۶ ــ ۸ ــ آزمون اختصاصی جستجو و شمارش ویبریو پاراهمولیتیکوس[۱] در ماهی

شکل۱۵ــ ۸ ــ ویبریو پاراهمولیتیکوس با شکل خمیده و یک تاژه قطبی

ویبریو پاراهمولیتیکوس یکی از گونه‌های مهم جنس ویبریو می‌باشد که همگی باکتری‌های گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری هستند و با تاژه قطبی دارای حرکت می‌باشند. این باکتری‌ها در محیط‌های دریایی و آب‌های شیرین یافت می‌شوند و از مهم‌ترین ویژگی آنها رشد در مقادیر بالای نمک(NaCl)است. ویبریو پاراهمولیتیکوس بخشی از باکتری‌های ساکن طبیعی آبهای مصب رودخانه است که در طول ماه‌های زمستان در رسوبات پنهان شده و با گرم شدن آب، دوباره فعال شده و سخت‌پوستان و برخی از ماهیان را مورد حمله قرار می‌دهد و در بدن آنها تکثیر می‌کند. بنابراین بیشتر عفونت‌های مربوط به این باکتری با مصرف آبزیانی مانند ماهی، خرچنگ، میگو و صدف‌های خوراکی که یا به صورت خام مصرف می‌شوند و یا پس از پخت، آلوده شده‌اند صورت می‌گیرد. این باکتری نسبت به گرما حساس بوده و با پخت کامل ماده غذایی دریایی از بین می‌رود.

نکته : به دلیل این که ویبریو پاراهمولیتیکوس بیشتر در تعداد کم وجود دارد و بیشتر همراه با باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه (گرم منفی روده‌ای) در محیط‌های آب یافت می‌شود بنابراین برای جداسازی آن نیاز به دو مرحله غنی‌سازی در محیط‌های کشت انتخابی ضروری است.

مراحل جداسازی ویبریو پاراهمولیتیکوس :

۱ــ غنی‌سازی در محیط کشت انتخابی

۲ــ جداسازی و شناسایی

۳ــ مرحله تأیید

محیط کشت‌های مورد نیاز در آزمون :

ــ **آبگوشت غنی کننده آب پپتونه آلکالین نمکی (ASPW)**[۲] : این محیط به دلیل افزایش pH و مقادیر بالای نمک انتخابی شده است.

ــ **تیوسولفات سیترات بایل ساکارز آگار (TCBS)**[۳] : محیط کشت افتراقی انتخابی است. مواد انتخابی در محیط شامل سیترات سدیم، تیوسولفات سدیم است که pH قلیایی ایجاد کنید و از رشد کلی فرم‌ها و باکتری‌های گرم مثبت جلوگیری می‌نماید. تیوسولفات سدیم و سیترات فریک به عنوان معرف برای تعیین تولید H۲S عمل می‌کنند.

ــ **محیط کشت TSI**

ــ **اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC)**[۴] : محیط نمکی برای شناسایی

ــ **لیزین دکربوکسیلاز(LDC)**[۵] : محیط نمکی برای شناسایی

۱ــ V b o pa ahaemo y cus

۲ــ A ka n pep on wa e

۳ــ Th osu fa e c a e_b e sa suc ose aga

۴ــ L O n h ne deca boxy ase monohyd och o de

۵ــ L Lys ne deca boxy a on med um

ـ **آرژنین دهیدروکسیلاز (ADH)**[1] : محیط نمکی برای شناسایی

ـ **محیط تریپتوفان نمکی** : برای شناسایی اندول

ـ **محلول ONPG** [2] : برای شناسایی بتاگالاکتوزیداز

ـ **محیط کشت آگار مغذی نمکی** : همان اگار مغذی ولی همراه با کلرید سدیم ۳٪است.

معرف واکنش اکسیداز : **N,N,N,N** – تترامتیل ـ ρ ـ دی امین

مواد و وسایل مورد نیاز

- ظرف‌های شیشه‌ای سترون شده
- پی‌پت‌های سترون
- لوپ یا حلقه کشت
- سوزن کشت
- کاغذ صافی
- آب پپتونه آلکالین نمکی (ASPW)
- لوله دارای ۱۰ میلی لیتر آب پپتونه آلکالین نمکی
- پلیت دارای محیط کشت TCBS
- محلول کلرید سدیم ۳٪
- محیط کشت‌های مرحله تأییدی
- محیط کشت آگار مغذی نمکی
- معرف تولوئن
- گرمخانه قابل تنظیم با دمای C ۳۷° و C ۴۲°

روش کار

الف) مقدار ۲۵ گرم نمونه مورد نظر را با ۲۲۵میلی لیتر محیط غنی کننده آب پپتونه آلکالین نمکی دریک ظرف شیشه ای خوب مخلوط کنید.

نکته : تعداد ویبریو پاراهمولیتیکوس در دمای یخچال کاهش می‌یابد بنابراین سوسپانسیون اولیه را تا جایی که امکان دارد در این دما نگهداری نکنید در صورت ضرورت، تا حد امکان، زمان نگهداری را کوتاه کنید.

ب) سوسپانسیون آماده شده را در دما C ۴۲° به مدت ۶ ساعت گرمخانه گذاری کنید.

نکته : برای نمونه‌های فریز شده دمای گرمخانه گذاری C ۳۷° ولی برای نمونه‌های تازه و نمک زده شده دمای C ۴۲° مناسب است.

پ) پس از این مدت از سوسپانسیون نگهداری شده در گرمخانه ۱میلی‌لیتر با پی‌پت سترون برداشته و به لوله دارای ۱۰ میلی لیتر محیط ASPW اضافه نمایید.

ت) لوله تلقیح شده را در دمای C ۴۲° به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه گذاری کنید.

