. (ظروف چوبی مناسب نیستند) موادی که برای شستشو و سترون کردن بکار می‌روند باید از پاک‌کننده‌های قابل سازش با آب، آب‌جوش، هیپوکلریت و الکل ۷۰ درصد باشند.

روش نمونه‌برداری از مواد غذایی

۱- تخم مرغ: تخم مرغ به چند شکل به بازار عرضه می‌شود. در این قسمت نمونه‌برداری از تخم مرغ به‌شکل کامل و به‌صورت پودر توضیح داده می‌شود.

الف) تخم مرغ کامل: پس از باز کردن جعبه‌های حاوی تخم مرغ، در صورتی که تمام آن‌ها از نظر ظاهری بدون عیب باشند تعدادی را به‌طور تصادفی انتخاب و برداشت کرده (به‌طوری که تخم مرغ‌ها نشکنند) سپس بلافاصله آن‌ها را به آزمایشگاه منتقل می‌کنند. چنانچه امکان انتقال فوری نمونه‌ها به آزمایشگاه وجود ندارد باید آن‌ها را تا زمان رسیدن به آزمایشگاه و آزمایش در حرارت بین ۴ تا ۱۰ درجه سلسیوس نگهداری نمود.

ب) پودر تخم مرغ: برای این منظور توسط وسیله‌ی نمونه‌برداری سترون، از هر بسته در سه نقطه یکی وسط و دو تا از اطراف بسته از قسمت عمقی، نمونه‌برداری می‌شود. سپس هر سه نمونه را که تقریباً باید مساوی باشند به یک ظرف شیشه‌ای سترون منتقل کرده، بلافاصله آن‌ها را به آزمایشگاه ارسال می‌کنند. نمونه‌ها تا موقع آزمایش باید در دمای مناسب نگهداری شوند.

۲- غذاهای منجمد: این غذاها باید تا زمان رسیدن به آزمایشگاه همچنان به‌حالت منجمد باشند. چنین فرآورده‌هایی اگر از حالت انجماد خارج شده باشند نباید دوباره منجمد گردند (مگر در موارد خیلی اضطراری).

الف) غذاهای دریایی پخته و نیپخته منجمد: باید از تمام محموله نمونه‌برداری انجام شود یعنی قسمت‌هایی از بسته‌های بزرگ برداشته و خرد شوند و به کیسه‌های دو جداره پلی اتیلنی منتقل گردند.

ب) گوشت خام منجمد (نمونه‌برداری از قطعات گوشت بدون استخوان): برای نمونه‌برداری از گوشت خام باید به کمک اره و یا ساطور تمیز و سترون، حداقل ۲۵۰ گرم نمونه برداشته و به کیسه‌ی پلی اتیلنی منتقل شود. سر کیسه را گره زده، در کیسه‌ی دیگری گذاشته و با دقت بسته شود.

ج) نمونه‌برداری از لاشه‌ی کامل: چنانچه گوشت به شکل لاشه‌ی کامل و یا قطعات بزرگ

و یا منجمد باشد در صورتی که ترکیب گوشت به حالت طبیعی خود باقی مانده باشد، پیش از هر چیز باید از نظر تشخیص آلودگی یا عدم آلودگی مورد بررسی واقع شود. و چون بخش زیادی از آلودگی گوشت سطحی است (به جز موافقی که حیوان در حال بیماری ذبح شده و یا مدتی در شرایط نامناسب نگهداری شده و فاسد شده باشد) باید میزان آلودگی در سطح معینی از لاشه معلوم گردد. اگر لاشه به صورت تازه یا منجمد است با وسیله‌ی سترون از سطح معینی به اندازه‌ی ۵° گرم برداشته، به آزمایشگاه ارسال می‌شود.

د) گوشت طیور: برای این منظور باید از کیسه‌های پلاستیکی جداگانه برای قسمت‌های مختلف لاشه (لفاف‌دار یا بدون لفاف) استفاده شود. به محض رسیدن این نمونه به آزمایشگاه باید آن را از کیسه‌ی خارجی درآورده، در یک سینی قرار داده، در یخچال بگذارند تا کمی باز و نرم شود سپس لفاف یا بقایای لفاف را از آن جدا کنند.

۳- غذاهای یخچالی: این گونه نمونه‌های غذایی نباید پیش از آزمایش منجمد شوند ولی می‌باید در طی نگهداری و جابجایی در دمای حدود ۴+ درجه سانتی‌گراد در ظروف عایق نگهداری شود و به سرعت به آزمایشگاه فرستاده شود.

۴- گوشت دام و طیور سرد شده: نمونه‌های گوشت دام و طیور سرد باید به روش فرآورده‌های منجمد خیلی سریع پس از رسیدن به آزمایشگاه مورد آزمایش واقع شوند. در تهیه نمونه برای آزمایش باید از روش خراشیدن استفاده شود.

۵- پنیر: برای نمونه‌برداری از پنیرهای سخت و نیمه سخت که مشکوک به آلودگی هستند باید به طریق زیر عمل شود. ابتدا باید قسمت سطحی پنیر را به عمق ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متر کنار زد. آنگاه از قسمت داخلی آن با وسیله‌ی مخصوص نمونه‌برداری پنیر (سرنگ مانند) از ۵ نقطه متمایز ۵ نمونه هر کدام به وزن تقریبی ۵ گرم برداشت. نمونه‌های پنیر را باید تا انجام آزمایش در دمای ۱° درجه سانتی‌گراد یا کمتر نگهداری کرد. چنانچه از پنیر تازه‌ی بی‌نمک نمونه‌برداری می‌شود باید تا هنگام رساندن آن به آزمایشگاه و انجام آزمایش، نمونه در دمای بین صفر تا ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود. چنانچه نمونه‌برداری به منظور آزمایش‌های شیمیایی انجام می‌گیرد باید طوری باشد که از قسمت سطحی و عمقی هر دو برداشت گردد و مقدار آن باید حدود ۲۰۰ گرم باشد.

۶- شیر تازه: برای آزمایش‌های مختلف روی شیر می‌توان از شیر یک رأس دام یا شیر مخلوط شده در یک ظرف کوچک یا بزرگ نمونه‌برداری کرد.

الف) نمونه‌برداری از شیر دام هنگام دوشش: قبل از دوشش باید پستان گاو با آب و صابون

و برس پاک شده، پس از نظافت، با یک پارچه‌ی تمیز خشک گردد. نظافت پستان گاو بیش از دوشش آن حائز اهمیت است زیرا در صورت آلوده بودن آن هنگام دوشیدن، شیر آلوده می‌شود و نتیجه آزمایش صحیح و قابل اطمینان نخواهد بود، بهتر است قطرات اولیه شیر دور ریخته شود زیرا مجرای پستان قبل از دوشش آلوده است و شیر به هنگام عبور از آن آلوده می‌گردد. پس از آن که شیر به‌طور کامل دوشیده شد چنانچه تهیه‌ی نمونه بلافاصله صورت گیرد لازم است آن را به خوبی هم زده و نمونه برداری کرد. کلیه ظروف و وسایل باید سترون باشند و نمونه برداری در شرایط سترونی صورت گیرد. در هنگام استفاده از شیردوش مکانیکی، چون لوله‌ی بعضی از شیردوش‌های مکانیکی به یک مخزن استیل ضدزنگ وصل است. پیش از نمونه برداری چند بار شیر موجود در مخزن هم زده شود. **ب) شیر در ظروف بزرگ (تانکر، مخزن، پیدون):** در هنگام تهیه‌ی نمونه از این ظروف باید به چند مورد توجه شود.

۱- مدتی که شیر در این ظروف مانده است. ۲- چگونگی نگهداری. ۳- دمای شیر.

با توجه به عوامل بالا پیشنهاد یک روش مشخص برای نمونه برداری صحیح نیست. ولی پیشنهاد می‌گردد که در هر صورت قبل از تهیه، نمونه‌ی شیر را با همزن الکتریکی یا همزن دستی یا هوای فشرده و یا هر وسیله‌ی ممکن دیگر یکنواخت کنند. چنانچه از ریختن شیر در این ظروف ۳۰ دقیقه گذشته باشد باید عمل هم‌زدن پنج دقیقه ادامه یابد. استفاده از همزن الکتریکی یا هوای فشرده باید آنقدر ادامه یابد تا شیر همگن شده و نمونه‌های برداشت شده از بالا و پایین یکسان باشند. بدیهی است مدت لازم را با تجربه می‌توان تعیین کرد. با اتمام یکنواخت کردن، از شیر نمونه برداری می‌شود مقدار نمونه نباید از ۵۰۰ سانتی‌متر مکعب کمتر باشد.

— **شیر پاستوریزه و استریلیزه:** در مورد شیر پاستوریزه یا استریلیزه باید به تعداد لازم نمونه انتخاب و به آزمایشگاه ارسال شود. کلیه وسایل نمونه برداری باید سترون باشند و برای رساندن نمونه‌های شیر به آزمایشگاه باید شرایط دما بین ۲۰ تا ۴ درجه سانتی‌گراد باشد و نمونه هر چه زودتر به آزمایشگاه برسد.

۷— **خامه:** نمونه برداری از خامه مانند شیر است. خامه نیز باید پیش از نمونه برداری با همزن یکنواخت شود. هنگام بهم‌زدن خامه باید دقت شود که تمام خامه بویژه قسمت‌های موجود در ته و اطراف ظرف به هم خورده، یکنواخت شود. در هنگام هم‌زدن همزن را نباید به شدت بالا و پایین برد بلکه باید آن را در داخل خامه فرو کرد. پس از یکنواخت شدن ۲۰۰ گرم نمونه در شرایط سترونی برداشت شده، با رعایت اصول بهداشتی به آزمایشگاه ارسال می‌گردد.

۸- کره: برداشت نمونه از کره ممکن است در محل تولید یا فروشگاه‌ها صورت گیرد.

الف) کره در دستگاه کره‌زنی: پس از آنکه کره در دستگاه کره‌زنی آماده شد، سه نمونه به وزن تقریبی هر یک ۱۰ گرم از سه نقطه یکی از وسط و دو نمونه از اطراف برای آزمایش‌های میکروبی برداشت شود. برای آزمایش‌های شیمیایی مقدار بیشتری نمونه لازم است.

ب) کره در ظروف و بسته‌های بزرگ: برای آزمایش میکروبی با وسایل سترون از دو قسمت جداگانه به وزن تقریبی هر یک ۱۵ گرم نمونه تهیه شود. اگر از بسته‌های بزرگ کره نمونه تهیه می‌شود، باید قسمتی از پوشش آن کنار زده شود تا سطح کره نمایان گردد. سپس با قاشق یا اسپاتول یا وسیله‌ی مناسب دیگر، نمونه برداری صورت گیرد. برداشت نمونه از کنار بسته به طوری صورت گیرد که قسمت‌های سطحی از سه طرف برداشته شود.

ج) کره قالبی: کره‌های قالبی در اندازه‌های مختلف تهیه می‌گردد. برای آزمایش‌های میکروبی باید بر طبق روش‌های نمونه برداری از تعداد معینی از بسته‌ها نمونه تهیه کرده، به آزمایشگاه ارسال دارند. یا اینکه بسته‌بندی کره را در شرایط سترونی بازکنند تا تمام سطح آن نمایان گردد. پس از مشاهده و اطمینان از یکنواختی آن از سطحی به اندازه‌ی ۸ تا ۱۰ سانتی متر مربع حدود ۱۵ گرم را با وسایل سترون برداشت نمایند. نمونه برداری باید طوری انجام شود که قسمت‌های سطحی نیز همراه نمونه باشد. پس از تهیه نمونه باید آن‌ها را بلافاصله در حرارت صفر تا ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده، به آزمایشگاه ارسال دارند. آزمایش‌های میکروبی روی کره باید هر چه زودتر انجام شود و فاصله نمونه برداری و آزمایش کوتاه باشد.

۹- بستنی: برای نمونه برداری از بستنی و سایر مواد غذایی منجمد، ابتدا با یک چاقو یا وسیله‌ی برنده و تیز سترون، سطح نمونه را تا عمق حدود ۲/۵ سانتی متر کنار زده و بعد، از آن محل نمونه برداشت شود چنانچه بستنی خیلی سفت و سخت باشد می‌توان از روش‌های مخصوص برای برداشت نمونه استفاده کرد. به هر حال ۵۰ گرم نمونه لازم است. نمونه‌ها پس از برداشت و انتقال به ظروف سترون هر چه سریع‌تر باید به آزمایشگاه ارسال شوند تا در هنگام آزمایش فرآورده از حالت انجماد خارج نشده باشد. چنانچه بستنی ایجاد مسمومیت کرده باشد، بهتراست علاوه بر آن از کلیه مواد اولیه آن در صورت موجود بودن نمونه برداری صورت گیرد.

۱۰- شیر غلیظ شده^۱: این شیرها را معمولاً در بسته‌های فلزی بسته‌بندی می‌کنند.

تهیه نمونه از بسته‌های کوچک: ابتدا قوطی‌ها را از نظر وضع ظاهری مورد آزمایش قرار

۱- Condensed Milk

می‌دهند. چنانچه برخی از آن‌ها دارای سوراخ بوده و یا وضع ظاهری مشکوک داشته باشد این قبیل قوطی‌ها از قوطی‌های سالم جدا می‌شوند و از هر یک به‌طور جداگانه به تعداد لازم نمونه برداشته می‌شود. (نمونه‌های قابل فساد باید در شرایط مناسب به آزمایشگاه فرستاده شوند) تهیه نمونه از بسته‌های بزرگ به همان صورت نمونه‌برداری از بسته‌های کوچک است و پس از یکنواخت نمودن محتویات ظرفها، از هر یک جداگانه حدود ۲۵۰ گرم نمونه برداشته می‌شود.

۱۱- شیرخشک: در محل نمونه‌برداری از شیرخشک به هیچ‌وجه نباید رطوبت هوا زیاد باشد اگر شیرهای خشک به‌صورت بسته‌های کوچک است، به تعداد مناسب از بسته‌ها انتخاب و برداشت می‌شود.

ولی اگر بسته بزرگ باشد از بین آن‌ها تعدادی انتخاب و سپس مقدار لازم از آن‌ها برداشته شود. چون شیرخشک خیلی سریع رطوبت را جذب می‌کند، نمونه‌برداری از ظروف باید خیلی سریع انجام شده، بلافاصله نمونه به ظروف سترون و شیشه‌ای منتقل شود و مهر و موم گردد. چنانچه امکان آلودگی در بعضی از قسمت‌های بسته زیاده‌تر به نظر می‌رسد، باید از آن قسمت‌ها به‌طور جداگانه برداشت شود و مشاهدات و علل نمونه‌برداری در گزارش قید گردد.

۱۲- مواد شکل‌دهنده: مواد شکل‌دهنده مانند ژلاتین، پکتین، آگار و غیره که به مواد غذایی افزوده می‌گردد چنانچه آلوده باشند، منبع مهمی برای آلودگی فرآورده‌های غذایی می‌باشند. بنابراین مواد شکل‌دهنده نیز قبل از مصرف، اگر مشکوک به نظر می‌رسند باید نمونه‌برداری و آزمایش شوند. پس از انتخاب بسته‌های لازم، در شرایط سترونی و در محلی که رطوبت زیاد نباشد، در آن‌ها باز شده، با استفاده از نمونه‌بردار سترون از هر بسته حدود ۲۵۰ گرم از نقاط مختلف برداشته، به یک ظرف سترون منتقل می‌شود، چنانچه مقدور باشد، بهتر است کلیه‌ی مواد موجود در بسته در یک ظرف بزرگ سترون خالی شده، پس از یکنواخت کردن از آن نمونه‌برداری گردد.

۱۳- مواد غذایی بسته‌بندی شده در قوطی (کنسروها و کمپوت‌ها): ابتدا تعداد لازم قوطی به روش تصادفی و با استفاده از جداول نمونه‌برداری استاندارد انتخاب می‌گردد. سپس سطح قوطی‌ها با آب نیم‌گرم و صابون خوب شسته و با پنبه‌ی آغشته به الکل سترون می‌شود. چون ممکن است مقداری گاز در داخل قوطی تولید شده باشد که در هنگام سوراخ کردن سبب پخش ماده‌ی غذایی به اطراف و برخورد آن به سر و صورت آزمایش‌کننده گردد، همچنین برگشت آن روی قوطی ممکن است سبب آلودگی ثانوی شود. باید قیف سترونی را که اندازه‌ی آن متناسب با اندازه‌ی قوطی کنسرو باشد به‌طور واژگون روی قوطی قرار داده، سپس میخ بلند و سترونی را از جهت باریک قیف

داخل کرده، با ضربه قوطی را سوراخ کرد. در مورد قوطی های سالم می توان با استفاده از دریاکن سترون در قوطی را به اندازه ی کافی باز کرده، سپس با وسیله ی فلزی توخالی و سترون که تا عمق قوطی وارد می شود نمونه تهیه کرد. چنانچه ماده موجود در قوطی مایع است با پیست سترون مقدار نمونه ی لازم تهیه و به یک ظرف سترون منتقل می شود و به آزمایشگاه ارسال می گردد.

۶-۳- نشانه گذاری^۱ ظروف حاوی نمونه

تمام ظروف باید قبل و یا بلافاصله پس از نمونه برداری نشانه گذاری شوند. بهتر است برای جلوگیری از کنده شدن و افتادن احتمالی برچسب در طول عملیات بعدی آنرا محکم چسباند. برچسب ها شماره گذاری شده، اطلاعات ضروری در مورد نمونه روی آن ها قید گردد. چنانچه نمونه اولیه از یک ظرف بزرگ مانند کیسه یا کارتن برداشته شده باشد ظرف حاوی نمونه با شماره روی کیسه یا کارتن مشخص شود.

گزارش نمونه برداری: گزارش نمونه برداری باید توسط نمونه بردار امضا گردد.

گزارش نمونه برداری از هر نمونه باید شامل اطلاعات زیر باشد:

۱- نام و آدرس نمونه بردار ۲- نام و آدرس نماینده ی کالا و یا صاحب کالا ۳- تاریخ، محل و زمان نمونه برداری ۴- علت نمونه برداری ۵- مشخصات ماده غذایی ۶- نام تولیدکننده، واردکننده، فروشنده، خریدار و در صورت لزوم سایر اطلاعات ضروری ۷- تعداد و اندازه واحدهای تشکیل دهنده ی بهر ۸- شماره و علامت بهر ۹- شماره فاکتور و بارنامه ° ۱- روش نمونه برداری (روش تصادفی از بهر یا انتخابی از واحدهای در دسترس) ۱۱- کلیه ی مدارک مربوط به حمل و نقل - گواهی بهداشت و استاندارد کشور مبدأ ۱۲- در صورتی که نمونه برداری از یک واحد بزرگ صورت گیرد کلیه داده ها روی بسته بندی بزرگ، ویژگی های کالا، اندازه و تعداد روی بسته کوچک قید گردد. ۱۳- چگونگی و کیفیت حمل نمونه ها به آزمایشگاه ۱۴- در مواردی که فروشنده و خریدار تقاضای آزمایش دارند خودشان باید آزمایش های مورد نظر را ذکر کنند. ۱۵- شرایطی که ممکن است در نمونه برداری و یا وضعیت نمونه ها تغییر ایجاد نماید.

۷-۳- جابه جایی و نگهداری نمونه ها

در جابه جایی نمونه ها باید کوشش شود که شرایط میکروبیولوژیکی ماده ی غذایی تغییر نکند.

۱- Labling

از این رو باید تا جای ممکن به فوریت نمونه‌ها را پس از برداشتن مورد آزمایش قرارداد و یا اینکه از وسایلی مانند یخدان، یخچال و فریزر استفاده شود که امکان تغییر شرایط ماده غذایی در طول جابه‌جایی و نگهداری وجود نداشته باشد. ارسال نمونه‌ها به آزمایشگاه تا حد ممکن باید سریع صورت گیرد. چنانچه نمونه‌ی موردنظر از غذاهای خشک و کنسروها باشد، در این موارد احتیاطات خاصی لازم نیست فقط درجه حرارت نباید از ۴۵ درجه سانتی‌گراد تجاوز کند. چنانچه نمونه‌ی غذایی فاسد شدنی و غیرمنجمد باشد باید تا هنگام آزمایش در ۰ تا ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود و با ظروف عایق‌دار به آزمایشگاه ارسال گردد. نمونه‌های غذایی منجمد را باید تا هنگام آزمایش همچنان به حالت انجماد نگاهداری نمود. برای این منظور باید آن‌ها را در ظروف نمونه‌برداری عایق که در فریزر قرار داشته و سرد شده‌اند قرار داد و با استفاده از یخ خشک یا وسیله‌ی مناسب دیگری در تمام مدت حمل و نقل یا نگهداری درجه حرارت نمونه را پایین‌تر از صفر نگاه داشت.

۸-۳- آماده کردن نمونه‌های مورد آزمون

پس از رسیدن نمونه‌های جمع‌آوری شده، باید بلافاصله اقدام به آزمایش کرد.

۸-۳-۱- چنانچه نمونه‌های رسیده به آزمایشگاه منجمد باشد باید به یکی از سه روش زیر

آماده شوند.

الف) نمونه در ظرفی که به آزمایشگاه رسیده است برای ۱۸ ساعت در یخچالی که ۲-۵ درجه سانتی‌گراد حرارت دارد قرار داده شود.

ب) چنانچه نمونه به آسانی قابل خرد شدن باشد باید آن را خرد کنند.

پ) نمونه‌هایی که بهسولت از حالت انجماد خارج می‌شوند باید به مدت کمتر از یک‌ربع ساعت در حرارت ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شوند.

۸-۳-۲- در صورتی که نمونه غذایی مایع یا به حالت سوسپانسیون و یا جامد باشد در هر حال قبل از باز کردن، ظرف دارای نمونه باید خوب تکان داده شود.

- هنگام باز کردن درب ظرف دارای نمونه باید از آلوده شدن آن جلوگیری شود. به این منظور روی درب و اطراف و محلی که از آنجا ظرف باز می‌شود باید ضدعفونی گردد.

- در مورد غذاهای بسته‌بندی شده برای از بین بردن آلودگی از شعله دادن یا پاک کردن با الکل ۷۰ درصد و یا هوای خشک گرم استفاده می‌شود.

- هنگام باز کردن ظروف حاوی نمونه‌های غذایی پودری شکل باید دقت شود تا از آلودگی

اطراف و محل کار و سایر نمونه‌ها جلوگیری گردد.

۳-۸-۳- هنگامی که نمونه‌ها متشکل از چندین ترکیب یا لایه هستند مانند کیک‌های خامه‌ای یا ژله‌ای به‌ویژه اگر به‌صورت قسمت‌ها و لایه‌های جداگانه تهیه شده‌اند باید نمونه‌های جداگانه از هر بخش برداشت شود. به‌طوری‌که بر اثر اختلاط با یکدیگر آلودگی پخش نشود. سپس همه قسمت‌ها به ظروف جداگانه منتقل شوند.

در تهیه‌ی رقت‌ها و یکنواخت کردن نمونه غذایی رعایت شرایط سترونی الزامی است.

— هرگونه شکل و یا وضعیت غیرعادی نمونه باید یادداشت شود.

— ظروف دارای باقیمانده نمونه‌های جمع‌آوری شده در یخچال یا فریزر برای تکرار آزمایشها نگاه داشته شوند. برای جداسازی و شمارش میکروب‌ها در ماده‌ی غذایی غیرمایع و یا مواد غذایی که دارای لایه‌ی ژلاتینی و خشک هستند نخست باید مخلوطی یکنواخت از ماده‌ی غذایی در محیط مایع تهیه شود سپس رقت‌های لازم از آن بدست آید. برای این منظور ماده‌ی غذایی باید خرد شود ولی هنگام خرد کردن آن و تهیه مخلوط اولیه باید به نکات زیر توجه داشت:

مدت عمل خرد کردن نباید طولانی شود زیرا باعث بالا رفتن دما و در نتیجه از بین رفتن بعضی از باکتری‌ها خواهد شد، همچنین سرعت بیش از حد مخلوط کن ممکن است باعث آسیب مکانیکی و در نتیجه از بین رفتن باکتری‌ها گردد و در شمارش تعداد باکتری‌ها باعث اشتباه شود، کم‌بودن زمان مخلوط کردن باعث می‌شود که تمامی میکروب‌های موجود در ماده‌ی غذایی در محیط آزاد نشود. چون در هنگام خرد کردن ماده‌ی غذایی خطر انتشار میکروب‌های بیماریزا در هوا وجود دارد باید این عمل در زیر هود انجام گیرد.

۳-۹- روش رقیق کردن نمونه

در بسیاری موارد میزان آلودگی در نمونه موردنظر در حد بالایی قرار دارد لازم است قبل از کشت دادن نمونه در محیط کشت آن‌را با رقیق‌کننده‌های استریل به نسبت معین رقیق نمود تا بتوان براحتی و با دقت بیشتر آلودگی موجود در نمونه را تعیین کرد. این عمل در اساس به‌خاطر این است که برابر استاندارد بین‌المللی بعد از کشت نمونه‌ها در محیط کشت و قرار گرفتن محیط‌ها به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در اینکوباتور با دمای معین، تعداد پرگنه‌های ناشی از تکثیر میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه می‌باید در حد ۳۰ تا ۳۰۰ قرار داشته باشد. محلول‌های رقیق‌کننده متداول عبارت‌اند از: آب مقطر استریل، سرم فیزیولوژی، محلول سیلین (محلول ۹ گرم در لیتر نمک طعام) و محلول رینگر.

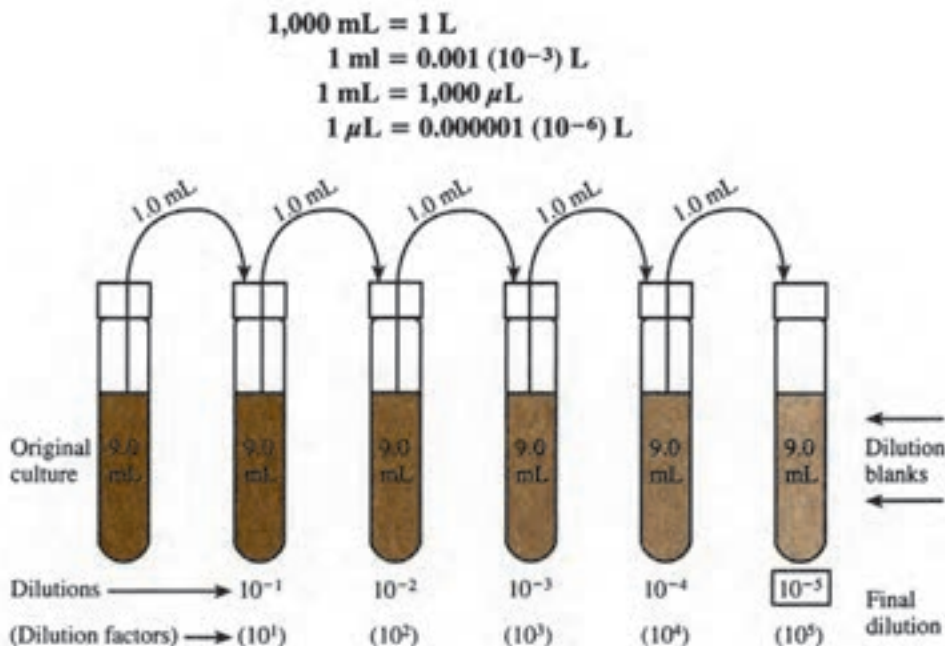
این مواد علاوه بر رقیق‌کنندگی نمونه مورد آزمایش دو نقش اساسی دیگر نیز دارا می‌باشند:

۱- جدا کردن میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه از آن و هدایت آن‌ها به داخل رقیق‌کننده سترون شده.

