فصل هشتم

آزمون‌های میکروبی مواد غذایی

معیارهای گزینش روش‌های آزمایشگاهی

انتخاب روش آزمون چه میکروبی و چه شیمیایی و فیزیکی به عوامل گوناگونی بستگی دارد که مهم ترین آنها عبارتند از :

✓ **دقت**[۱] : عبارت است از یکسان بودن داده‌های به دست آمده از چند اندازه‌گیری پشت سر هم که توسط یک پژوهشگر یا کارشناس انجام شده یا اندازه‌گیری‌های انجام شده توسط پژوهشگران مختلف با استفاده از یک روش یکسان یا یک ابزار یکسان

✓ **تکرارپذیری یافته‌ها**[۲] : توانایی دستیابی به پاسخ‌های مشابه توسط پژوهشگران یا کارشناسان آزمایشگاه‌های مختلف با استفاده از روش آزمون ثابت

✓ **صحت**[۳] : بیانگر میزان توانایی و صحت روش برای اندازه‌گیری آنچه قصد تعیین آن می‌رود می‌باشد؛

✓ **سادگی**[۴] : روش به نحوی که نیازی به دستگاه‌های پیچیده و گران قیمت یا تخصص‌های بالا نداشته باشد.

✓ **اقتصادی**[۵] **بودن روش** : و به عبارت دیگر پایین بودن هزینهٔ آزمون شامل محیط‌های کشت و مواد شیمیایی مصرفی و نیروی انسانی

✓ **سرعت عمل**[۶] : منظور زمان لازم برای انجام آزمون از ابتدا تا بدست آمدن نتیجهٔ تجزیه و تحلیل یافته‌هاست.

✓ **حساسیت**[۷] : عبارت است از تابعیت روش مورد استفاده در تشخیص و تعیین مقدار مواد یا تعداد میکروارگانیسم‌ها به مقدار کم یا تعداد کم

✓ **اختصاصی بودن روش**[۸] : عبارت است از توانایی تشخیص و تعیین مواد یا باکتری‌های ویژه درمجاورت مواد یا باکتری‌های مشابه بدون مداخلهٔ منفی

✓ **ایمنی**[۹] : کار با پاره‌ای از مواد شیمیایی میکروارگانیسم‌های بیماری زا یا عامل مسمومیت‌های غذایی برای هنرآموزان

۱ــ P ec s on

۲ــ Rep oduc b y

۳ــ Accu acy

۴ــ S mp c y

۵ــ Economy

۶ــ Speed

۷ــ Sens v y

۸ــ Spec f c y

۹ــ Safe y

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

✓ **رسمیت داشتن**[1] : عبارت است از پذیرفته شدن یا مورد تأیید بودن روش توسط سازمان‌های معتبر جهانی و ملی

مهم‌ترین سازمان‌های معتبر جهانی برای این منظور عبارتند از :

الف) کمیسیون جهانی تعیین ویژگی‌های میکروبی مواد غذایی

International Commission for Microbiological Specification of Foods

ب) کمیته ملی ــ مشورتی معیارهای میکروبی موادغذایی

National Advisory Committee for Microbiological Criteria for Foods, NACMCF

پ) سازمان جهانی استاندارد

International Standard Organization, ISO

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

و مهم‌ترین سازمان‌های ملی معتبر در این مورد :

الف) سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی وابسته به وزارت صنایع

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

۱ــ ۸ ــ آزمون‌های میکروبی آب

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

ــ باکتری‌های آبزی طبیعی

ــ باکتری‌های خاکزی

ــ باکتری‌های دستگاه گوارش انسان یا جانوران

بیشتر باکتری‌های ساکن آب، گرم منفی هستند مانند سودوموناس[2]، کروموباکتریوم[3]، پروتئوس[4]، آکروموباکتر[5]، استرپتوکوکوس[6]، آئروباکتر[7]، سایتوفاگا[8] و اسنتوباکتر[9]. البته باکتری‌های گرم مثبت مانند میکروکوکوس[10] و باسیلوس[11] نیز به تعداد کم در آب یافت می‌شوند.

۱ــ Off c a app ova

۲ــ Pseudomonas

۳ــ Ch omobac e um

۴ــ P o eus

۵ــ Ach omobac e

۶ــ S ep ococcus

۷ــ Ae obac e

۸ــ Cy ophaga

۹ــ Acene obac e

۱۰ــ M c ococcus

۱۱ــ Bac us

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

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

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

۱ــ۱ــ۸ ــ نمونه‌برداری : اولین مرحله، برای آزمون‌های میکروبی آب آشامیدنی نمونه برداری است. بنابراین هدف از این قسمت آشنایی با روش‌های معمول نمونه‌گیری آب است و هدف از نمونه گیری به دست آوردن قسمت کوچکی از آب است که باید نمایانگر ویژگی‌های واقعی منبع اصلی آن باشد و چند عامل به شرح زیر در آن دخالت دارد :

ــ مکان نمونه گیری

۱ــ Ind ca o

۲ــ Co fo m

۳ــ Esche ch a co

۴ــ S ep ococcus feca s

۵ــ C os d um pe f ngens

۶ــ Sa mone a

۷ــ Sh ge a

ـ زمان و تناوب نمونه گیری

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

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

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

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

ـ نمونه‌ها باید به گونه ای جمع آوری، بسته‌بندی و جا به جا شوند که پیش بینی و مراقبت‌های لازم جهت عدم تغییر در ترکیبات و ویژگی‌های آن تا مرحله اجرای آزمون‌ها صورت پذیرد.

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

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

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

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

نکته‌ها

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

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

✓ درپوش‌های فلزی ممکن است هنگام سترون سازی ظرف‌ها در اتوکلاو وآون، مواد سمی‌ایجاد کنند.

✓ بهتر است از بطری‌هایی که دارای درپوش پلاستیکی فشاری متصل به بطری هستند استفاده شود، زیرا نسبت به نشتی شدن مقاوم هستند و هنگام باز کردن درپوش، در متصل به بطری باقی مانده و ضمن نگهداشتن در و بطری با هم نیز از آلودگی محافظت می‌شود.

پ) ظرف‌های جابه جایی نمونه که جهت انجام آزمون‌های میکروبیولوژی به کار می‌روند باید ابتدا سترون شوند. در صورتی که بطری‌ها برای بار دوم مورد استفاده قرار می‌گیرند پس از تمیز کردن بطری شیشه‌ای و درپوش آن با استفاده از مواد پاک کننده لازم است آن را با آب مقطر آب‌کشی و سپس سترون نمود.

نکته‌ها

✓ درپوش بطری‌ها را باید هنگام اتوکلاو کردن شل بست ولی پس از سترون سازی آنها را محکم نمود. بطری‌های خالی را باید در آون با دمای خشک $170^{\circ}C$ به مدت ۱ ساعت قرار داده و سترون نمود.

✓ در صورتی که سترون سازی با هیچ یک از روش‌های بالا امکان‌پذیر نباشد، باید ظرف‌ها و درپوش آنها را با غوطه وری در آب در حال جوش به مدت ۳۰ دقیقه سالم‌سازی نمود و در کاغذ تمیز پیچید. برای ظرف‌هایی که با استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده

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

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

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

از نظر تئوری مقدار تیوسولفات سدیم لازم برای غیر فعال سازی یک میلی گرم کلر ۷/۱ میلی گرم است. بنابراین مقدار ۰/۱ میلی لیتر (دو قطره) از محلول تیوسولفات سدیم را به ظرف با گنجایش ۱۰۰ میلی لیتر اضافه می‌کنند. این مقدار باعث خنثی سازی حداقل ۵ــ۲ میلی گرم بر لیتر کلر باقی مانده می‌شود که برای بیشتر نمونه‌های آب کافی است.

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

- **وسیله‌های مورد نیاز در نمونه برداری از آب**

➢ شعلهٔ گاز

➢ بشر

➢ فندک، کبریت

➢ مارکر، قلم، برچسب

➢ آچار، آچار پیچ گوشتی، انبر دست و چاقو

➢ ظرف یخ یا قالب یخ، کیسهٔ یخ و بسته‌های یخ مصنوعی

➢ یخچال قابل حمل ونقل و یا وسیلهٔ نقلیهٔ یخچال‌دار

➢ دماسنج یا ثبت کنندهٔ دما

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

➢ انبرک یا گیرهٔ بلند یا وسیلهٔ نمونه برداری قابل تنظیم برای عمق‌های مختلف آب

➢ نقشهٔ محل نمونه برداری، فهرست نقاط نمونه برداری، برگهٔ نمونه برداری

➢ چکمهٔ ایمنی و ضد آب

➢ دستکش سترون

- **روش‌های نمونه گیری** :

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

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

نکته‌ها

✓ نمونه برداری باید در شرایط استریل و با دست تمیز و ضد عفونی شده و یا دستکش سترون انجام شود.

✓ هنگام پرکردن بطری، قسمت داخلی درپوش نباید با انگشت، دهان و زمین تماس حاصل کند. پس از نمونه‌گیری باید به سرعت درپوش بطری را بست.

✓ به منظور به دست آوردن یک نمونه نمایانگر ویژگی‌های اصلی منبع آب، شیر جریان آب را باید به مدت ۱تا۲ دقیقه باز کرد.

● ***آب در تصفیه خانه و مخازن ذخیره :***

ــ در مخازن ذخیره و تصفیه خانه‌ها، نمونه‌های خاص باید از شیرهای تعبیه شده در قسمت خروجی اصلی و سایر نقاط نمونه‌برداری شود. برای نمونه‌برداری از شیرهایی که قابل سترون‌سازی با شعله باشد، استفاده می‌شود.

جدول۱ــ ۸ ــ نمونه برداری از شیر برای اهداف مختلف

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

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

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

نکته‌ها

✓ شیر را باید به‌وسیلهٔ شعله گندزدایی کرد. پس از شعله دادن و باز کردن شیر، صدای ناشی از حرارت شنیده می‌شود. تنها زمانی که گرمادهی شیر امکان‌پذیر نیست، می‌توان از روش‌های دیگری برای گندزدایی استفاده نمود.

✓ برای گندزدایی دهانهٔ شیرهای پلاستیکی، پس از تمیز کردن کامل، باید آن را به مدت ۲ تا ۳ دقیقه در بشر دارای محلول هیپوکلریت، الکل یا ایزوپروپانول فرو برد.سپس شیر را باز کرده تا آب خارج شود و درجهٔ حرارت آب به حد ثابتی برسد. پس از آن باید با برداشتن درپوش، بطری را زیرجریان آب قرار داده و در شرایط اسپتیک آن را پرکرد.