۱ـ A g n ne dehyd oxy ase

۲ـ **Ortho**ـN opheno ـ β ـD ـ ga ac opy anos de

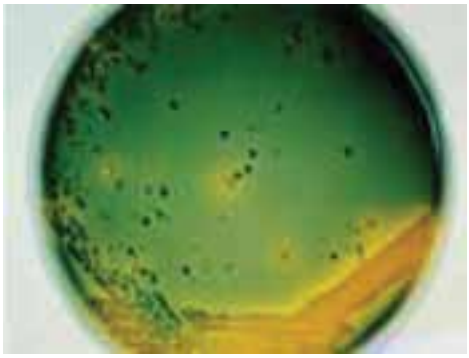
ث) پس از ۱۸ ساعت ابتدا لوله را به خوبی تکان داده و با لوپ یک حلقه کامل از محتویات داخل آن برداشته و بر روی سطح محیط کشت TCBS کشت دهید.

ج) پلیت‌های کشت شده را به صورت وارونه در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری کنید.

چ) پس از این مدت پرگنه‌های تشکیل شده را از نظر وجود ویبریو پاراهمولیتیکوس بررسی کنید و از پشت با ماژیک آنها را علامت بگذارید.

ح) از کلنی‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس با لوپ برداشت کرده و در محیط آگار مغذی کشت خطی انجام دهید و کشت‌ها را در گرمخانه با دمای $37^{\circ}C$ به مدت ۲۴ ساعت نگهداری نمایید.

مشخصات کلنی ویبریو پاراهمولیتیکوس در محیط TCBS آگار : پرگنه‌های ویبریو پارهمولیتیکوس در این محیط کروی و ۳ــ۲ میکرون قطر دارد و به رنگ سبز یا آبی دیده می‌شود در صورتی که کلنی‌های ویبریوکلرا در این محیط به دلیل تخمیر ساکارز زرد رنگ دیده می‌شود.

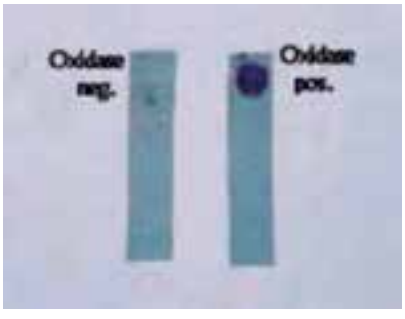


شکل۱۶ــ ۸ ــ پرگنه‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس(سبز) و ویبریو کلرا(زرد) در محیط TCBS

خ) از پرگنه‌های تک ویبریو پاراهمولیتیکوس در محیط آگار مغذی نمکی برداشت کرده و در محیط‌های مربوط به تست‌های بیوشیمیایی کشت دهید.

تست‌های بیوشیمیایی

ــ آزمون اکسیداز : با سوزن کشت از پرگنه ویبریو پاراهمولیتیکوس تشکیل شده در محیط آگار مغذی نمکی برداشته و روی کاغذ صافی آغشته شده به معرف اکسیداز تترامتیل ــ پارافنیل آمین کلراید بکشید. مشاهده رنگ ارغوانی پر رنگ پس از ۱۰ ثانیه نشان‌دهنده اکسیداز مثبت بودن واکنش است.



شکل۱۷ــ ۸ ــ نتیجه آزمون اکسیداز

ـ **تست TSI نمکی** : با سوزن کشت از پرگنه ویبریو پاراهمولیتیکوس برداشت کرده و در محیط TSI کشت دهید. (ابتدا در عمق محیط فرو برده و سپس در روی سطح مورب محیط به شکل زیگزاگ کشت دهید)

نتیجه کشت در محیط TSI نمکی: ویبریو پارا هموليتکوس درسطح شیبدار به دلیل عدم تجزیه لاکتوز یا ساکارز هیچ گونه تغییر رنگ، ایجاد نکرده، سطح محیط قرمز وعمق محیط کشت در اثر تولید اسید به رنگ زرد دیده می‌شود و به دلیل عدم تشکیل حباب و عدم تولید سولفید هیدروژن بدون گاز و به رنگ سیاه دیده نمی‌شود ولی ویبریو کلرا درسطح شیبدار به دلیل تجزیه لاکتوز یا ساکارز به رنگ زرد و عمق محیط کشت به رنگ زرد در اثر تولید اسید بدون حباب گاز و به علت تولید نشدن سولفید هیدروژن به رنگ سیاه دیده نمی‌شود.

ـ **آزمون اورنیتین دکربوکسیلاز** : با استفاده از لوپ از کلنی ویبریو پاراهمولیتیکوس برداشت کرده و در محیط اورنیتین دکربوکسیلاز کشت دهید و در دمای C ˚۳۷ به مدت ۲۴ ساعت نگهداری نمایید.

نتیجه :پس از این مدت گرمخانه‌گذاری پیدایش رنگ صورتی مایل به بنفش در محیط نشانگر مثبت بودن و پیدایش رنگ زرد نشانه منفی بودن واکنش است.

ـ **آزمون لیزین ـ دکربوکسیلاز** : با حلقه کشت سترون شده، از کلنی‌های مشخص برداشته و به عمق محیط تلقیح کنید. پس از افزودن یک میلی لیتر روغن معدنی استریل به محیط آن را در دمای C ˚۳۷ به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری کنید.

نتیجه : کدورت و ایجاد رنگ ارغوانی مایل به بنفش بعد از گرمخانه گذاری نشانگر واکنش مثبت و مشاهده رنگ زرد نشانگر واکنش منفی است.

ـ **آزمون هیدرولیز آرژنین دهیدروکسیلاز** : با استفاده از سوزن کشت بخشی از کلنی ویبریو پاراهمولیتیکوس را برداشته و به محیط آبگوشت نمکی منتقل کنید و سپس سطح محیط مایع را با روغن معدنی استریل بپوشانید و سپس آن را در گرمخانه با دمای C ˚۳۷ به مدت ۲۴ ساعت نگهداری کنید.

نتیجه : کدورت و ایجاد رنگ ارغوانی نشانه واکنش مثبت است ولی رنگ زرد نشانه واکنش منفی است.