۲- جدا و پراکنده نمودن میکروارگانیسم‌ها از یکدیگر.

بدین ترتیب هنگامی که از محلول‌های رقیق‌کننده عمل کشت دادن در محیط‌های جامد (در پتری‌دیش) صورت می‌گیرد، میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه با وضعیت مناسب و شرایط آماده‌تری شروع به تغذیه و رشد و تکثیر می‌نمایند.

طرز رقیق کردن: ابتدا ظرف خالی و سترون مخلوط‌کن را توزین کرده، ۱۰ گرم از نمونه یکنواخت شده را داخل آن وزن می‌کنند. ۹۰ میلی‌لیتر رقیق‌کننده‌ی آب پیتونه یا بافر فسفات به آن افزوده و مخلوط‌کن را با سرعت کم راه می‌اندازند و سرعت را به صورت یکنواخت افزایش داده، مدت ۱-۲ دقیقه با سرعت بالا عمل مخلوط کردن را ادامه می‌دهند تا مخلوطی یکنواخت از نمونه با رقت یک‌دهم بدست آید. برای رقیق کردن نمونه مورد آزمایش ابتدا به تعداد لازم لوله‌های حاوی ۹ میلی‌لیتر مایع رقیق‌کننده را به ترتیب با $\frac{1}{10}$ ، $\frac{1}{100}$ ، $\frac{1}{1000}$ و ... مشخص کرده سپس به کمک پیپت



شکل ۲-۳- مراحل رقیق کردن نمونه‌های آزمایشگاهی

یک میلی لیتر از رقت (نمونه‌های مایع) یا از رقت $\frac{1}{10}$ (نمونه‌های جامد) برداشته، به اولین لوله حاوی مایع رقیق کننده بیفزایید و چندبار با پرو خالی کردن پیست آن را هم بزنید. سپس با یک پیست یک میلی لیتری دیگر، یک میلی لیتر از آن را به دومین لوله‌ی حاوی محلول رقیق کننده اضافه کنید و به همین ترتیب عمل رقیق کردن را تا بیشترین رقت مورد نظر ادامه دهید ($\frac{1}{1000000}$ یا بیشتر و یا کمتر) باید دقت داشت که هر پیست فقط در یک رقت فرو رود و هرگز با رقت‌های دیگر تماس پیدا نکند ولی چنانچه کشت یک رقت، در چند محیط مورد نظر باشد می‌توان از یک پیست استفاده کرد. کلیه عملیات رقیق کردن باید در کنار شعله در شرایط سترونی صورت گیرد.

خودآزمایی

- ۱- نمونه و نمونه‌ی اولیه را تعریف کرده، طرز تهیه‌ی آن‌ها را بنویسید.
- ۲- از مایعات منجمد چگونه نمونه برداری می‌شود؟
- ۳- ویژگی ظروف نمونه برداری را بنویسید.
- ۴- از آب‌های ساکن مثل مخازن و چاه و ... چگونه نمونه برداری می‌شود؟
- ۵- نمونه‌ای از آب محل زندگی خود را تهیه کنید و همراه با گزارش به آزمایشگاه تحویل دهید.
- ۶- طرز آماده کردن نمونه‌های منجمد در آزمایشگاه چگونه است؟
- ۷- به هنگام خرد کردن نمونه‌ی مواد غذایی جامد رعایت چه نکاتی الزامی است؟
- ۸- روش رقیق کردن نمونه‌های مختلف را توضیح دهید.
- ۹- محلول‌های رقیق کننده را نام برده، خواص دیگر آن‌ها را بنویسید.
- ۱۰- قبل از باز کردن درب ظروف نمونه برداری شده، رعایت چه نکاتی الزامی است؟
- ۱۱- نحوه‌ی نمونه برداری از بودر تخم مرغ را توضیح دهید.
- ۱۲- نمونه برداری از گوشت خام منجمد چگونه انجام می‌گیرد؟
- ۱۳- هنگام نمونه برداری شیر از ظروف بزرگ به چه مواردی باید دقت نمود؟
- ۱۴- چرا نمونه برداری از شیر خشک باید خیلی سریع انجام گیرد؟
- ۱۵- چرا برای جابه‌جایی و نگهداری نمونه‌ها از وسایلی مانند یخدان، یخچال یا فریزر استفاده می‌شود؟

محیط‌های کشت باکتری‌ها

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

- ۱- اهمیت محیط‌های کشت و تفاوت بین انواع آن‌ها را بیان نماید.
- ۲- محیط‌های کشت آماده را در آزمایشگاه تهیه نماید.

۴- محیط‌های کشت باکتری‌ها

۴-۱- تعریف

منظور از محیط کشت مخلوطی متعادل از مواد مغذی موردنیاز برای رشد میکروارگانیسم‌ها می‌باشد به نحوی که بتواند از لحاظ مواد غذایی، رطوبت و pH شرایط رشد میکروب موردنظر را تأمین نماید.

۴-۲- انواع محیط‌های کشت^۱

در میکروبیولوژی انواع متعددی از محیط‌های کشت بکار می‌رود این محیط‌ها برحسب نیازهای مخصوص میکروارگانیسم‌های مورد نظر از یکدیگر متفاوتند. از لحاظ فرم فیزیکی محیط کشت شامل انواع جامد و مایع هستند. از نظر ترکیب نیز شامل محیط کشت‌های عمومی (ساده)، افتراقی و اختصاصی می‌شوند.

۴-۲-۱- محیط‌های کشت عمومی: این محیط‌ها به نحوی گزینش می‌شوند که بتوانند

مواد مغذی لازم برای رشد و نمو تمام میکروارگانیسم‌های آلوده‌کننده را فراهم سازند. مهم‌ترین نمونه‌های این نوع محیط کشت عبارتند از نوتریت آگار (جامد)^۲ و نوتریت برات (مایع)^۳ که بیشتر

۱- Media

۲- Nutrient agar

۳- Nutrient broth

برای شمارش تعداد کل میکروارگانیسم‌های آلوده‌کننده مواد غذایی به کار می‌روند، بدیهی است شرایط کشت میکروبی با استفاده از این محیط‌ها تابع نوع میکروارگانیسم‌ها است و برای نمونه چنانچه لازم باشد تعداد کل میکروارگانیسم‌های بی‌هوازی شناسایی و شمارش شوند. محیط کشت تلقیح شده باید در شرایط بی‌هوازی قرار گیرد.

۲-۲-۴- محیط کشت اختصاصی^۱: به گروهی از محیط کشت‌ها می‌گویند که به دلیل دارا بودن یک سری از ترکیبات خاص فقط اجازه رشد به یک و یا تعداد محدودی از باکتری‌ها را می‌دهند. ۲-۲-۳- محیط کشت افتراقی^۲: این گروه از محیط‌های کشت دارای ترکیباتی هستند که با توجه به متابولیسم مختلف باکتری‌ها باعث تفکیک و یا جدایی گروه‌های مختلف باکتری‌ها از هم می‌شوند مثل Blood Agar که به کمک آن میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا از هم تشخیص داده می‌شود.

۳-۴- آماده سازی محیط‌های کشت

هنگامی که بخواهیم باکتری‌ها را روی یک محیط کشت جامد رشد دهیم معمولاً از یک ماده جامدکننده به نام آگار در محیط کشت استفاده می‌شود. (آگار یک پلی‌ساکارید پیچیده است که از جلبک دریایی گرفته شده است و به‌عنوان یک قوام‌دهنده‌ی ژله، بستنی و ... مدت‌های طولانی مورد استفاده بوده است) آگار با خواص مهمی که دارد برای میکروبیولوژی باارزش است. تاکنون جانشین مطلوبی برای آگار پیدا نشده است. تعداد کمی از باکتری‌ها می‌توانند آگار را تجزیه کنند بنابراین آگار جامد باقی می‌ماند. آگار در حدود نقطه‌ی جوش آب ذوب می‌شود و در موقع سرد کردن تا 4°C مایع باقی می‌ماند که این خاصیت بسیار مهمی است. برای آزمایشگاه از آگاری استفاده می‌شود که در حمام‌های آب گرم با دمای 5°C نگهداری می‌شود. در این دما اگر آگار بر روی یک مایع تلقیح میکروبی ریخته شود به آن‌ها آسیب نمی‌رساند.

در مواردی که محیط کشت مورد نظر به‌صورت پودر است به اندازه مناسب از آن وزن نموده (مقدار مناسب در روی بسته مشخص شده است)، در داخل ارلن بریزید و بعد از افزودن آب مقطر به اندازه‌ی تعیین شده و حل کردن محیط کشت (به کمک حرارت) و قرار دادن در پیچ و یا دربوش پنبه‌ای و بستن دهانه آن با کاغذ آلومینیومی، ارلن را داخل اتوکلاو قرار دهید و در دمای 121 درجه سانتی‌گراد

۱- Selective media

۲- Differential media

و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع (15PSI) آن را برای مدت حداقل ۱۵ دقیقه استریل نمایید. در مرحله بعد پتری دیش و ظرف کشت‌های استریل شده را که مورد نیاز هستند از آون خارج نموده، داخل لوله فلزی پوششی یا کاغذ آلومینیومی باقی بگذارید تا سرد شوند. سپس محلول محیط کشت استریل شده بعد از قدری سرد شدن (حدود ۴۵ درجه سانتی‌گراد) آماده استفاده است. در این موقع میز کار را با پارچه تمیز نموده، با پنبه‌ی الکلی آلودگی سطح آن را پاک نمایید. بعد از چیدن پلیت بر روی میز و نوشتن نام محیط کشت بر روی درب آن‌ها با بلند کردن دربشان در هر کدام به اندازه‌ای که تمام سطح پلیت را بپوشاند از محلول محیط کشت ریخته، سپس درب آن‌ها را برای مدتی به حالت زاویه‌دار روی لبه آن‌ها قرار دهید. بعد از افزودن مواد محیط کشت به تمام پلیت، درب آن‌ها را به حالت اول برگردانید تا از ورود میکروب‌ها به داخل پلیت جلوگیری شود. پس از سرد شدن و بسته شدن محیط کشت، آن‌ها را تا زمان استفاده داخل یخچال قرار دهید.

خودآزمایی

- ۱- آیا تنظیم pH محیط کشت ضروری است؟ چرا؟
- ۲- چرا رشد بعضی از انواع میکروارگانیسم‌ها روی یک محیط مشخص غیرممکن است؟
- ۳- منظور از محیط کشت چیست و به‌طور کلی چند نوع محیط کشت موجود است؟
- ۴- محیط‌های کشت متمایزکننده را شرح دهید.
- ۵- معمول‌ترین محیط کشت میکروارگانیسم‌ها چیست و از چه موادی ساخته می‌شود؟
- ۶- آگار چیست و چه استفاده‌ای از آن در میکروبیولوژی بعمل می‌آید؟
- ۷- طرز تهیه و آماده‌سازی محیط‌های کشت پودری موجود در بازار را بنویسید.

روش‌های کشت میکروارگانیسم‌ها

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

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

۵- روش‌های کشت میکروارگانیسم‌ها

۵-۱- کشت میکروارگانیسم‌های هوازی

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

۵-۱-۱- روش کشت پورپلیت یا استاندارد پلیت کانت^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

^۱ - 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 در نظر 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 این ترتیب با استفاده از یک پیپت، کلیه‌ی رقت‌ها به پلیت منتقل می‌شوند. محیط کشت مناسب ذوب و در حمام ماری 45°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 45°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 به آرامی 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 به طوری که لایه نازکی از محیط سطح پلیت را بپوشاند. در نتیجه‌ی 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 5°C - و باکتری‌های مزوفیل 37°C - 25°C و باکتری‌های گرمادوست در 55°C) دمای انتخابی با توجه به هدفی که از شمارش باکتری مورد نظر است انتخاب می‌شود. در مورد غذاهایی که در حالت انجماد نگهداری می‌شوند دمای 5°C و 35°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 55°C را انتخاب کرد. به‌رحال انتخاب دما به دلیل اهمیتی که دارد باید در نتیجه 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 30° - 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 در نظر گرفته شده نباید هیچ پرگنه ظاهر گردد. مدت گرمخانه‌گذاری در مورد باکتری‌های گرمادوست^۱ و میان‌دمادوست^۲ ۲۴ تا ۴۸ ساعت و در مورد سردما دوست‌ها^۳ بیشتر می‌باشد ولی برای قارچها و مخمرها ممکن است یک هفته یا بیشتر ادامه یابد.

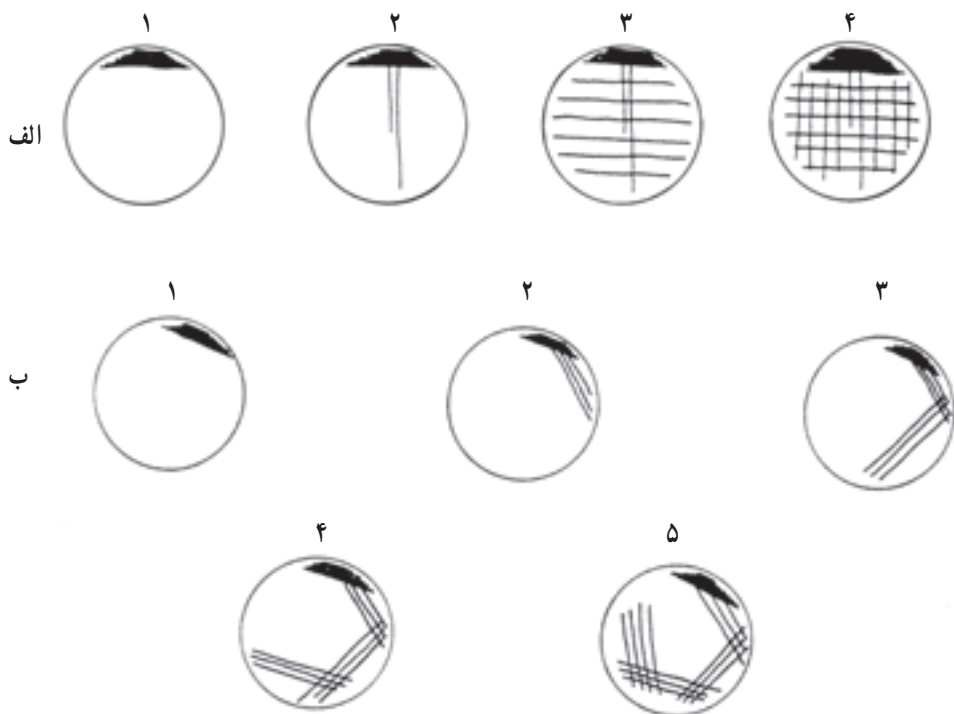
۲-۱-۵- روش کشت سطحی: در این روش باید ظروف پتری حاوی محیط کشت تهیه شده باشند و سطح محیط با قرار دادن آن‌ها در گرمخانه 55°C - 50°C به مدت نیم تا دو ساعت خشک شود. در این مدت باید در پلیت باز و سطح محیط رو به پایین باشد و یا می‌توان محیط‌های کشت را با در بسته به مدت ۴ ساعت در گرمخانه 37°C قرار داد تا خشک شوند. سپس با توجه به رقت‌های تهیه شده، برای هر رقت ۲ تا ۴ پلیت انتخاب نمود و یک ظرف به عنوان کنترل منفی در نظر گرفت. روی هر ظرف پتری را با شماره‌ی نمونه رقت و تاریخ کشت مشخص می‌کنند و پس از تهیه رقت‌ها، از رقیق‌ترین آن‌ها به کمک پپیت $1/1$ میلی‌لیتری برداشت کرده، در سطح محیط می‌ریزند و بعد همان پپیت را در رقت بعدی که 10° برابر بیشتر است سه بار شسته و $1/1$ از آن را برداشته، در پلیت مربوط می‌ریزند. به همین ترتیب ادامه داده می‌شود تا آخرین رقت، سپس برای هر رقت از یک پخش‌کننده‌ی شیشه‌ای سترون استفاده کرده، نمونه را بخوبی در سطح پلیت می‌گسترانند. (برای تهیه پخش‌کننده، یک میله شیشه‌ای را به کمک شعله تحت زاویه 90° درجه خم کرده، سترون می‌کنند). نحوه حرکت میله شیشه‌ای یا آنس پلاتین روی سطح محیط کشت باید به گونه‌ای باشد که از زخمی کردن سطح محیط کشت جلوگیری کند. انجام این کار با استفاده از میله شیشه‌ای سترون آسان‌تر می‌باشد. سپس پلیت را مانند روش قبل با توجه به انتخاب و زمان گرمخانه‌گذاری، مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ قرار داده، پس از ۲۴ ساعت ظروفی را که بین 30° - 30° 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.

۳-۱-۵- روش کشت قطره‌ای: در این روش از پپیت‌های پاستور کالیبره که حجم قطرات آن‌ها مشخص می‌باشد استفاده می‌شود (پپیت‌هایی که 20 ، 25 یا 40 قطره آن‌ها یک میلی‌لیتر است) ظروف پتری حاوی محیط کشت به همان 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

۱- Termophilic

۲- Mesophilic

۳- Psychophilic



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

اختصاص می‌دهند. (رقت 10^{-1} ، 10^{-2} و 10^{-3} که نماینده‌ی رقت‌های $1/10^0$ و $1/10^1$ و $1/10^2$ می‌باشد) بدین ترتیب برای هر رقت دو تا چهار ظرف در نظر گرفته می‌شود. بعد به کمک یک پیپت پاستور کالیبره که سر آن به یک حباب لاستیکی مجهز است از رقیق‌ترین لوله مقداری برداشت کرده، در سطح پلیت در همان بخشی که با علامت رقت مربوط مشخص شده، دو قطره جدا از هم قرار می‌دهند. سپس بقیه را در لوله خودش خالی کرده، در لوله بعدی که حاوی نمونه‌ی 10^0 برابر غلیظ‌تر است سه بار پیپت را شسته، از آن برداشت می‌کنند و به همان ترتیب قبل دو قطره در بخش مربوط محیط کشت قرار می‌دهند. و به همین ترتیب تا 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 20° پرگنه در هر قطره می‌باشد شمارش می‌کنند. پلیت‌ها دوباره به مدت ۲۴

ساعت گرمخانه گذاری و پس از آن شمارش نمایند. این روش از نظر صرفه جویی در محیط کشت مناسب است و برای شمارش استافیلوکوک و باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری مانند کلوستریدیوم پرفرترانس که مشخصات پرگنه در سطح محیط کشت در شمارش اهمیت دارد بکار می‌رود. می‌توان از محیط‌های اختصاصی مانند محیط بردپارکر برای استافیلوکوک و یا محیط ژلوز خون دار که سطح آن با نئوماسین آغشته شده برای کلوستریدیوم پرفرترانس استفاده نمود.

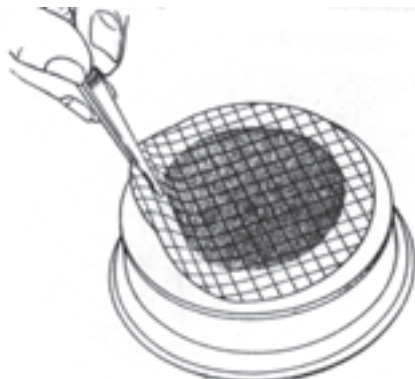
۴-۱-۵- روش اتوماتیک: برخی کارخانجات محیط‌های کشت آماده را، در ظروف مخصوص تهیه کرده‌اند که با فرو بردن آن‌ها در رقت معینی از نمونه و سپس قرار دادن در گرمخانه می‌توان با شمارش پرگنه‌های ظاهر شده، تعداد باکتری‌ها و حتی بعضی از انواع آن‌ها را تشخیص داد. همچنین دستگاه‌های خودکاری ساخته شده که از نمونه‌ی ماده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

۵-۱-۵- کشت باکتری‌ها به کمک کاغذ صافی: کاغذهای صافی مخصوص میکروبی‌شناسی 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 صحرائی تهیه و عرضه کرده‌اند. از این صافی‌ها برای جست‌وجو 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 جست‌وجوی باکتری بکار رود استفاده می‌شود؛ به این ترتیب که مقدار کافی نمونه

۱- Coulter Counter

۲- کارخانه میلی‌پور آمریکا و سوتر آلمان

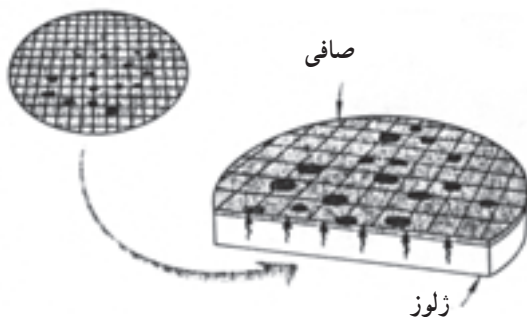
از صافی عبور داده می‌شود تا کلیه باکتری‌های موجود در آن حجم در منافذ کاغذ به دام بیفتند سپس کاغذ صافی روی محیط کشت جامد قرار داده می‌شود و در صورت لزوم ممکن است روی آن نیز با یک لایه‌ی نازک از محیط کشت مذاب که حرارت آن کمتر از 45°C است پوشانده شود. سپس این ظرف گرمخانه‌گذاری شده پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تعداد 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.



۱- برداشتن صافی از روی دستگاہ صاف‌کننده



۲- گذاشتن صافی روی تشتک ژلوزدار



۳- انتشار مایع به طرف صافی

شکل ۲-۵- نمایش شمارش میکروارگانیسم‌ها به کمک صافی

۱. شکل



۲. سطح



۳. لبه، کناره



شکل ۳-۵ - شکل کلنی‌ها روی محیط جامد

۲-۵ - روش‌های تأمین شرایط بی‌هوازی

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

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

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

برای تأیید شرایط بی‌هوازی درون جار از معرف استفاده می‌شود.

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

^۱ - Gaspak

تیوگلیکولات برات ترکیباتی احیاکننده مانند سیستین 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^۱ می‌باشد.

۴- 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 ۴-۵- جار بی‌هوازی

۳-۵- روش کشت بی‌هوایی

- ۱- لوله‌های حاوی تیوگلیکولات جوشانده و سرد کرده را با میکروب بی‌هوایی تلقیح کنید.
- ۲- تمام کشت‌ها را در گرمخانه 37°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 ۵-۵- رابطه بین تراکم اکسیژن و رشد میکروب‌ها در محیط جامد

فکر کنید و پاسخ دهید:

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

۴-۵- روش شمارش مستقیم

از این روش به دلیل 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 نتوبار^۱ و یا لام توما^۲ که برای شمارش گلبول‌های خون بکار می‌رود استفاده نمود. بدین ترتیب که نمونه مورد آزمایش به نسبت‌های

۱- Neubar

۲- Thoma

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

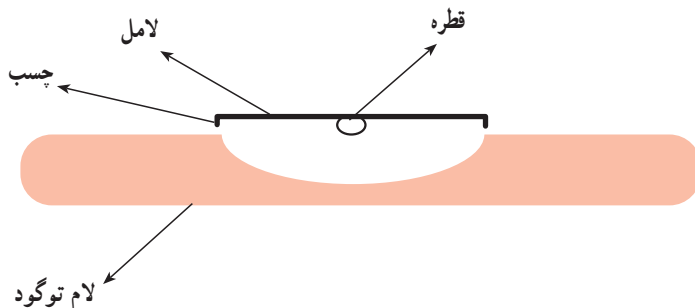
ب) سوسپانسیونی از مخمر که در زیر میکروسکوپ به وضوح قابل تشخیص‌اند و در محلول‌ها به خوبی به حالت تعلیق درمی‌آیند تهیه می‌شود و به روش فوق تعداد مخمرهای آن در میلی‌لیتر تعیین می‌گردد. سپس از این تعلیق با حجم مساوی به رقت‌های تهیه شده از نمونه غذایی می‌افزایند بنابراین در محلول به دست آمده تعداد مخمر یا دیاتمه به $\frac{1}{4}$ تقلیل می‌یابد. حال اگر یک قطره از این محلول را در زیر میکروسکوپ قرار داده، در یک یا چند میدان تعداد مخمرها را بشمارند و تعداد میکروب‌ها را به دست آورند تعداد باکتری‌ها در ماده‌ی غذایی به دست می‌آید.

۵-۵ - آزمون حرکت در باکتری

جهت آزمایش حرکت در باکتری‌ها بهتر است از کشت روی محیط‌نوترین 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 100°

۱- 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

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

رنگ آمیزی میکروارگانیسم ها

هدف های رفتاری: در پایان این فصل، فراگیر باید بتواند:

- ۱- گسترشی تهیه و آن را رنگ آمیزی نماید و باکتری ها را زیر میکروسکوپ مورد مشاهده قرار دهد.
- ۲- تئوری رنگ آمیزی و اهمیت آن را بیان نماید.
- ۳- یک نوع رنگ آمیزی ساده را انجام دهد.
- ۴- یک نوع رنگ آمیزی تشخیصی انجام دهد.

۶- رنگ آمیزی میکروارگانیسم ها

۱-۶- اهمیت رنگ آمیزی باکتری ها

مورفولوژی باکتری ها را به دو طریق می توان مورد بررسی قرار داد:

- ۱- به وسیله ی مشاهده ی موجودات زنده و بدون رنگ آمیزی.
- ۲- به وسیله ی مشاهده ی سلول های مرده و رنگ شده با مواد رنگی.

باکتری های زنده بی رنگ اند، و تضاد کافی با آبی که در آن معلق هستند ندارند و در نتیجه خوب دیده نمی شوند. رنگ آمیزی موجودات باعث می شود که بین آن ها و محیط اطرافشان تضاد رنگی حاصل شود و بدین طریق بهتر دیده بشوند. همینطور بعضی از رنگ هایی که بکار می روند، می توانند ساختمان های داخلی سلول را که به طور طبیعی غیر قابل رؤیت هستند، مشخص کنند. اگر چه باکتری ها با محیط اطرافشان اختلاف زیادی نشان نمی دهند، ولی از نظر شیمیایی از محیط خود متفاوت هستند. این اختلاف شیمیایی ما را در تشخیص باکتری ها به وسیله ی رنگ آمیزی توانا می سازد، زیرا رنگ یا ماده به طور معمول با سلول باکتری واکنش ایجاد می کند، در حالی که روی زمینه لام اثری

ندارد. بنابراین، مزایای اصلی رنگ آمیزی عبارت است از ۱- ایجاد تضاد بین میکروارگانیسم‌ها و زمینه‌ی آن‌ها، که در نتیجه باعث تمایز اشکال مختلف می‌شود. ۲- امکان بررسی ساختمان‌های داخلی سلول باکتری‌ها، مثل دیواره‌ی سلولی، واکوئول^۱، یا ضمائم هسته^۲ را فراهم می‌نماید. ۳- به باکتری‌شناس امکان می‌دهد که از درشت‌نمایی بیشتر استفاده کند.