✓ به عنوان روش جایگزین برای گندزدایی قسمت‌های خارجی و تا حد امکان قسمت‌های داخلی شیر از یک سواب یا یک بطری شیر دارای مواد شیمیایی سترون کننده یا وسیلهٔ مشابه استفاده نمود.

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

نکته‌ها

✓ از شیرهایی که چکه می‌کنند، نمونه برداری نمی‌شود.

✓ هنگام نمونه‌برداری هرگونه افشانک یا سایر اتصالات شیر باید از آن جدا شود.

✓ شیر باید بوسیله شعله گندزدایی شود.

✓ پس از گندزدایی، آب باید به اندازه‌ای جریان یابد تا هیچ‌گونه اثری از مادهٔ گندزدا باقی نماند. سپس بطری‌ها را بدون بستن و باز کردن دوبارهٔ شیر آب، زیر شیر قرارداده شود.

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

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

الف) آگاهی از کیفیت سفرهٔ آب زیرزمینی

ب) آگاهی از کیفیت آب داخل چاه

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

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

نکته‌ها

✓ برای نمونه برداری از چاه‌هایی که در آن پمپ دائمی‌نصب شده و دارای شیر یا خروجی فلزی هستند. بسته به هدف نمونه‌برداری پمپ کردن زیاد و گندزدایی شیر به‌وسیله شعله لازم است.

✓ پمپ کردن زیاد دست کم ۳ بار برای آب‌های زیرزمینی بدین معناست که پمپ‌کردن تا زمان تثبیت درجهٔ حرارت آب و هدایت الکتریکی انجام شود.

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

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

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

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

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

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

نکته‌ها

✓ بهتر است هنگام حمل و نقل، نمونه‌ها در دمای C °(۵±۳) نگهداری شوند. برای این منظور می‌توان از کیسه‌های یخ استفاده نمود.

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

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

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

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

✓ نمونهٔ آب‌های سرد وگرم باید به طور جداگانه جابه جا شوند.

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

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

الف) تعداد نمونه بر حسب جمعیت مصرف کننده : در این مورد تعداد نمونه برای آزمون باکتری‌های نشانگر آلودگی مدفوعی در شبکهٔ توزیع، تعداد نمونهٔ لازم با توجه به جمعیت مصرف کنندهٔ تحت پوشش مطابق با جدول ۲ــ ۸ تعیین می‌شود.

جدول ۲ــ ۸ ــ حداقل تعداد نمونه برای آزمون باکتری‌های نشانگر آلودگی مدفوعی در شبکهٔ توزیع

ردیف	جمعیت	تعداد نمونه در سال
۱	کمتر از ۵	۱۲
۲	۵ تا ۱	به ازای هر ۵ نفر ۱۲
۲	۱ ۱ تا ۵	به ازای هر ۱نفر۱۲به علاوه ۱۲ نمونه اضافی
۴	بیشتر از ۵	به ازای هر ۱ نفر به علاوه ۱۸ نمونه اضافی

گزینش روش آزمون میکروبی آب به عوامل زیادی مانند ویژگی‌های فیزیکی ــ شیمیایی نمونه آب وگونه میکروبی مورد جستجو در آب بستگی دارد.

نکته‌های مهم در مورد گزینش روش مناسب برای آزمون میکروبی آب

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

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

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

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

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

۲ــ۱ــ ۸ ــ آزمون شمارش کلی [۱] : هدف از انجام این آزمون ارزیابی وضع بهداشتی آب بوده و اگر تعداد میکروب‌ها از حد معین تجاوز کند آب غیر قابل شرب و مصرف در صنایع غذایی خواهد بود.

وسایل و مواد مورد نیاز

- لوله‌های آزمایش
- پی‌پت
- تشتک‌های یکبار مصرف
- محلول آب بافر پپتونه
- تشتک کانت آگار مذاب با دمای $45^{\circ}C$
- گرمخانه

روش کار

الف) ابتدا لوله‌های آزمایش را با شماره رقت‌های اعشاری از 10^{-1} تا 10^{-5} علامت گذاری کنید. سپس درون هر لوله آزمایش ۹ میلی لیتر محلول آب پپتونه ریخته و از نمونه آب مورد نظر در لوله‌های آزمایش رقت تهیه کنید.

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

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

ت) پس از سفت شدن محیط‌ها تشتک‌ها را در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ــ۲۴ ساعت قراردهید.

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

۱ــ To a coun

۳ــ۱ــ۸ ــ آزمون جستجو وشمارش کلی فرم‌ها در آب به روش چند لوله‌ای (آزمایش بیشترین تعداد احتمالی باکتری‌ها)[1] : همانطور که گفته شد گونه‌هایی آنتروباکتریاسه باکتری‌های گرم منفی روده‌ای هستند که به عنوان شاخص آلودگی در نظر گرفته می‌شوند. کلی فرم‌ها یکی از مهم‌ترین جنس‌های این خانواده باکتریایی هستند که قادرند قند لاکتوز را تخمیر کرده، اسید و گاز تولید کنند. به طور کلی همه باکتری‌های گرم منفی میله‌ای شکل، هوازی و بی‌هوازی اختیاری که قادر به تخمیر قند لاکتوز در دمای $37^{\circ}C$ در مدت ۴۸ ساعت هستند کلی فرم نامیده می‌شوند. محل طبیعی زندگی این باکتری‌ها در روده انسان و دام، خاک و آب است. محیط کشت مورد استفاده کلی فرم باید دارای قند لاکتوز باشد.

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

● **روش شمارش بیشترین تعداد احتمالی باکتری‌ها** : این روش یکی از راه‌های شمارش میکروارگانیسم‌های زنده موجود در مواد غذایی است. با این روش می‌توان گفت تعداد و تراکم میکروارگانیسم‌ها در یک ماده غذایی چه میزان است. روش MPN برپایه نظریه احتمالات بوده و فرض بر این است که میکروارگانیسم‌ها با یک توزیع یکنواخت و به‌طور اتفاقی در نمونه ماده غذایی پخش شده‌اند. این روش به ویژه برای آن گروه از مواد غذایی به کار می‌رود که احتمال وجود تعداد کمی‌میکروارگانیسم (کمتر از ۱۰ عدد در هر گرم) در آنها تخمین زده می‌شود. روش MPN بیشتر برای شمارش کلی فرم‌های آب، شیر و فرآورده‌های آن به کار می‌رود. به دلیل این که در مواد غذایی جامد امکان توزیع یکنواخت ارگانیسم‌ها بعید است، این روش کاربرد چندانی ندارد. به طور کلی روش MPN نسبت به روش‌هایی کشت که در فصل پیش گفته شد دقت کمتری دارد. در روش شمارش بیشترین تعداد احتمالی باکتری‌ها، حجم‌هایی از ماده غذایی به ۳ تا ۱۰ لوله آزمایش دارای محیط مایع منتقل می‌گردد. لوله‌ها در دمای $37^{\circ}C$ ــ۳۵ گرمخانه گذاری شده و پس از ۴۸ــ۲۴ ساعت نتیجه بررسی می‌شود. پس از تشخیص لوله‌های مثبت از روی کدورت یا تولید اسید و گاز در لوله‌ها، تعداد اولیه باکتری‌ها از روی جدول استاندارد MPN تعیین می‌شود.

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

محیط‌های کشت مورد استفاده در این آزمون :

الف) لوریل سولفات تریپتوز برات[2] : این محیط کشت دارای ترپیتوز به عنوان منبع نیتروژن، لاکتوز منبع کربوهیدرات و انرژی، بافر فسفات و نمک NaCl و لوریل سولفات است. محیط LST یک محیط کشت انتخابی و افتراقی است (براساس تعریف محیط‌های کشت در فصل سوم). واژه انتخابی به دلیل وجود لوریل سولفات است که از رشد باکتری‌های گرم مثبت جلوگیری می‌کند و واژه افتراقی به این دلیل برای محیط LST به کار می‌رود که تولید گاز در آن قابل تشخیص است (با لوله‌های دورهام).

ب) بریلیانت گرین بایل برات[3] : یا آبگوشت سبز درخشان این محیط دارای پپتن منبع ازت، لاکتوز منبع انرژی و بریلیانت گرین است و نوعی محیط کشت انتخابی و افتراقی است. انتخابی به دلیل وجود بریلیانت گرین که از رشد باکتری‌های گرم مثبت جلوگیری می‌کند و افتراقی به دلیل تشخیص تولید گاز توسط لوله‌های دورهام و تشخیص تولید اسید با تغییر رنگ محیط آبگوشت سبز درخشان (pH این محیط ۴ و رنگ آن سبز مایل به زرد است).

برای آزمون شمارش کلی‌فرم‌ها از روش MPN سه لوله‌ای استفاده کنید.

۱ــ Mos p obab e numbe (MPN)

۲ــ Lau y su fa e yp ose b o h (LST)

۳ــ B an g een b e b o h(BGB)

مواد و وسایل مورد نیاز

- لوله‌های آزمایش در پیچ دار با گنجایش ۱۰ میلی لیتر
- لوله‌های دورهام برای جمع آوری حباب گاز ایجاد شده در لوله آزمایش
- جا لوله‌ای
- پی‌پت‌های سترون شده ۱یا ۱۰ میلی لیتری
- یکی از محیط کشت‌های LST یاBGB
- گرمخانه با دمایC° ۳۷

روش کار

الف) برای نمونه برداری باید به میزان ۱۰۰ میلی لیتر از آب مورد نظر برداشته و در بطری سترون شده نگهداری کنید (به روش‌های نمونه برداری از آب در ابتدای همین فصل مراجعه شود).

ب) برای هر یک از رقت‌های 10^{0}، 10^{-1}، 10^{-2} و 10^{-3} تعداد ۳ لوله انتخاب کنید و درون همه لوله‌های آزمایش یک لوله دورهام به صورت وارونه قرار دهید (۳ لوله برای رقت 10^{0}، ۳ لوله برای رقت 10^{-1} و...) و روی هر لوله برچسب زده و شماره رقت مورد نظر را یادداشت کنید.

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

نکته‌ها

- ✓ برای رقت‌های بالاتر 10^{0}و 10^{-1} غلظت محیط کشت باید دو برابر تهیه شود. یعنی اگر روش تهیه محیط کشت ۲۴ گرم در ۱۰۰۰میلی لیتر آب مقطر است برای این دو رقت باید ۴۸ گرم در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شود.
- ✓ برای هر سری رقت از یک پی‌پت مجزا و سترون شده استفاده کنید.
- ✓ همه مراحل آزمون باید در کنار شعله و با فاصله ۳۰ سانتی‌متری از آن انجام شود.