ـ **آزمون بتاگالاکتوزیداز** : با استفاده از سوزن کشت مقداری از کلنی باکتری را برداشته و به لوله درپیچ دار دارای محلول کلرید سدیم تلقیح کنید. سپس یک قطره از معرف تولوئن را به لوله اضافه نمایید و به خوبی تکان دهید. سپس محیط را در حمام آب با دمای C ˚۳۷ قرار دهید و به مدت زمان ۵ دقیقه در آن نگه دارید. بعد از این مدت از محلول ONPG به لوله اضافه نموده و لوله را دوباره در دمای C ˚۳۷ به مدت ۲۴ ساعت قرار دهید.

نتیجه : ایجاد رنگ زرد در محیط نشانه واکنش مثبت است که کمتر از ۲۰ دقیقه ایجاد می‌شود و عدم مشاهده رنگ زرد پس از ۲۴ ساعت نشانه واکنش منفی است.

ـ **آزمون تحمل نمک** : با افزودن کلرید سدیم محیط کشت آب پپتونه با غلظت‌های ۰٪، ۲٪، ۴٪، ۶٪، ۸٪ و ۱۰٪ را تهیه کنید و از سوسپانسیون باکتری یک حلقه کامل توسط لوپ به لوله‌ها اضافه نمایید و لوله‌ها را در گرمخانه با دمای C ˚۳۷ به مدت ۲۴ ساعت نگهداری کنید و در این فاصله لوله‌ها را بررسی نمایید.

نتیجه : کدورت ایجاد شده در لوله‌ها نشانه رشد باکتری در غلظت نمک مربوطه است.

در جدول ۵ ـ ۸ نتیجه آزمون‌های بیوشیمیایی ویبریو پاراهمولیتیکوس و ویبریو کلرا با هم مقایسه شده است.

جدول ۵ ــ ۸ ــ یافته‌های تست‌های بیوشیمیایی ویبریوکلرا و ویبریو پاراهمولیتیکوس

آزمون	ویبریو کلرا	ویبریو پاراهمولیتیکوس
اکسیداز	+	+
تولید گاز از گلوکز		
لاکتوز		
ساکارز	+	
اورنیتین دکروکسیلاز	+	+
لیزین دکربوکسیلاز	+	+
آرژینین دهیدروکسیلاز		
بتاگالاکتوزیداز	+	
رشد در آب پپتونه با غلظت‌های :		
٪	+	د
٪۲	+	+
٪۶		+
٪۸		+
٪۱		

۷ــ ۸ ــ روش‌های شناسایی کپک‌ها و مخمرها در مواد غذایی

کپک‌ها[1] گونه‌هایی از قارچ‌ها هستند که به شکل چند سلولی و با تشکیل هیف[2] رشد می‌کنند. به هیف‌هایی که به هم تابیده می‌شوند و شکل کلنی کپک‌ها را می‌سازند میسلیوم[3] گفته می‌شود در صورتی که مخمرها[4] گونه‌های تک سلولی هستند. جمعیت زیادی از کپک‌ها وجود دارند که می‌توانند روی

شکل ۱۸ــ ۸ ــ نمونه‌ای از آلودگی میوه‌ها با کپک‌ها

۱ــ mou ds

۲ــ hyphe

۳ــ myce um

۴ــ yeas s

غلات، حبوبات و میوه‌ها پیش از برداشت و طی زمان نگهداری پس از برداشت، رشد کنند. غذایی در مواد فرآیند شده نیز ممکن است یافت شوند. برخی از کپک‌ها به دلیل تولید سموم قوی به نام مایکوتوکسین[1] و از جمله آفلاتوکسین که در برابر دما تا حدود ۳۰۰ درجه سیلسیوس مقاوم بوده و بنابر این طی فرآیندهای گرمایی مواد غذایی و پختن از بین نمی‌روند و مشکلات زیادی را از نظر ایمنی مصرف ایجاد می‌کنند.

بین باکتری‌ها، مخمرها و کپک‌ها تفاوت‌های عمده‌ای وجود دارد که شامل موارد زیر است :

ــ بیشتر مخمرها و کپک‌ها هوازی هستند، گونه‌هایی از مخمرها در شرایط هوازی اختیاری هم به خوبی رشد می‌کنند.

ــ نسبت به باکتری‌ها سرعت رشد کمتری دارند به همین دلیل طول مدت نگهداری آنها برای رشد ۵ تا ۱۳ روز است، در صورتی که رشد باکتری‌ها ۴۸ــ۲۴ ساعت طول می‌کشد.

ــ دامنه تحمل pH در آنها وسیع است (۹ــ۲)

ــ دمای مورد نیاز مخمرها و کپک‌ها برای رشد $25^{\circ}C$ــ۴ است در صورتی که بیشتر باکتری‌ها، غیر از سرمادوست‌ها، به دمای $37^{\circ}C$ برای رشد نیاز دارند.

– بیشتر کپک‌ها در محیط‌های با میزان آب ($aw < 85\%$) رشد می‌کنند.

برای رشد مخمرها و کپک‌ها محیط‌های کشت انتخابی و دمای پایین به منظور جلوگیری از رشد باکتری‌ها استفاده می‌شود.

برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها در محیط رشد مخمرها و کپک‌ها روش‌های زیر نیز به کار گرفته می‌شود :

الف) اضافه کردن برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها مانند کلرآمفنیکل[2] به میزان ۱۰۰میلی گرم به ازای هر لیتر یا جنتامایسین[3] به مقدار ۵۰ میلی گرم در لیتر.

ب) برای رشد کپک‌ها و مخمرها لازم است محیط‌های کشت اسیدی شوند. با افزودن اسید تارتاریک به محیط کشت پوتیتو دکستروزآگار[4] محیط اسیدی و برای رشد کپک‌ها مساعد می‌شود.

کپک‌ها با تولید اسپور تکثیر می‌کنند و روش تولید مثل آنها جنسی و یا غیر جنسی است. کلنی‌های کپک‌ها در محیط‌های کشت و در سطح مواد غذایی به گونه ای است که هیف و میسلیوم‌های سطحی آنها و اسپورشان در سطح قرار می‌گیرد و بقیه قسمت‌ها درون محیط یا داخل ماده غذایی، بنابراین ویژگی‌های کلنی کپک‌ها تا حدود زیادی به رنگ اسپور و ساختار میسلیوم بستگی دارد.