۲-۶- تئوری رنگ آمیزی

برای درک این که یک ماده رنگی سلول باکتری‌ها را رنگ می‌کند، ابتدا باید بدانید که یک ماده‌ی رنگی چیست. مواد رنگی اغلب املاحی هستند که یکی از یون‌های آن‌ها رنگی است یک ملح یا نمک ترکیبی است که از یک یون با بار الکتریکی مثبت و یک یون با بار الکتریکی منفی تشکیل شده است ماده رنگی ساده متیلن بلو در حقیقت ملح کلرورمتیلن بلو می‌باشد که تجزیه آن به شرح ذیل است

$$\text{کلرور}^- + \text{متیلن بلو}^+ \rightarrow \text{کلرورمتیلن بلو}$$

قسمت رنگی این ماده در یون مثبت متیلن بلو قرار دارد. سلول باکتری‌ها هنگامی که در محیطی قرار بگیرد که دارای pH^۱ حدود خنثی باشد - که به طور معمول چنین است -، دارای بار الکتریکی منفی مختصری خواهند بود. سلول باکتری با بار الکتریکی منفی با یون متیلن بلو با بار الکتریکی مثبت ترکیب شده و در نتیجه سلول رنگ می‌شود. در حقیقت تفاوت بار الکتریکی است که باعث گرایش بین ماده رنگی و سلول باکتری می‌شود.

۳-۶- روش‌های رنگ آمیزی

امروزه تعداد زیادی مواد رنگی در اختیار باکتری‌شناسان است که به اشکال متفاوت در روش‌های رنگ آمیزی اصلی به کار می‌روند.

الف) رنگ آمیزی‌های ساده: شامل رنگ آمیزی با مواد رنگی قلیایی، مواد رنگی اسیدی و مواد رنگی خنثی می‌باشد

۱- رنگ‌های اسیدی: رنگ‌هایی هستند که قسمت رنگی آن‌ها (کروموفور) دارای بار منفی می‌باشد و با قسمت‌هایی از سلول که بار مثبت دارند مثل پروتئین‌ها ترکیب می‌شوند مثل اسید پیکریک و نیگروزین و فوشین اسیدی

۲- رنگ‌های قلیایی: قسمت رنگی (کروموفور) این گروه دارای بار مثبت می‌باشد و با

۱- Vacuole

۲- Nuclearbodies

قسمت‌هایی از سلول که بار منفی دارند مثل اسیدهای نوکلئیک ترکیب می‌شوند از این گروه می‌توان به کریستال یوله (بنفش)، متیلن بلو سافرانین و فوشین بازی اشاره کرد.

۳- رنگ‌های خنثی: رنگ‌هایی هستند که قسمت رنگی آن‌ها فاقد بار الکتریکی می‌باشد و با قسمت‌های بدون بار الکتریکی سلول مثل چربیها، ترکیب می‌شوند مثل سودان سیاه

(ب) رنگ آمیزی‌های تشخیصی^۱: شامل رنگ آمیزی گرم^۲ و رنگ آمیزی اسید فست^۳

— طرز تهیه و تثبیت باکتری‌ها برای رنگ آمیزی

پیش از رنگ آمیزی باید باکتری‌هایی را که می‌خواهید مورد بررسی قرار دهید تثبیت کنید، یعنی آن‌ها را به لام شیشه‌ای که باید رنگ شود بچسبانید. اگر یک نمونه تثبیت نشده باشد لایه‌ی سلولی در حین عملیات مربوط به رنگ آمیزی شسته شده، از بین خواهد رفت. روشی که در این آزمایش ذکر می‌شود، خیلی معمول است و به عنوان کار اولیه در بیشتر روش‌های رنگ آمیزی باکتری‌ها بکار می‌رود. در این آزمایش، از حرارت برای کشتن و چسباندن سلول‌ها به لام استفاده می‌شود.

۱- با یک سوزن کشت حلقه‌ای، یک قطره کوچک از هر کدام از کشت‌های موردنظر را برداشته و روی لام‌های جداگانه تمیز قرار دهید لازم است لام‌ها تمیز باشد. روشی که برای تمیز کردن پیشنهاد می‌شود عبارتست از الف) یک قطره گزیلول (xyIol) روی سطح لام قرار دهید. ب) به کمک کاغذ مخصوص عدسی یا پارچه آن را پاک کنید. ج) لام تمیز شده را از میان شعله چراغ عبور داده و بگذارید تا سرد شود. یا اگر نمونه از روی محیط جامد برداشته می‌شود، یک قطره کوچک آب روی لام گذاشته، آن را با یک تکه کوچک از کشت باکتری به‌طور کامل مخلوط کنید.

۲- قطره روی لام را گسترده و پخش کنید تا یک لایه‌ی نازک و یکنواخت تشکیل شود. توجه داشته باشید که اگر گستره کلفت باشد شمارش را دچار اشکال می‌کند.

۳- مقداری بزاق را در یک لوله آزمایش استریل جمع‌آوری کنید. به کمک یک حلقه استریل یک حلقه از آن را روی لام تمیز قرار داده، آن را گسترده کنید، تا یک لایه نازک را تشکیل بدهد.

۴- لام‌ها را در هوا و یا با نگهداشتن در قسمت بالای شعله گاز خشک کنید.

۵- هنگامی که لایه‌های میکروبی خشک شد، لام را سه بار از درون شعله گاز عبور دهید. به‌طوری که قسمت لایه‌ی میکروبی به طرف بالا باشد. توجه کنید که گرمای زیاد باعث تغییر شکل ساختمان طبیعی میکروارگانیسم‌های رنگ شده خواهد شد. اگر لام گرم شده را پشت دست قرار دهیم، باید گرمای آن حس شود ولی داغ و سوزنده نباشد. منظور از تثبیت عبارتست از کشتن میکروارگانیسم‌ها،

۱- Differential

۲- Gram stain

۳- Acid fast stain

۱- یک قطره آب استریل بر روی لامل تمیز شده قرار دهید.



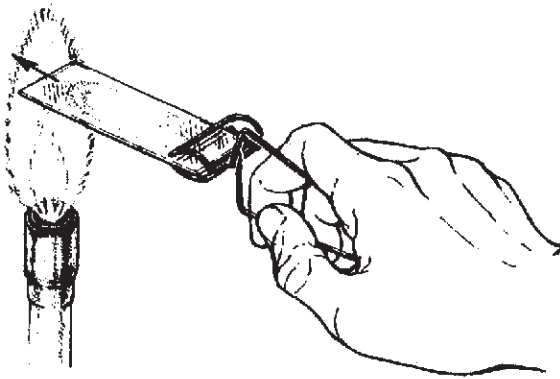
۲- یک قطره از کشت میکروبی را به آن اضافه کنید.



۳- قطره را با ضخامت کم در سطح لام بخش کنید.



۴- آن را در هوا خشک کنید.



۵- آن را با سه بار گذراندن از روی شعله تثبیت کنید.

شکل ۱-۶- تهیه گستره و تثبیت میکروارگانیسم ها برای رنگ آمیزی

انعقاد پروتوپلاسم سلول‌ها، و همینطور که گفته شد، چسباندن آن‌ها به لام. یک عامل تثبیت کننده مناسب، ساختمان‌های سلول را به همان شکل و موقعیت ویژه خود بدون اینکه ایجاد تغییرات (ساختمان‌هایی که در سلول زنده وجود ندارد) بکند حفظ می‌نماید. به‌طور معمول برای تثبیت از روش گرم کردن ملایم استفاده می‌شود، ولی از عوامل الکل و مواد شیمیایی دیگر هم می‌توان استفاده کرد.

۱-۳-۶- رنگ آمیزی‌های ساده

الف) رنگ آمیزی با رنگ‌های قلیایی: رنگ آمیزی با رنگ‌های قلیایی متیلن بلو، کریستال ویوله^۱ و کربول فوشین^۲ حدود ۳۰ تا ۶۰ ثانیه وقت لازم دارد. کریستال ویوله دارای قدرت واکنش بیشتر است و به‌طور معمول برای رنگ کردن احتیاج به حدود ۱۰ ثانیه وقت دارد. کربول فوشین که مخلوطی از فوشین و فنل است رنگ قویتری می‌باشد و به‌طور معمول ۵ ثانیه وقت لازم دارد. قدرت واکنش کربول فوشین آنقدر بالاست که ممکن است به دلیل زیاد رنگ کردن مشکلاتی ایجاد کند، به‌ویژه در نمونه‌هایی که حاوی مقدار زیادی مواد و عناصر آلی باشند.

ب) مراحل رنگ آمیزی:

- ۱- لام‌هایی را که در قسمت اول آزمایش تثبیت کردید روی صفحه سیمی مخصوص رنگ آمیزی که روی ظرف مخصوص مایعات زائد است قرار دهید.
- ۲- هریک از لایه‌های میکروبی تثبیت شده را با تقریباً ۵ قطره از یکی از رنگ‌ها آغشته کرده، بگذارید تا با گذشت زمان رنگ آمیزی انجام شود، در مورد متیلن بلو، ۳۰ ثانیه، کریستال ویوله، ۱۰ ثانیه، و کربول فوشین ۵ ثانیه.
- ۳- نمونه‌های رنگ شده را با آب فشان شستشو دهید.
- ۴- لام‌ها را بین کاغذ آب‌خشک کن بدون وارد کردن فشار روی لامل یا در هوای بالای شعله خشک کنید.

۵- نمونه‌های رنگ شده را زیر میکروسکوپ گذاشته و با عدسی روغنی ایمرسیون مشاهده کرده، از یک میدان میکروسکوپی خوب، اشکال میکروبی را رسم کنید. اگر گسترش‌های میکروبی کلفت تهیه کرده باشید، در این مرحله مشخص خواهد شد. در لایه‌های میکروبی کلفت توده‌ای از مواد رنگ شده دیده می‌شود که ممکن است در آن تعدادی هم سلول جدا و منفرد وجود داشته باشد. تفاوت‌های مشخص مربوط به اندازه‌ی سلول‌ها، شکل و ترتیب آن‌ها را به دقت مورد ملاحظه قرار دهید. در بزاق رنگ شده انواع زیاد و گوناگونی سلول دیده می‌شود. چندین نوع باکتری و قارچ،

۱- Crystal Violet

۲- Carbol fuchsin

سلول‌های اپی‌تلیال^۱، ذرات بزاقی، و گلبول‌های سفید خون، بیشتر بار الکتریکی یک باکتری (یا یک پروتئین) مربوط به اسیدی بودن محیط است اگر اسیدیته کاهش پیدا کند (بالا رفتن pH) بار الکتریکی منفی سلول افزایش یافته، و در نتیجه گرایش آن به رنگ‌های قلیایی قویتر می‌شود. در مورد رنگ‌های اسیدی، عکس این مطلب صادق است. بنابراین رنگ‌های قلیایی در pH‌های پایین و رنگ‌های اسیدی در pH‌های بالا دارای قدرت رنگ‌آمیزی ضعیفی هستند.

فکر کنید و پاسخ دهید:

آیا می‌توانید بگویید که تمام باکتری‌های جدا شده کشت خالص هستند؟

۲-۳-۶- روش‌های رنگ‌آمیزی تشخیصی^۲: اساس رنگ‌آمیزی‌های ساده بر این حقیقت بنا شده است که سلول باکتری‌ها از نظر شیمیایی از محیط اطرافشان متفاوت است و بنابراین می‌توانند پس از رنگ‌آمیزی از محیط خود متمایز شوند. خود میکروارگانیسم‌ها هم دارای اختلافات شیمیایی و فیزیکی هستند و بدین‌طریق در مقابل یک روش رنگ‌آمیزی معین واکنش‌های متفاوتی نشان می‌دهند. این اصلی است که براساس آن رنگ‌آمیزی‌های تشخیصی بنا شده است. بنابراین رنگ‌آمیزی تشخیصی روشی است که با آن انواع باکتری‌ها را می‌توانیم مشخص کنیم.

الف) رنگ‌آمیزی گرم^۳: رنگ‌آمیزی گرم که بیشتر از روش دیگری در باکتریولوژی به کار می‌رود رنگ‌آمیزی تشخیصی است. با به کار بردن این روش می‌توان باکتری‌ها را به دو گروه تقسیم کرد: گرم مثبت و گرم منفی.

تصور می‌شود که این تمایز رنگی مربوط به اختلاف لایه‌ی سطحی یا دیواره‌ی سلولی این دو نوع می‌باشد. به‌طور کلی میکروارگانیسم‌های گرم مثبت و گرم منفی در مقابل بسیاری از عوامل فیزیکی و شیمیایی واکنش‌های مختلفی نشان می‌دهند. در رنگ‌آمیزی گرم چهار محلول مختلف مورد نیاز است. یک رنگ قلیایی، یک دندان^۴ یک عامل رنگ‌بر^۵ و یک رنگ دوم. درباره رنگ قلیایی بحث شده است. دندان ماده‌ای است که گرایش یا جذب ماده رنگی را به سلول افزایش می‌دهد، یعنی به شکلی، تثبیت رنگ را در روی سلول تسهیل می‌کند. اسیدها، قلیایی‌ها، املاح معدنی و ید را می‌توان به عنوان دندان مثال زد. سلولی که روی آن ریخته شده دندان بیشتر و بهتر رنگ می‌شود.

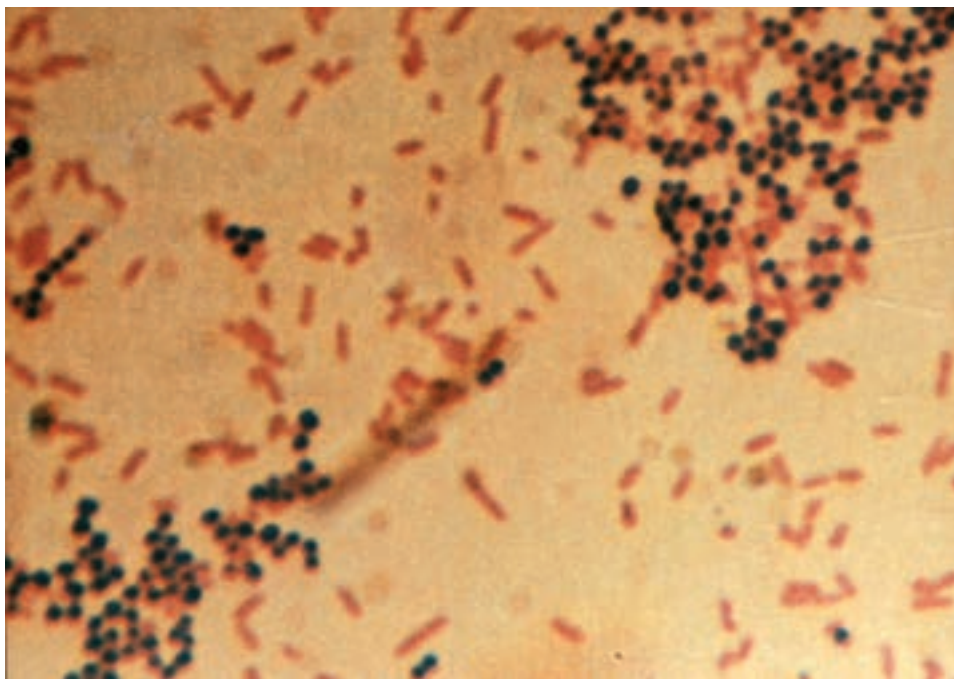
۱- Epithelial

۲- Differential Staining

۳- Gram Stain

۴- Mordant

۵- Decolorizing Agent



شکل ۲-۶- رنگ آمیزی گرم. باکتری های گرم مثبت به رنگ بنفش یا ارغوانی و باکتری های گرم منفی به رنگ صورتی

همین طور بعد از به کار بردن دنداننه شستن و از بین بردن رنگ دشوارتر است. عامل رنگ بر، همان طور که از اسمش معلوم است، ماده ای است که رنگ را از یک سلول رنگ شده خارج می کند. بعضی از سلول های رنگ شده راحتتر از سلول های دیگر بی رنگ می شوند. در رنگ آمیزی گرم و در سایر روش های رنگ آمیزی تشخیصی از این تفاوت در میزان بی رنگ شدن استفاده کرده، انواع مختلف باکتری ها را از یکدیگر متمایز می کنیم. رنگ دوم، یک ماده رنگی قلیایی است که از نظر رنگ با ماده رنگی اولیه متفاوت است. منظور از به کارگیری رنگ دوم عبارتست از رنگ کردن سلول های بی رنگ شده به وسیله رنگی که با رنگ اولیه متفاوت است. میکرو ارگانسیم هایی که رنگ اولیه خود را از دست نداده اند رنگ قلیایی اولیه را نگه می دارند و آن هایی که رنگ خود را از دست داده اند رنگ دوم را جذب می کنند. رنگ آمیزی گرم در مرحله اول عبارتست از رنگ شدن سلول ها با یک رنگ قلیایی. این عمل با مجاور کردن سلول های رنگ شده با یک دنداننه مثل ید، دنبال می شود. سپس سلول ها را با یک ماده رنگ بر مثل الکل مجاور می کنند. سلول هایی که بعد از رنگ بری، رنگ قلیایی خود را حفظ کنند گرم مثبت خوانده می شوند و آن هایی که بی رنگ شده اند گرم منفی هستند که

می‌توانند با رنگ دوم که از رنگ اول متفاوت است دوباره رنگ شوند.

روش کار:

۱- گستره مخلوط باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را تهیه کنید. این گستره‌ها را به کمک حرارت تثبیت کنید.

۲- گستره‌ها را به مدت ۳۰ ثانیه با کریستال یوله رنگ کنید.

۳- گستره‌ها را با آب فشان بشوید.

۴- به گستره‌ی آماده شده ید اضافه کنید، بگذارید تا ۳۰ ثانیه مانده و اثر کند.

۵- گستره‌ها را با آب فشان بشوید.

۶- گستره‌ها را به وسیله‌ی الکل ۹۵٪ بی‌رنگ کنید. برای بی‌رنگ کردن یک گسترش نازک ۱۰ تا ۲۰ ثانیه کافی است، بعد از گذشت زمان مناسب، قطرات الکی که از لام خارج می‌شود بی‌رنگ خواهد بود.

۷- گستره‌ها را با آب فشان بشوید.

۸- گستره‌ها را با فوشین یا سافرانین به مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه رنگ کنید.

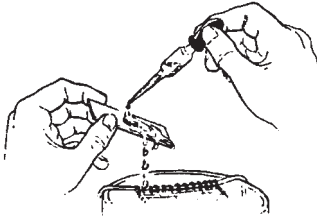
۹- گستره‌ها را با آب فشان شسته و خشک کنید.

۱۰- روی هر یک از گستره‌ها یک قطره روغن سدر^۱ بریزید و آن را با عدسی با بزرگنمایی ۱۰۰ مشاهده کنید.

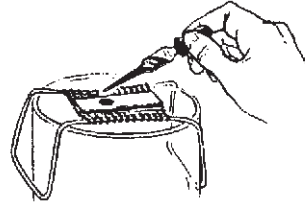
شکل میکروب‌ها را رسم کنید. در هر مرحله از این روش چه اتفاقی حادث می‌شود؟ اگر بعد از هر مرحله، سلول‌های گرم مثبت و گرم منفی را بررسی کنیم، می‌توانیم نتایجی را که در جدول ۱-۶ خلاصه شده است ملاحظه کنیم. برای بحث درباره اساس تمایز بین باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، همین‌طور برای شناختن فرضیاتی که مکانیسم واکنش گرم را تشریح می‌کنند، به یک کتاب درسی یا مقاله‌ای درباره سیتولوژی میکروبی مراجعه کنید.

روش کار:

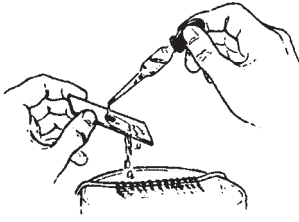
گستره‌ای مخلوط از باکتری‌های گرم مثبت و منفی تهیه کرده، آن را فیکس نموده و برابر شکل رنگ‌آمیزی آن را کامل کنید.



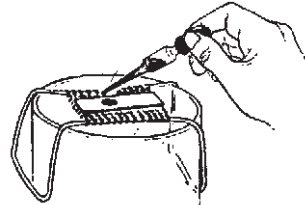
۲- آن را با آب بشویید.



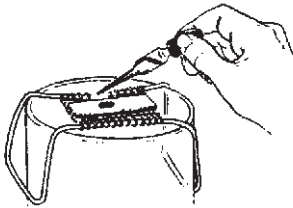
۱- گستره را با کریستال و بوله به مدت حدود ۳۰ ثانیه رنگ کنید.



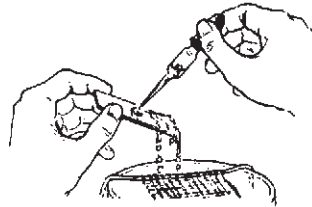
۴- آن را با آب بشویید.



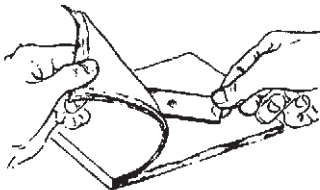
۳- گستره را با محلول ید گرم به مدت حدود ۳۰ ثانیه بیوشانید.



۶- گستره را با رنگ متفاوت سافرانین به مدت حدود ۲۰ ثانیه رنگ کنید.



۵- گستره را به مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه با الکل ۹۵٪ بی‌رنگ کنید.



۸- گستره را خشک کنید.



۷- آن را با آب بشویید.

شکل ۳-۶- مراحل رنگ آمیزی گرم

جدول ۱-۶- مراحل رنگ آمیزی گرم

نتایج حاصل		روش کار	مرحله
گرم منفی	گرم مثبت		
به رنگ بنفش ارغوانی	به رنگ بنفش ارغوانی	کریستال یوله به مدت ۳۰ ثانیه	رنگ اولیه
رنگ بنفش ارغوانی باقیمانده بی رنگ می شود.	رنگ بنفش ارغوانی باقیمانده رنگ بنفش ارغوانی باقیمانده	ید به مدت ۳۰ ثانیه الکل اتیلیک ۹۵٪ به مدت ۱۰ تا ۳۰ ثانیه	دندان رنگ بری
به رنگ سرخ	رنگ بنفش ارغوانی باقیمانده	سافرانین به مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه	رنگ دوم

فکر کنید و پاسخ دهید:

- ۱- آیا می توان رنگ اولیه و رنگ دوم را تغییر داد؟
- ۲- اگر ید را با سایر عوامل اکسیدکننده عوض کنید چه تغییراتی حاصل خواهد شد؟
- ۳- آیا الکل های دیگر نیز به خوبی الکل اتیلیک می توانند به عنوان عوامل رنگ بر به کار روند؟
- ۴- اثر pH روی واکنش گرم چیست؟

ب) رنگ آمیزی اسید فست^۱: رنگ آمیزی اسید فست، رنگ آمیزی تشخیصی است که میزان و درجه مقاومت سلول های رنگ شده را در برابر رنگ بری اسیدها تعیین می کند. خاصیت مقاومت در برابر اسیدها در بعضی مایکوباکتریوم ها^۲ و اکتینومیست ها^۳ بستگی به مقدار زیادی لیپید دارد که در آنها موجود است. برای رنگ آمیزی این باکتری ها حرارت و رنگی که دارای گرایش قوی به سلول این باکتری ها دارد مورد نیاز است. این باکتری ها، بعد از یک بار رنگ شدن، به دشواری ممکن است بی رنگ شوند. در این روش از کربول فوشین گرم برای رنگ آمیزی، و از محلول اسید - الکل به عنوان عامل بی رنگ کننده استفاده و بعد هم رنگ آمیزی دوم سلول باکتری ها عملی می شود. باکتری های اسید فست، کندتر از سایر میکروارگانیسم ها، در برابر اسید - الکل بی رنگ شده، بعد از رنگ آمیزی دوم، رنگ اولیه

۱- Acid fast stain

۲- Mycobacterium

۳- Actinomycete

خود را حفظ می‌کنند. این رنگ‌آمیزی در درجه اول برای تشخیص و بررسی بیماری‌هایی که به وسیله‌ی میکروب‌های اسید فست، مثل سل و جذام تولید می‌شود، مورد استفاده قرار می‌گیرد. همین‌طور این روش به عنوان یک رنگ‌آمیزی تشخیصی، در مورد تعدادی از میکروبیهای ساپروفیت^۱ و بی‌آزار اسید فست هم بکار می‌رود.

روش کار:

- ۱- یک گستره میکروبی شامل مخلوطی از کشت‌های مایکوباکتریوم و اشریشیا تهیه کنید.
 - ۲- گستره را در هوا خشک کرده، با حرارت تثبیت کنید.
 - ۳- در حدود ۱/۵ سانتیمتر آب در یک ظرف کوچک ریخته، آن را بجوش آورید، یک صفحه سیمی روی لبه ظرف قرار داده، لام میکروبی را روی این صفحه بگذارید.
 - ۴- گستره را به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه با کربول فوشین رنگ کنید، بدین شکل که ابتدا یک تکه کوچک کاغذ خشک‌کن یا پارچه حوله‌ای روی گستره گذاشته، آن را با ماده‌ی رنگی بیوشانید. توجه کنید که درحین رنگ‌آمیزی، نگذارید گستره خشک شود. از زیاد شدن ماده رنگی روی گستره جلوگیری کنید.
 - ۵- نمونه را با آب بشویید.
 - ۶- نمونه را با اسیدالکل (الکل اتیلیک ۹۵٪ حاوی اسیدنیتریک ۲/۵٪) به مدت ۱۰ تا ۳۰ ثانیه بی‌رنگ کنید.
 - ۷- نمونه را با آب بشویید.
 - ۸- رنگ‌آمیزی دوم را با متیلن‌بلو به مدت ۳۰ ثانیه انجام دهید. (بدون حرارت)
 - ۹- نمونه را با آب شسته، با کاغذ خشک‌کن بدون وارد کردن فشار خشک کنید.
 - ۱۰- نمونه را با عدسی روغنی ایمرسیون ملاحظه کرده، اشکال میکروبی را رسم کنید.
- با بکار بردن روش رنگ‌آمیزی اسید فست، خلط یک بیمار مسلول را که در اتوکلاو قرار داده‌اید (به وسیله‌ی بخار و زیر فشار استریل شده است) رنگ‌آمیزی کنید. برای تهیه‌ی گستره میکروبی، خلط را در بین دو لام گذاشته و با فشار، یک لایه‌ی نازک میکروبی ایجاد کنید. بعد از رنگ‌آمیزی، به جستجوی میکروب‌های اسید فست بپردازید دقت کنید که از نظر ظاهر چه اختلافی بین آن‌ها و سایر میکروارگانیسم‌های خلط وجود دارد. میکروارگانیسم‌های اسید فست، با اسیدالکل بی‌رنگ نمی‌شوند و به رنگ قرمز دیده می‌شوند. سایر میکروبیها به رنگ آبی خواهند بود.

^۱- Saprophyte

۳-۳-۶- رنگ آمیزی ساختمان‌های سلولی: برای به دست آوردن تضادی که در دیدن ساختمان‌های مختلف سلول باکتری‌ها به وسیله‌ی میکروسکوپ نوری ضروری است، باید روش‌های رنگ آمیزی مخصوصی را به کار برد این آزمایش بعضی از رنگ آمیزی‌های ساختمانی را نشان می‌دهد.