ت) لوله‌های آماده شده با رقت‌های مورد نظر و حجم تلقیح شده نمونه آب را به صورت دربسته درون جا لوله‌ای قرار داده و در گرمخانه با دمای C° ۳۷ــ۳۵ به مدت ۴۸ــ۲۴ ساعت نگهداری کنید.

ث) پس از ۴۸ ساعت لوله‌ها را بررسی کرده و لوله‌هایی را که دارای کدورت (تیرگی در محیط کشت مایع درون لوله آزمایش) هستند، لوله‌هایی که دارای کدورت و همراه با تولید گاز در لوله‌های دورهام هستند و لوله‌هایی را که همراه با تولید اسید (به ویژه در محیط‌هایی که دارای معرف pH می‌باشند) از روی تغییر رنگ تشخیص داده و به عنوان نتیجه مثبت برای وجود کلی فرم‌های احتمالی در نظر بگیرید.

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

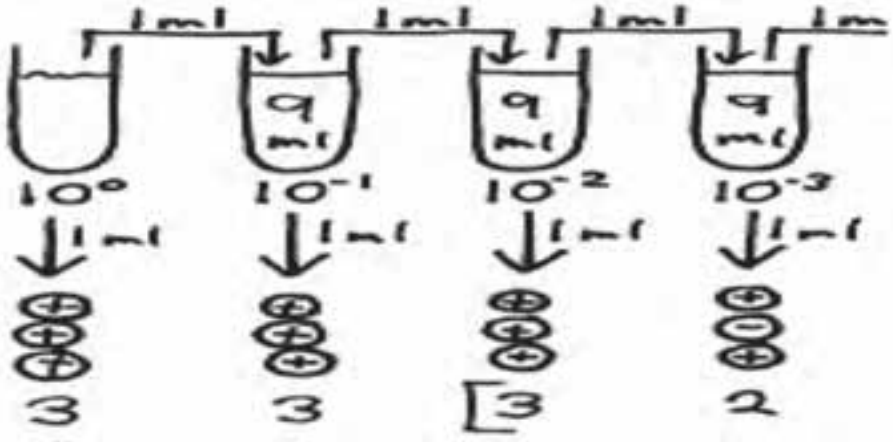
ج) تعداد لوله‌های مثبت در هر سری رقت یادداشت می‌شود. (بر طبق شکل ۱ــ۶)

یافته‌های آزمون MPN سه لوله‌ای باید با استفاده از جدول MPN سه لوله‌ای مربوطه انجام شود. (جدول ۴ــ۶)

نکته : جدول MPN براساس استاندارد سازمان FDA[1] یا سازمان غذا و داروی امریکا ارائه شده است و این جدول برای

۱ــ Food and D udg Adm n s a on

لوله‌هایی با مقادیر تلقیح شده ۰/۱ و ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ تنظیم شده است.



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

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

راهنمای انتخاب سه رقت مناسب : برای این منظور بالاترین رقت در تمام لوله‌های مثبت و دو رقت بالاتر بعدی انتخاب می‌شود. برای نمونه اگر تعداد لوله‌های مثبت از رقت 10^{0} (هر سه مثبت)،رقت 10^{-1} (هر سه مثبت)، رقت 10^{-2} (یکی از سه لوله مثبت) و رقت 10^{-3}(یکی از سه لوله مثبت) بود باید ترتیب ۱ــ۱ــ۳ در جدول MPN انتخاب شود.

➢ اگر دو رقت بالاتر در دسترس نباشد باید سه رقت پشت سرهم انتخاب شود. برای نمونه اگر در رقت‌های 10^{0}، 10^{-1} و 10^{-2} هر سه لوله مثبت باشد ودر رقت 10^{-3} یک لوله مثبت باشد باید ترتیب ۱ــ۳ــ۳ از جدول انتخاب شود.

➢ اگر هیچ رقتی مثبت نبود باید سه رقت پایین را به عنوان نتیجه مثبت در نظر گرفت.برای نمونه اگردررقت 10^{0}(همه منفی)،رقت 10^{-1} (یکی از سه لوله مثبت)ورقت 10^{-2}و 10^{-3}(همه لوله‌ها منفی) بود باید ترتیب ۰ــ۱ــ۰ از جدول انتخاب شود.

نکته : زمانی که تنها از رقت 10^{0}، 10^{-1} و 10^{-2} برای ترتیب جدول استفاده شود چون سری جدول بر اساس ۰/۱ و ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ است، تعداد MPN را در نهایت باید به عدد ۱۰ تقسیم نمود. ولی اگر از رقت‌های 10^{-1} و 10^{-2}و 10^{-3}برای ترتیب جدول استفاده شود خود عدد MPN به تنهایی به عنوان نتیجه استفاده می‌شود.

جدول ۳ــ ۸ ــ MPN سه لوله‌ای

NUMBER OF TUBES GIVING POSITIVE REACTION OUT OF			MIPN INDEX	95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS	
3 of 10 ml each	3 of 1 ml each	3 of 0 1 ml each	per 100 ml	LOWER	UPPER
0	0	1	3	<0 5	9
0	1	0	3	<0 5	13
1	0	0	4	<0 5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

۴ــ۱ــ۸ ــ آزمون تأیید وجود کلی فرم‌ها در آب : محیط کشت مورد استفاده در این آزمون محیط کشت لاکتوز برات[۱] است.

مواد و وسایل مورد نیاز

- حلقه کشت
- گرمخانه

۱ــ Lac ose b o h

➢ لوله آزمایش دارای محیط مایع لاکتوز برات

روش کار

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

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

ب) لوله‌های تلقیح شده را با استفاده از تکان دهنده[1] مخلوط کرده و در گرمخانه با دمای $37^{\circ}C$ ـ۳۵ به مدت ۴۸ـ۲۴ ساعت قرار دهید.

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

ت) یافته‌ها را به صورت تعدادکلی فرم‌ها در ۱۰۰ میلی لیتر نمونه آب و یا عدم آلودگی آب به کلی فرم در ۱۰۰ میلی لیتر نمونه آب ارائه دهید.

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

الف) محیط مک کانکی آگار[2] این محیط دارای رنگ کریستال ویوله برای جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم مثبت و املاح صفراوی برای جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم منفی غیر روده‌ای و یک محیط انتخابی و افتراقی است.

ب) محیط ویولت رد بایل آگار[3] این محیط دارای عصاره مخمر، پپتون، نمک‌های صفراوی، کلرید سدیم، لاکتوز و معرف قرمز خنثی و کریستال ویوله بوده و یک محیط انتخابی افتراقی محسوب می‌شود.

مواد و وسایل مورد نیاز

➢ تشتک‌های دارای یکی از محیط‌های کشت جامد بالا

➢ حلقه کشت

➢ گرمخانه با دمای $37^{\circ}C$

روش کار

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

ب) تشتک‌های کشت داده شده را درگرمخانه با دمای $37^{\circ}C$ به مدت ۴۸ ساعت نگهداری کنید.

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

مشخصات کلنی کلی فرم‌ها در محیط کشت‌های مک کانکی آگار و ویولت ردبایل آگار : کلی فرم‌ها به دلیل تخمیر قند لاکتوز، اسید تولید کرده که در حضور معرف قرمز خنثی کلنی آنها به همان رنگ قرمز مشاهده می‌شود. به علاوه کلنی کلی فرم‌ها مسطح با قطر ۲ـ۱ میلی متر است که معمولاً توسط هاله روشن ناشی از تجزیه و رسوب نمک‌های صفراوی احاطه شده است. (شکل۲ـ ۸)

شکل۲ـ۸ـ کلنی‌های سطحی،قرمز همراه با هاله روشن کلی فرم‌ها در محیط ویولت رد بایل آگار

۱ـ Shake ۲ـ Mac Conkey's Aga ۳ـ V o e ed b e aga

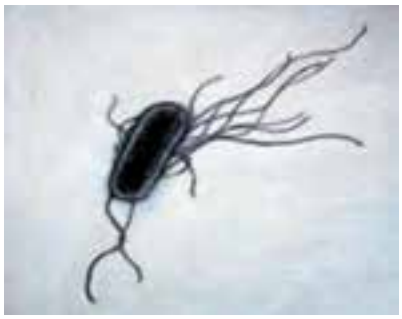
۵ــ۱ــ۸ــ آزمون جستجو و شمارش کلی فرم‌های مدفوعی[1] در آب : کلی فرم‌هایی هستند که در مدت ۲۴ ساعت در دمای C ° ۰/۵ ± ۴۴رشد کرده و اسید و گاز تولید می‌کنند. بنابراین دمای بالا برای جدا کردن کلی فرم‌هایی که منشأ مدفوعی دارند از آنهایی که منشأ مدفوعی ندارند به کار برده می‌شود.

محیط کشت‌های مورد استفاده در این آزمون : لوریل تریپتوز مانیتول برات[2] دارای تریپتوفان

روش کار

برای این آزمون پس از انجام آزمایش MPN که در پیش گفته شد، توسط حلقه کشت از لوله‌های واکنش مثبت در آزمون MPN برداشت کرده و به لوله دارای محیط کشت لوریل تریپتوز برات همراه با مانیتول و تریپتوفان منتقل کنید. سپس لوله‌های تلقیح شده را در گرمخانه با دمای C ° ۴۴ قرار داده و پس از ۲۴ ساعت از نظر تولید گاز بررسی و گزارش نمایید.

۶ــ۱ــ۸ــ آزمون جستجو و شمارش اشریشیاکلی در آب : محل طبیعی این باکتری در قسمت انتهایی روده حیوانات خون گرم است. باکتری میله‌ای شکل دارای تاژه که وجودش در آب نشانه آلودگی مدفوعی است.



شکل۳ــ۸ــ اشریشیا کلی

محیط‌های کشت استفاده شده در این آزمون :

ــ لوریل تریپتوز مانیتول برات دارای تریپتوفان

ــ محیط مایع MRVP

ــ محیط سیمون سیترات

روش کار

برای این آزمون با استفاده از حلقه کشت از لوله‌های مثبت آزمایش MPN نمونه برداشت کرده و به لوله‌های دارای محیط‌های کشت ذکر شده در این آزمون منتقل کنید. لوله‌های تلقیح شده را در گرمخانه با دمای C°۴۴ به مدت ۲۴ ساعت قرار داده و تولید گاز، اندول و نتیجه واکنش سیترات و MRVP را نیز بررسی و شمارش نمایید.