کپک‌های زیادی در مواد غذایی رشد می‌کنند و باعث فساد می‌شوند که برخی از آنها شامل آسپرژیلوس[5]، فوزاریوم[6]، موکور[7]، پنی سیلیوم[8]، ریزوپوس[9] و تریکودرما[10] هستند که در این فصل ساختار سلولی چهار کپک مهم به طور خلاصه ارائه می‌شود.

۱ــ myco ox ne

۲ــ Ch o amphen co

۳ــ Jen am c n

۴ــ Po a odex ose aga

۵ــ Aspe g us

۶ــ Fusa um

۷ــ Muco

۸ــ Pen c um

۹ــ Rh zopus

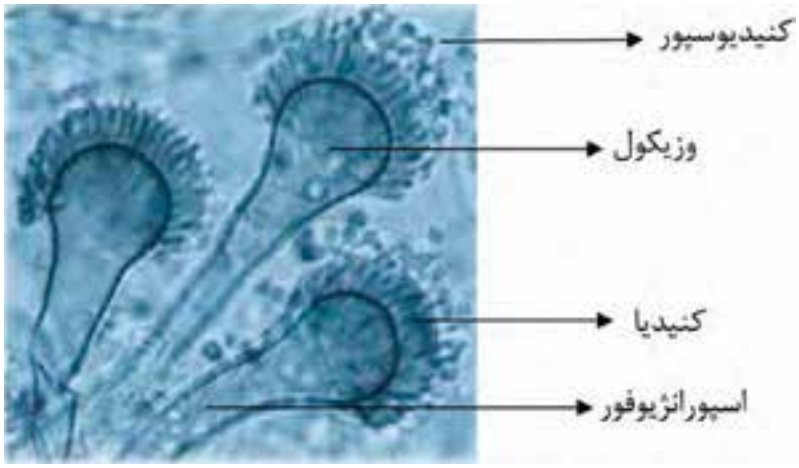
۱۰ــ T chode ma

شکل ۱۹ــ ۸ ــ پرگنه‌های برخی از گونه‌های آسپرژیلوس

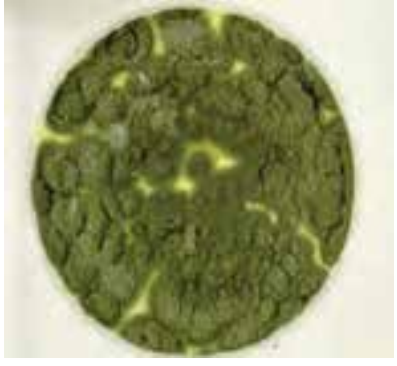
● **آسپرژیلوس** : گونه‌های آسپرژیلوس هوازی اجباری هستند و در محیط‌های غنی از اکسیژن یافت می‌شوند. بیشتر روی سطح مواد غذایی قادر به رشد هستند. گونه‌های آسپرژیلوس بیشتر در مواد غذایی نشاسته دار مانند نان و سیب زمینی رشد می‌کنند.

گونه آسپرژیلوس نیجر[۱] مهم ترین گونه آن است که در محیط کشت سابرو دکستروز آگار پرگنه‌های پرزی و سیاه رنگ تولید می‌کند. گونه‌های دیگر دارای پرگنه‌هایی به رنگ‌های مختلف مانند سبز،زرد و سفید هستند (شکل۱۹ــ ۸).

ساختار میکروسکوپی آسپرژیلوس : کپک آسپرژیلوس جزء کپک‌هایی است که هیف آن دارای دیواره عرضی و شاخه دار است وروی ساختارهای هوایی خود اندامک‌هایی به نام کنیدیوفور (هیف حامل کنیدی[۲]، کنیدیوسپورها[۳]) را می‌سازد. در انتهای هیف حامل کنیدی که شاخه‌ها قرار دارند دارای یک ساختمان بر آمده به نام ستونک است و در ابتدای هیف سلول پایه دارد.



شکل ۲۰ــ ۸ ــ ساختمان میکروسکوپی کپک آسپرژیلوس



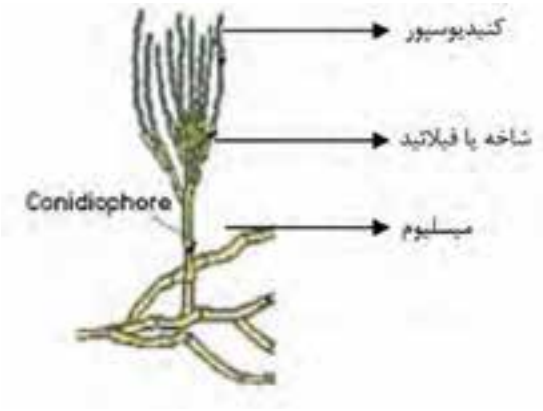
پنی سیلیوم : یکی از مهم‌ترین گونه‌های کپک‌ها در محیط‌های طبیعی است که رنگ پرگنه‌های آن به دلیل رنگ سبز کنیدیوسپورها بیشتر سبز رنگ است(شکل ۲۱ــ ۸). Penicillium notatum (تولید کننده پنی‌سیلین) و Penicillium camemberti در تولید نوعی پنیر به نام پنیر کاممبرت به کار می‌رود.