روش کار:

الف) رنگ آمیزی اندوسپور^۱: انواع جنس باسیلوس^۲ و کلوستریدیوم^۳ها^۴ در برابر عوامل نامساعد تبدیل به شکل اندوسپور خوانده می‌شود. اندوسپور برخلاف سلول جوان به وجودآورنده‌ی آن، دارای جسم بسیار مقاومی است و می‌تواند، به مدتی طولانی، حتی در محیطی که به دلیل درجه حرارت بالا یا مواد شیمیایی سمی نامساعد شده است، زنده بماند. اندوسپور در برابر رنگ آمیزی مقاومت نشان می‌دهد و بعد از یک بار رنگ شدن هم به سختی رنگ خود را از دست داده، یا رنگ زمینه را می‌پذیرد. از این خاصیت برای نمایش میکروسکوپی اندوسپورها استفاده شده است. در شرایط معمولی اندوسپور باکتری‌ها با میکروسکوپ الکترونی قابل مشاهده است که تصویر آن در شکل ۴-۶ نمایش داده شده است. دو روش رنگ آمیزی در این جا ذکر می‌شود:

۱- روش دورنر^۴: در روش دورنر، از کربول فوشین گرم برای نفوذ به اندوسپور مقاوم استفاده می‌شود. نیگروزین هم به عنوان عامل بی‌رنگ کننده و هم به عنوان رنگ منفی گستره بکار می‌رود. بعد از رنگ آمیزی با این روش، اندوسپورها به رنگ قرمز و قسمت‌های جوان سلول‌ها به صورت بی‌رنگ در یک زمینه‌ی تیره دیده می‌شوند. مراحل رنگ آمیزی به شرح زیر است:

۱- ۵ قطره آب استریل در دو لوله‌ی آزمایش ریخته، در این دو لوله دو سوسپانسیون غلیظ از باسیلوس سرئوس^۵ و کلوستریدیوم اسپورورژنس^۶ بسازید.

۲- به دو سوسپانسیون میکروبی به مقدار مساوی کربول فوشین بیفزایید.

۳- رنگ آمیزی را به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش انجام دهید.

۴- نمونه‌ها را با عدسی شیئی ایمرسیون مشاهده کرده، شکل آن‌ها را بکشید.

۲- روش شافر و فولتون^۷: در روش رنگ آمیزی شافر و فولتون از رنگ گرم سبزمالاشیت^۸

به عنوان رنگ قوی که بعد از شستشو از اندوسپور جدا نمی‌شود و از سافرانین به عنوان رنگ دوم استفاده می‌شود. بنابراین اندوسپور به رنگ سبز درمی‌آید ولی بقیه سلول‌ها (یا سلول بدون اندوسپور) به رنگ قرمز کمرنگ خواهند بود.

۱- Endospore

۲- Bacillus

۳- Clostridium

۴- Dorner

۵- Bacillus cereus

۶- Cl.Sporogenes

۷- Schaeffer and fulton

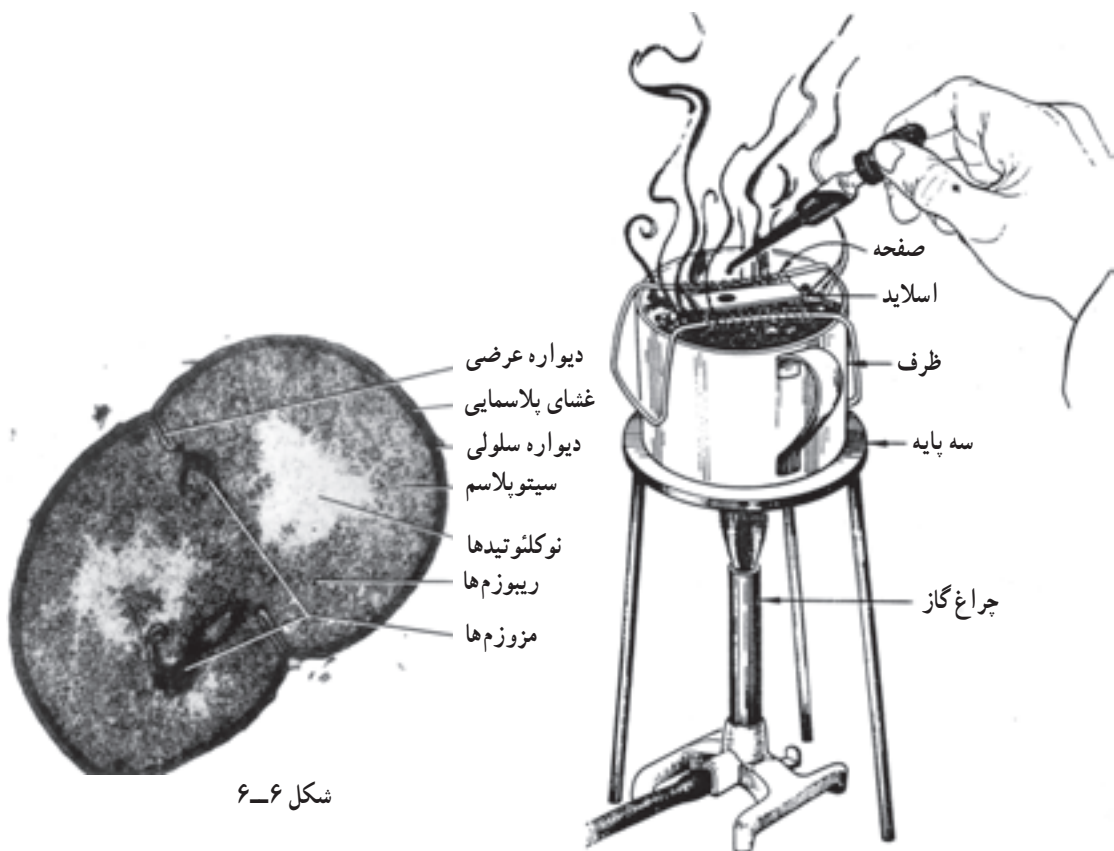
۸- Malachite green



شکل ۴-۶

— روش رنگ آمیزی با رنگ سبزمالاشیت:

- ۱- گستره باسیلوس سرئوس یا کلستریدیوم اسپوروزنس را تهیه کرده، گستره‌ها را در هوا خشک کنید و آن‌ها را با حرارت تثبیت نمایید.
 - ۲- لام‌ها را روی پایه‌ی مخصوص رنگ آمیزی که روی ظرف آب جوش قرار دارد بگذارید.
 - ۳- گستره‌ها را با قطعات کوچک کاغذ خشک‌کن پوشانده، و با سبزمالاشیت آغشته کنید تا به صورت اشباع درآمده (محللول آبی ۵٪) و حرارت دادن را به مدت ۵ دقیقه ادامه دهید.
 - ۴- گستره‌ها را با آرمی با آب بشوید.
 - ۵- رنگ آمیزی را به مدت ۳۰ ثانیه با سافرانین به عنوان رنگ دوم انجام دهید.
 - ۶- گستره‌ها را با آب شسته، با خشک‌کن خشک کنید.
 - ۷- گستره‌ها را با عدسی شیئی روغنی ایمرسیون مشاهده کرده، شکل آن‌ها را بکشید.
- برای دیدن اندوسپور بدون رنگ آمیزی می‌توان از میکروسکوپ فازکنتراست استفاده کرد که در



شکل ۶-۶

شکل ۶-۵- بخار دادن به لام در حین رنگ آمیزی اسپور باکتری‌ها

این مورد اندوسپور به صورت یک ساختمان سفید کلفت در داخل سلول دیده می‌شود. اگر میکروسکوپ فاز کنتراست در دسترس باشد، اندوسپورهای کشت باسیلوس سرئوس و کلستریدیوم اسپوروزنس را زیر آن مشاهده کنید. (شکل ۶-۵ حرارت دادن لام را در حین رنگ آمیزی اسپورباکتری‌ها نشان می‌دهد.)

برای مطالعه

ب) رنگ آمیزی دیواره‌ی سلولی^۱: به دلیل نازکی و مقاومت در برابر رنگ آمیزی، دیواره‌ی سلولی سخت باکتری‌های حقیقی را به‌طور طبیعی به سختی می‌توان از بقیه قسمت‌های سلول تشخیص داد اما این قسمت با میکروسکوپ الکترونی به راحتی قابل مشاهده است که تصویر آن در شکل ۶-۶ نمایش داده شده است. به

^۱ Cellwall

هرحال، با به کار بردن بعضی دندانه‌ها امکان رنگ‌آمیزی و دیدن این ساختمان امکان‌پذیر است. برای مثال، با مجاور کردن دیواره‌ی سلولی با یک عامل کاتیون سطحی، می‌توان آن را، دارای بار الکتریکی مثبت کرد، که بعد این ساختمان می‌تواند با یک رنگ اسیدی رنگ‌آمیزی شود، سیتوپلاسم بار الکتریکی منفی خود را حفظ کرده، می‌تواند به وسیله‌ی یک رنگ قلیایی متضاد رنگ‌آمیزی شود. نمونه‌ای را که برای نشان دادن رنگ‌آمیزی دیواره‌ی سلولی برایتان تهیه شده است به وسیله‌ی عدسی شیئی روغنی ایمرسیون میکروسکوپ نوری خود مشاهده کنید. توجه کنید که برای دیدن این رنگ‌آمیزی نورپردازی دقیق ضروری است.

برای این آزمایش با استعمال ستیل پیریدینیوم کلراید^۱ دیواره‌ی سلولی دارای بار



شکل ۶-۷- تاژک باکتری‌ها که با رنگ‌آمیزی مشخص گردیده است.

الکتریکی مثبت شده است، که این ماده در آب به صورت کاتیون ستیل پیریدینیوم با بار الکتریکی مثبت و یون کلرور با بار الکتریکی منفی تجزیه شده است. در نتیجه جذب کاتیون ستیل پیریدینیوم، سطح، یا دیواره، سلول باکتری دارای بار الکتریکی مثبت شده است. سپس دیواره با رنگ اسیدی کنگو^۲ به رنگ قرمز و سیتوپلاسم با رنگ متیلن بلو^۳

۱- Cetyl Pyridinium chloride

۲- Congo

۳- Methylene blue

به رنگ آبی رنگ آمیزی می شوند.

ج) رنگ آمیزی تاژک^۱: ابعاد تاژک باکتری ها کمتر از حد بزرگ نمایی میکروسکوپ نوری است. بنابراین تا قبل از استفاده از میکروسکوپ الکترونی، رؤیت مستقیم این ساختمان ها غیر ممکن بود، ولی به هر حال با روش های رنگ آمیزی مخصوص یعنی با پوشاندن سطح تاژک ها با یک دندان (رسوب دادن نمک های مختلف) و بدین طریق افزایش ابعاد قابل رؤیت آن ها، می توان تاژک ها را در حدود درشت نمایی میکروسکوپ نوری قرار داد.

آزمایش: رنگ آمیزی تاژک باکتری ها

مواد مورد نیاز:

- ۱- کشت ۲۴ - ۱۸ ساعته باسیلوس سابتیلیس^۲ در محیط کشت نوترینت آگار که به صورت شیب دار کشت داده شده است.
 - ۲- الکل اتیلیک ۹۵٪
 - ۳- رنگ تاژک لیفسون (Liefson's) محلول A، B و C
 - ۴- محلول متیلن بلو
 - ۵- لوله های آزمایش استریل
 - ۶- محلول تمیزکننده ی بی کرومات
 - ۷- لوله های دارای آب مقطر استریل
- روش کار:

- ۱- ابتدا به مدت یک هفته لام های مورد استفاده برای رنگ آمیزی تاژک را در محلول تمیزکننده ی بی کرومات قرار داده، بعد از طی مدت مذکور آن ها را با الکل ۹۵٪ شست و شو دهید و بگذارید خشک شود. (بدون پاک کردن)
- سعی کنید در برداشتن لام های مزبور از محلول تمیزکننده، کناره های آن ها را بگیرید تا از آلوده و کثیف شدن سطح لام ها جلوگیری شود.
- ۲- مدت چند ثانیه لام را روی شعله ی چراغ الکلی به جلو و عقب حرکت دهید.
- ۳- بگذارید لام ها در هوای آزمایشگاه سرد شوند.
- ۴- درب لوله دارای کشت باکتری باسیلوس سابتیلیس را باز نموده، ۲-۳

^۱- Flagellum

^۲- Bacillus subtilis

میلی لیتر آب مقطر استریل روی سطح شیب دار محیط بریزید و بعد از بستن درب لوله بآرامی آن را تکان دهید.

۵- با پیت استریل یک قطره از سطح بالای محلول (جایی که باکتری‌های متحرک فراوان هستند) برداشته، در یک طرف لام نزدیک یک لبه‌ی آن قرار دهید.

۶- با کمی شیب دادن به لام، اجازه دهید مواد قطره قطره به سمت دیگر لام جریان یابد. (تأخیری که در سطح لام پخش شود)

۷- بدون آن که با حرارت گسترش را ثابت کنید، بگذارید تا در هوای اتاق خشک شود.

۸- محلول‌های A، B و C لیسوسون را به مقدار مساوی (هرکدام ۲ میلی‌لیتر) با یکدیگر مخلوط نموده، به وسیله‌ی پیت استریل، یک قطره از مخلوط فوق را روی سطح گسترش قرار دهید و بگذارید به مدت ۱۰ دقیقه باقی بماند.

۹- بعد از گذشت مدت مزبور، بدون آن که رنگ‌های اضافه را دور بریزید، لام را زیر جریان ملایم آب معمولی گرفته، شست‌و‌شو دهید.

۱۰- رنگ متیلن‌بلو (۱ درصد) را افزوده، بگذارید یک دقیقه باقی بماند.

۱۱- لام را زیر جریان ملایم آب معمولی شستشو داده، بگذارید تا در هوای آزمایشگاه خشک شود و سپس مورد مشاهده‌ی میکروسکوپی قرار دهید.

۱۲- تازکها را به رنگ قرمز و سلول باکتری را به رنگ آبی خواهید دید.

د) رنگ آمیزی کپسول^۱: خیلی از باکتری‌ها به وسیله‌ی یک لایه‌ی صمغی با ضخامت‌های مختلف احاطه شده‌اند که به نام کپسول خوانده شده، نسبت به سلول با شدت کمتری رنگ آمیزی می‌شوند چون اغلب اوقات کپسول‌ها به صورت یک محوطه‌ی رنگ نشده در اطراف سلول‌های رنگ شده ظاهر می‌شوند، بنابراین می‌توانند با مواد خارجی رنگ نشده مثل محوطه خالی حاصل از مچاله و منقبض شدن سلول‌ها، اشتباه شوند، بنابراین برای نشان دادن کپسول‌ها مهم‌ترین روش رنگ آمیزی، روش رنگ آمیزی منفی است که مراحل آن در شکل ۲-۶ مشخص شده است. با کمک رنگ‌های منفی، نظیر نیگروزین، می‌توانید نمونه‌هایی را برای مشخص کردن کپسول باکتری‌ها تهیه نمایید و با بکار بردن عدسی شیئی روغنی ایمرسیون میکروسکوپ نوری مشاهده کنید.

گاهی ممکن است کپسول‌ها با مواد روشن اطراف سلول باکتری اشتباه شوند. چنان‌که سطح روشن اطراف سلول‌ها ممکن است نشان دهنده‌ی کپسول نباشد ولی صرفاً رنگ‌آمیزی غیر صحیح و یا کم‌رنگ موجب چنین اشتباهی می‌شوند. به این جهت کپسول‌ها باید به طریقی رنگ شوند که به خوبی از سلول باکتری تمیز داده شوند.

روش رنگ‌آمیزی کپسول باکتری‌ها:

مواد و لوازم مورد نیاز:

۱- کشت شیب‌دار ۴۸ ساعته باکتری کلبسیلا نمونیا^۱

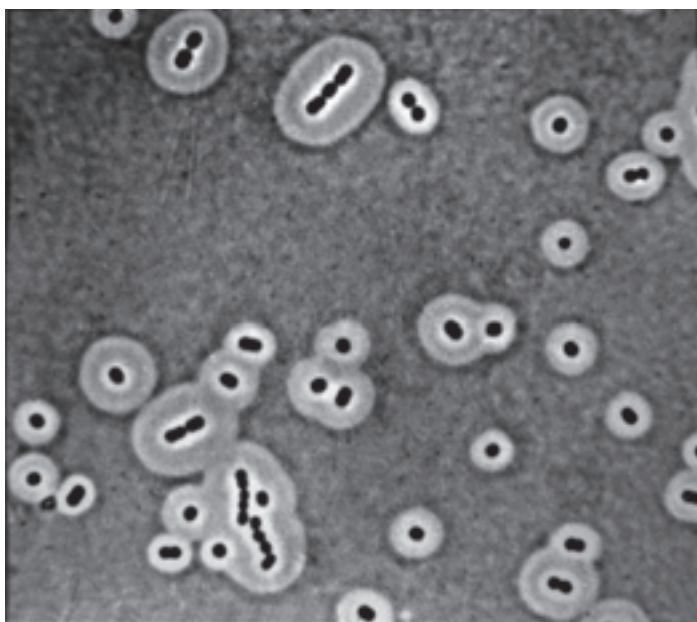
۲- محلول یک درصد کریستال ویوله

۳- محلول ۲۰٪ سولفات مس

روش کار:

۱- از پرگنه کلبسیلا نمونیا روی یک لام تمیز گستره تهیه نموده، بگذارید در هوای آزمایشگاه خشک شود.

۲- از حرارت دادن لام برای ثابت نمودن گستره خودداری نمایید.



شکل ۸-۶- کپسولهای رنگ شده در زیر میکروسکوپ معمولی

^۱- Klebsiella pneumonia

۳- از محلول کریستال ویوله مقداری روی گستره ریخته، بگذارید مدت دو دقیقه باقی بماند.

۴- لام را با محلول ۲۰٪ سولفات مس شستشو داده، بگذارید در هوای آزمایشگاه خشک شود.

۵- لام را مورد مشاهده‌ی میکروسکوپی قرار دهید. سلول باکتری به رنگ آبی تیره و کپسول به رنگ آبی بنفش دیده می‌شود.

۴-۳-۶- رنگ آمیزی مواد ذخیره‌ای سلول باکتری: سلول میکروب‌ها، در مراحل مختلف رشد خود دارای مواد ته‌نشین یا گرانول‌هایی^۱ هستند که اغلب تصور می‌شود مواد ذخیره‌ای سلول باشند. یک منبع ساکاریدی که اغلب در سلول مخمرها و بعضی از سلول باکتری‌ها یافت می‌شود گلیکوژن است. به نظر می‌آید که این ماده شبیه کربوهیدرات ذخیره‌ای سلول حیوانات باشد، زیرا با ید به رنگ قرمز مایل به قهوه‌ای درمی‌آید. منابع لیپیدی هم که مهم‌ترین آن‌ها اسید پلی-بتا-هیدروکسی بوتیریک^۲ است، در خیلی از باکتری‌ها وجود دارد. اگرچه این مواد را نمی‌توان با رنگ‌های معمولی به سهولت رنگ آمیزی کرد، ولی می‌توان آن‌ها را با رنگ‌های محلول در چربی نشان داد، که احتمالاً بدین طریق یک لایه‌ی لیپیدی اطراف این منابع رنگ می‌شوند. یکی از بهترین انواع این رنگ‌ها سودان سیاه^۳ می‌باشد. بعضی از منابع ذخیره‌ای باکتری‌ها را اغلب به نام ولوتین^۴ می‌خوانند که با رنگ‌های قلیایی به شدت رنگ آمیزی می‌شود. این مواد گرانول‌های پلی‌متا-فسفات^۵ هستند. (تصویر گرانول‌های ذخیره‌ای که به کمک میکروسکوپ الکترونی تهیه شده در شکل ۹-۶ به نمایش گذاشته شده است.)

روش کار: (گلیکوژن)

۱- با به کار بردن سیم مخصوص تلقیح مقداری سلول مخمر ساکارومیسس سروسیسه^۶ را به یک قطره آب که روی یک لام تمیز قرار دارد انتقال داده، بآرامی آن را در آب مخلوط کنید تا یک سوسپانسیون حاصل شود.

۲- یک قطره ید لوگل اضافه کرده، آن‌ها را به آرامی در روی لام مخلوط کنید.

۱- Granule

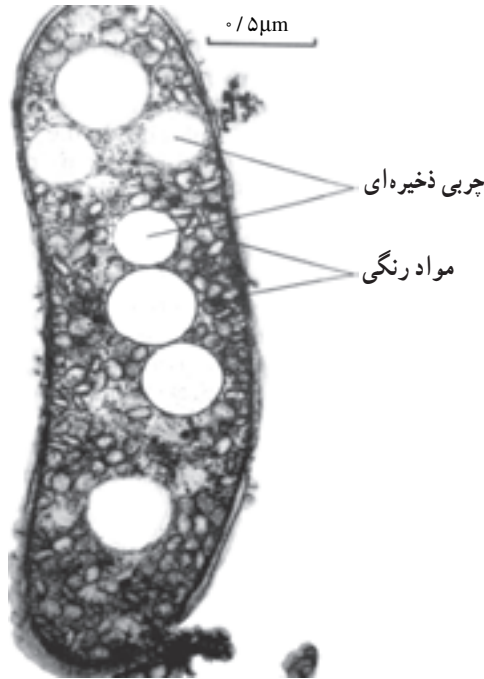
۲- poly Beta hydroxybutyric acid

۳- Sudan black - B

۴- Volutin

۵- Polymetaphosphate

۶- Saccharomyces cerevisiae



شکل ۹-۶- تصویر میکروسکوپ الکترونی اندوسپور

۳- یک لامل روی نمونه گذاشته، آن را با عدسی شیئی روغنی ایمرسیون مشاهده کنید.

برای این آزمایش، محیط کشت باید اسیدی باشد. اگر کشت قلیایی است، قبل از افزودن پد آن را اسیدی کنید، بعضی از باکتری‌ها، مخصوصاً گروهی از باکتری‌های بی‌هوازی اسپوردار، حاوی کربوهیدرات ذخیره‌ای دیگری به نام یوژن^۱ یا گرانولوز^۲ هستند که با پد به رنگ آبی درمی‌آید. اسید پلی - بتا - هیدروکسی بوتیریک.

۱- تعدادی سلول باسیلوس مگاتریوم^۳ را به یک قطره‌ی آب که در روی یک لام تمیز قرار دارد انتقال داده، مخلوط کنید.

۲- یک قطره محلول سودان سیاه ب اضافه کرده، مخلوط کنید.

۳- یک لامل روی نمونه‌ی حاصل گذاشته، آن را با عدسی شیئی روغنی ایمرسیون مشاهده کنید.

۱- Iogen

۲- Granulose

۳- *Bacillus megaterium*

یادداشت: چون سلول‌ها باستثنای جدار اطراف پلی - بتا - هیدروکسی بوتیریک بی‌رنگ هستند، از این‌رو برای افزایش تضاد، مقدار نور را کاهش دهید.

ولوتین

۱- گستره‌ای از باسیلوس سرئوس تهیه کنید. بگذارید تا خشک شده، آن را با حرارت تثبیت کنید.

۲- یک قطره محلول آبی اسیدی شده متیلن‌بلو اضافه کنید.

۳- روی نمونه حاصل یک لامل گذاشته، آن را با عدسی شیئی روغنی ایمرسیون مشاهده کنید.

بیشتر محتویات سلولی، مثل پروتئین‌ها، با رنگ‌های قلیایی فقط هنگامی رنگ می‌شوند که pH محیط اطرافشان بالاتر از نقطه‌ی ایزوالکتریک^۱ آن‌ها باشد. موادی که دارای نقطه‌ی ایزوالکتریک خیلی اسیدی هستند با یک رنگ قلیایی اسیدی شده ($\text{pH} = 2-3$) رنگ‌آمیزی می‌شوند. بنابراین، ولوتین که از مواد اسیدی تشکیل شده با یک رنگ قلیایی حتی در کمتر از $\text{pH} 4$ هم‌رنگ می‌شود. ولوتین یک پلی‌فسفات است که ظاهراً در سنتز اسیدهای نوکلئیک و در تأمین انرژی سلول‌ها وارد عمل می‌شود.

خودآزمایی

۱- اثر تغییر دادن رنگ اول و دوم چیست؟ همین‌طور با حذف حرارت چه تغییری حاصل

خواهد شد؟

۲- آیا میکروارگانسیم‌های اسید فست گرم مثبت و یا گرم منفی هستند؟

۳- مزایای رنگ آمیزی باکتری‌ها چیست؟

۴- انواع روش‌های رنگ آمیزی باکتری‌ها و رنگ‌های مورد استفاده در آن‌ها را بنویسید.

۵- منظور از تثبیت باکتری‌ها قبل از رنگ آمیزی چیست؟ از چه عواملی برای آن استفاده

می‌شود؟

۶- روش تثبیت باکتری‌ها را بنویسید.

۷- رنگ‌های قلیایی و اسیدی هر یک چگونه باعث رنگ آمیزی باکتری‌ها می‌شوند؟

۸- اساس رنگ آمیزی‌های تشخیصی چیست؟

۹- به‌طور خلاصه رنگ آمیزی گرم را شرح دهید.

۱۰- از رنگ آمیزی اسید فست به چه منظورهایی استفاده می‌شود؟

۱۱- برای رنگ آمیزی اندوسپور باکتری‌ها از چه روش‌ها و رنگ‌هایی می‌توان استفاده کرد؟

سنجش میزان رشد میکروارگانیسم‌ها

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

- ۱- روش‌های مختلف تعیین تعداد باکتری‌ها را توضیح دهد.
- ۲- روش‌های تعیین توده‌های سلولی را بیان نماید.
- ۳- باکتری‌های چند نمونه‌ی ماده‌ی غذایی و آب را با کشت تعیین نماید.
- ۴- تأثیر عوامل مختلف محیطی بر کشت و حیات باکتری‌ها را مورد بررسی قرار

دهد.