نتیجه کشت در محیط دارای تریپتوفان : کلی فرم‌هایی که تاحدودی مقاوم به گرما هستند و در مدت ۲۴ ساعت در دمای C°۴۴ گاز تولید کرده و با استفاده از تریپتوفان محیط، اندول تولید می‌کند که با معرف کواکس قابل مشاهده باشند اشریشیاکلی هستند. (به فصل پنجم مراجعه شود.)

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

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

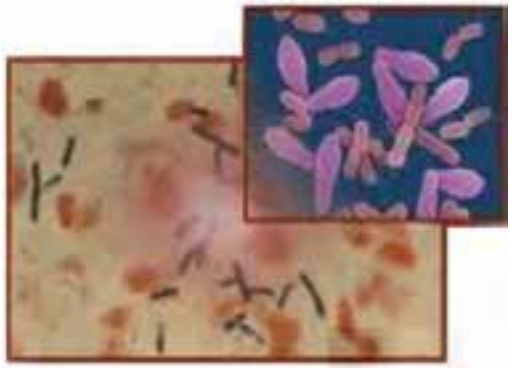
نکته : از روش‌های سریع نیز می‌توان برای تشخیص اشریشیا کلی در نمونه آب استفاده نمود.

۷ــ۱ــ ۸ ــ آزمون جستجو و شمارش کلستریدیوم پرفرانژانس(ولشای) در آب : کلستریدیوم ولشای باکتری میله‌ای، گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری، اسپوردار و بدون حرکت است که بومی لوله گوارش انسان و حیوانات بوده و در خاک و گرد و غبار نیز یافت می‌شود. در مشاهده میکروسکوپی اسپور این باکتری در مرکز یا نزدیک به انتهای سلول رویشی باکتری قرار دارد ولی باعث تورم در سلول باکتری نمی‌شود. اسپور باکتری دمای مرطوب C°۱۰۰ را حدود ۵ ساعت یا بیشتر تحمل

۱ــ Faeca co fo m

۲ــ Lau y T p ose Man o B o h

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



شکل ۴ــ ۸ ــ کلستریدیوم پرفرانژانس و اسپورنزدیک به انتهایی آن

مواد و وسایل مورد نیاز

- ظرف‌های سترون با گنجایش ۱ لیتر
- استوانه مدرج سترون شده
- حمام آب C ° ۸۰
- دماسنج
- شیر لیتموس دار[1]
- وازپار ذوب و سترون شده
- گرمخانه با دمای C ° ۳۷

نکته : وازپار مخلوط مساوی وازلین و پارافین مایع است.

روش کار

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

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

نکته : باید توجه کرد که شیر لیتموس دار باید در دمای C ° ۱۰۰ بخار داده شده و هوای آن خارج شود و به سرعت سرد و به ظرف افزوده شود.

پ) ظرف دارای نمونه آب و شیر لیتموس دار را به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب C ° ۸۰ قرار دهید.

نکته‌ها

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

✓ همزمان می‌توان ظرف مشابهی را که دارای ۶۰۰ میلی لیتر آب است همراه با یک دماسنج در حمام آب قرار داد تا دما کنترل شود.

ت) ظرف دارای نمونه و شیر لیتموس دار را سرد کرده و سطح مایع درون ظرف را با مخلوط وازپار ذوب و سترون شده بپوشانید و به مدت ۵ روز در دمای C ° ۳۷ گرمخانه گذاری کنید.

۱ــ L mus m k

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

بیشتر بدانیم

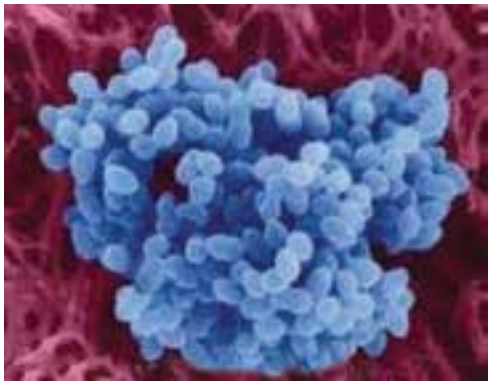
لخته طوفانی حالتی است که در محیط کشت و در اثر اسیدیته، لخته و گاز به‌وجود می‌آید (شکل ۵ــ ۸).

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

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

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

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



شکل۶ــ ۸ ــ استرپتوکوکوس فکالیس

محیط‌های کشت مورد استفاده در آزمون :

ــ محیط مایع گلوکز آزیدبارت[۳]

ــ محیط جامد اسکولین آزید اگار[۴]

۱ــ S o my c o

۲ــ S ep ococcus faeca s

۳ــ G ucose Az de b o h

۴ــ Aescu n Az de aga

مواد و وسایل مورد نیاز

- لوله‌های آزمایش سترون شده و در پیچ دار
- پی‌پت‌های سترون شده ۱و ۱۰ میلی لیتری
- گرمخانه با دمای C ° ۳۷

روش کار

الف) مانند روش تهیه رقت‌های متوالی گفته شده، برای هر یک از رقت‌های 10^{-1}، 10^{-2} و 10^{-3} تعداد ۳ لوله انتخاب کنید. این رقت‌ها باید درون لوله‌های آزمایش دارای محیط کشت مایع گلوکز آزید تهیه شوند.

نکته : برای مقادیر بیشتر از ۱ میلی لیتر (۳ رقت بالاتر) غلظت محیط باید دو برابر باشد.

ب) لوله‌های تلقیح شده با نمونه آب را در دمای C ° ۳۷ به مدت ۷۲ ساعت در گرمخانه گذارید.

پ) پس از این مدت هر ۲۴ ساعت یک بار لوله‌های مثبت را از نظر تغییر رنگ محیط مورد بررسی قرار دهید.

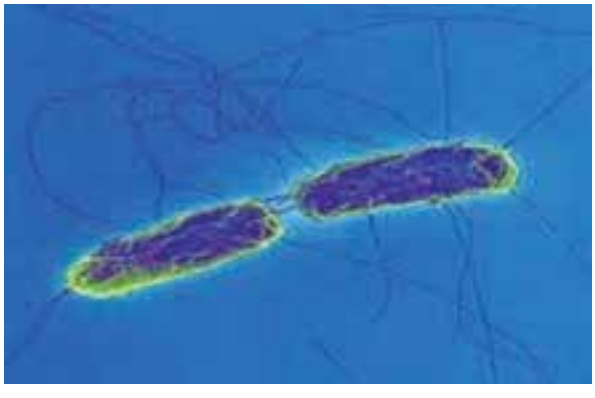
نکته‌ها

- ✓ استرپتوکوک‌های مدفوعی با تخمیر قند، گلوکز و اسید تولید می‌کنند که با تغییر رنگ محیط از ارغوانی به زرد مشخص می‌شود.
- ✓ تغییر رنگ می‌تواند در سراسر لوله یا فقط در قسمت انتهای لوله ایجاد شود.
- ✓ برای دقت بیشتر می‌توان لوله‌های واکنش منفی را برای مدت ۲۴ ساعت دیگر در دمای C ° ۳۷ قرار داده و پس از پایان این مدت حتی اگر تغییر رنگ ضعیفی مشاهده شود واکنش را باید مثبت در نظر گرفت.
- ✓ برای تفسیر یافته‌ها بهتر است از یک لوله شاهد استفاده شود.

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

مرحله تأیید : برای تأیید وجود استرپتوکوکوس فکالیس از لوله‌های مثبت پس از تکان دادن و یکنواخت کردن محتوی آنها یک حلقه کشت کامل برداشت کرده و روی محیط کشت جامد اسکولین آزید آگار به صورت خطی کشت دهید. تشتک‌های کشت‌شده را به مدت ۴۸ ساعت در دمای C ° ۴۴ گرمخانه گذاری کنید.

۹ــ۱ــ ۸ ــ آزمون جستجو و شمارش سالمونلا در آب : گونه‌های سالمونلا باکتری‌هایی هستند که به طورگسترده در تمام دنیا پراکنده می‌باشند. این میکروارگانیسم‌ها در گروه باکتری‌های بیماری‌زا طبقه‌بندی می‌شوند و گونه‌های مختلف آن، توانایی بیماری‌زایی متفاوتی دارند. میزبان طبیعی گونه‌های سالمونلا انسان، دام، حیوانات وحشی بویژه پرندگان می‌باشند. افراد آلوده به سالمونلا ممکن است بدون این‌که علائم بیماری را داشته باشند، این باکتری را به دیگران منتقل کنند، بنابراین حذف آنها از طبیعت در عمل غیر ممکن است. برخی از گونه‌های سالمونلا مانند سالمونلا تایفی می‌توانند در انسان بیماری حصبه ایجاد کنند. با در نظر گرفتن این که آب یکی از راه‌های انتقال این باکتری به انسان است، بنابر این وجود یا عدم وجود آنها در آب به طور منظم باید بررسی شود. گونه‌های سالمونلا ممکن است در آب‌های شیرین، آب‌های زیرزمینی، آب دریا و همچنین پساب وجود داشته باشند.



شکل۷ــ ۸ ــ سالمونلا

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

روش شناسایی سالمونلا براساس مراحل پی در پی زیر می‌باشد :

ـ پیش غنی‌سازی نمونه در محیط‌های کشت غنی کنندهٔ غیرانتخابی مایع

ـ غنی‌سازی در محیط‌های کشت غنی‌کنندهٔ انتخابی مایع

ـ شناسایی سالمونلا با استفاده از محیط‌های کشت جامد انتخابی

ـ تأیید سالمونلا با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی مناسب

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

محیط‌های کشت مورد استفاده در آزمون :

ـ ***آب پپتونه بافردار*** به عنوان محیط غنی کننده برای رشد اغلب سالمونلاها

ـ ***محیط کشت آبگوشت راپاپورت***[1]. این محیط دارای سویا، کلرید سدیم و پتاسیم هیدروژن فسفات و یک محیط مایع غنی‌کننده انتخابی برای گونه‌های سالمونلا است.

ـ ***محیط کشت انتخابی گزیلوز – لیزین ـ دزوکسی کولات آگار***[2] دارای گزیلوز، عصاره مخمر به عنوان منبع ازت، قندهای لاکتوز و ساکارز به عنوان منبع انرژی، کلرید سدیم و تیوسولفات سدیم و سیترات آمونیوم آهن سه ظرفیتی است.