شکل ۲۱ــ ۸ ــ پرگنه‌های سبز رنگ کپک پنی‌سیلیوم

۱ــ Aspe g us n ge

۲ــ Con d opho e

۳ــ Con d ospo e

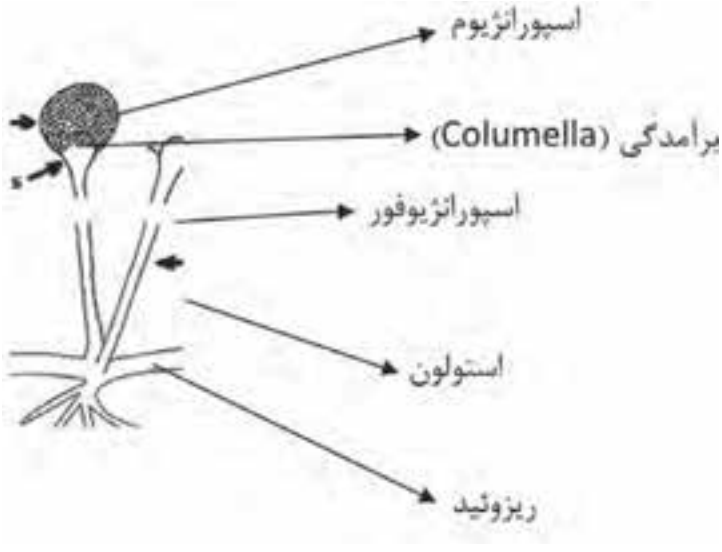


شکل ۲۲ــ ۸ ــ ساختار کپک پنی‌سیلیوم

ساختار پنی سیلیوم: میسلیوم این کپک به طور معمول از شبکه‌های منشعب تشکیل شده است و هیف آن دارای دیواره عرضی است. مانند آسپرژیلوس دارای کنیدیوفور و کنیدیوسپور است.اما وزیکول یا برآمدگی نداشته در نتیجه شکل گرز مانند آسپرژیلوس را ندارد و شکلی شبیه به جاروهای دسته بلند دارد (شکل۲۲ــ ۸).

- **ریزوپوس:** ریزوپوس یکی از کپک‌های غیر بیماری‌زا برای انسان (ساپروفیت) است که از باقیمانده‌های گیاهان و جانوران تغذیه می‌کند و روی بسیاری از ترکیبات آلی به ویژه مواد غذایی مانند سبزی‌ها و میوه‌ها و نان قادر به رشد است. این کپک به روش تکثیر جنسی و غیرجنسی تولید مثل می‌کند. گونه‌های مختلفی از این کپک عامل فساد در مواد غذایی هستند مانند Rhysopus nigricans که کپک شایع در نان است وstolonifer Rhysopus کپک سیاه نان و سیب زمینی و گوجه فرنگی است. پرگنه‌های ریزوپوس در محیط کشت دارای رنگ خاکستری و پشمی‌می‌باشد که کل تشتک را پر می‌کند؛ زیرا رشد میسلیوم آن خیلی سریع است.

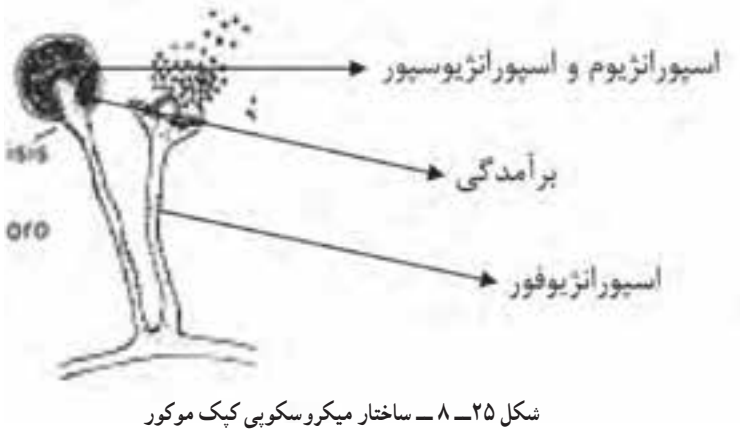
ساختار میکروسکوپی ریزوپوس : هیف فاقد دیواره عرضی است.دارای ساختاری کیسه مانند در انتهای هیف می‌باشد به نام اسپورانژیوم که درون آن اسپورانژیوسپورها قرار دارند. هیف حامل اسپورانژیوم اسپورانژیوفور نام دارد و دارای یک برآمدگی است. مهم‌ترین ویژگی ساختاری ریزوپوس وجود ساختمان ریشه مانند یا ریزوئید در محل اتصال هیف‌ها می‌باشد(شکل۲۳ــ ۸).



شکل ۲۳ــ ۸ ــ ساختار میکروسکوپی ریزوپوس

شکل ۲۴ــ ۸ ــ پرگنه کپک موکور

● **موکور :** موکور دارای ۳۰۰۰ گونه است که کپک‌های شایع در خاک، سطح گیاهان و سبزی‌ها هستند. کلنی‌های این کپک در محیط کشت به رنگ سفید، بژ و خاکستری با رشد سریع میسلیوم هستند که کل تشتک را پر می‌کنند.



شکل ۲۵ــ ۸ ــ ساختار میکروسکوپی کپک موکور

ساختار میکروسکوپی: مانند ریزوپوس هیف آنها دیواره عرضی ندارد و اسپورانژیوم، اسپورانژیوسپور و اسپورانژیوفور دارد و بر خلاف ریزوپوس، ریزوییید ندارند.

روش‌های آزمون میکروسکوپی کپک‌ها

۱ــ۷ــ ۸ ــ روش خرد کردن پرگنه[۱] :

مواد و وسایل مورد نیاز

- لام
- لامل
- سوزن کشت
- محیط کشت دارای کپک مورد نظر
- لاکتوفنل کاتن بلو
- شعله

روش کار

الف) توسط سوزن کشت قسمت کوچکی از پرگنه قارچ را برداشته و بر روی لام دارای یک قطره محلول لاکتوفنل کاتن بلو

۱ــ Teased moun

قرار داده و با لامل سطح آن را بپوشانید.

نکته : بهتر است برای مشاهده همه ساختار کپک با سوزن کشت از قسمت عمقی تر پرگنه برداشت کنید و با سوزن دیگر روی لام داخل قطره رنگ پرگنه‌ها را از هم باز کنید.

ب) رنگ اضافی را خارج نموده و با ۳ بار عبور دادن لام از روی شعله نمونه راتثبیت کنید.