۷- سنجش میزان رشد میکروارگانیسم‌ها

عملاً در هر مرحله از میکروبیولوژی، برای اندازه‌گیری رشد میکروب‌ها به روش‌هایی نیاز است. در این مورد تعداد سلول‌ها و یا توده‌ی سلول‌ها اندازه‌گیری می‌شود. روش‌هایی که تعداد سلول‌ها را تعیین می‌کند به خصوص برای شمارش موجودات تک سلولی مثل باکتری‌ها و مخمرها قابل استفاده می‌باشد. در حالی که روش اندازه‌گیری توده سلول‌ها را می‌توان برای تمام انواع میکروب‌ها از جمله انواع رشته‌دار بلند مثل کپک‌ها که نمی‌توان آن‌ها را با روش تعیین تعداد سلول‌ها اندازه‌گیری کرد به کار برد. معمول‌ترین روش اندازه‌گیری تعداد سلول‌ها روش پلیت یا شمارش کلنی‌هاست. این روش بر اساس فرضیه‌ایست که طبق آن یک سلول باکتری ایجاد یک کلنی کرده، در نتیجه تعداد کلنی‌های تشکیل شده روی پلیت ژلوز معادل تعداد باکتری‌های اصلی است. در شمارش با رقت، یک سری نمونه با رقت‌های متفاوت تهیه کرده، آن‌ها را در یک سری لوله حاوی محیط مایع - به جای کشت در پلیت - تلقیح می‌کنیم. پس از قرار دادن در گرم‌خانه تمام لوله‌های حاوی سلول، به دلیل

تکثیر میکروب‌ها، کدر خواهد شد و بعضی از لوله‌ها با رقت زیاد ممکن است شفاف باشند. دلیل این امر، آن است که در نمونه‌ی تلقیحی هیچ‌گونه باکتری زنده‌ای وجود نداشته است. از رقیق‌ترین نمونه‌ای که در آن تکثیر صورت گرفته است تعداد میکروب‌ها اندازه‌گیری می‌شود. در آزمایش برای تعیین تعداد باکتری‌ها در نمونه‌های آب، روش و شمارش با رقت تغییر یافته‌ای را به کار خواهید برد. همین‌طور، برای شمارش کلنی‌ها می‌توان از صافی‌های غشایی استفاده کرد. با عبور دادن یک نمونه از درون صافی غشایی گیرنده باکتری‌ها، می‌توانید سلول‌ها را در سطح صافی به دست آورید. سپس با به کار بردن یک محیط کشت مناسب، سلول‌ها روی سطح صافی رشد کرده، تعداد کلنی‌های حاصل نشان‌دهنده تعداد باکتری‌هاست. استعمال صافی‌های غشایی در تعیین باکتری‌های مدفوع در آب می‌باشد. در این روش‌های کشت سلول‌های زنده‌ای که در محیط‌های آماده شده تکثیر می‌یابند اندازه‌گیری می‌شوند. تعدادی روش‌های دیگر وجود دارد که می‌توان در آن‌ها مستقیماً تمام سلول‌های زنده و مرده‌ی نمونه را اندازه‌گیری کرد. این روش‌های مستقیم ارزش روش‌های کشت را ندارند، ولی وقت کمتری می‌گیرند. یکی از معمول‌ترین این روش‌ها عبارتست از شمارش مستقیم میکروسکوپی، که در آن حجمی معین از یک نمونه را روی یک سطح معین لام پخش می‌کنند. با شمارش میکروب‌ها در یک سطح مشخص و ضرب آن در ضریب مخصوص، می‌توانید تعداد میکروب‌های نمونه‌ی اصلی را محاسبه کنید. برای راحت کردن عملیات، لام‌های مخصوصی برای شمارش وجود دارد (برای مثال لام پتروف - هازر^۱) که دارای یک گودی با عمق و حجم مشخص است، و به مربعی تقسیم شده است. تعداد میکروب‌ها در یک حوزه‌ی معین (مثلاً در ۵۰ یا ۱۰۰ مربع) شمارش شده، با در نظر گرفتن این که نسبت حجم کلی به حجم محاسبه شده معین است می‌توان تعداد کل باکتری‌ها را در نمونه محاسبه کرد. در روش برید^۲، حجمی معین از نمونه را در یک سطح یک سانتی‌متر مربعی لام پخش کرده، آن را خشک و تثبیت و رنگ می‌کنند. بعد تعداد میکروارگانیزم‌ها را در حوزه‌های متعدد میکروسکوپی تعیین می‌کنند. از آنجایی که مساحت حوزه میکروسکوپی مشخص است، شمارش باکتری‌ها را می‌توان محاسبه کرد. روش برید را برای تعیین تعداد باکتری‌های شیر در آزمایش به کار خواهید برد. نمونه‌ای از لام‌های مدرج شمارش میکروارگانیزم‌ها در شکل ۱-۷ مشخص شده است. سلول‌ها و عناصر دیگر را می‌توان به وسیله‌ی الکترونیکی هم محاسبه کرد. در شمارش‌گر کولتر^۳ نمونه‌ای را از یک سوراخ کوچک عبور داده، از روی تغییری که در مقاومت الکتریکی ایجاد می‌شود، نه تنها تعداد عناصر، بلکه اندازه‌ی آن‌ها را هم می‌توان مشخص کرد. به هر حال چون این

۱- Petroff - Hauser slide

۲- Breed

۳- Coulter Counter

روش تمام عناصر یک نمونه را اندازه می‌گیرد، فقط برای سوسپانسیون‌های آبی میکروب‌ها قابل استفاده است و نمی‌توان آن‌را برای تعیین تعداد مثلاً میکروارگانیسم‌ها در خاک به کار برد. در اندازه‌گیری توده‌ی سلولی یک کشت میکروبی مقدار کل پروتوپلاسم سلولی در میلی‌لیتر محیط کشت محاسبه می‌شود. برای تعیین توده‌های سلولی، معمول‌ترین روش‌ها عبارت است از: ۱- انتشار نور یا روش‌های کدورت‌سنجی، ۲- اندازه‌گیری شیمیایی محتویات سلولی، ۳- روش‌های وزن خشک و ۴- روش‌های حجم سلولی.

روش‌های کدورت‌سنجی^۱، اغلب در اندازه‌گیری توده سلولی به کار می‌رود. این روش‌ها بر این واقعیت بنا شده است که سلول‌های یک محیط کشت مایع بر حسب توده‌ی کل آن در کشت مانع از عبور نور می‌شوند یا آن‌را پخش می‌کنند. سنجش شیمیایی، توده‌ی سلولی به وسیله‌ی اندازه‌گیری مقدار بعضی از محتویات مخصوص سلول‌ها مثل، ازت سلولی، پروتئین، فسفر یا DNA، انجام می‌شود. در شرایط استاندارد مقدار این مواد می‌تواند یک سنجش دقیق از پروتوپلاسم محیط کشت به دست دهد. وزن خشک، سلول‌ها یا میسلیم‌های حجم معینی از محیط کشت می‌تواند مشخص‌کننده‌ی مقدار توده سلولی باشد. برای چنین سنجشی، کشت میکروبی به وسیله‌ی سانتریفوژ یا صاف کردن جمع‌آوری شده، سلول‌ها شسته، بعد از خشک کردن وزن آن‌ها اندازه‌گیری می‌شود. حجم سلولی، با قرار دادن مقدار استاندارد یک محیط کشت در لوله سانتریفوژ مدرج و اندازه‌گیری حجم مرطوب ته‌نشین بعد از سانتریفوژ سنجیده می‌شود.

روش‌های کمی کشت روی پلیت

در آزمایش برای جدا کردن باکتری‌ها، کشت روی پلیت را به کار بردید و دیدید که هر سلول باکتری زنده یک کلنی قابل رؤیت از سلول‌های دختر را تشکیل می‌دهد. از آنجا که هر سلول باکتری یک کلنی تشکیل می‌دهد، می‌توانید از کشت روی پلیت برای تعیین شماره‌ی باکتری‌ها در یک ماده مثل یک نمونه آب استفاده کنید. برای شمارش باکتری‌ها نمونه را رقیق کرده، روی پلیت کشت می‌دهند، و بعد از قرار دادن در گرمخانه، کلنی‌های ایجاد شده را می‌شمارند. پس از آن، تعداد باکتری‌های نمونه‌ی اصلی را با ضرب کردن تعداد کلنی‌های تشکیل شده در درجه رقت (ضریب رقت) پلیت مخصوصی که شماره شده است تعیین می‌کنند. رقت را اغلب اوقات با علامت منفی نشان می‌دهند. برای مثال، به جای ۱۰۰۰۰۰، ۱۰^۵ بکار برده می‌شود. برای رقیق کردن کمی یک نمونه، اغلب یک گرم یا یک میلی‌لیتر

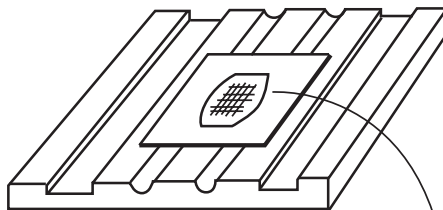
۱ - Turbidimetric

۲ - Mycelium

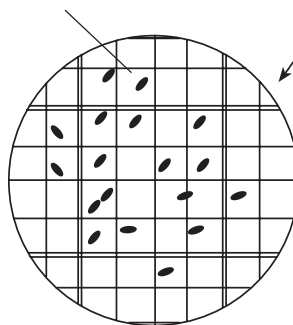
نمونه با یک سری لوله آزمایش یا بطری‌هایی که حاوی مقدار معینی آب استریل یا محلول تامپون است به تدریج رقیق می‌شود. در این آزمایش یک میلی‌لیتر از نمونه‌ی آب را به ۹۹ میلی‌لیتر آب استریل اضافه کرده، در نتیجه دارای رقت یک صدم از نمونه اصلی خواهید شد. با ادامه‌ی تدریجی این عمل یعنی با بکار بردن بطری‌های اضافی برای عمل رقیق کردن، می‌توانید نمونه‌هایی با رقت $۱۰^۴$ ، $۱۰^۶$ و غیره بدست آورید. سپس، با کشت دادن یک میلی‌لیتر و $۱/۱۰$ میلی‌لیتر از هر کدام از رقت‌ها می‌توانید پلیت‌هایی با رقت $۱۰^{-۱}$ ، $۱۰^{-۲}$ ، $۱۰^{-۳}$ ، $۱۰^{-۴}$ و بیش‌تر به‌دست آورید.

روش کار:

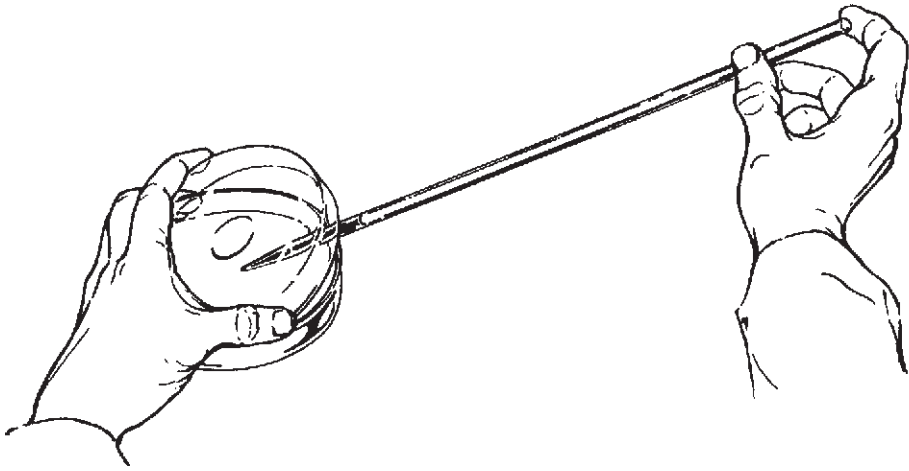
دو نمونه آب الف و ب فراهم شده است. نمونه‌ی الف دارای کیفیتی خوب و حاوی تعداد کمی باکتری است. نمونه‌ی ب نمونه‌ای ناخالص است که حاوی مقدار زیادی باکتری است. بنابراین برای تهیه پلیت‌های قابل شمارش باید بیش از نمونه الف رقیق شود.



تعداد میکروب‌ها در یک حوزه معین شمارش می‌شوند.



شکل ۱-۷- لام‌های مخصوص مدرج شمارش میکروب‌ها که اسامی مختلفی دارند (روش مستقیم شمارش) و برای تعیین افزایش تعداد میکروارگانیسم‌ها در هر میلی‌لیتر به کار می‌روند.



شکل ۲-۷- نخستین کشت در پلیت به وسیله‌ی پیپت

در شروع کار، پلیت‌های پتری و نمونه‌های آب را مرتب کنید. پلیت‌ها و نمونه‌های آب را برحسب رقت آن‌ها علامت‌گذاری نمایید. همین‌طور پلیت‌هایی را هم که ممکن است ضروری باشد علامت‌گذاری کنید و رقت‌های دلخواه را تهیه کنید. دقت کنید که برای هر رقت پیپت عوض شود.

۱- پنج لوله حاوی ژلوز غذایی را ذوب کنید (در هر کدام ۱۵ میلی‌لیتر). آن‌ها را تا 45°C خنک کنید و تا هنگامی که رقت‌ها تهیه می‌شوند آن‌ها را برای مصرف آماده نگهدارید. فاصله‌ای که نمونه‌ها را در پلیت‌های پتری می‌ریزند تا موقعی که آن‌ها را با ژلوز مخلوط می‌کنید، نباید بیش از چند دقیقه باشد.

۲- با یک پیپت استریل، $1/1$ میلی‌لیتر از نمونه‌ی الف را برداشته و $1/1$ میلی‌لیتر آن را در یک پلیت پتری استریل بریزید. یک میلی‌لیتر نمونه‌ی باقی‌مانده را در یک پلیت پتری استریل دیگر بریزید. پلیت اول را با الف - 10^{-1} و پلیت دوم را با الف - ۱ علامت‌گذاری کنید.

۳- نمونه‌ی ب را که حاوی مقادیر زیادی باکتری است نمی‌توان به‌طور مستقیم آن‌طور که در مورد نمونه‌ی الف عمل شده کشت داد، بلکه باید آن را با آب استریل رقیق کرد. با یک پیپت استریل یک میلی‌لیتر از نمونه‌ی ب را برداشته، آن را با ۹۹ میلی‌لیتر آب مخلوط کنید. چنین مخلوطی حاوی یک میلی‌لیتر از نمونه‌ی اصلی است که 10° بار رقیق شده است، بنابراین یک میلی‌لیتر از این محلول رقیق شده معادل $1/10^{\circ}$ میلی‌لیتر از نمونه اصلی می‌باشد.

۴- بطری حاوی مخلوط میکروبی را ۲۵ دفعه به شدت تکان دهید، به طوری که مچ دستتان در یک قوس حدود ۷۵ سانتیمتر حرکت کند. این عمل برای این است که اختلاط یکسانی در نمونه ایجاد شده، باکتری‌هایی که ممکن است به صورت چسبیده به هم و معلق باشند از یکدیگر جدا شوند.

۵- با یک پیست استریل دیگر، مقدار ۱/۱ میلی لیتر از بطری حاوی نمونه‌ی رقیق شده (با رقت 10^{-2}) را برداشته و مقدار ۱/۱ میلی لیتر آن را در یک پلیت پتری استریل (با رقت 10^{-3} نسبت به نمونه‌ی اصلی) بریزید و روی آن را با 10^{-3} علامت‌گذاری کنید. یک میلی لیتر باقی مانده را در یک پلیت پتری استریل دیگر ریخته (با رقت 10^{-2} نسبت به نمونه‌ی اصلی)، آن را با 10^{-2} علامت‌گذاری کنید.

۶- با همان پیست قبلی یک میلی لیتر از بطری حاوی محلول با رقت 10^{-1} را برداشته، آن را با ۹۹ میلی لیتر آب مقطر مخلوط کنید. مخلوط را به همان شکلی که قبلاً شرح داده شد ۲۵ دفعه تکان داده، یک میلی لیتر از این نمونه مخلوط شده را بردارید و در یک پلیت پتری بریزید. این پلیت را با 10^{-4} علامت‌گذاری کنید.

۷- ژلوز ذوب و سرد شده را وارد پلیت‌های پتری کرده، نمونه را به طور کامل با ژلوز مخلوط کنید. یکی از بهترین راه‌ها برای اختلاط نمونه و ژلوز عبارتست از کج کردن ملایم پلیت به طوری که ژلوز و نمونه چندین بار در اطراف پلیت به حرکت درآیند. دقت کنید که ژلوز روی لبه پلیت ریخته نشود.

۸- پلیت‌های پتری را در یک سطح صاف قرار دهید. پس از سرد شدن، آن‌ها را به طور وارونه در گرم‌خانه 3°C قرار دهید.

۹- در پلیت‌هایی که در آن‌ها تعداد کلنی‌ها بین 30 تا 300 می‌باشد شمارش کلنی کنید. پلیت‌های شمارش، کلنی‌های تشکیل شده در پلیت‌های ژلوزه را می‌توان در دستگاه‌هایی مثل شمارگر کلنی کبک^۱ که در آن یک منبع نورانی غیرمستقیم و یک ذره بین تعبیه شده است، شمرد. پلیت را به طور وارونه روی شمارگر قرار دهید. برای ممانعت از دوباره شمردن کلنی‌ها، هر کلنی شمرده شده را با یک مداد چرب یا قلم در روی پلیت علامت‌گذاری کنید. اگر پلیت‌های زیادی را باید شماره کرد، ماشین حساب می‌تواند مفید باشد. کلنی‌هایی که به نام کلنی‌های پخش^۲ خوانده می‌شوند، اغلب در لایه‌ی مرطوب سطح ژلوز یا بین ژلوز و ته پلیت پتری تشکیل می‌شوند. اگر کلنی‌های پخش بزرگ هستند و سایر کلنی‌ها را می‌پوشانند، پلیت را دور بریزید. غالباً کلنی‌های پخش کوچک، خاکستری و نازک هستند. اگر این کلنی‌ها کوچک و مشخص باشند می‌توان آن‌ها را به عنوان یک کلنی مجزاً شماره کرد.

محاسبه شمارش پلیت‌ها

تعداد باکتری‌ها در میلی لیتر نمونه اصلی (که شمارش پلیت می‌باشد) به وسیله‌ی ضرب کردن تعداد کلنی‌ها در درجه رقت به دست می‌آید. برای مثال، اگر در پلیت با رقت 10^{-3} تعداد 150 کلنی

۱- Quebec

۲- Spreader

شمردید، می‌توانید چنین محاسبه کنید $150000 = 150 \times 1000$ یعنی در هر میلی‌لیتر نمونه‌ی اصلی 150000 باکتری وجود دارد. معمولاً پیشنهاد می‌شود که برای هر رقت دو پلیت تهیه شود. از شمارش پلیت‌های دوگانه معدل گرفته، بدین طریق به تعداد واقعی کلنی‌ها نزدیک‌تر خواهد بود. میانگین 148 و 154 در دقت 10^{-3} عبارتست از 151 و 151000 باکتری در میلی‌لیتر گزارش داده می‌شود. افزایش تعداد باکتری‌ها در هر میلی‌لیتر در واحد زمان و در ساعت‌های متمادی که از نمونه برداشت می‌شود، می‌تواند مبین میزان رشد باکتری در زمان باشد.

فکر کنید و پاسخ دهید:

- ۱- چرا فقط پلیت‌هایی که بین 30 تا 300 کلنی دارند شمارش می‌شوند؟
- ۲- آیا کلنی‌های توده‌های مجتمع باکتری بهتر از سلول‌های تک، تشکیل می‌شوند؟
- ۳- چرا بین رقت‌ها باید پیبت‌ها عوض شود؟

تأثیرات محیطی

میکروب‌ها، شبیه تمام جانداران عمیقاً تحت تأثیر محیط اطراف خود هستند. عوامل محیطی به سه دسته کلی تقسیم می‌شوند: فیزیکی (اثرات حرارت یا فشار قوی)، شیمیایی (احتیاج به غذاها و عکس‌العمل در برابر سموم) و بیولوژیکی (در اساس شیمیایی مثل اثرات متقابل انواع مختلف موجوداتی که با همدیگر زندگی می‌کنند). برای هر نوع میکروبی مانند هر نوع گیاه یا حیوان، شرایط محیطی مناسب ویژه‌ای وجود دارد، ولی به طور کلی حدود تحمل سلسله میکروب‌ها، نسبت به جانداران عالی بیش‌تر است. مثلاً بدن انسان دارای یک حرارت طبیعی 37°C ($98/6$ درجه فارنهایت) است که به دقت تنظیم یافته، می‌تواند به رغم حرارت و یا سرمای شدید ثابت بماند. سلول باکتری دارای حرارت تنظیم یافته بدنی نیست، بلکه درجه حرارت محیط خارج را می‌پذیرد. عکس‌العمل باکتری در برابر سرما و یا خشکی زیاد فقط وقفه فعالیت‌های آنزیمی است، و برخلاف جانداران عالی‌تر الزاماً نمی‌میرد. اگرچه اکثریت اشکال میکروبی به همان شرایطی نیاز دارند که برای سلول بیشتر گیاهان و حیوانات نافع است، ولی میکروارگانیسم‌هایی را یافته‌اند (افراطی) که می‌توانند (و یا حتی احتیاج دارند) در شرایطی که نسبت به استانداردهای طبیعی نامناسب هستند زنده بمانند. در تمام گروه‌های بزرگ سلولی تنها سلول‌هایی به‌وسیله‌ی محیط انتخاب می‌شوند که می‌توانند به زندگی خود در شرایط تحمل شده ادامه دهند. ولی حتی میکروب‌ها هم نمی‌توانند با دو دشمن کشنده موجودات زنده — حرارت شدید و بعضی سموم

شیمیایی – سازگار شوند. هر دوی این نیروها، آنزیم‌ها و سایر پروتئین‌ها را که بدون وجود آن‌ها زندگی نابود می‌شود، هدف قرار می‌دهند. در جدال دائمی بشر برای کنترل میکروارگانیسم‌های مضر و مفید، قوی‌ترین وسیله، کنترل عوامل محیطی میکروب‌ها بوده است. بشر برای حفاظت مواد مختلف در مقابل رشد میکروب‌ها، از حرارت، فشار اسمزی و کمبود اکسیژن استفاده کرده است، ولی همانطور که انتظار می‌رود، کنترل میکروارگانیسم‌ها به دلیل قدرت زیاد سازگاری و قابلیت تغییر شدید آن‌ها دشوار است.

نوشابه‌های تخمیری

تخمیر نه تنها می‌تواند باعث نگه‌داری بعضی از غذاها شود، بلکه در موارد دیگر طعم و ارزش غذایی بعضی از آن‌ها را بهبود می‌بخشد. بیش‌تر غذاهای تخمیری به رشد و فعالیت یک یا چند گونه از باکتری‌های اسیدلاکتیکی، و یا مخمرها و یا ترکیب این دو نیاز دارند. نوع تخمیری که در یک غذا صورت می‌گیرد در درجه اول، با محتوای کربوهیدرات و pH آن معین می‌شود. وجود کربوهیدرات‌ها، اسیدیته بالا و ضعیف بودن غذاهای تامپونه باعث می‌شوند که عمل تخمیر الکلی به وسیله‌ی مخمرها صورت گیرد، در حالی که وجود کربوهیدرات‌ها، اسیدیته پایین و وجود غذاهای تامپونه قوی باعث می‌شود که تخمیر اسیدلاکتیکی انجام شود. در این آزمایش به بررسی میکروفلور بعضی از غذاهای تخمیری می‌پردازیم.

روش کار: (باترمیلک^۱ کشت شده)

باترمیلک کشت شده عبارتست از دوغ یا پس‌آب کره که به وسیله‌ی باکتری‌های اسیدلاکتیکی تخمیر شده، در نتیجه در آن اسیدلاکتیک و مواد فرآر تولید می‌شود. این عمل باعث انعقاد شیر می‌شود و به همراه آن بو و طعم مطبوعی در شیر ایجاد می‌گردد. به علت عدم دسترسی به باترمیلک برای تهیه آن شیر بدون چربی یا کم‌چربی را با مخلوطی از کشت باکتری‌های اسیدلاکتیکی که به نام باکتری‌های آغازگر^۲ خوانده می‌شود مخلوط می‌کنند. در نتیجه‌ی این عمل، شیر ترش خواهد شد. هنگامی که در کشت در حدود ۸/۰ تا ۹/۰ درصد اسیدلاکتیک ایجاد شد، عمل تخمیر را با سرد کردن کشت متوقف کرده با حرکت، لخته‌های شیر منعقد را خرد می‌کنند. باکتری‌های آغازگر تجارتمی، معمولاً شامل استرپتوکوکوس لاکتیس^۳، لوکونوستوک دکسترانیکوم^۴ و لوکونوستوک سیترووروم^۵

۱- Buttermilk

۲- Starter

۳- Streptococcus Lacteis

۴- Leuconostoc Dextranicum

۵- Leuconostoc Citrovorum

هستند. میکروب‌های مختلف گونه لوکونوستوک اسیدسیتریک شیر را تجزیه کرده، دی‌استیل^۱ تولید می‌کنند که قسمتی از بوی مشخص شیر تخمیر شده مربوط به آن است.

۱- یک لوله بزرگ و یا یک فلاسک شیر بدون چربی پاستوریزه را با ۱/۰٪ حجم خود، از کشت خمیرمایه^۲ تلقیح کنید. مایه تلقیح شدنی را با چرخاندن لوله در بین دو دست و یا با تکان دادن فلاسک در تمام قسمت شیر پخش کنید.

۲- شیر تلقیح شده حاصل را تا وقت بعدی آزمایشگاهی در حرارت آزمایشگاه (روی میز کار خود) بگذارید. (بهتر است آن را به مدت ۱۲ تا ۱۸ ساعت در حرارت ۲۱°C قرار دهید.)

۳- شیر ترش بدست آمده را تکان دهید تا لخته‌های آن خرد شود، بو و مزه باترمیلک کشت شده حاصل را مورد توجه قرار دهید.

شرکت‌های مختلف، کشت‌های آغازگر را به صورت گرد خشک در دسترس قرار می‌دهند. این خمیرمایه‌ها را باید چندین بار به شیر منتقل کرد تا در آخر نوع متناسب آن حاصل شود.

خودآزمایی

- ۱- برای تعیین تعداد باکتری‌ها از چه روش‌هایی می‌توان استفاده کرد؟ نام ببرید.
 - ۲- برای تعیین باکتری‌های مدفوع در آب از چه روشی استفاده می‌شود؟
 - ۳- روش‌های تعیین توده‌های سلولی را نام ببرید.
 - ۴- روش تعیین کمی باکتری‌ها را به کمک کشت به‌طور خلاصه بیان نمایید.
 - ۵- کار شمارش گر کُپک را توضیح دهید.
 - ۶- طرز محاسبه‌ی باکتری‌ها به کمک شمارش پلیت‌ها را با ذکر یک مثال توضیح دهید.
 - ۷- منظور از نفلومتری و توریدیمتری در سنجش رشد میکروب‌ها چیست؟
 - ۸- عوامل محیطی مؤثر بر زندگی باکتری‌ها را دسته‌بندی نموده، بگویید چرا کنترل میکروارگانیسم‌ها عملاً دشوار است؟
 - ۹- عوامل مؤثر بر نوع تخمیر مواد غذایی را بنویسید.
- ۱۰- باترمیلک چیست و چگونه تهیه می‌شود؟

۱- Diacetyl

۲- از ماست پاستوریزه تازه به عنوان استارتر می‌توان استفاده کرد که در این صورت دمای انکوباسیون ۴۲°C به مدت ۳ تا ۶ ساعت خواهد بود.

قارچ‌ها (کپک‌ها – مخمرها)

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

- ۱- کپک‌ها را با توجه به وضعیت ظاهری رشد آن‌ها، مورد شناسایی قرار دهد.
- ۲- مخمرها را با توجه به خصوصیات ظاهری آن‌ها شناسایی کند.