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

مواد و وسایل مورد نیاز

- لوله‌های آزمایش دارای ۱۰ میلی لیتر محیط مایع راپاپورت سترون شده
- لوپ
- ظرف‌های سترون شده
- پی‌پت‌های سترون شده ۱میلی لیتری
- تشتک‌های دارای محیط کشت جامد انتخابی
- گرمخانه قابل تنظیم در دمای ۳۷°C و ۴۲ °C

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

روش کار

الف) مرحله پیش غنی سازی : مقدار ۱۰ میلی لیتر نمونه آب مورد آزمون را به ۵۰ میلی لیتر محلول آب پپتونه بافردار با غلظت دو برابر تلقیح کنید. سپس نمونه را در گرمخانه با دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت قرار دهید.

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

ب) مرحله غنی سازی انتخابی : پس از پایان گرمخانه‌گذاری نمونه در مرحله پیش، ۰/۱ میلی لیتر از آن را در شرایط سترون به لوله دارای ۱۰ میلی لیتر محیط راپاپورت اضافه کنید. سپس لوله تلقیح شده را در گرمخانه با دمای ۴۲°C به مدت ۲۴ ساعت قرار دهید.

۱ـ Rapapo b o h

۲ـ Xy ose ـ Lys ne Deoxycho a e Aga (XLD)

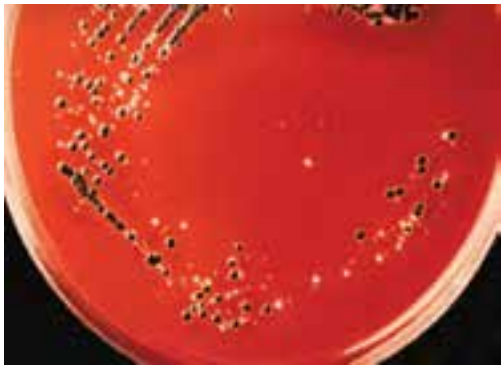
نکته : برای گونه‌های سالمونلا که رشدشان کند است، گرمخانه‌گذاری را می‌توان تا ۴۸ ساعت ادامه داد.

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

نکته : برای این مرحله می‌توان از محیط‌های کشت انتخابی دیگر مانند بیسموت سولفیت آگار ویا بریلیانت گرین آگار نیز استفاده نمود و همزمان بر روی این محیط‌ها نیز از نمونه مرحله پیش کشت خطی انجام داد.

پس از مدت زمان گرمخانه گذاری تشتک‌ها را از نظر ویژگی‌های کلنی سالمونلا بررسی کنید.

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



شکل ۸ــ ۸ ــ کلنی‌های سالمونلا در محیط XLD agar

ت) مرحله تأیید بیوشیمیایی : برای انجام آزمون‌های تأییدی سالمونلا، از کلنی‌های مشخص محیط کشت XLD agar انتخاب کنید و در محیط‌های SIM،TSI،سیمون سیترات و MRVP کشت دهید (روش‌های کشت در فصل ۴ به طور کامل شرح داده شده است).

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

۱۰ــ۱ــ ۸ ــ آزمون جستجو و شمارش قارچ‌ها در آب : قارچ‌ها که شامل مخمرها و گونه‌های رشته‌ای یا کپک‌ها هستند، ارگانیزم‌هایی هتروتروف و بدون کلروفیل می‌باشند که دارای دیواره سلولی سخت وهسته حقیقی بوده و بیشتر هوازی و یا میکروآئروفیل[۱] هستند. قارچ‌ها در همه‌جا پراکنده‌اند و در هر جایی که ماده آلی غیر زنده وجود دارد یافت می‌شوند. با توجه به ارتباط بین میزان توده قارچ و مواد آلی می‌توان قارچ‌ها را شاخص خوبی برای آلودگی آب در نظر گرفت ولی متأسفانه تاکنون هیچ گونه یا گونه‌هایی از قارچ‌ها که از این نظر اهمیت داشته باشند، شناخته نشده‌اند. وجود تعداد زیادی قارچ، نشانه وجود مقدار زیاد مواد آلی می‌باشد. در بررسی‌های انجام شده قارچ‌ها از آب آشامیدنی و نیز از سطح داخلی لوله‌های توزیع آب جدا شده‌اند. آنها در آب تصفیه شده باقی مانده و یا پس از فرآیند تصفیه وارد سیستم شده، در هر صورت اسپور قارچ‌ها قادرند مدت زمان طولانی زنده باقی بمانند. قارچ‌های بیماری زا در آب مقطر استریل برای مدت زمان زیادی زنده می‌مانند. گرچه مزه و بوی آب‌های آشامیدنی مربوط به وجود ارگانیزم‌های پروکاریوت مثل باکتری‌ها، اکتینومیست‌ها و سیانوباکترها است، ولی قارچ‌ها نیز باعث تغییر بو و مزه آب می‌شوند.

۱ــ M c oae oph e

محیط‌های مورد استفاده در این آزمون :

ـــ ***سابرو دکستروز اگار***[1] دارای پپتون و گلوکز است و برای جداسازی و شمارش کپک‌ها به کار می‌رود و فاقد آنتی بیوتیک است.

ـــ ***عصاره مخمر مالت گلوکز آگار***[2] این محیط دارای عصاره مخمر، مالت، گلوکز و پپتون است و برای جداسازی مخمرها به کار می‌رود.

الف) آزمون جداسازی و شمارش قارچ‌ها به روش پورپلیت

مواد و وسایل مورد نیاز

- ارلن با گنجایش ۲۵۰ میلی لیتر
- پی‌پت‌های سترون ۱ و ۱۰ میلی لیتری
- استوانه مدرج سترون شده
- تشتک‌های سترون
- یکی از محیط‌های کشت بالا به صورت ذوب شده
- گرمخانه

روش کار

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

نکته‌ها

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

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

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

ب) ارلن حاوی نمونه را روی هم زن با ۱۵۰ـ۱۲۰ دور در دقیقه به‌مدت نیم ساعت قرار دهید و یا محتویات آن‌را به یک مخلوط کن منتقل کرده و درپوش مخلوط کن را گذاشته و با سرعت کم به‌مدت یک دقیقه یا با سرعت زیاد به‌مدت ۳۰ ثانیه مخلوط کنید.

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

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

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

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

۱ـ Sab audex ose aga

۲ـ Ma g ucose aga

تشتک را در جهات مختلف بچرخانید تا به خوبی مخلوط شوند سپس بگذارید تا محیط جامد شود.

ج) تشتک‌ها را در دمای محیط (۲۴ــ۲۰ درجه سانتی گراد) قرار دهید و از تابش مستقیم نور خورشید به آنها جلوگیری نمایید. پس از مدت ۳ الی ۷ روز پرگنه‌ها را شمارش کنید.

نکته‌ها

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

✓ دمای مورد نیاز قارچ‌ها بر خلاف باکتری‌ها پایین‌تر و حدود C° ۳۰ــ۲۰ است.

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

چ) پس از مدت زمان مورد نظر رقتی را که حدود ۱۵۰ــ۲۰ پرگنه ایجاد می‌کند، انتخاب کنید.

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

ح) تعداد پرگنه‌ها در هر میلی لیتر نمونه آب را از فرمول زیر به دست آورید.

ضریب رقت × میانگین تعداد پرگنه‌ها در ۵ تشتک تعداد پرگنه

ب) آزمون جستجو و شمارش قارچ‌ها به روش کشت سطحی

مواد و وسایل مورد نیاز

- ارلن با گنجایش ۲۵۰ میلی لیتر
- استوانه مدرج
- پی‌پت‌های سترون ۱ میلی لیتری
- تشتک‌های دارای یکی از محیط‌های کشت ارائه شده در آزمون
- میله شیشه‌ای سر کج
- گرمخانه با دمای C° ۲۰

روش کار

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

ب) تشتک‌های دارای محیط کشت آزمون را به مدت ۱/۵ــ۱ ساعت زیر هود، بصورت در باز قرار دهید تا رطوبت اضافی آنها گرفته شود. سپس یک میلی لیتر از نمونه یا از رقت تهیه شده را توسط پی‌پت سترون به محیط انتقال داده و با میله شیشه‌ای سر کج یا L شکل سترون بطور یکنواخت روی محیط کشت پخش کنید.

پ) پس ازتلقیح بگذارید محیط کشت خشک شود، سپس آنها را بطور وارونه در گرمخانه با دمای ۲۰ درجه سلسیوس و رطوبت هوای بالا (۹۵٪ ــ ۹۰٪) به مدت ۷ــ ۵ روز قرار دهید.

نکته : قارچ‌های کند رشد ممکن است در عرض ۶ــ۷ روز پرگنه ایجاد نکنند و به زمان بیشتری نیاز داشته باشند.

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

نکته‌ها

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

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

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

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

۲ــ ۸ ــ آزمون‌های میکروبی شیر

شیر و فرآورده‌های آن از اجزای مهم تشکیل‌دهنده رژیم غذایی است که دارای پروتئین،چربی، لاکتوز، ویتامین‌ها و مواد معدنی همراه با آنزیم‌های طبیعی و دارای ارزش تغذیه‌ای بالایی است به همین دلیل محیط مناسبی برای رشد همه عوامل معمولی فساد می‌باشد. شیر خام به صورت طبیعی حتی با در نظر گرفتن میزان مراقبتی که در تهیه، نظافت دستگاه‌ها و وسایل حمل و نقل آن می‌شود دارای انواع میکروارگانیسم‌ها است. برای از بین بردن میکروب‌های عامل فساد و بیماری‌زا در شیر از روش‌های گرمایی مانند پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون استفاده می‌شود. تعیین بار میکروبی شیر مایع چه به صورت خام و چه به صورت پاستوریزه شده اهمیت زیادی دارد. مقدار زیادی از شیر به صورت فرایند شده مانند ماست و پنیر تهیه می‌شود و بار میکروبی اولیه شیر روی این محصولات نیز تأثیر می‌گذارد. به علاوه هر چه بار میکروبی شیر پس از مراحل پاستوریزاسیون کمتر باشد زمان نگهداری آن زیاد می‌شود وحتی به حدود ۶ ماه هم می‌رسد. روش‌های آزمون میکروبی شیر شامل آزمون‌هایی است که اطلاعات کلی را از نظر تعداد و فعالیت‌های میکروارگانیسم‌های موجود فراهم می‌کند. واضح است که شمارش میکروبی مورد انتظار یا مطلوب نمونه‌های شیر بستگی به میزان و نوع فرایند دارد. برای نمونه پس از پاستوریزاسیون شیر، شمارش کلی میکروبی نباید از 10^5 عدد در هر میلی لیتر بیشتر باشد و تعداد کلی‌فرم‌ها نیز باید کمتر از ۱۰ عدد در هر میلی لیتر باشد. برای کسب اطلاعات بیشتر به استانداردهای ملی مربوطه مراجعه شود.