پ) لام آماده شده را در زیر میکروسکوپ قرار داده با عدسی با بزرگنمایی ۱۰ و در صورت لزوم با عدسی با بزرگنمایی ۴۰ نمونه را مورد بررسی قرار دهید.

نکته : با توجه به این که در روش خرد کردن پرگنه، اغلب ساختمان‌های کپک و ارتباط آن از بین می‌رود، برای مطالعه ساختمان کپک‌ها بطور کامل از روش‌های مختلف اسلایدکالچر استفاده می‌شود.

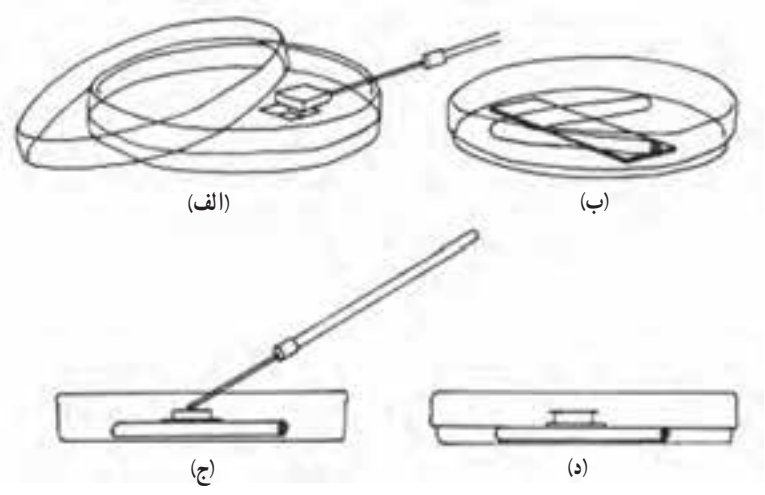
۲ــ۷ــ ۸ ــ اسلاید کالچر[۱] :

مواد و وسایل مورد نیاز

- تشتک‌های خالی
- لوله شیشه‌ای خمیده U شکل
- لام و لامل
- پنس
- بیستوری
- محلول لاکتوفنل کاتن بلو
- محیط کشت سابرودکستروز آگار

روش کار

الف) ۱۵ میلی لیتر از محیط کشت سابرودکستروز آگار را درون تشتک خالی سترون ریخته و پس از سفت شدن محیط توسط تیغ بیستوری سترون آن را به قطعات چهارگوش ۱×۱ سانتی‌متری تقسیم نمایید (شکل۲۶ــ ۸ ــ الف).



شکل ۲۶ــ ۸ ــ مراحل آماده‌سازی آزمون اسلاید کالچر

ب) ۷ الی ۸ میلی لیتر آب مقطر سترون در تشتک دیگری ریخته و یک میله U شکل روی آب بگذارید و یک لام آزمایشگاهی روی آن قرار دهید و سترون کنید. این کار برای تأمین رطوبت لازم جهت رشد قارچ لازم است.

پ) یک تکه از محیط کشت چهارگوش بریده شده را در شرایط سترون بر روی لام درون تشتک قرار دهید و در وسط آن با سوزن کشت سترون چند پرگنه قارچ مورد نظر را تلقیح نمایید (شکل ۲۶ــ ۸).

۱ــ S decu u e

ت) یک لامل سترون را بر روی محیط کشت تلقیح شده قرار داده و کمی‌فشار دهید تا به خوبی به سطح آگار بچسبد. درب تشتک را گذاشته و آن را در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار دهید و به طور مرتب کشت را از نظر رشد و رطوبت موجود در تشتک مورد بررسی و کنترل قرار دهید و پس از اطمینان از رشد کافی کپک با روش زیر دو نمونه تهیه کنید (شکل ۲۶ــ ۸).

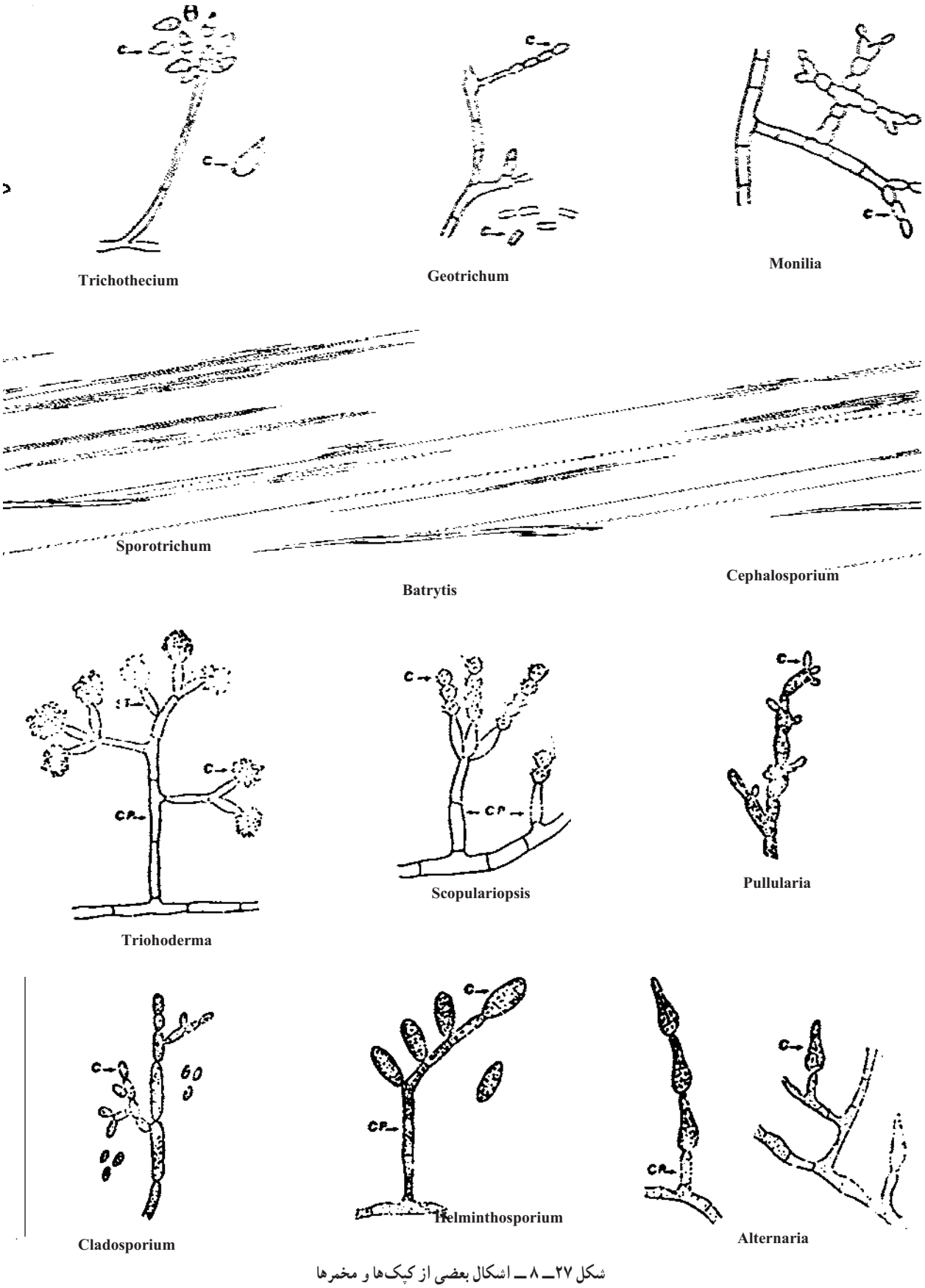
ث) به طور مرتب کشت را از نظر رشد و رطوبت موجود در تشتک مورد بررسی و کنترل قرار دهید. پس از اطمینان از رشد کافی کپک با روش زیر دو نمونه تهیه نمایید :