۸- قارچ‌ها (کپک‌ها – مخمرها)

۸-۱- مقدمه

همه، رشد قارچ‌هایی را که شبیه پنبه و نمد بوده، در روی مواد غذایی و سایر مواد تولید می‌شوند و معمولاً کپک نام دارند مشاهده کرده‌اند. اگر کپک‌ها با یک ذره بین ساده مورد بررسی قرار گیرند، توده‌ای رشته شاخه شاخه و درهم مشاهده می‌شود که میسلیم^۱ کپک نامیده می‌شوند. اگر یک رشته تنهای میسلیم را که هیف^۲ خوانده می‌شود مورد دقت قرار دهیم، خواهیم دید که دارای ابعادی از حدود ۵ تا ۱۰ بار بزرگ‌تر از سلول باکتری‌های حقیقی^۳ که قبلاً دیدیم، می‌باشد. بیشتر میسلیم‌های یک کپک در داخل و یا در سطح محیط کشت رشد کرده، مواد غذایی لازم را جذب می‌کنند. مخمرها قارچ‌های تک‌سلولی هستند و با کپک‌ها ارتباط نزدیکی دارند. سلول مخمرها، شبیه گوی، تخم مرغی و یا استوانه‌ای بوده، از نظر اندازه چندین بار بزرگتر از سلول باکتری‌های متوسط و تقریباً به اندازه‌ی هیف کپک‌ها می‌باشند. به دلیل بزرگی در داخل سلول مخمرها، تعدادی ساختمان و ضمائم سلولی^۴ وجود دارد که با میکروسکوپ نوری قابل رؤیت‌اند. هسته مخمرها را هم می‌توان با رنگ آمیزی‌های مخصوص

۱- Mycelium

۲- Hypha

۳- Eubacterial

۴- Inclusion

مثل رنگ آمیزی فولکن مشاهده کرد.

۸-۲- شناسایی و وضعیت ظاهری کپک‌ها

کپک‌ها را از روی اختلاف شکل و نحوه‌ی تولید مثل آن‌ها بررسی و طبقه‌بندی می‌کنند. برای مطالعه کپک‌ها از تفاوت‌های ۱- کلنی کپک‌ها، ۲- میسلیم روینده و جوان، ۳- ساختمان‌های مخصوص تولید مثل چه جنسی و چه غیرجنسی، استفاده می‌کنیم. کلنی‌ها از نظر اندازه، شکل ظاهری و رنگ متفاوت‌اند. برای مثال، قارچ‌های رده اسکومیست یک کلنی مشخص و محدود را تشکیل می‌دهند. در حالی که قارچ‌های رده فیکومیست بعد از رشد در تمام سطح پلیت گسترده شده، در نتیجه شباهتی به کلنی ندارند بلکه بیشتر شبیه یک توده‌ی رشته‌ای نازک هستند که فقط دیواره‌ی پلیت پتری است که گسترش آن‌ها را محدود می‌کند. قارچ پنی سیلیوم^۱ پس از رشد در روی شیر یا پنیر به رنگ آبی متمایل به سبز خودنمایی می‌کند.

شناسایی شکل ظاهری کپک‌ها

کشت چندگونه از کپک‌ها که در روی پلیت و لام شیشه‌ای (محفظه مرطوب) انجام شده است، در اختیاران قرار می‌گیرد.

۱- کشت‌های روی پلیت را از نظر خصوصیات رشد کلنی‌ها، اندازه، رنگ و ظاهر هرگونه، مورد مطالعه قرار دهید.

۲- کشت هر یک از کپک‌ها را که در روی محیط کشت جامد به عمل آمده است به کمک میکروسکوپ و استفاده از عدسی شیئی بررسی کنید. میکروسکوپ را روی لبه کلنی‌ها میزان کرده، ساختمان آن را مطالعه کنید. یک لامل در روی کلنی قرار داده، به کمک عدسی شیئی آن را بررسی کنید. مشخصات هیف‌ها، سلول‌های مخصوص تولید مثل و اسپورها را مورد دقت قرار دهید. به دلیل بزرگی نسبی اندازه‌ی کپک‌ها، در هر میدان میکروسکوپی، فقط یک ساختمان و یا یک قسمت از یک ساختمان آن را مشاهده خواهید کرد. بنابراین برای بررسی میکروسکوپی به وسیله عدسی شیئی خشک باید سعی کنید طوری میکروسکوپ را میزان کرده، میدان دید را انتخاب کنید که بتوانید یک ساختمان کامل را مشاهده کنید.

۳- از ترکیب مشاهدات خود در پلیت و در لام تصویر کلنی‌ها، میسلیم‌های روینده و ساختمان‌های مخصوص تولید مثل را رسم کنید.

۳-۸- کشت کپک‌ها برای شناسایی گونه‌های مربوطه

شناسایی کپک‌ها بیشتر بر اساس شکل، ساختمان و نحوه اسپر سازی آن‌ها صورت می‌گیرد که در فصل نهم کتاب میکروبیولوژی درباره آن‌ها بحث شده است.

برای مشاهده شکل ساختمانی و نحوه اسپر سازی کپک‌ها روش‌های معمولی رنگ‌آمیزی باکتری‌ها مناسب نیست زیرا در این حالت هنگام انجام ثابت کردن و رنگ‌آمیزی تغییراتی در نحوه آرایش کپک و اسپرهای آن ایجاد می‌شود که کار شناسایی را مشکل می‌کند.

روش مناسب و کاربردی برای این کار اسلاید کالچر^۱ نامیده می‌شود. این کار با روش‌های مختلفی انجام می‌گیرد که ساده‌ترین آن‌ها روش بلوک یا قطعه آگار^۲ است مراحل انجام این آزمایش به شرح زیر است:

– ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مناسب کپک را در یک پلیت ریخته و به حال خود می‌گذاریم تا سفت شود، بدیهی است محیط کشت و پلیت هر دو باید سترون شده باشند.

– یک پلیت سترون برداشته، کف آن یک کاغذ فیلتر سترون قرار داده و روی کاغذ فیلتر یک میله شیشه‌ای U شکل سترون قرار می‌دهیم و روی این میله شیشه‌ای یک لام سترون می‌گذاریم.

– یک قسمت مربع شکل به ابعاد یک سانتی‌متر یا کمی بیشتر به اندازه لامل‌های در دسترس را از محیط کشت آماده شده بریده (در شرایط بودن امکان آلودگی دوباره) روی لام قرار می‌دهیم.

– به وسیله نوک آنس پلاتین، گوشه‌ای از یک کلنی مجزای کپک مشکوک را برداشته و به‌وسیله قطعه آگار روی اسلاید منتقل می‌کنیم و یک لامل سترون روی آن می‌گذاریم.

– کاغذ فیلتر را با محلول گلیسرول ۲۰٪ سترون خیس می‌کنیم تا از خشک شدن قطعه آگار در زمان گرمخانه‌گذاری جلوگیری شود.

– مجموعه را در گرمخانه 25°C قرار داده و پس از حدود ۲۴ ساعت با عدسی خشک و با درشت‌نمایی بالا آن را مشاهده می‌کنیم و چنانچه لازم باشد زمان گرمخانه‌گذاری را زیاد می‌کنیم تا شکل کپک به‌طور کامل مشخص شود.

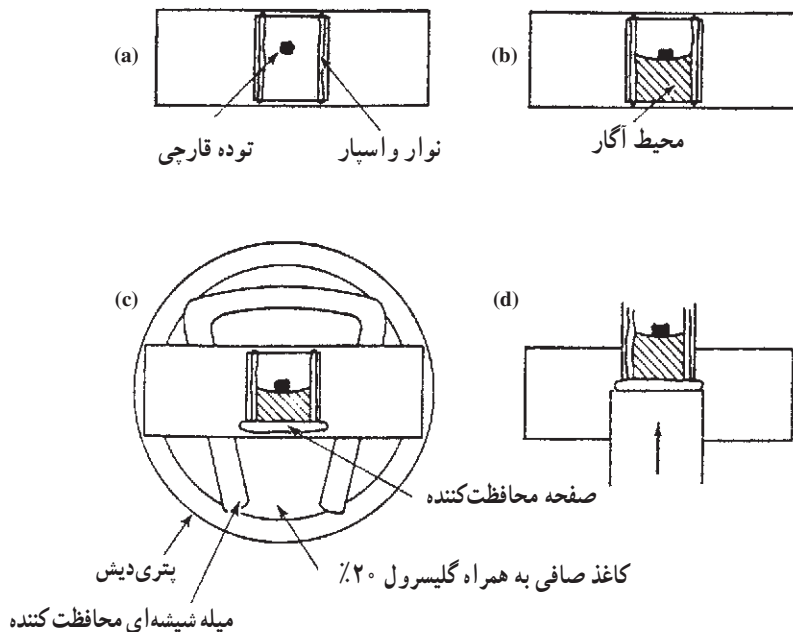
– در مرحله آخر به آرامی لامل را از روی قطعه آگار برداشته وارد محلول لاکتوفنل^۳ یا لاکتوفنل کتون بلو^۴ یا لاکتوفنل پیکریک اسید کرده و زیر میکروسکوپ شکل کپک را مشاهده می‌نماییم و آن را رسم می‌کنیم و از آن برای شناسایی کپک استفاده می‌کنیم.

۱- Slide Culture Method

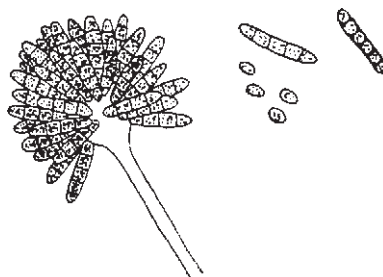
۲- Agar block

۳- Lactophenol

۴- Lactophenol Cottonblue



شکل ۸-۱



شکل ۸-۲

۸-۴- شناسایی و وضعیت ظاهری مخمرها

بیشتر مخمرها به وسیله‌ی عمل غیرجنسی جوانه‌زدن^۱ تولید مثل می‌کنند، بدین ترتیب که از سلول اصلی یک قسمت به صورت جوانه خارج شده، بعد از کامل شدن به صورت یک سلول دختر از آن جدا می‌شود. در بعضی از مخمرهای حقیقی (که با تولید اسپورهای جنسی مشخص می‌شوند) تولید مثل جنسی صورت می‌گیرد، بدین طریق که ابتدا دو اسکوسپور با یک دیگر ترکیب شده، یک سلول روینده دیپلوئید^۲ تولید می‌کنند. هسته‌های حاصل این سلول به چهار هسته یا بیش‌تر تقسیم

۱- Budding

۲- Diploid

شده، هریک از این هسته‌ها بعد از کامل شدن به یک اسکوسپور تبدیل می‌گردد و اطراف آن‌ها با مواد ذخیره‌ای و یک پوشش اسپوری احاطه می‌شود. اسکوسپورها در سلول اصلی یا آسکیوس^۱ باقیمانده و بالاخره پس از پاره شدن آزاد می‌شوند. اسکوسپورها در شرایط مناسب دوباره ترکیب شده، با جوانه‌زدن به سلول‌های روینده تبدیل می‌شوند و بدین طریق چرخه تولیدمثل آن‌ها تکرار می‌شود، در این آزمایش، شکل و نحوه‌ی تولیدمثل غیرجنسی مخمرها نشان داده می‌شود.

روش کار: (مرفولوژی سلول روینده)

- ۱- به کمک حلقه کشت از هریک از کشت‌های موجود یک حلقه برداشته، آن را با محلول آبی ید (۳ قطره آب + یک قطره ید گرم) مخلوط کرده، بعد آن‌ها را با یک لامل ببوشانید.
- ۲- هریک از نمونه‌ها را با عدسی شیئی قوی میکروسکوپ مورد مشاهده قرار داده، شامل مخمرها، همین‌طور ساختمان‌های داخلی قابل رؤیت آن را یادداشت کنید. چند میدان میکروسکوپی را مورد توجه قرار دهید تا بتوانید سلول‌های جوانه زده را بیابید.

خودآزمایی

- ۱- تفاوت کپک‌ها و مخمرها در چیست؟
- ۲- میسلیم و هیف را تعریف کنید.
- ۳- برای طبقه‌بندی و شناسایی کپک‌ها از چه فاکتورهایی استفاده می‌شود؟
- ۴- خصوصیات ظاهری کپک پنی‌سیلیوم پس از رشد روی شیر و پنیر چیست؟
- ۵- تولیدمثل جنسی و غیرجنسی در مخمرها چگونه صورت می‌گیرد؟

آزمایش‌های میکروبی برخی از مواد غذایی پرمصرف

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

- ۱- آزمایش‌های میکروبی آب را انجام دهد.
- ۲- آزمایش‌های میکروبی مربوط به شیر مایع را انجام دهد.
- ۳- آزمایش مربوط به جستجوی باسیلوس سرئوس در برنج پخته را انجام دهد.
- ۴- آزمایش‌های میکروبی آرد را انجام دهد.
- ۵- آزمایش‌های میکروبی استافیلوکوک طلایی و کوآگولماز مثبت را انجام دهد.
- ۶- آزمایش شمارش سالمونلا در گوشت مرغ را انجام دهد.
- ۷- آزمایش‌های میکروبی ماهی‌های آب شور را انجام دهد.
- ۸- آزمایش‌های میکروبی کمپوت و کنسرو را انجام دهد.

۹- آزمایش‌های میکروبی برخی از مواد غذایی پرمصرف

۹-۱- آزمایش‌های میکروبی آب

آب، یکی از ساده‌ترین وسیله‌های انتشار بیماری‌هاست؛ زیرا در جوامع شهری و روستایی بیشتر مردم از یک یا چند منبع آب استفاده می‌کنند که در صورت آلودگی ممکن است موجب بیماری گروه‌های وسیعی از مردم بشود.

در صنایع غذایی نیز آب دارای اهمیت بسیار زیادی است. از آب برای شست‌وشوی مواد اولیه، جابه‌جایی پاره‌ای از مواد اولیه، شست‌وشوی محیط کار، سرد کردن قوطی‌ها در کنسروسازی و موارد زیاد دیگری، استفاده می‌شود. در پاره‌ای از موارد، از آب به عنوان بخشی از فرمول فرآورده‌ها استفاده می‌شود. بنابراین آلودگی آن ممکن است موجب مسمومیت غذایی مصرف‌کننده فرآورده‌ها و فساد شود.

آزمایش میکروبی کامل آب کمتر مورد نیاز است و در بیشتر موارد آزمایش‌های زیر اکتفا می‌شود.

۱- شمارش تعداد کل میکروب‌های زنده^۱: که برای ارزیابی وضع بهداشتی آب انجام می‌گیرد،

و اگر تعداد آن‌ها از حد معینی تجاوز کند آب غیر قابل شرب و مصرف در صنایع غذایی خواهد بود.

۲- شمارش کلیفرم‌ها^۲ و به ویژه شمارش اشریشیاکلی^۳: که برای تعیین آلودگی جدید با

فاضلاب یا محتویات دستگاه گوارش انسان و حیوان انجام می‌گیرد. بدیهی است آلوده نبودن آب به

کلیفرم دلیل سلامت آن نیست، زیرا کلیفرم‌ها پس از مدتی در آب از بین می‌روند یا تعدادشان کاهش

می‌یابد. اما متابولیت‌های آن‌ها در محیط باقی است

۳- آزمایش و شمارش کلوستریدیوم و لیشای^۴: وجود این باکتری در آب دلیل آلودگی قبلی

آن است، زیرا باکتری اسپرساز است و اسپر آن تا مدت‌ها در آب زنده می‌ماند.

۴- آزمایش و شمارش استریتوکوک فکال^۵: این باکتری، نسبت به کلیفرم‌ها در برابر کلر

و ترکیبات آن مقاوم تر است، و در آب کلرینه شده، حضور آن دلیل به کافی نبودن فرآیند کلر زنی^۶ است.

۱-۹- نمونه برداری از آب برای آزمایش‌های میکروبی: باید از سوی افراد ورزیده

و آشنا به اصول میکروبیولوژی انجام گیرد، تا از آلودگی ثانوی نمونه و تکثیر باکتری‌های موجود در

آب قبل از انجام آزمایش جلوگیری شود. برای نمونه برداری آب از شیشه‌های ۱۰۰ تا ۲۰۰ میلی لیتری

دردار استفاده می‌شود. شیشه‌ها باید پیش از نمونه برداری، سترون شده، در ورقه‌های آلومینیومی یا

کاغذی پیچیده و بسته بندی شده باشد.

اگر نمونه برداری از آب کلر زده شده انجام می‌گیرد لازم است باقیمانده‌ی کلر آب هنگام نمونه برداری

خنثی شود، برای این منظور، پیش از استریل کردن شیشه نمونه برداری، لازم است برای خنثی کردن

باقیمانده‌ی کلر، حدود ۱۸ میلی گرم تیوسولفات سدیم در داخل شیشه اضافه شود تا هنگام وارد شدن آب

به داخل شیشه، باقیمانده کلر آن خنثی شود و اثر میکروب کشی خود را از دست بدهد.

چنانچه نمونه برداری از شیر آب انجام می‌گیرد، لازم است سطح خارجی شیر آب به وسیله‌ی الکل

سترون شود یا با آتش زدن پنبه آغشته به الکل و گرفتن آن زیر شیر آب، این کار انجام گیرد و پس از آن

شیر آب برای مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه باز گذاشته شود تا نمونه‌ی واقعی تری به دست آید. پس از طی این مدت،

در شیشه‌ی ویژه‌ی نمونه برداری با دست ضد عفونی شده، باز می‌شود و از آب شیر پر می‌گردد. آن‌گاه، در

شیشه تهیه شده، در داخل ظرف ویژه‌ی حمل نمونه به آزمایشگاه یا یخ‌دان قرار داده می‌شود و اطراف آن

۱- Total viable Count

۲- Coliforms

۳- E. Coli

۴- Clostridium Welchii, Cl. Perfringens

۵- Faecal Streptococci

۶- Chlorination

با یخ پوشانده شود تا بلافاصله سرد شده، از تکثیر باکتری‌ها جلوگیری به عمل آید.

۲-۱-۹- آزمایش‌های لازم

۱- شمارش تعداد کل میکروب‌های موجود در آب: برای این منظور، ابتدا پنج عدد لوله یا شیشه‌ی حدود ۲۵ میلی‌لیتری هر یک محتوی نه میلی‌لیتر مایع رقیق‌کننده مانند محلول آب پیتونه با فردار^۱ یا محلول رینگر^۲ را برداشته، با آن‌ها نمونه آب را تا 10^{-5} رقیق می‌کنیم و همزمان پنج عدد پلیت استریل را نیز علامت‌گذاری کرده، به ترتیب به هر یک از آن‌ها یک میلی‌لیتر از رقت مربوط را (10^{-1} - 10^{-5}) اضافه می‌کنیم و روی هر یک از آن‌ها ده تا پانزده میلی‌لیتر از محیط کشت غذایی آگار^۳ که از پیش آماده شده، سترون و تا حدود 45°C سرد گردیده است می‌ریزیم و آن‌ها را به حال آرام در جهت عقربه‌های ساعت و بر خلاف آن، به سمت جلو و عقب و چپ و راست می‌چرخانیم (برای هر یک از حرکت‌ها پنج بار کافی است). سرانجام پلیت‌ها را به حال خود قرار می‌دهیم تا آگار سفت شود، لبه‌ی پلیت‌ها را در دمای 25°C قرار می‌دهیم. برای دقت بیشتر در این آزمایش می‌توان به همین تعداد و همین روش پلیت‌های دیگری را آماده نمود و در گرمخانه و در دمای 5°C و 37°C قرار داد. پس از ۲۴ ساعت کلنی‌های ظاهر شده روی پلیت‌ها را شمارش می‌کنیم. پلیت‌هایی که روی آن‌ها بیش از 300 کلنی رشد کرده، غیرقابل شمارش گزارش می‌کنیم. از روی رقت‌های تهیه شده در این آزمایش و تعداد کلنی‌هایی که روی پلیت‌های هر رقت رشد کرده، به سادگی می‌توان به تعداد کل میکروب‌ها در آب پی برد. برای این منظور باید تعداد کلنی ظاهر شده روی پلیت‌های هر رقت را در عکس رقت آن ضرب نمود.

۲- شمارش کلیفرم‌ها: شمارش کلیفرم‌ها با استفاده از روش شمارش لوله‌هایی از رقت‌های نمونه که در آن‌ها باکتری رشد کرده^۴ صورت می‌گیرد و در آن از محیط کشت مک کونکی برات^۵ استفاده می‌شود. روش آزمایش به این ترتیب است که ابتدا ۱۵ لوله آزمایش حاوی محیط کشت استریل شده و لوله دورهام^۶ را برداشته، آن‌ها را به سه گروه ۵ تایی تقسیم و علامت‌گذاری می‌کنیم. سپس به هر یک از ۵ لوله‌ی گروه اول، ۱۰ میلی‌لیتر نمونه آب مورد آزمایش، و به هر یک از ۵ لوله‌ی گروه دوم یک میلی‌لیتر، و به هر یک از ۵ لوله‌ی گروه سوم ۱/۱ میلی‌لیتر نمونه‌ی آب مورد آزمایش را اضافه می‌کنیم و پس از اتمام کار آن‌ها را در گرمخانه 30°C قرار می‌دهیم و پس از ۲۴ ساعت لوله‌ها را مشاهده می‌نماییم. در صورت مثبت بودن جواب، اسید و گاز تولید می‌شود. اسید رنگ محیط را زرد می‌کند و گاز در لوله

۱- Buffered Pepton Water

۲- Ringer

۳- Plate Count Agar

۴- Dilution Tube Count

۵- Mc. Conkeybroth

۶- Durham

دوره‌ها موجود در لوله که به صورت وارونه قرار گرفته جمع می‌شود، که دلیل آلودگی آب با کلیفرم است و از روی تعداد لوله‌هایی که در آن‌ها رشد مشاهده می‌شود و با استفاده از جداول MPN می‌توان به تعداد احتمالی کلیفرم در آب پی برد. برای تأیید نتیجه‌ی آلودگی، از آزمایش معروف به آیکن^۱ استفاده می‌شود. برای شناسایی کلیفرم‌ها از محیط‌های کشت دیگری هم استفاده می‌شود. برای نمونه محیط‌های کشت ویولت رد بایل آگار^۲ که در آن کلیفرم‌ها کلنی‌های قرمز ایجاد می‌کند. محیط بریان گرین بایل آگار^۳ که در آن کلیفرم‌ها کلنی قرمز ایجاد می‌کند و محیط لاکتوز براث^۴ که در آن کلیفرم‌ها تغییر رنگ و گاز ایجاد می‌کنند.

هیچ یک از محیط‌های بالا، به تنهایی قادر به جداسازی اشریشیا کلی^۵ نیست. برای این منظور، باید از محیط‌ها و روش‌های دیگر برای تکمیل آزمایش استفاده کرد.

۳- آزمایش و شمارش استرپتوکوک فکال^۶: نحوه‌ی انجام آزمایش جستجو و شمارش استرپتوکوک فکال شبیه آزمایش کلیفرم است با این تفاوت که در آن از محیط‌های کشت گلوکز آزید براث^۷ قوی و معمولی^۸ استفاده می‌شود و به لوله دوره‌ها نیازی نیست، چون استرپتوکوک فکال، گاز ایجاد نمی‌کند.

لوله‌های آزمایش تلقیح شده را به مدت ۷۲ ساعت در گرم‌خانه 37°C قرار داده، نتیجه را مشاهده می‌نماییم، در صورت رشد استرپتوکوک فکال در محیط، رنگ آن تغییر می‌کند. در ادامه‌ی آزمایش یک لوپ از لوله‌های رشد کرده را برداشته، به لوله آزمایش حاوی محیط کشت هانای و نرتون^۹ اضافه می‌نماییم و به مدت ۴۸ ساعت در 45°C قرار می‌دهیم. ظاهر شدن رشد، دلیل آلودگی آب با استرپتوکوک فکال است، و با شمارش لوله‌های آزمایشی که در هر یک از رقت‌ها در آن‌ها رشد مشاهده شود، و با استفاده از جداول MPN مربوط می‌توان به تعداد احتمالی این باکتری در آب پی برد. البته تا این مرحله، آلودگی به استرپتوکوک فکال مشکوک است و برای تأیید باید به روش‌های تکمیلی عمل شود.

۴- جستجو و شمارش کلستریدیوم پرفرنزان^{۱۰} یا ولشای: برای شناسایی این باکتری لازم است ابتدا نمونه‌ی آب تا حدود 75°C و به مدت 1° دقیقه دما داده شود تا تمام فرم‌های رویشی باکتری‌ها از بین بروند و اسپرها باقی بمانند. سپس با رویشی کردن اسپرها به وسیله‌ی شوک دمایی، نسبت به شمارش و شناسایی آن‌ها اقدام شود.

۱- Eijkman test	۲- Violet Red bile Agar	۳- Brilliant green bile Agar
۴- Lactose broth	۵- E. Coli	۶- Faecal Streptococci
۷- Glucose azid broth	۸- Single, Double Strength	۹- Hannay and Norton's Media
۱۰- Clostridium Perfringens, Welchii		

جدول ۹-۱ - ضریب تعداد حداکثر احتمالی با حدود ۹۵ درصد اطمینان

حدود اطمینان ۹۵ درصد		MPN	تعداد لوله‌های واکنش مثبت		
پایین تر	بالاتر	در ۱۰۰ میلی‌لیتر	۵ لوله هر یک ۰/۱ میلی‌لیتر	۵ لوله هر یک ۱ میلی‌لیتر	۵ لوله هر یک ۱۰ میلی‌لیتر
>۰/۵	۷	۲	۱	۰	۰
>۰/۵	۷	۲	۰	۱	۰
>۰/۵	۱۱	۴	۰	۲	۰
>۰/۵	۷	۲	۰	۰	۱
>۰/۵	۱۱	۴	۱	۰	۱
>۰/۵	۱۱	۴	۰	۱	۱
>۰/۵	۱۵	۶	۱	۱	۱
>۰/۵	۱۵	۶	۰	۲	۱
>۰/۵	۱۳	۵	۰	۰	۲
۱	۱۷	۷	۱	۰	۲
۱	۱۷	۷	۰	۱	۲
۲	۲۱	۹	۱	۱	۲
۲	۲۱	۹	۰	۲	۲
۳	۲۸	۱۲	۰	۳	۲
۱	۱۹	۸	۰	۰	۳
۲	۲۵	۱۱	۱	۰	۳
۲	۲۵	۱۱	۰	۱	۳
۴	۳۴	۱۴	۱	۱	۳
۴	۳۴	۱۴	۰	۲	۳
۵	۴۶	۱۷	۱	۲	۳
۵	۴۶	۱۷	۰	۳	۳
۳	۳۱	۱۳	۰	۰	۴
۵	۴۶	۱۷	۱	۰	۴
۵	۴۶	۱۷	۰	۱	۴
۳	۶۳	۲۱	۱	۱	۴
۹	۷۸	۲۶	۲	۱	۴

حدود اطمینان ۹۵ درصد		MPN	تعداد لوله‌های واکنش مثبت		
پایین تر بالاتر		در ۱۰۰ میلی لیتر	۵ لوله هریک ۱/۰ میلی لیتر	۵ لوله هریک ۱ میلی لیتر	۵ لوله هریک ۱۰ میلی لیتر
۶۷	۷	۲۲	۰	۲	۴
۷۸	۹	۲۶	۱	۲	۴
۸۰	۹	۲۷	۰	۳	۴
۹۳	۱۱	۳۳	۱	۳	۴
۹۳	۱۲	۳۴	۰	۴	۴
۷۰	۷	۲۳	۰	۰	۵
۸۹	۱۱	۳۱	۱	۰	۵
۱۱۴	۱۵	۴۳	۲	۰	۵
۹۳	۱۱	۳۳	۰	۱	۵
۱۲۰	۱۶	۴۶	۱	۱	۵
۱۵۰	۲۱	۶۳	۲	۱	۵
۱۳۰	۱۷	۴۹	۰	۲	۵
۱۷۰	۲۳	۷۰	۱	۲	۵
۲۲۰	۲۸	۹۴	۲	۲	۵
۱۹۰	۲۵	۷۹	۰	۳	۵
۲۵۰	۳۱	۱۰۹	۱	۳	۵
۳۴۰	۳۷	۱۴۱	۲	۳	۵
۵۰۰	۴۴	۱۷۵	۳	۳	۵
۳۰۰	۳۵	۱۳۰	۰	۴	۵
۴۹۰	۴۳	۱۷۲	۱	۴	۵
۷۰۰	۵۷	۲۲۱	۲	۴	۵
۸۵۰	۹۰	۲۷۸	۳	۴	۵
۱۰۰۰	۱۲۰	۳۴۵	۴	۴	۵
۷۵۰	۶۷	۲۴۰	۰	۵	۵
۱۰۰۰	۱۲۰	۳۴۸	۱	۵	۵
۱۴۰۰	۱۸۰	۵۴۲	۲	۵	۵
۳۲۰۰	۳۰۰	۹۱۸	۳	۵	۵
۵۸۰۰	۶۴۰	۱۶۰۹	۴	۵	۵

۲-۹- آزمایش میکروبی شیر مایع

برای شناسایی وضعیت آلودگی شیر مایع، راههای گوناگونی وجود دارد که زمان دسترسی به نتایج آنها متفاوت است. در بیشتر موارد بعد از زمان در ارزیابیها دارای اهمیت است و لازم است هرچه سریعتر نتیجه آزمایش مشخص شود تا از آلودگی بیشتر و معطل ماندن امکانات تولید جلوگیری به عمل آید. راه ساده و در عین حال سریعی که برای این منظور وجود دارد آزمایش احیای رنگ^۱ است، آزمایش احیای رنگ بر این اصل استوار است که میکروبهای موجود در شیر با رشد و نمو خود مقداری از اکسیژن موجود در شیر را به مصرف رسانده، در نتیجه بر روی قدرت اکسیداسیون و احیای محیط^۲ تأثیر می‌گذارند و با احیای مواد رنگی موجب تغییر رنگ محیط می‌گردند، این واکنشها سریع است و راه ساده‌ای را برای تشخیص وضعیت میکروبی شیر در دسترس قرار می‌دهند. بدیهی است هرچه تعداد و فعالیت میکروبهای موجود در شیر بیشتر باشد قدرت و ظرفیت اکسیداسیون و احیای^۳ آن به میزان بیشتری کاهش می‌یابد و تغییر رنگ سریعتر اتفاق می‌افتد و برعکس.