واژه‌ها و تعریف عملی آنها :

● **شیر خام** : مایعی است حاصل از دوشیدن کامل پستان دام سالم حداقل ۴ روز پس از زایمان که در شرایط بهداشتی دوشیده شده و با اصول صحیح نگهداری شده باشد و آب یا ماده دیگری به آن اضافه یا از آن کسر نشده باشد. همچنین شیر خام باید فاقد آغوز[1] باشد و هیچ گونه عملیات فرآوری روی آن انجام نشده باشد. آغوز اولین مایع مترشحه از پستان گاو شیرده حداقل ۴ روز پس از زایمان است.

نکته‌ها

✓ شیر خام بلافاصله پس از دوشیدن باید خنک شود و در شرایط مناسب و دمای $4^{\circ}C$ نگهداری شود.

✓ شیر خام باید با دمای کمتر از $8^{\circ}C$ تحویل گرفته شود و یخ نزده باشد.

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

۱ــ Co es om

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

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

حد مجاز در میلی لیتر..... نوع میکروارگانیسم

$۵/۷\times۱۰^{۵}$..... باکتری‌های هوازی مزوفیل

کمتر از ۱۰..... کلی‌فرم‌ها

منفی..... اشریشیاکلی

روش‌های ارزیابی آلودگی میکروبی شیر عبارتند از :

۱ــ۲ــ ۸ ــ آزمون احیای متیلن بلو : یکی از آزمایش‌های تعیین کیفیت شیر که با آن تعداد باکتری‌های موجود در شیر خام تخمین زده می‌شود، آزمایش احیای متیلن بلو است. اساس این آزمون بر این است که باکتری‌های موجود در شیر در دمای مناسب به سرعت رشد کرده و اکسیژن محیط را مصرف کنند. در اثر مصرف اکسیژن، حالت شیمیایی محیط تغییر کرده و پتانسیل اکسیداسیون و احیاء پایین می‌آید. برای تخمین زدن میزان فعالیت باکتری‌ها، می‌توان رنگ متیلن بلو (شناساگر حالت اکسیداسیون و احیاء) به شیر اضافه کرد. این شناساگر در ابتدا رنگ آبی دارد. اما پس از مصرف شدن اکسیژن محیط توسط باکتری‌های موجود در شیر رنگ خود را از دست داده و بی‌رنگ می‌شود. به طور کلی، طول مدت احیاء با تعداد باکتری‌های موجود در شیر نسبت عکس دارد. یعنی هر چه تعداد باکتری‌ها زیاد تر باشد زمان کمتری برای تغییر رنگ متیلن بلو لازم است. برای تسریع رشد باکتری‌های موجود در شیر و کاهش طول مدت آزمون، پس از افزودن شناساگر، باید نمونه شیر را در دمای کنترل شده قرار داد.

مواد و وسایل مورد نیاز

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

ب) گرمخانه با دمای ۲۵ــ۲۰ درجه سانتی‌گراد

پ) لوله آزمایش حدود ۲۵ــ۲۰ میلی لیتری با در لاستیکی

ت) نمونهٔ شیر و نمونهٔ شاهد برای مقایسهٔ رنگ

روش کار

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

مزایای روش احیاء رنگ

ــ سرعت زیاد در رسیدن به پاسخ

ـ نیاز به کمترین فضا و امکانات
ـ امکان انجام آزمون برای تعداد زیادی نمونه به صورت همزمان

عیب‌های روش احیای رنگ

ـ در این روش نوع میکروب و بیماری‌زا بودن باکتری‌ها مشخص نمی‌باشد.
ـ یافته‌های آزمون تاحدی تابع دما، نور، نوع باکتری و مواد طبیعی احیاء کننده موجود در شیر می‌باشد.

نکته : به‌جای آزمون احیای متیلن‌بلو می‌توان از رنگ‌های دیگر مانند رزازورین و ۲،۳،۵تری فنیل تترازولیم کلراید هم استفاده نمود.

۲ـ۲ـ ۸ ـ آزمون شمارش باکتری‌های مقاوم به گرما در شیر (ترمودوریک[۱]) : در شیر خامی‌که چند روز در دمای یخچال نگهداری شود یک یا چند نوع از باکتری‌های زیر یافت می‌شود، استرپتوکوکوس[۲]، لوکونوستوک[۳]، لاکتوباسیلوس[۴]، میکروباکتریوم[۵]، پروپیونی‌باکتریوم[۶]، میکروکوکوس، کلی‌فرم، پروتئوس، سودموناس، باسیلوس. باکتری‌هایی که در دمای پایین قادر به رشد نیستند از نظر تعداد کم هستند.عمل پاستوریزاسیون تعداد همه باکتری‌های بالا غیر از ترمودوریک‌ها (از جمله استرپتوکوک‌ها و لاکتوباسیل‌ها) را کاهش می‌دهد.

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

باکتری‌های مقاوم به گرما : باکتری‌هایی هستند که پس از پاستوریزاسیون در دمای ۶۳/۵ °C به مدت ۳۰ دقیقه زنده می‌مانند و در شرایط مناسب رشد می‌کنند و پرگنه‌های قابل شمارش تشکیل می‌دهند.

مواد و وسایل مورد نیاز

- ظرف‌های شیشه‌ای درپوش‌دار سترون شده
- پی‌پت‌های سترون شده
- حمام بخار آب قابل تنظیم با دمای ۶۳/۵°C
- گرمخانه با دمای ۳۰ °C
- تشتک‌های خالی
- رقیق کننده پپتون نمک‌دار
- محیط کشت ذوب شده آگار شیردار[۷]

۱ـ The modu c
۲ـ S ep ococcus
۳ـ Leuconos oc
۴ـ Lac obac us
۵ـ M c obac e um
۶ـ P op on bac e um
۷ـ L mus M k Aga

روش کار

الف) ۱۰میلی‌لیتر نمونه شیرمورد آزمون را وارد یک ظرف شیشه ای سترون شده کنید و درپیچ آن را محکم ببندید.

ب) ظرف شیشه‌ای را به‌طور کامل در حمام آب با دمای C ° ۶۳/۵ غوطه‌ور کنید. بعد از ۳۵ دقیقه آن را خارج کرده و بلافاصله در آب با دمای C ° ۲۰ خنک کنید. نمونه‌های لخته شده را جدا و از مراحل آزمون خارج کنید. این امر را در گزارش آزمون وارد نمایید.

نکته‌ها

✓ برای اطمینان از این که تمام شیشه‌ها حداکثر به مدت ۵ دقیقه به دمای C ° ۶۳/۵ رسیده اند. روش زیر را به‌کار گیرید.

✓ دماسنجی با درجه‌بندیC ۰/۱ را از یک درپیچ سوراخ دار عبور دهید به نحوی که مخزن آن در نمونه غوطه‌ور شود و نشتی نداشته باشد. ده میلی‌لیتر آزمونه را به شیشه منتقل کنید و درپیچ حامل دماسنج را ببندید. سپس در حین انجام آزمون این شیشه را نیز در حمام آب غوطه‌ور سازید. به مدت رسیدن دما تا C ° ۶۳ توجه نمایید.

✓ اگر در مدت ۵ دقیقه دمای داخل شیشه‌ها به C ° ۶۳ نرسیده ممکن است به دلیل جابجایی ضعیف گرما در آنها باشد که در این صورت باید تعداد آنها را کم کرد، یا سرعت گردش و یا هم زدن آب را بیشتر کرد.

پ) بلافاصله بعد از خنک کردن نمونه، کشت پورپلیت (روش استاندارد) را انجام دهید. برای این منظور با پی‌پت سترون شده، ۱میلی لیتر از نمونه خنک شده را به تشتک اضافه کنید و محیط کشت ذوب شده آگار شیردار را روی آن بریزید. سپس تشتک‌های دارای نمونه و محیط ذوب شده را دوران دهید تا به خوبی مخلوط شود، سپس به حال خود بگذارید تا سفت شوند.

ت) تشتک‌های آماده شده را به مدت دو روز در دمای C ° ۳۰ گرمخانه گذاری کنید به مدت دو روز نگهداری کنید.

ث) پس از این مدت تعداد باکتری‌ها را با استفاده از فرمولCFU محاسبه نمایید ونتیجه را به عنوان تعداد باکتری‌های ترمودوریک به ازای هر گرم یا هر میلی لیتر نمونه گزارش کنید.

۳ــ۲ــ ۸ ــ آزمون شمارش کلی میکروبی شیر : از این آزمون برای تعیین بار میکروبی شیر استفاده می‌شود.

محیط‌های کشت مورد استفاده در آزمون :

ــ تشتک پلیت کانت اگار

ــ آگار مغذی

مواد و وسایل مورد نیاز

- تشتک‌های یکبار مصرف
- پی‌پت‌های سترون ۱میلی لیتری
- لوله‌های آزمایش برای تهیه رقت‌های پی‌درپی
- رقیق کننده رینگر
- یکی از محیط کشت‌های مورد استفاده در آزمون به حالت ذوب شده
- گرمخانه قابل تنظیم با دمای C ° ۳۰

روش کار

الف) ابتدا رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-5} از نمونه شیر مورد آزمون را در لوله‌های دارای ۹میلی لیتر رقیق کننده رینگر تهیه کنید. (براساس روش تهیه رقت‌های بعدی یا متوالی در فصل چهارم)

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

استاندارد در فصل چهارم)

پ) تشتک‌های کشت شده را به مدت ۴۸ــ۲۴ ساعت در دمای $30^{\circ}C$ قرار دهید.

نکته : برای شمارش باکتری‌های سرماگرا و مقاوم به گرما می‌توان کشت‌ها را به ترتیب به مدت ۷و۲روز در دمای $6^{\circ}C$ و $55^{\circ}C$ قرار داد.

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

۴ــ۲ــ۸ــ آزمون شمارش مستقیم میکروسکوپی در شیر : این روش در فصل ششم شرح داده شده است.

۵ــ۲ــ۸ــ آزمون شمارش کلی فرم‌ها : برای انجام این آزمون از روش ارائه شده در آزمون میکروبی آب استفاده کنید.

۶ــ۲ــ۸ــ شمارش اسپور مقاوم باکتری‌های هوازی (مزوفیل و مقاوم به گرما) :

الف) ۱ میلی لیتر از محلول تورنسل را به ۱۰۰ میلی لیتر آزمایه(نمونه مورد آزمون) اضافه کنید.

ب) ۹ شیشه در پیچ دار دارای ۹میلی لیتر شیر تورنسل دار آماده کنید و به هر یک از سه شیشه درپیچ دار سترون ۱۰ میلی لیتر و به سه شیشه دیگر ۱ میلی‌لیتر و به سه شیشه آخر ۰/۱ میلی لیتر از نمونه آماده شده بند الف را بیافزایید.