الف) نمونه تهیه شده از لامل : به آرامی‌و توسط پنس لاملی را که در اطراف آن کپک رشد نموده از سطح محیط برداشته و بر روی یک لام تمیز دارای یک قطره لاکتوفنل کاتن بلو قرار دهید. اگر کپک در اطراف لامل نیز رشد کرده , یک قطره دیگر از لاکتوفنل کاتن بلو بر روی لامل ریخته و با لامل بزرگتری آن را بپوشانید.

نکته : هنگام برداشتن لامل از روی تکه آگار باید از لغزیدن اسلاید روی محیط جلوگیری شود، در غیر این صورت قسمت‌هایی از ساختمان کپک کنده یا جابجا می‌شود و کار شناسایی را با مشکل مواجه می‌کند.

ب) نمونه تهیه شده از لام : محیط کشت را به آرامی‌از سطح لام بردارید و داخل تشتک بگذارید. سپس لام را از تشتک خارج کرده و یک قطره لاکتوفنل کاتن بلو را در محل رشد پرگنه کپک اضافه نموده و لاملی را بر روی آن قرار دهید. در صورت وجود رنگ اضافی در خارج لامل توسط کاغذ خشک کن آن را خشک و برای مسدود نمودن اطراف لامل از لاک ناخن و یا هر ماده مشابه دیگری استفاده نمایید و سپس لام‌های مزبور را در زیر میکروسکوپ بررسی کنید.

به جای استفاده از تکه آگار در آزمون بالا می‌توان وسط لام قرار گرفته روی میله U شکل مربعی به ابعاد حدود ۱ cm فرض کرده، سه ضلع آن را یک لایه و اسپار سترون قرار داده روی آن یک لامل سترون شده گذاشته و از محل ضلع چهارم با پی‌پت پاستور سترون شده تعداد کمی‌سلول کپک وارد کرده و بعد با پی‌پت پاستور سترون شده محیط کشت اختصاصی رشد کپک را وارد کرده و پس از پر شدن فضای بین لام و لامل آن را (ضلع چهارم) با واسپار سترون پوشانده و گرمخانه‌گذاری نمایید. یافته‌های این روش کامل‌تر و واضح‌تر دیده می‌شود.



شکل ۲۷ــ ۸ ــ اشکال بعضی از کپک‌ها و مخمرها

فصل نهم

آزمون‌های میکروبی تعیین نوع و میزان آلودگی محیط کار

۱ــ۹ــ آزمون‌های میکروبی تعیین نوع و میزان آلودگی محیط کار

محیط کار و محیط زیست انسان از نظر آلودگی میکروبی تأثیر بسیار زیادی در به خطر انداختن سلامت مصرف کنندگان مواد غذایی و کارکنان آن دارد. از یک طرف محیط کار خود با هوا، آب، خاک، اندام‌های انسان، حیوانات اهلی و وحشی، حشره‌ها و جونده‌ها به میکروارگانیسم‌های گوناگون آلوده می‌شود و از طرف دیگر خود می‌تواند موجبات آلودگی مواد اولیه، فرآورده‌های غذایی و اندام‌های کارکنان را فراهم نماید.

✓**خاک ــ** منبع اصلی همهٔ میکروب‌ها شناخته شده است و این میکروب‌ها از راه محل کاشت و گرد وخاک ناشی از جریان‌های هوا به مواد غذایی، آب، هوا و گیاهان و همچنین محیط کار در کارخانه‌های مواد غذایی منتقل می‌شوند، از طرفی خاک می‌تواند به‌وسیله انسان، حیوان‌ها، آب و هوا و به‌ویژه پساب‌های خانگی و صنعتی آلوده شود.

✓**آب ــ** میکروب‌های موجود در آب بیشتر از گونه‌های میکروارگانیسم‌های موجود در خاک، پساب و هواست. آب‌های سطحی دارای مقداری مواد آلی هستند و محیط آنها کم و بیش برای رشد میکروب‌ها مناسب است. در حالی که آب خالص برای زندگی میکروب‌ها نامساعد بوده و پس از مدت کوتاهی مقاومت میکروبی در آن کم می‌شود و نابود می‌شوند. در مواردی که پساب‌ها و زباله‌های به آب‌های سطحی ریخته می‌شوند، میکروب‌هایی مانند استروپتوکوکوس فکالیس، کلیفرم‌ها، سالمونلا و کلستریدیم در آن حضور دارند و مشکلات زیادی را برای سلامت محیط کار و مصرف‌کنندگان مواد غذایی فراهم می‌کند.