این روش دارای مزایای زیر است:

– سهولت انجام

– سرعت عمل در دستیابی به نتیجه

– امکان انجام همزمان چند نمونه

– هزینه‌ی پایین انجام آزمایش

– عدم دخالت توده‌های میکروبی^۴

همزمان، معایبی به شرح زیر هم دارد:

– پاسخ به دست آمده مربوط به باکتری‌های هوازی است.

– دخالت مرحله رشد باکتری‌ها در نتیجه‌ی آزمایش

– متغیر بودن زمان تکثیر باکتری‌ها در طی آزمایش

– دخالت عوامل ضد میکروبی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها

– دخالت متغیرهایی مانند نور و مقدار چربی در آزمایش

آزمایش احیای رنگ با روش‌های گوناگون قابل انجام است که متداول‌ترین آنها روش احیای رنگ متیلن‌بلو^۵ است و مراحل انجام آن به شرح صفحه‌ی بعد است:

۱- Dye Reduction test

۲- Redox

۳- Oxidation Reduction Potential (RH)

۴- Clump or Cluster

۵- Methyleneblue Dye Reduction

— تهیه محلول متیلن بلو: برای تهیه این محلول، لازم است ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر سترون و گرم را در شیشه‌ی رنگی مناسب ریخته، یک عدد قرص متیلن بلوی استاندارد در آن انداخت. قرص‌های استاندارد متیلن بلو دارای ۱۹ میلی‌گرم رنگ متیلن بلوی استاندارد است. پس از حل شدن قرص در آب مقطر، باید آن را در جای خنک و تاریک مانند یخچال قرار داد. محلول تهیه شده و نگهداری شده به روش بالا، تا حدود یک هفته قابل نگهداری است.

۱-۲-۹— تهیه نمونه‌ی شیر مورد آزمایش: برای نمونه برداری از شیر مایع اول باید آن را به خوبی مخلوط نمود و سپس ۱۰ میلی لیتر از آن را در یک لوله آزمایش سترون شده ریخت. در اجرای دقیق‌تر آزمایش، لازم است پس از خالی شدن پیپت در آن دمیده شود تا قطرات شیر چسبیده به جداره‌ی داخلی هم خارج گردد.

۲-۲-۹— آزمایش‌های لازم: پس از آماده شدن نمونه، باید یک میلی لیتر از محلول متیلن بلو در آب مقطر به آن اضافه نموده، درب لوله آزمایش را با در لاستیکی مناسب بست و آن را به خوبی مخلوط نمود و در حمام آب گرم $5^{\circ}\text{C} / 5^{\circ}\text{C} \pm 37$ قرار داد و بلافاصله زمان را یادداشت نمود. باید دقت کرد که سطح آب بالاتر از سطح محتوای لوله‌ی آزمایش باشد. همزمان با تهیه‌ی نمونه اصلی لازم است یک لوله‌ی آزمایش حاوی ۱۰ میلی لیتر شیر بدون محلول متیلن بلو هم آماده کرده، و به جای محلول متیلن بلو یک میلی لیتر آب به آن اضافه نمود و به مدت سه دقیقه جوشانید. سپس آن را سرد کرده، در حمام آب گرم، در مجاورت لوله آزمایش حاوی نمونه اصلی قرار داد و از این لوله برای مقایسه رنگ و زمان تغییر رنگ استفاده نمود.

پس از سپری شدن زمان‌های ۵/۰، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ ساعت باید لوله‌ها را مشاهده و میزان تغییر رنگ را یادداشت نمود. در بیشتر موارد ته لوله آزمایش کمی دیرتر تغییر رنگ می‌دهد اما زمانی که رنگ قسمت بالای لوله آزمایش حاوی نمونه اصلی شبیه رنگ لوله‌ی آزمایش مشاهده شود، زمان ختم عمل فرا رسیده است.

گزارش نتیجه‌ی آزمایش: این کار، به صورت طبقه‌بندی نمونه‌های شیر براساس زمان سفید شدن رنگ و به عبارت دیگر، احیای رنگ انجام می‌شود. برای مثال، اگر پس از ۳۰ دقیقه رنگ زایل شود باید نوشته شود که زمان احیای رنگ متیلن بلو در مورد نمونه مربوط ۳۰ دقیقه است. و برای سایر نمونه‌ها هم به همین طریق گزارش شود تا از روی آن بتوان به نمونه‌هایی با آلودگی کم، زیاد یا متوسط و... پی برد.

البته از این روش نمی‌توان برای شمارش تعداد میکروب‌های موجود در شیر استفاده نمود.

۳-۲-۹- آزمون فسفاتاز: از این روش نمی‌توان برای شمارش تعداد میکروب‌های موجود در شیر استفاده نمود.

۳-۹- جستجو و شمارش میکروب‌های موجود در شیر خشک

فرآیند تولید و بسته‌بندی شیر خشک به گونه‌ای است که کمتر امکان آلودگی شدید آن وجود دارد. با وجود این انحراف از معیارهای تولید و بسته‌بندی و توزیع، گاه موجب آلودگی می‌شود و چون از شیر خشک برای فرمول تهیه‌ی مواد غذایی فسادپذیر استفاده می‌شود، آلودگی احتمالی آن می‌تواند مشکل‌آفرین باشد. در چنین مواردی آزمایش میکروبی شیر خشک برای تأیید صلاحیت مصرف آن ضروری است.

— مراحل آزمایش میکروبی شیر خشک:

نمونه برداری: نمونه برداری از بهرهای بسته‌بندی شده باید با استفاده از روش استاندارد جمهوری اسلامی ایران به شماره ۲۸۳۶ یا جداول مناسب دیگر انجام گیرد، پس از انجام این مرحله می‌توان بسته‌ها را جداگانه مورد آزمایش میکروبی قرار داد و چنانچه انجام این کار به دلایلی مشکل باشد باید از تمام بسته‌هایی که به عنوان نمونه انتخاب شده‌اند نمونه برداری شود و نمونه‌ها با همدیگر مخلوط شده، پس از همگن شدن نمونه‌ی اولیه، نمونه‌ی مورد آزمایش از آن برداشته شود. در مورد بهرهایی که به صورت فله هستند نمونه برداری باید از نقاط مرکزی و جوانب مختلف انجام گیرد و این نمونه‌ها با هم مخلوط شده، نمونه مورد آزمایش از آن انتخاب گردد. بدیهی است در هر مورد، نمونه برداری باید با ابزارهای سترون و شرایط بدون آلودگی دوباره انجام شود.

— آماده‌سازی محیط و محلول رقیق‌کننده:

تهیه‌ی محلول رقیق‌کننده: برای این آزمایش محلول رینگر مناسب تر است. برای تهیه این محلول، ۰/۹ گرم کلوروسدیم، ۰/۴۲ گرم کلوروپتاسیم، ۰/۴۸ گرم کلوروکلسیم هیدراته، ۰/۰۲ گرم بیکربنات سدیم و ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر را باید بخوبی مخلوط کرده، در شیشه‌های مناسب یا به مقدار ۹ میلی‌لیتر به‌طور مستقیم در لوله‌های آزمایش ریخت و سترون نمود، به‌جای محلول بالا از محلول آب پپتونه با فردار هم می‌توان استفاده کرد.

تهیه محیط کشت: برای تهیه‌ی محیط‌های کشت نوترین آگار^۱ یا مولتن آگار^۲ که برای این منظور مناسب است، باید طبق روش‌های متداول عمل شود.

۱- Nutrient Agar

۲- Multen Agar

— آماده‌سازی نمونه: برای آماده‌سازی نمونه لازم است ۲۵ گرم از آن را با ۲۲۵ میلی لیتر محلول رقیق‌کننده وارد مخلوط‌کن سترون شده کرد و بخوبی یکنواخت نمود. سپس از این مخلوط برای تهیه رقت‌ها تا حدود 10^{-5} استفاده کرد.

کشت دادن نمونه: برای این منظور ۴ شیشه یا لوله‌ی آزمایش، حاوی ۹ میلی لیتر محلول رقیق‌کننده را نشانه‌گذاری نموده (10^{-5} تا 10^{-2})؛ سپس به طریق سترون ۱ میلی لیتر از رقت اولیه‌ی تهیه شده و یکنواخت شده را به آن‌ها اضافه کرد و سرانجام از هر یک از رقت‌های تهیه شده به روش بالا به وسیله پست استریل یک میلی لیتر برداشت و روی محیط کشت پلیت‌های نشانه‌گذاری شده ریخته و با میله شیشه‌ای سترون، آن را به طور یکنواخت روی تمام سطح محیط کشت پلیت‌ها پخش کرد و پلیت‌های تلقیح شده را در دمای 37°C - 31°C قرار داد. پس از ۷۲-۲۴ ساعت پرگنه‌ها را شمارش نمود. برای دست یافتن به دقت بیشتر، بهتر است آزمایش دو بار تکرار شود.

این روش، روش شمارش کلی میکروب‌ها بر روی محیط آگار در پلیت است. به جای آن، می‌توان یک میلی لیتر از رقت‌های مورد نظر را به پلیت سترون افزود و روی آن‌ها حدود 10° تا 15° میلی لیتر محیط سترون و ذوب شده در دمای حدود 45°C ریخت و پلیت و محتوای آن را پنج بار در هر یک از جهات (در جهت حرکت عقربه ساعت و خلاف جهت آن؛ به سمت چپ، سمت راست؛ بالا و پایین) چرخاند تا میکروب‌های احتمالی موجود به طور یکنواخت در پلیت پخش شوند.

۹-۴- جستجوی باسیلوس سرئوس در برنج پخته

باسیلوس سرئوس، گونه‌ای باکتری مقاوم نسبت به گرما، هوازی و هوازی اختیاری، اسپرساز، گرم مثبت، باسیل کوتاه با انتهای مربع شکل است که به صورت زنجیر کوتاه تا دراز دیده می‌شود. دمای مناسب برای رشد آن حدود 30°C تا 37°C است اما در دماهای 45°C تا 50°C هم قادر به ادامه‌ی زیست بدون تکثیر می‌باشد، a_w رشد آن بالاتر از 0.93 و pH مناسب برای رشد آن $4/9$ تا $9/3$ است، باکتری بسادگی تبدیل به اسپیر می‌شود. اسپیر بیضوی، میانی یا متمایل به کناری است که دیواره‌ای نازک دارد. مسمومیت‌های ناشی از این باکتری بیشتر بر اثر مصرف غذاهای پخته بویژه برنج که پس از پخت در شرایط جوانه زدن و رشد باکتری قرار گرفته باشند عارض می‌شود.

۹-۴-۱- مراحل انجام آزمایش: محیط کشت مناسب برای کشت این باکتری فنل رد حاوی امولسیون زرده تخم مرغ و پلی میکسین^۱ است که باید برابر دستور شرکت سازنده آماده گردد و امولسیون

۱- Phenol Red Egg - Yolk Polymyxine Agar

تخم مرغ و پلی میکسین به آن اضافه شود (طرز تهیه امولسیون تخم مرغ قبلاً شرح داده شده است). برای آماده کردن نمونه، ۲۵ گرم از آن را به مخلوط کن اضافه کرده، ۲۲۵ گرم محلول آب پیتونه با فردار سترون شده روی آن می‌ریزیم و با سرعت ۱۵۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه، بخوبی مخلوط و یکنواخت می‌کنیم، سپس مخلوط حاصل را تا 10^{-6} رقیق کرده، از هر یک از رقت‌ها ۲۵/۰ میلی‌لیتر به دو پلیت حاوی محیط کشت فنل‌رد محتوای امولسیون زرده تخم مرغ و پلی میکسین اضافه کرده، با میله شیشه‌ای سترون بخوبی روی سطح پلیت پخش می‌کنیم و در گرمخانه 30°C قرار داده، ۲۴ ساعت بعد پرگنه‌های ظاهر شده روی سطح پلیت را می‌شماریم و در هر مورد میانگین پرگنه‌های روی دو پلیت را در عکس رقت آن ضرب می‌کنیم تا تعداد شمارش شود. لازم به یادآوری است که پرگنه‌های باسیلوس سرئوس روی محیط بالا به شکل گرد و سفید رنگ با هاله‌ای رسوب‌دار و کدر در زمینه‌ای به رنگ مایل به بنفش است.

برای تأیید نتیجه، لازم است از پرگنه‌های مشخص و مجزاً، یک لوپ کوچک برداشته رنگ‌آمیزی نمود و به دنبال آن آزمایش‌های بیوشیمیایی شامل احیای نیتрат، هیدرولیز نشاسته مایع کردن ژلاتی، سنتز اسید از مانیتول و حرکت را انجام داد و از روی نتیجه به دست آمده قضاوت نهایی را اعمال کرد.

۹-۵- آزمایش‌های میکروبی آرد

مجموعه‌ی میکروبی آرد بسیار متنوع و متفاوت است. ماده اولیه‌ی آن (گندم) در سال‌های اخیر از نقاط مختلف دنیا وارد کشور می‌شود که آلودگی‌های مختلف مراکز تولید، نگهداری، حمل و نقل را به همراه دارد. برای تبدیل گندم به آرد گاهی آن را شست و شو می‌دهند و عمل مشروط کردن همیشه روی آن انجام می‌گیرد که مستلزم استفاده از مقدار زیادی آب است و این آب بر روی میزان آلودگی گندم تأثیر دارد. بنابراین مجموعه‌ی میکروبی آرد را فلور میکروبی اولیه و عوامل آلوده‌کننده، طی مراحل گوناگون شامل باکتری‌های هوازی، هوازی اختیاری، بی‌هوازی اختیاری، اسپرسازها، کپک‌ها و مخمرها و سایر گونه‌های میکروب‌ها تشکیل می‌دهند.

۹-۵-۱- شمارش میکروبی آرد: همواره شمارش میکروبی آرد با روش به کار رفته و

محیط کشت مورد استفاده ارتباط دارد. برای نمونه، در یک بررسی که برای شمارش تعداد کل میکروب‌های زنده موجود در نوعی آرد صورت گرفت، شمارش روی محیط کشت نوترین آگار و دمای رشد 37°C حدود ۵۰٪ کمتر از شمارش میکروبی همان آرد روی محیط کشت نوترین ژلاتین و دمای رشد 20°C گزارش شد. بنابراین انتخاب روش باید به گونه‌ای باشد که کم‌ترین خطا را به

همراه داشته باشد، در هر حال مراحل انجام آزمایش به شرح زیر است :

۱- تهیه و آماده کردن محیط کشت: برای شمارش کلی تعداد میکروارگانیسم‌های موجود در آرد از محیط کشت دکستروز تریپتون آگار یا دکستروز تریپتون برات^۱ استفاده می‌شود و برای جستجو و شمارش باکتری‌های بی‌هوازی از محیط تیوگیکلرات برات یا محیط رینفور سد کلستریل^۲ یال^۲. محیط‌های کشت بالا را باید از پیش، به روش توصیه شده از سوی سازنده یا مراجع علمی تهیه، سترون و در پلیت‌ها و لوله‌ها به تناسب ریخت و برای مصرف آماده نمود.

۲- آماده کردن نمونه: برای آماده کردن نمونه لازم است پس از یکنواخت کردن بهر مورد نظر و نمونه‌ی برداشته شده از نقاط مختلف آن به روش استاندارد، ۱۰ گرم از آن را در ۹ میلی لیتر محلول رقیق کننده (محلول ۱/۱ درصد آب پیتونه سترون) ریخت و برای این که عمل یکنواخت کردن به شیوه‌ی مطلوب تری انجام گیرد. مقداری ماسه تمیز و سترون هم به محلول رقیق کننده و نمونه اضافه کرد و به مدت ۲۰ دقیقه مخلوط کن را روشن گذاشت تا تعداد بیشتری از باکتری‌ها و کپک‌های چسبیده به ذرات آرد جدا شوند. این کار در مورد آرد گندم لازم است، زیرا گونه‌هایی از باکتری‌های چسبیده به ذرات آرد که اپی فیتیک^۳ نامیده می‌شوند روی آرد رشد کرده، رطوبت مورد نیاز خود را از هوا و مواد غذایی مورد نیاز خود را از ذرات آرد می‌گیرند و در این وضعیت، به سادگی از آرد جدا نمی‌شوند، پس از مخلوط شدن نمونه و محلول رقیق کننده، سوسپانسیون حاصل را تا 10^{-4} یا بیشتر (در صورت لزوم) رقیق کرده، بر روی رقت‌های به دست آمده، آزمایش‌های میکروبی زیر را انجام می‌دهیم.

شمارش کلی تعداد میکروب‌ها: برای این آزمایش از محیط دکستروز تریپتون آگار و شمارش پرگنه‌ها و یا از محیط دکستروز تریپتون برات و کاربرد جداول MPN استفاده می‌کنیم. طبق معمول سه سری لوله آزمایش پنج تایی انتخاب می‌کنیم. به ۵ تایی اول ۱۰ میلی لیتر، به ۵ تایی دوم ۱ میلی لیتر و به ۵ تایی سوم ۱/۱ میلی لیتر از رقت مورد نظر اضافه کرده، پلیت‌ها و لوله‌های آزمایش را به مدت سه روز در گرمخانه 32°C قرار می‌دهیم و پس از آن به شمارش میکروبی اقدام می‌کنیم.

۹-۶- جستجوی باکتری‌های بی‌هوازی

برای این آزمایش از محیط کشت تیوگیکلرات برات یا RCM استفاده کرده، پلیت‌ها و لوله‌های آزمایش را به مدت سه روز در شرایط بی‌هوازی و در دماهای 25°C و 37°C قرار می‌دهیم

۱- Dextros Trypton Agar or Broth

۲- Thioglycolate broth or Reinforced Clostridial Media (RCM)

۳- Epiphitic

۴- Total Count

و پس از سپری شدن زمان لازم، شمارش را انجام می‌دهیم.

جداسازی اسپرها: در مورد جداسازی اسپرترموفیل‌ها^۱ از رقت 10^{-1} استفاده نموده، دو لوله آزمایش دردار حاوی محیط کشت مناسب را تلقیح می‌کنیم و مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم 8°C قرار می‌دهیم و پس از طی این زمان، لوله‌ها را از حمام آب گرم خارج کرده، بسرعت سرد می‌کنیم و یک میلی‌لیتر از آن را در پلیت حاوی محیط کشت جامد یا لوله‌ی حاوی محیط کشت مایع ریخته، در گرمخانه با دمای 37°C قرار می‌دهیم. این آزمایش باید برای شرایط کشت بی‌هوازی تکرار شود. در مورد جداسازی اسپرترموذوریک‌ها^۲ لازم است نمونه را به مدت ۵ دقیقه در حمام آب گرم با دمای 100°C قرار داد و بلافاصله سرد کرد و مانند روش بالا مراحل بعدی را ادامه داد.

۱-۶-۹- جستجوی استافیلوکوک^۳ طلائی، کوآگولاز مثبت^۴: گونه‌های جنس استافیلوکوک، باکتری‌هایی هستند هوازی تا هوازی اختیاری بدون حرکت و دارای تجمع خوشه‌ای، توده‌ای، زنجیری کوتاه و کوسی شکل و گرم مثبت، که نقش بسیار مهمی در مسمومیت‌های غذایی دارند، زیرا قادرند سموم و آنتی‌بیوتیک‌های زیاد سنتز کرده، به‌وسیله‌ی آن‌ها سلامت مصرف‌کنندگان فرآورده‌های غذایی را به خطر بیندازند.

این باکتری‌ها بسادگی بر روی دست و دهان و بینی رشد کرده، جزو فلور طبیعی این اندام‌ها هستند و از این طریق وارد مواد غذایی می‌شوند. این باکتری‌ها همچنین در هوا، خاک، آب، دستگاه گوارش نیز ممکن است وجود داشته باشند.

مواد غذایی ممکن است از یکی از رده‌های بالا آلوده شوند و بنابراین در صنایع غذایی آزمایش مواد اولیه، فرآورده‌های نهایی، اندام‌های کارکنان و سطوح در تماس با مواد غذایی از نظر آلودگی به این باکتری‌ها دارای اهمیت است.

از طرفی به تجربه ثابت شده است که بیش از ۶۰٪ از کارکنان واحدهای تولیدی و به‌طور کلی بیش از ۶۰٪ مردم، در اندام‌های خود باکتری استافیلوکوک طلائی را به‌طور طبیعی دارا هستند. بنابراین، افراد آلوده به این باکتری اگر در برابر مواد غذایی سرفه یا عطسه کرده، یا به مواد غذایی و ظروف و وسایل دست بزنند از این راه موجب آلودگی و مسمومیت می‌شوند، بنابراین لازم است کارکنان واحدهای تولید از نظر آلودگی به این باکتری مورد آزمایش قرار گیرند، تا چنانچه اندام‌هایشان به این باکتری آلوده است از کار آن‌ها در محل‌هایی که تماس با مواد غذایی زیاد است جلوگیری شود.

۱- Thermo Phyl

۲- Thermoduric

۳- Staphylococcus aureus

۴- Bacteriological filter

به همین دلیل، لازم است، رده ساده‌ی تشخیص آلودگی اندام‌های کارکنان واحدهای تولیدی به این باکتری در دسترس و قابل اجرا باشد.

— جستجوی باکتری استافیلوکوک طلایی کوآگولاز مثبت در نقاط مختلف بدن

— مراحل انجام آزمایش: مراحل انجام آزمایش به شرح زیر است:

— محیط کشت اختصاصی رشد این باکتری برد پارکر^۱ است.

محیط کشت برد پارکر به صورت پودر آماده در دسترس است، که لازم است برابر دستور کارخانه سازنده آماده و سترون شود. هنگام کاربرد محیط سترون شده و زمانی که دمای آن حدود 45°C است باید مقداری امولسیون زرده‌ی تخم مرغ و تلوریت پتاسیوم^۲ به آن اضافه شود. برای تهیه امولسیون تخم مرغ لازم است به تعداد نیاز، تخم مرغ تازه و سالم را مدتی حدود یک ساعت در الکل قرار داد تا پوسته‌ی خارجی آن سترون شود، بعد تخم مرغ را از الکل خارج کرده، در معرض هوا یا نزدیک شعله با جای گرم قرار داد تا الکل باقیمانده بر روی پوسته تبخیر شود، سپس به وسیله‌ی پنس سترون انتهایی آن را سوراخ کرده، به آرامی سفیده آن را خارج نمود و زرده‌ی خالص را در ظرف مدرج سترون ریخت و معادل حجم آن، به آن سرم فیزیولوژی سترون اضافه نموده، به وسیله‌ی همزن شیشه‌ای یکنواخت کرد و به میزان ۵ درصد به محیط کشت آماده و سترون شده قبلی اضافه نمود.

همزمان برای تهیه محلول تلوریت پتاسیوم، لازم است یک گرم از آن را در شرایط عاری از آلودگی^۳ وزن نموده، به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر سترون اضافه کرد و به خوبی به هم زد تا به طور کامل حل شود. سپس محلول را از روی صافی جداکننده‌ی میکروب^۴ عبور داد تا سترون شود. این محلول تا زمان مصرف باید در یخچال نگهداری شود و هنگام مصرف به میزان یک درصد به محیط اضافه گردد. پس از آماده شدن، سترون شدن و اضافه شدن امولسیون زرده‌ی تخم مرغ و تلوریت پتاسیوم و یکنواخت شدن محیط کشت آن را به مقدار ۱۰ تا ۱۵ میلی لیتر در پلیت‌های سترون ریخته، پلیت‌های حاوی محیط کشت سفت شده را به شکل وارونه در سبدهای مخصوص قرار داده سپس جهت استریل در داخل اتوکلاو گذاشته می‌شود تا برای مراحل بعدی آماده گردد.

— با پنبه‌ی سترون دسته‌دار^۵ که در نوعی مایع رقیق‌کننده و از جمله لیتوس میلک^۶ یا آب پیتونه

خیس شده است، اندام مورد نظر برای جستجوی باکتری را مرطوب کرده، چند بار آرامی روی آن

۱- Baird Parker Agar

۲- Pottasium tellurite, Egg - yolk tellurite

۳- Aseptic technique

۴- Bacteriological filter

۵- Swab

۶- Litmus milk

می‌مالیم تا باکتری‌های چسبیده به پوست جدا شده، به پنبه بچسبند (در مورد پوست دست لازم است پیش از انجام آزمایش، دست با آب ولرم شسته شود تا بار آلودگی آن کم شود).

– پنبه‌ی دسته‌دار را که اکنون به باکتری‌های پوست دست آلوده شده، در شیشه‌ی درددار حاوی لیتموس‌میلک استریل انداخته، در شیشه را بخوبی می‌بندیم و چند بار بشدت تکان می‌دهیم، یا برای این منظور از دستگاه شیکر آزمایشگاهی استفاده می‌نماییم.

– پلیت‌های حاوی محیط کشت برد پارکر خشک شده به روش بالا را نشانه‌گذاری می‌نماییم.

– میکروب‌های جدا شده از پوست دست را تا 10^{-3} یا کمتر رقیق می‌کنیم.