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

پ) درپیچ شیشه‌ها را محکم بسته و آنها را در اتوکلاو با دمای $100^{\circ}C$ یا آب در حال جوش به مدت ۳۰ دقیقه قرار دهید و سپس بگذارید خنک شوند.

ت) پس از خنک شدن، شیشه‌ها را به مدت ۱۴ روز در دمای $30^{\circ}C$ و به مدت ۷ روز در دمای $55^{\circ}C$ (برای مزوفیل‌ها) گرمخانه‌گذاری کنید.

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

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

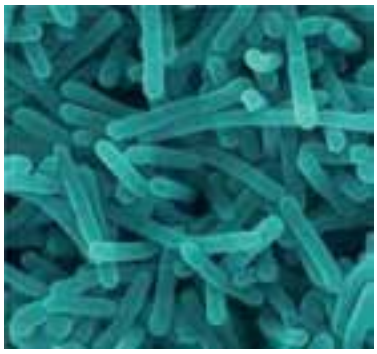
***روش رنگ‌آمیزی نیومن*[1] :** ابتدا یک قطره سرم فیزیولوژی بر روی لام قرار دهید و یک پرگنه را در آن پخش کرده و یک گستره میکروبی تهیه کنید و آن را در دمای ۵۰ درجه‌سانتی‌گراد در گرمخانه به مدت حدود ۵ دقیقه خشک کنید. سپس به مدت دو دقیقه گسترش‌ها را با رنگ نیومن رنگ‌آمیزی کنید. رنگ نیومن دارای متیلن بلو و تتراکلرواتان به عنوان حلال چربی است. پس از خنک شدن گستره‌ها در معرض هوا به ملایمت آنها را با آب شستشو دهید و آب اضافی را از روی لام خارج کنید، در هوا خشک کنید. سپس زیر میکروسکوپ مشاهده کنید.

ج) پس از بررسی شیشه‌ها از نظر کدورت و تعیین نمونه‌های مثبت با استفاده از جدول MPN اسپور باکتری‌ها (جدول۴ــ ۸، MPN) را برای شمارش تعداد اسپور هر گروه باکتری (مزوفیل و مقاوم به گرما) محاسبه کنید.

۱ــ Newman's S am

جدول ۴ــ ۸ ــ جدول استاندارد MPN اسپورها

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



شکل۹ــ ۸ ــ لیستریا مونوسایتوجنز

۷ــ۲ ــ ۸ ــ آزمون جستجوی لیستریا مونوسایتوجنز[1] در شیر : باکتری‌های جنس لیستریا شکل میله‌ای کوتاه به طول ۰/۴تا ۰/۵ و قطر ۵ ــ۲ میکرون با دو انتهای گرد و در بعضی موارد به صورت سلول‌های خمیده تکی یا زنجیره کوتاه و یا به شکل v دیده می‌شوند. طول رشته‌های آنها گاه ۲۰ــ۶ میکرون یا بیشتر می‌رسد. این باکتری‌ها قادربه رشد در دمای C ° ۴۳ــ C ° ۳۰ می‌باشند و pH مناسب رشد آنها نزدیک به خنثی است. باکتری میکروآئروفیل بوده و در شرایط هوازی نیز به خوبی رشد می‌کنند. گرم مثبت هستند اما در کشت‌های کهنه ممکن است تغییر رنگ دهند. پرگنه‌های این جنس درشرایط تابش نور به طور مایل به رنگ خاکستری مایل به آبی با درخشندگی عادی و جلای سبزآبی دیده می‌شوند.

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

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

با وجود گزارش‌های بحث انگیز در مورد مقاومت این باکتری به حرارت پاستوریزاسیون به‌نظرمی‌رسد که این باکتری به طور عادی نمی‌تواند در فرایند پاستوریزاسیون (۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۵ ثانیه) زنده بماند. جداسازی لیستریا از نمونه‌های غذایی نیاز به مراحل غنی سازی دارد.

محیط کشت‌های مورد استفاده در آزمون :

– آبگوشت غنی کننده لیستریا[2]

– آگار لیستریا مک براید[3]

– آگار تریپتیکاز سوی

مواد و وسایل مورد نیاز

- ظروف شیشه ای سترون شده با گنجایش ۳۰۰ میلی لیتر
- همزن یا مخلوط کن
- لوپ یا حلقه کشت
- لوله آزمایش برای تهیه رقت
- محیط‌های کشت گفته شده در بالا
- محلول ۰/۵ درصد هیدروکسید پتاسیم (رقیق کننده)
- گرمخانه قابل تنظیم با دمای C ° ۳۰ و C° ۳۵

۱ــ L s e a monocy ogenes s

۲ــ L s e a en chmen b o h

۳ــ L s e a Mc B de aga

روش کار

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

ب) مخلوط آماده شده را به مدت ۷ روز در گرمخانه با دمای $30^{\circ}C$ قرار دهید.

پ) یکبار پس از ۲۴ ساعت و بار دیگر پس از ۷ روز با استفاده از رقیق کننده ۰/۵ در صد هیدروکسید پتاسیم و نمونه غنی‌شده در مرحله پیش رقت 10^{-1} را تهیه کنید.

ت) از رقت تهیه شده با لوپ یک حلقه کامل برداشته و روی سطح مک براید آگار کشت دهید.

نکته : نمونه رقیق شده باید به سرعت کشت داده شود.

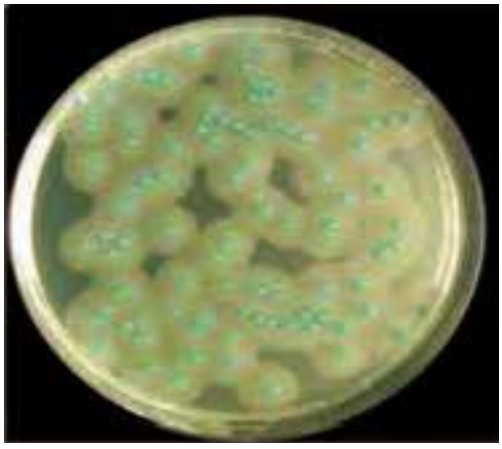
ث) تشتک‌های دارای محیط کشت شده را در شرایط هوازی به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه با دمای $35^{\circ}C$ قرار دهید.

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

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

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

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



شکل ۱۰ــ ۸ ــ پرگنه‌های لیستریا مونوسایتوجنز در محیط آگارغنی کننده لیستریا

۸ ــ۲ــ ۸ ــ آزمون جستجو و شمارش کپک‌ها و مخمرها در شیر : این آزمون را مانند آنچه در مورد آب گفته شد، انجام دهید.

۳ــ۸ ــ آزمون‌های میکروبی پنیر

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

نکته : وزن نمونه برداشت شده نباید از ۵۰ گرم کمتر باشد.

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

- **رقیق کننده‌ها :**

ــ محلول شیر لیتموس دار

ــ محلول سیترات سدیم ۲٪ : رقیق کننده مناسب‌تری است.

نکته : دمای این دو رقیق‌کننده هنگام رقیق‌کردن نمونه پنیر باید $45^{\circ}C$ باشد.

● **یکنواخت کردن :**

ــ همگن کردن یا یکنواخت کردن نمونه پنیر رقیق‌شده در دو رقیق‌کننده بالا با روش امولسیون‌کردن با دست یا استفاده از مخلوط‌کن الکتریکی انجام می‌شود.

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

● **رقت‌های پی‌درپی** : برای تهیه رقت‌های مورد نظر می‌توان از رقیق‌کننده آب پپتونه استفاده کرد.

آزمایش‌های میکروبی پنیر اغلب همانند آزمون‌های میکروبی در شیر است که به همان روش‌ها نیز انجام می‌شود مانند آزمون‌های با :

ــ جستجو و شمارش کلی‌فرم‌ها

ــ جستجو و شمارش اشریشیا کلی

ــ جستجو و شمارش کپک‌ها و مخمرها

ــ جستجو و شمارش باکتری‌های مقاوم به گرما (باسیلوس‌ها)

ــ جستجو و شمارش کلستریدیوم ولشای‌های مقاوم به گرما

۴ــ ۸ ــ آزمون‌های میکروبی شیر خشک

عوامل مهمی بر روی میکروفلور شیر خشک تأثیر می‌گذارد که مهم‌ترین آنها عبارتند از :

۱ــ فرآیند حرارتی که پیش از خشک کردن به شیر داده می‌شود.

۲ــ روش خشک کردن شیر

۳ــ آلودگی‌هایی که شیر از کارخانه کسب می‌کند.

در میان این میکروارگانیسم‌ها استافیلوکوکوس اورئوس مهم‌ترین باکتری از نظر بهداشت عمومی‌است که می‌تواند رشد کند و سمومی به نام‌های آنتروتوکسین و اگزوتوکسین تولید کند که دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد را برای مدت بیش از یک ساعت تحمل می‌کند. بنابراین در روش‌های پاستوریزاسیون و گرم کردن از بین نرفته و حدود ۱۲ ساعت بعد از مصرف موجب مسمومیت مصرف‌کننده با نشانه‌های اسهال، تهوع و بدون تب می‌شود، گرچه به صفر رساندن آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در غذاها مطلوب است اما در عمل این کار مقدور نیست و در بیشتر موارد تعدادی از آن در غذا وجود دارد.

نکته‌ها

✓ در طول نگهداری شیر خشک بار میکروبی آن کاهش می‌یابد به طوری که پس از یک سال بیشترین میزان رشد مربوط به باکتری‌های اسپوردار بی هوازی مانند کلستریدیوم‌ها است.

✓ بازسازی شیر خشک یعنی خارج کردن آن از حالت خشک و تبدیل آن به شیر مایع رقیق در انجام آزمون‌های میکروبی مهم است زیرا زمانی که شیر باز سازی می‌شود همه میکروب‌های زنده آن قادر به رشد می‌شوند.

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

● **رقیق کننده‌ها :**

ــ محلول رینگر $\frac{1}{4}$ غلظت

ــ محلول آب پپتونه ۰/۱۸٪

روش رقیق کردن شیر خشک برای آزمون‌های میکروبی

الف) در شرایط سترون مقدار ۱۰ گرم شیرخشک را وزن کرده و به یک ظرف دهان گشاد که دارای ۹۰ میلی لیتر آب مقطر سترون با دمای $50^{\circ}C$ است اضافه کنید تا همگن شود.

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

● **روش آزمون‌های میکروبی شیر خشک** : بیشتر آزمون‌های میکروبی شیر خشک مانند آزمون‌های میکروبی شیر است و مهم‌ترین آنها عبارتند از :

ـ آزمون مستقیم میکروسکوپی

ـ شمارش کلی میکروب‌ها

ـ شناسایی و شمارش کلی فرم‌ها و اشریشیاکلی

ـ شناسایی آلودگی‌های قارچی (کپک‌ها و مخمرها)

ـ جستجو، شناسایی و شمارش سالمونلاها

شناسایی و شمارش استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت در شیرخشک

محیط کشت‌های مورد استفاده در آزمون :

ـ ***برد پارکر آگار[1] همراه با زرده تخم مرغ:*** محیط کشت افتراقی ـ انتخابی برای تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس است که دارای تریپتون و عصاره گوشت به عنوان مواد مغذی، لیتیم کلرید و نمک تلوریت پتاسیم برای جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم منفی و زرده تخم مرغ برای شناسایی آنزیم لسیتیناز تولید شده توسط این باکتری است.

ـ ***مانیتول سالت آگار[2] :*** محیط کشت انتخابی است که دارای پپتون و عصاره گوشت به عنوان مواد مغذی، نمک طعام برای جلوگیری از رشد سایرمیکروارگانیسم‌ها و قند مانیتول است.

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

ـ ***پلاسما کواگولاز با اتیلن دی آمین ترا استیک اسید[3] :*** افزودن اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (EDTA) به عنوان آنتی کوآگولانت (ضد انعقاد) است.

نکته : پلاسمای خون خرگوش برای ساخت این محیط و برای تعیین قدرت تولید آنزیم کواگولاز وایجاد لخته در پلاسمای خون استفاده می‌شود.

مواد و وسایل مورد نیاز

- لوله‌های آزمایش برای تهیه رقت‌های اعشاری
- پی‌پت‌های سترون ۱ میلی‌لیتری
- تشتک‌های دارای یکی از دو محیط کشت برد پارکر آگار یا مانیتول سالت آگار
- گرمخانه قابل تنظیم با دمای $37^{\circ}C$

روش کار

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

۱ـ Ba d Pa ke Aga

۲ـ Mann o Sa Aga

۳ـ Coagu ase P asma W h EDTA

۹ میلی لیترآب مقطر تهیه کنید. (10^{-1} تا 10^{-5})

ب) برای هر رقت کشت سطحی بر روی دو پلیت انجام دهید (یکی از محیط کشت‌های گفته شده)

پ) تشتک‌های کشت شده را به مدت ۴۸ـ۲۴ ساعت در گرمخانه با دمای $37^{\circ}C$ قرار دهید.

ت) پس از این مدت کلنی‌های تشکیل شده را از نظر وجود استافیلوکوکوس اورئوس بررسی نمایید.

نتیجه : کلنی‌های استافیلوکوکوس اورئوس در محیط برد پارکر آگار به دلیل تجزیه نمک تلوریت پتاسیم و تولید ماده سیاه رنگ تلوریم سیاه رنگ و همراه با هاله رسوبی دور هر کلنی به دلیل تجزیه زرده تخم مرغ با آنزیم لیستیناز می‌باشند.

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

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

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

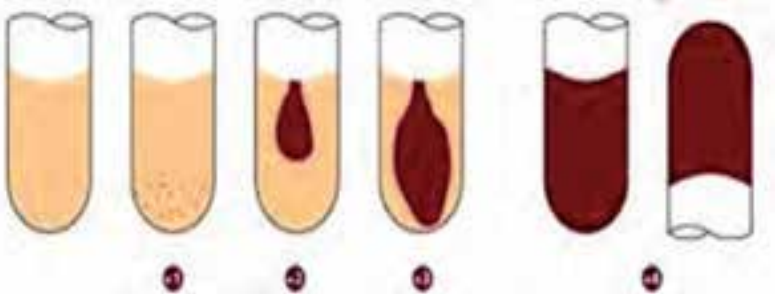
ب) روش آهسته :

ـ در یک لوله آزمایش ۰/۵ میلی لیتر از پلاسمای سیتراته خرگوش را که چهار بار رقیق شده اضافه کنید. سپس با حجم مساوی از محیط آبگوشت غذایی دارای کشت ۲۴ تا ۳۰ ساعته استافیلوکوکوس مورد آزمایش مخلوط کنید.

ـ در لوله دیگر ۰/۵ میلی لیتر پلاسمای سیتراته را به ۰/۵ میلی لیتر آبگوشت غذایی سترون بیفزایید (کنترل پلاسما به‌عنوان شاهد منفی) و ۱تا ۴ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ قرار دهید.

نکته : لوله‌های منفی را تا ۲۴ساعت در گرمخانه نگه داشته و سپس دوباره بررسی کنید.

ـ چنانچه استافیلوکوکوس کواگولاز مثبت بوده و آزمایش درست انجام شده باشد پلاسما در لوله محتوی میکروارگانیسم منعقد می‌شود ولی در لوله شاهد منفی پلاسما نباید منعقد گردد. وجود لخته‌های کوچک جدا از



شکل۱۲ـ ۸ ـ نمونه‌های تست مثبت و منفی کواگولاز در سرم سیتراته خون خرگوش

هم (۱) مثبت به‌حساب نیامده و با مراجعه به‌شکل ۱۲ــ ۸ حالات ۲ ۳ و ۴ مثبت بشمار می‌آیند.

۵ــ ۸ ــ آزمون‌های میکروبی فراورده‌های غلات

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

ویژگی‌های میکروبیولوژی آرد غلات

ویژگی / نوع فرآورده	گندم آرد، پوست‌کنده، بلغور	جو آرد،پوست کنده، بلغور	ذرت آرد، بلغور	آرد برنج
شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در گرم	حداکثر $۱^{۵}$	حداکثر ۵×۱^{۵}	حداکثر $۱^{۴}$	حداکثر $۱^{۵}$
کلی فرم‌ها در گرم	–	–	–	–
اشریشیاکلی در گرم	–	–	–	–
کلستریدیوم پرفرانژانس در گرم	حداکثر $۱^{۲}$	حداکثر $۱^{۲}$	حداکثر $۱^{۲}$	حداکثر $۱^{۲}$
باسیلوس سرئوس در گرم	–	–	–	حداکثر $۱^{۲}$
کپک‌ها در گرم	حداکثر ۵×۱^{۳}	حداکثر ۵×۱^{۳}	حداکثر ۵×۱^{۳}	حداکثر ۵×۱^{۳}

*** برای مواردی که به صورت ــ مشخص شده عدد نداریم**

۱ــ۵ــ ۸ ــ آزمون جستجو و شمارش باسیلوس سرئوس در برنج : باسیلوس سرئوس[۱] باکتری میله‌ای شکل گرم مثبت، اسپورزا، هوازی، بی‌هوازی اختیاری و مقاوم به آنتی بیوتیک پنی‌سیلین می‌باشد. این باکتری در طبیعت بطور گسترده‌ای پراکنده است. و از مواد غذایی گوناگون جدا می‌شود. باسیلوس سرئوس تا دمای $۴۸^{\circ}C$ قادر به رشد بوده و دمای مناسب رشد آن ۳۰ تا $۳۵^{\circ}C$ است.این باکتری آنتروتوکسین و آنزیم لسیتیناز تولید می‌کند و یکی از عوامل مسمومیت غذایی می‌باشد. مسمومیت غذایی ناشی از باسیلوس سرئوس هنگامی روی می‌دهد که موادغذایی پخته شده پیش از مصرف چند ساعت خارج ازیخچال نگهداری شوند. موادغذایی که تا به حال سبب مسمومیت با این باکتری شده‌اند، شامل گوشت پخته، سبزی‌ها، برنج پخته و سرخ شده، سس وانیل، سوپ‌ها و جوانه گیاهان خام می‌باشند. دو نوع بیماری در رابطه با مصر ف موادغذایی آلوده به باسیلوس سرئوس نسبت داده می‌شود. نوع اول و شناخته شده تر آن که با دردهای شکمی، اسهال و دوره

شکل۱۳ــ ۸ ــ باسیلوس سرئوس

۱ــ Bac us ce eus

نهفتگی ۴ تا ۶ ساعته مشخص می‌گردد و علائم آن ۱۲ تا ۲۴ ساعت به‌طول می‌انجامد و ناشی از مصرف شیر و لبنیات آلوده است نوع دوم با حملات حاد تهوع واستفراغ مشخص می‌گردد در زمان بین ۱ تا ۵ ساعت پس از مصرف غلات و برنج پخته آلوده رخ می‌دهد.

محیط‌های کشت مورد استفاده در آزمون محیط کشت کامل MYP آگار[1] : دارای محیط پایه مانیتول همراه با زرده تخم مرغ و آنتی بیوتیک پلی میکسین

مواد و وسایل مورد نیاز

- پی‌پت‌های ۱ میلی لیتری سترون شده
- لوله‌های شیشه‌ای سترون شده برای تهیه رقت‌های اعشاری
- تشتک‌های دارای محیط کشت MYP Agar
- رقیق کننده آب بافر پپتونه
- گرمخانه قابل تنظیم با دمای C ° ۳۰
- میله شیشه‌ای سرکج

روش کار

الف) ابتدا سوسپانسیون اولیه و آزمایه را تهیه کنید.

ب) در لوله‌های آزمایش دارای ۹ میلی لیتر رقیق کننده آب پپتونه با استفاده از نمونه آزمایه رقت‌های اعشاری آماده کنید. (10^{-1} تا 10^{-5})

پ) با استفاده از پی‌پت سترون ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت به دو پلیت محیط کشت MYP agar منتقل کنید و با میله شیشه‌ای سرکج آن‌را روی سطح محیط به خوبی پخش نمایید.(کشت سطحی)

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

ث) سپس پلیت‌های کشت شده را در گرمخانه با دمای C ° ۳۰ به مدت ۴۸ــ۲۴ ساعت قرار دهید.

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

ویژگی‌های پرگنه باسیلوس سرئوس در محیط MYP Agar :

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

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

ــ به دلیل تجزیه لسیتین زرده تخم مرغ با آنزیم لسیتیناز اطراف هر کلنی هاله رسوبی مشاهده می‌شود.

نکته :برای شمارش کلنی‌ها پلیت‌های دو رقت متوالی را که تعداد پرگنه‌های آنها ۱۵۰ــ۱۵ باشد شمارش کنید.

شکل۱۴ــ ۸ ــ پرگنه‌های صورتی همراه با هاله رسوبی باسیلوس سرئوس در محیط MYP Agar

---

۱ــ Mann o yo k po ym x n Aga