– یک میلی‌لیتر از رقت‌های مورد نظر را روی محیط کشت برد پارکر ریخته، با میله‌ی شیشه‌ای ویژه، روی تمام سطح آگار به‌طور یکنواخت پخش می‌نماییم.

– پلیت‌های تلقیح شده را به‌صورت وارونه در اتو 37°C قرار می‌دهیم.

– پس از ۲۴ ساعت کلنی‌های تشکیل شده روی سطح آگار را شمارش می‌کنیم. کلنی‌های استافیلوکوک روی محیط بردپارکر به رنگ سیاه برآمده دارای حاشیه‌ی سفید نازک و اطراف روشن و پهن هستند. در برخی موارد به علت تغییرات امولسیون زرده‌ی تخم مرغ موجود در محیط، ممکن است اطراف کلنی‌ها به‌جای رنگ روشن دارای رنگ مات شود و نتیجه آزمایش را مشکوک نماید، بنابراین لازم است آزمایش کوآگولاز هم انجام گیرد تا نتیجه‌ی به‌دست آمده تأیید شود.

– آزمایش کوآگولاز: این آزمایش برای تشخیص باکتری استافیلوکوک طلائی که دارای قدرت بیماری‌زایی و سمومیت‌زایی شدیدتری است انجام می‌گیرد. روش انجام آن به‌ترتیب زیر است:

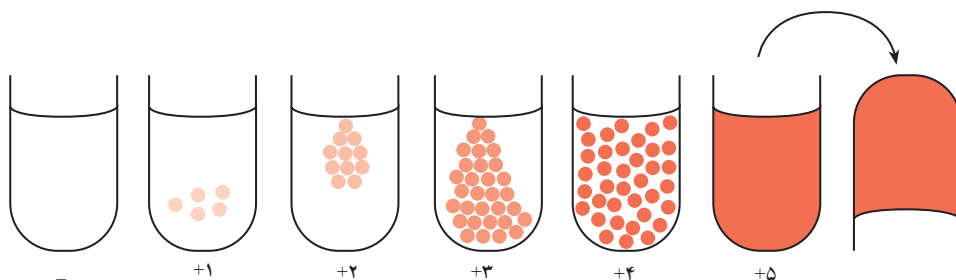
– کلنی‌های مجزا و مشکوک به استافیلوکوک کوآگولاز مثبت را به‌وسیله‌ی لوپ برداشته، به محیط کشت برین‌هات اینفیورژن برات^۱ آماده و سترون شده اضافه می‌کنیم و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه 37°C قرار می‌دهیم.

– $3/0$ میلی‌لیتر پلاسما‌ی خون خرگوش را در لوله‌های آزمایش کوتاه ویژه‌ی انجام این آزمایش می‌ریزیم.

– به لوله‌های آزمایش حاوی $3/0$ میلی‌لیتر پلاسما‌ی خون خرگوش، $1/0$ میلی‌لیتر از محیط کشت برین‌هات اینفیورژن برات اضافه کرده، در دمای 37°C – 35 قرار می‌دهیم.

– پس از ۴ ساعت لوله‌های آزمایش را مشاهده و نتیجه را گزارش می‌کنیم. نتیجه‌ی آزمایش

برحسب مقدار انعقاد در لوله و به شرح شکل بالا انجام می‌گیرد. بدیهی است آزمایش‌های مواد غذایی از نظر آلودگی به این باکتری با همین روش انجام می‌گیرد و تنها تفاوت، در آماده کردن نمونه‌هاست.



شکل ۱-۹

۹-۷- جستجو و شمارش سالمونلا^۱ در گوشت مرغ

گونه‌های سالمونلا در خانواده‌ی آنتروباکتریا^۲ سه قرار دارند، باکتری‌های این جنس گرم منفی، باسیلی‌شکل، بدون اسپر، هوازی و هوازی اختیاری و دارای حرکت هستند.

منشأ باکتری، دستگاه گوارش انسان و حیوانات به ویژه مرغ است. اما بر روی گیاهان هم زندگی می‌کند. دمای مناسب برای رشد آن‌ها حدود 37°C است اما دماهای $5/5$ تا 45°C را تحمل کرده، به رشد کند خود ادامه می‌دهد. سالمونلاها بیشتر از طریق آب آلوده، میوه‌ها و سبزی‌ها، گوشت طیور، گوشت قرمز، تخم مرغ، شیر و اندامهای کسانی که با مواد غذایی سر و کار دارند منتقل می‌شوند و موجب عفونت و مسمومیت می‌گردند، گونه‌های سالمونلا در شرایط نامساعد قادر به رشد نیستند اما در شرایط مناسب با میکروب‌های دیگر رقابت کرده، شرایط محیط را به نفع خود تغییر می‌دهند و سرعت رشد می‌کنند، در دمای بالا حساس هستند و در برابر دمای پاستوریزاسیون ظرف چند ثانیه نابود می‌شوند، اما اگر دما بخوبی به همه نقاط نرسد یا آلودگی دوباره رخ دهد امکان بروز و اشاعه‌ی عفونت‌ها و مسمومیت‌های مربوط به صورت همه‌گیر وجود دارد.

جستجوی سالمونلا در مواد غذایی، کار بسیار مشکلی است و با روش‌های ساده و سریع، عملی نیست. اگر میکروب مدتی را در شرایط نامساعد مانند دمای بالا، سرما، شوک، خشکی و مانند

۱- Salmonella

۲- Enterobacteriaceae

اینها به سر برده باشد، قبل از آزمایش لازم است چند بار در محیط‌های کشت تقویت کننده و غیراختصاصی کشت داده شود تا شرایط فیزیولوژیک طبیعی خود را به دست آورد. در هر صورت جستجوی سالمونلا در مواد غذایی دارای چند مرحله به شرح زیر است.

۱-۷-۹- مرحله‌ی پیش از غنی‌سازی: برای این منظور، ابتدا حدود ۲۵ گرم از نمونه مورد آزمایش را در یک ظرف سترون ریخته، ۲۲۵ میلی‌لیتر لاکتوز برات ۵/۰ درصد یا سرم فیزیولوژی و یا محلول آب پیتونه با فردار به آن اضافه می‌کنیم و ظرف حاوی نمونه را به مدت ۲۴ تا ۱۸ ساعت در گرمخانه $37 \pm 1^\circ\text{C}$ قرار می‌دهیم. بدیهی است چنانچه نمونه جامد باشد باید آن را در مخلوط‌کن سترون ریخته، یکنواخت نمود.

۲-۷-۹- مرحله‌ی غنی کردن: در این مرحله دو نمونه ۲۵ گرمی از ماده غذایی مورد آزمایش را به طریق بدون آلودگی وزن کرده، به ظرف شیشه‌ای دردار با ظرفیتی حدود 500° گرم منتقل می‌کنیم. سپس به یکی از آن‌ها ۲۲۵ میلی‌لیتر تتراتیونات برات^۱ و به دیگری همین مقدار سلنیت سیستئین برات^۲ اضافه می‌نماییم. اگر مقدار چربی نمونه زیاد باشد بهتر است ۶ میلی‌لیتر محلول 10% تریتول^۳ (سدیم هیتادسیل سولفات) به آن اضافه کنیم و پس از بستن در آن، محتویات بسته را بشدت به هم زده، به مدت ۲۴ ساعت در اتو $35 \pm 2^\circ\text{C}$ قرار دهیم. دمای مناسب برای این مرحله را برخی از محققان تا 43°C ذکر کرده‌اند. استفاده از محیط‌های غنی کننده‌ی اختصاصی و دمای بالا از رشد باکتری‌های رقیب جلوگیری و محیط را به نفع گونه‌های سالمونلا مساعد می‌کنند.

در صورت جامد بودن نمونه، لازم است از مخلوط‌کن و یکنواخت کننده‌ی مناسب با دور ۱۵۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰ استفاده شود.

۳-۷-۹- مرحله‌ی کشت روی پلیت: برای اجرای این مرحله یک لوپ^۴ پر از کشت مرحله بالا را برداشته، روی محیط‌های سالمونلا شینگلا آگار^۵، بیسموت سولفیت آگار^۶، بریان گرین آگار^۷ کشت می‌دهیم. به نحوی که در صورت حضور سالمونلا در قسمتی از پلیت کلنی‌های مجزا تشکیل شود. پلیت‌ها را به مدت ۲۲ تا ۲۴ ساعت در گرمخانه $35 \pm 1^\circ\text{C}$ قرار می‌دهیم. پرگنه‌های سالمونلا روی محیط کشت سالمونلا شینگلا آگار معمولاً بیرنگ است.

اما ممکن است پرگنه‌های قهوه‌ای روشن، صورتی روشن یا زرد هم تشکیل شود، پرگنه‌ها در

۱- Tetrathionate broth

۲- Selenit cystein broth

۳- Tergitol No.7

۴- Loop

۵- Salmonella Shigella Agar (SSA)

۶- Bismuth sulphite Agar (BSA) ۷- Brilliant green Agar (BGA)

شرایط نامساعد رشد و بعد از ۲۴ ساعت، حدود ۵ میلی لیتر یا بیشتر خطر دارند و مرکز آن‌ها ممکن است به رنگ تیره باشد. روی محیط بریان‌گرین آگار پرگنه‌های سالمونلا دارای رنگ صورتی یا قرمز شبیه رنگ فوشین هستند.

۴-۷-۹- مرحله‌ی تشخیص: برای تشخیص نهایی لازم است از هر یک از محیط‌های کشت BSA، SSA و BGA پنج پرگنه مشخص و مشکوک را از روی سطح آگار برداشته، در عمق و روی سطح محیط تریبل شوگرآیرون آگار^۱ که به صورت خوابیده در لوله آزمایش قرار دارد، کشت داد. و در گرمخانه $35 \pm 2^\circ\text{C}$ گذاشت. در صورت رشد سالمونلا در محیط TSI در قسمت شیب‌دار آن رنگ مایل به ارغوانی ایجاد می‌شود که مربوط به قلیایی شدن محیط است. در قسمت میانی محیط، بر اثر اسیدی شدن آن، رنگ زرد حاصل می‌شود. قسمت عمقی محیط هم به علت سنتز SH_2 تیره رنگ می‌شود. (پاره‌ای از گونه‌های سالمونلا SH_2 سنتز نمی‌کنند).

۵-۷-۹- مرحله‌ی تأیید: در این مرحله، ابتدا با مقداری از محیط TSI که باکتری روی آن رشد کرده، مقداری سرم فیزیولوژی یک سوسپانسیون میکروبی تهیه می‌کنیم و بعد آن را با یک قطره سرم بلی‌والان مخلوط کرده، با چشم غیرمسلح تشکیل یا تشکیل نشدن لخته و انعقاد را مشاهده می‌نماییم. برای این منظور، از درشت‌نمایی 10° تا 40° برابر هم می‌توان استفاده کرد و بهتر است یک لام شاهد هم تهیه شود.

برای تعیین سروتیپ‌های سالمونلا، مراحل تخصصی دیگری هم باید انجام شود که مربوط به سازمان‌های تخصصی مربوط است.

۸-۹- آزمایش میکروبی ماهی‌های آب شور

ماهی، از فسادپذیرترین مواد غذایی، و مسمومیت‌ها و عفونت‌های حاصل از مصرف ماهی آلوده و فاسد، از بزرگ‌ترین و شدیدترین عارضه‌های میکروبی است. آلودگی ماهی از راه‌های گوناگون مانند محیط زیست، ابزارهای صید، وسایل حمل و نقل و نگهداری، اندام‌های کارکنان و موارد مشابه انجام می‌گیرد، از طرفی pH ماهی، رطوبت آن و فعالیت‌های آنزیمی آن به گونه‌ای است که شرایط بسیار مناسبی برای رشد عوامل آلوده‌کننده ایجاد می‌کنند. به علت شوری آب دریا و پایین‌تر بودن دمای آب نسبت به ساحل، آلودگی‌های اولیه ماهی بیشتر از نوع باکتری‌های نمک‌دوست و سرمادوست است. بنابراین برای انجام آزمایش میکروبی، نیاز به تکنیک‌های ویژه است.

۱- Triple sugar Iron Agar (TSI)

۱-۸-۹- نمونه برداری و آماده کردن نمونه: نمونه برداری ممکن است از نقاط مختلف

بدن ماهی انجام گیرد، برای مثال، نمونه برداری از سطح بدن ماهی، به چند شکل زیر انجام می شود: یکی روش شست و شوی سطح بدن ماهی^۱ است که برای ماهی درسته با شکم خالی یا پرو با وزن کمتر از ۲ کیلوگرم یا فیله ماهی انجام می گیرد. برای این منظور ابتدا با ابزارهای مناسب پولک های ماهی را جدا کرده، نمونه را در کیسه ی نایلونی محکم و سترون قرار می دهیم و ۵۰۰ میلی لیتر محلول ۱/۱ درصد آب پیتونه سترون به آن اضافه نموده تا سرحد امکان هوای کیسه را خالی می کنیم. آن گاه، برای مدت دو دقیقه آن را بشدت ماساژ داده، تکان می دهیم. در این مرحله تمام سطح بدن ماهی باید ماساژ داده شود تا میکروب های تمام قسمت های سطح بدن ماهی جدا شود. پس از این عمل مایع رقیق کننده را به ظرف اولیه آن برگردانده، آن را تا ۱۰^{-۴} یا حد دلخواه رقیق می کنیم و مورد آزمایش های لازم قرار می دهیم.

در صورتی که هدف، جداسازی سالمونلا باشد لازم است به جای محلول رقیق کننده بالا از محلول رقیق کننده ی آب پیتونه ۱٪ با فرادار استفاده شود.

— روش نمونه برداری با پنبه سترون دسته دار^۲: در این روش یک پنبه سترون از جنس آلژینات کلسیم را در محلول رقیق کننده خیس کرده، بخوبی روی سطحی معادل ۱۰ سانتیمتر مربع از بدن ماهی بمالید. سپس پنبه ی دسته دار را وارد لوله ی آزمایش حاوی مایع رقیق کننده کرده، از حدود ۵/۰ سانتیمتری بالای قسمت پنبه پیچ شده بشکنید و پس از ورود آن به داخل محلول رقیق کننده، حدود ۵۰ بار آن را بشدت تکان دهید. (برای این منظور می توانید از تکان دهنده ی الکتریکی استفاده کنید.) بعد تا حد دلخواه رقیق می نمایم.

— نمونه برداری از گوشت عضله ماهی

روش اول: در این روش، قسمتی از سطح بدن ماهی را با صفحه ی فلزی داغ سترون نموده، ابعاد معینی از آن را (برای نمونه طول و عرض ۴ و عمق ۲ سانتی متر) بریده، وارد محلول رقیق کننده می کنیم و به وسیله ی مخلوط کن برقی آن را یکنواخت کرده، از آن نمونه برمی داریم.

روش دوم: در این روش، سطح بدن ماهی را به وسیله ی پنبه دسته دار خیس شده در الکل سترون کرده یا مقداری الکل روی آن ریخته، آتش می زنیم. بدین ترتیب بدون داغ شدن گوشت ماهی سطح آن سترون می شود. سپس قسمتی از آن را، به طول و عرض ۴ و عمق ۲ سانتی متر، بریده، داخل محلول رقیق کننده ریخته، به وسیله ی مخلوط کن برقی یکنواخت می کنیم. بدیهی است چنانچه شمارش

تعداد مطرح باشد، مقدار وزنی عضله زیر پوست و مقدار محلول رقیق کننده باید ۲۵ و ۲۲۵ میلی لیتر باشد و با روش‌های معمول رقت‌های لازم تهیه شود. محلول‌های رقیق کننده برای جست و جوی میکروارگانیسم‌های مختلف متفاوت است و به شرح زیر پیشنهاد می‌شود:

- برای جست و جوی سالمونلا محلول ۱٪ آب پیتونه با فردار
 - برای جست و جوی ویبریدپارا همولیتیکوس محلول ۳٪ کلوروسدیم
 - برای سایر موارد محلول ۱/۸ درصد آب پیتونه با فردار یا محلول رینگر
- ۲-۸-۹- آزمایش‌های لازم: شمارش میکروارگانیسم‌های سطح عضله، امعا و احشا، به تفکیک و روی محیط‌های خاص آن‌ها باید انجام شود.

- تعداد کل میکروب‌های زنده با استفاده از محیط کشت پلیت کانت آگار
- شمارش میکروب‌های تحمل کننده‌ی نمک^۱ با استفاده از محیط کشت پلیت گانت آگار به اضافه ۱۵٪ کلوروسدیم که برای این دسته از میکروارگانیسم محلول رقیق کننده هم محلول ۳٪ کلوروسدیم است.
- شمارش کلیفرم‌ها با استفاده از محیط کشت مک کونکی، لوریل تریپتون برات و روش Dilution tube count، مناسب تر است.

- جستجو و شمارش گونه‌ی استافیلوکوک طلائی با استفاده از محیط برد پارکر یا محیط‌های اختصاصی دیگر.

- جستجو و شمارش کلستریدیوم پرفرنژان یا ولشای با استفاده از محیط کشت تریپتوز سولفیت سیکلوسرین آگار دولایه، که در این مورد ابتدا یک لایه از محیط کشت حاوی امولسیون زرده تخم را در پلیت ریخته، سپس یک میلی لیتر از رقت مورد نظر را روی آن به طور یکنواخت پخش می‌کنیم و روی این قسمت یک لایه محیط کشت بدون امولسیون زرده تخم مرغ اضافه می‌کنیم و پلیت‌ها را در شرایط بی‌هوای مانند جار بی‌هوای قرار می‌دهیم و سرانجام جار حاوی پلیت‌های آماده شده به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه 37°C قرار داده، پس از طی این زمان پرگنه‌های حاصل را مشاهده می‌کنیم، پرگنه‌های کلستریدیوم ولشای روی این محیط به رنگ سیاه و با هاله سفید مات احاطه شده است.

در صورت دسترسی نداشتن به محیط بالا می‌توان از محیط تیوگلیکولات استفاده نمود. این محیط دارای تیوگلیکولات سدیم است که ماده‌ای است احیاکننده‌ی قوی، و اکسیژن محیط را جذب کرده، آن را بی‌هوای یا حداقل بی‌هوای اختیاری می‌کند که برای رشد باکتری مناسب است. دمای مناسب برای اتوگذاری پلیت‌ها و لوله‌های آزمایشگاهی ۵، ۱۵، ۲۵ و 37°C درجه سانتیگراد

برای رشد باکتری‌های سرما دوست، مزوفیل و گرمادوست است.

۹-۹-۹-۹ آزمایش میکروبی کمپوت و کنسرو

انجام آزمایش‌های میکروبی کمپوت‌ها و کنسروها، شامل مراحل زیر است:

۹-۹-۹-۱- اتوگذاری مقدماتی^۱: در این مرحله دو سری از نمونه‌ی قوطیهای کنسرو انتخاب

شده با روشهای آماری درست را برداشته، یک سری از آنها را به مدت یک هفته در دمای 37°C - 33 قرار می‌دهیم تا در صورت آلودگی احتمالی، میکروب‌ها رشد کرده، تعداد آنها به حد لازم برای شناسایی برسد. بدیهی است چنانچه نمونه قوطی‌ها متورم باشند نیازی به این مرحله نیست. (مگر اینکه علت تورم، وجود گاز میکروبی نباشد). سری دوم نمونه‌ها را لازم است برای آزمایش‌های تأییدی نگهداری نمود.

۹-۹-۹-۲- باز کردن قوطی‌های کنسرو به منظور انجام آزمایش‌های میکروبی: برای

این منظور، سری یا ته قوطی مورد نظر را با پنبه خیس شده در الکل سترون نموده، مقدار کمی (حدود ۱ میلی‌لیتر) الکل روی آن می‌ریزیم و پس از مدت کوتاهی آن را آتش می‌زنیم تا الکل تبخیر شود، سپس با درب بازکن دوار استریل، سوراخی با حداقل قطر بر روی در قوطی ایجاد نموده، چنانچه محتویات قوطی مایع است، به وسیله‌ی پیست سترون، مقداری از آن را برمی‌داریم و در صورت نیاز رقیق نموده، در غیر این صورت، به طور مستقیم به محیط کشت منتقل می‌نماییم.

چنانچه محتوای قوطی جامد باشد باید از قسمتهای مختلف آن نمونه برداری شود، به طوری که نمونه گزینش شده معرف خوبی از کل محتوای بسته باشد. در مواردی که آلودگی مشهود نیست حداقل ۲۵ گرم از نمونه باید با ماده رقیق کننده رقیق شده، رقت‌های بعدی از آن آماده شود.

۹-۹-۹-۳- باز کردن درب قوطی‌های باد کرده: در مورد قوطی‌های باد کرده، نمونه برداری

باید به صورت زیر انجام گیرد:

ابتدا یک تشت انتخاب نموده، مقداری آب حاوی مواد ضد عفونی کننده در آن می‌ریزیم بعد سطح قوطی مورد نظر برای آزمایش را به روش بالا سترون نموده، روی آن یک قیف سترون متناسب با قطر قوطی قرار می‌دهیم (قطر دهانه قیف باید بیشتر از قطر قوطی باشد). بعد از سوراخ قیف یک میله‌ی نوک تیز یا میخ نوک تیز سترون وارد کرده، به وسیله‌ی چکش یا ابزار مناسب دیگر روی در را سوراخ می‌کنیم تا گازهای قوطی خارج شود. در این مرحله، لازم است قوطی طوری نگه داشته شود

که محتوای آن از راه سوراخ قیف به بیرون پرت نشود و براحتی به داخل تشت بریزد. پس از این عمل، مانند روش بالا، بر روی در قوطی سوراخ کوچکی ایجاد نموده، از راه آن نمونه برداری را انجام می‌دهیم.

۴-۹-۹- آزمایش‌های پیشنهادی:

— **شمارش مستقیم میکروسکوپی:** آزمایش عمومی، برای انجام این آزمایش از شش سری محیط کشت دکستروز تریپتون آگار^۱ با معرف پرموکرازول ارغوانی استفاده کرده، پلیت‌های تلقیح شده^۲ را در دماهای C ۲۵-۲۲ و C ۳۷-۳۵ و C ۶۰-۵۵ به صورت هوازی و بی‌هوازی به مدت ۲۴-۳۶ ساعت در گرمخانه می‌گذاریم و پس از طی این مدت، پرگنه‌های تشکیل شده را مورد مراحل شناسایی بعدی قرار می‌دهیم.

— **شمارش و شناسایی اسپرها:** برای این آزمایش از دو سری از رقت‌های تهیه شده در لوله آزمایش دردار یا شیشه مک‌کارتی دریچی را یکی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای C ۸° و دیگری ۵ دقیقه در دمای C ۱۰° قرار می‌دهیم و پس از سرو نمودن تدریجی به محیط کشت اختصاصی منتقل می‌نماییم، همچنین برای اسپر گونه‌های کلستریدیوم^۳ از محیط^۴ SPS و برای گونه‌های باسیلوس از محیط تریپتون سوی برات^۵ استفاده می‌نماییم.

— برای جستجوی کلستریدیها از محیط‌های کشت آگار خون‌دار با توامیسن^۶ SPS، روبرتسون کودمیت^۷، لیور برات^۸، تیوگلیکولات برات^۹ و قرار دادن لوله‌ها و پلیت‌های تلقیح شده در شرایط بی‌هوازی استفاده می‌شود.

— برای جستجوی گونه‌های باسیلوس، از محیط کشت TSB استفاده می‌شود.
— برای جستجوی کلیفرم‌ها از محیط‌های لوریل تریپتون برات^{۱۰}، مک کانکی^{۱۱} یا وایولت رد بایل آگار^{۱۲} استفاده می‌شود.

— برای جستجوی مخمرها و کپک‌ها از محیط مالت اکستراکت آگار^{۱۳} یا محیط مایکولوژیکی^{۱۴} استفاده می‌شود.

۱- Dextrose trypton Agar	۲- Inoculated	۳- Clostridia
۴- Sulphit polymyxine sulphadiazin	۵- Trypton soy broth	۶- Blood Agar with Neomycine
۷- Robertson cooked Meat Media	۸- Liver broth	۹- Thioglycolate broth
۱۰- Lauryl trypton broth	۱۱- Mac. Conkey	۱۲- Violet Red bile Agar
۱۳- Malt Extract Agar	۱۴- Mycological Media	

خودآزمایی

- ۱- شمارش هر یک از موارد تعداد کل میکروب‌های زنده، کلیفرم‌ها، استرپتوکوک فعال و کلسترییدیوم پرفرتزان یا ولشای در آب، به چه منظور انجام می‌گیرد؟
- ۲- محاسن آزمایش احیای رنگ برای شناسایی وضعیت آلودگی شیر را بنویسید.
- ۳- آماده کردن نمونه باسیلوس سرئوس چگونه انجام می‌گیرد؟
- ۴- مجموعه‌ی میکروبی آرد را نام ببرید.
- ۵- جداسازی اسپرها در آزمایش میکروبی آرد چگونه انجام می‌شود؟
- ۶- مرحله غنی‌سازی در آزمایش سالمونلا را شرح دهید.
- ۷- نمونه برداری از بدن ماهی به چند طریق انجام می‌گیرد؟ توضیح دهید.
- ۸- نمونه برداری از قوطی‌های باد کرده چگونه انجام می‌شود؟

منابع و مآخذ

- ۱- اسماعیل خلیل، میکروبیولوژی عملی، چاپ فارابی، ۱۳۶۴.
- ۲- کریم گیتی، آزمون‌های میکروبی مواد غذایی، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۷۴.
- ۳- کازرونی تیمسار جهانگیر (ترجمه)، فعالیت میکروب‌ها (روش‌های آزمایشگاهی میکروبیولوژی عمومی)، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۵۸.
- ۴- روح بخش عباس و دیگران، کنترل بهداشتی مواد خوراکی (نمونه برداری، آزمایش، تفسیر)، انتشارات چهر، ۱۳۶۹.
- ۵- مرتضوی علی، اطلس میکروبیولوژی مواد غذایی، انتشارات گلنشر، ۱۳۷۱.

6_ Essays in Applied Microbiology

J. R Norris

M. H Richmond

1981

7_ MICROBIOLOGY IN HEALTH AND DISEASE

Forbisher and Fuerst's

1983

8 _ MICROBIOLOGY AND INFECTION DISEASE

BRIODY

1974

9_ BACTERIOLOGY

PRINCIPLES AND PRACTICE

H. BRYAN

A. BRYAN

G. BR YAN

1962

10_ MICROBIOLOGY MICHAEL J. PELCZAR . JR .

ROGERD . REID

1972

11_ THE MICROBES LECHEVALIER PRAMER

1971

۱۲- لوئیس بیشایر ۱۹۸۳ ترجمه شایسته سپهر و دیگران، ۱۳۷۱ خودآموز میکروبیولوژی
عملی مرکز نشر دانشگاهی شماره ۶۳۹.

۱۳- پایان رسول، کنسروسازی، انتشارات آبیژ، ویرایش سوم ۱۳۸۵.

۱۴- پایان رسول، مقدمه‌ای بر تکنولوژی فرآورده‌های غلات، انتشارات نوپردازان، ویرایش
سوم ۱۳۸۵.

۱۵- پایان رسول، مبانی کنترل کیفیت در صنایع غذایی، چاپ دوم، ویرایش سوم، انتشارات آبیژ.

۱۶- آل محمد، محمد مهدی، میکروبیولوژی عملی، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۶۵.