✓**هوا ــ** در حالت طبیعی دارای بار میکروبی ویژه‌ای نیست و عوامل آلوده‌کننده آن از راه خاک، اندام‌های موجودات زنده وارد می‌شوند. ذرات معلق در هوا با قطرات آب موجود در آن محیط مناسبی برای جذب و انتقال میکروب‌هاست. بدیهی است مقدار و گونه‌های میکروارگانیسم‌های موجود در هوا بسیار گوناگون است و بستگی به عواملی مانند میزان رطوبت، دمای محیط کار، جریان هوا، شرایط خاک و میزان آلودگی آن دارد. منبع دیگر آلودگی هوا دستگاه تنفس انسان و حیوان‌هاست که در موارد بسته بودن محیط و حضور فرد بسیار تشدید می‌شود. پساب‌های خانگی، کارگاه‌ها و کارخانه‌های مواد غذایی از منابع مهم آلودگی خاک و سایر عوامل محیط‌زیست هستند. مجموعه میکروبی پساب‌ها عبارتند از میکروب‌های هوازی، هوازی اختیاری، بی هوازی اختیاری و حتی بی‌هوازی اجباری که از منشأ خاک و دستگاه گوارش انسان و دام‌ها است. میکروارگانیسم‌هایی مانند گونه‌های استرپتوکوک فکال، کلستریدیوم پرفرنژان، شیگلا، سالمونلا، میکروکوک، پسودوموناس، لاکتوباسیلوس و در پاره‌ای موارد حتی ویروس‌ها، مخمرها و بویژه کپک پساب همگی ممکن است دارای بیشتر میکروب‌های بیماری‌زا برای انسان باشد و سلامت مردم و محیط کار را به خطر بیاندازد و بنابراین کنترل آلودگی و سالم سازی آن بسیار ضروری است.

✓و اما انسان خود یکی از جدی‌ترین عوامل آلوده‌کننده محیط کار است. بدیهی است انسان در حالت ابتلا به بیماری یا

گذراندن دورهٔ نقاهت بیماری عامل میکروب بیماری زای مربوطه است و در صورت تماس با مواد غذایی و محیط کار موجب آلودگی آنها می‌شود. اما در بسیاری موارد انسان در حالت سلامت هم ممکن است ناقل میکروب بیماری‌زا باشد و چنین افرادی از نظر سازمان‌هایی که به نحوی با مواد غذایی سروکار دارند دارای اهمیت ویژه‌ای هستند. ناقل بیماری فردی است که میکروب بیماری‌زا در اندام‌های بدنش وجود دارند اما علایم بیماری در او آشکار نیست و به دلایلی در برابر میکروب مورد نظر مصون است و افراد ناقه بیماری افرادی هستند که یا از بیماری مربوطه شفا یافته‌اند و دورهٔ نقاهت کوتاه و گاه طولانی خود را سپری می‌نمایند و یا هرگز به بیماری مبتلا نشده‌اند. منبع اصلی میکروب در بدن افراد ناقل و ناقه ممکن است در یکی از اندام‌های زیر باشد :

ـــ **پوست** : پوست اندامی‌است که هرگز بدون میکروب نیست، حتی لای پوست‌های بسیار تمیز هم همواره تعدادی از گونه‌های میکروبی که مجموعه طبیعی آن را تشکیل می‌دهد زیست می‌کنند. اما زمانی که پوست تمیز نباشد تعداد گونه‌های میکروبی و میزان آلودگی بسیار گوناگون و متنوع است. باکتری‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها از راه‌های گوناگون به پوست منتقل می‌شوند، زیرا انسان دست خود را برای کارهای گوناگون به کار می‌برد که از راه هر یک از آنها تعدادی میکروب به دست می‌چسبد که ممکن است همان جا تکثیر هم بشوند و یا از راه دست آلوده به نقاط دیگر منتقل شوند.

تکثیر میکروب‌ها در روی پوست‌های مرطوب و عرق کننده بیشتر است. گذشته از میکروب‌هایی که روی پوست دست وجود دارند و منشأ خارجی دارند، مجموعه میکروبی پوست دست را گونه‌های مختلف شامل استافیلوکوک اپیدرمیس که از گونه‌های بی‌آزار است و استافیلوکوک طلایی که از گونه‌ای خطرناک و بیماری‌زاست که چنانچه از راه پوست وارد مواد غذایی شود و شرایط رشد و نمو و تکثیر آن فراهم باشد به سرعت تکثیر شده و سم خطرناک و کشنده‌ای سنتز کرده و مصرف چنین غذایی سلامت مصرف‌کننده را به خطر انداخته و ممکن است منجر به مرگ شود. سم این باکتری در برابر دمای تا حدود ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت حدود یک تا دو ساعت مقاوم است و بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که حدود ۵۰ تا ۶۰٪ کارکنان و سایر مردم ناقل گونه‌ای از استافیلوکوک به‌وسیلهٔ دست‌های خود هستند که عامل بیماری‌هایی مانند جوش‌ها، کورک‌ها، آکنه‌ها، ورم‌های پوستی و مانند اینهاست.

در کارگران کارخانه‌های مواد غذایی نوعی عفونت استافیلوکوکی به صورت جوش‌های زیاد به نام کاربونکل یا دمل چرکی در نقاط عمیق پوست و نوعی عفونت چرکی به نام فورونکلوزیس یا سالک روی محل بریدگی‌های پوست ایجاد می‌شود که به علت کار مداوم کارکنان و تماس با مواد غذایی دیر ترمیم می‌شود و بنابراین نوعی کانون دایم آلودگی است. نوعی عفونت ناخن به نام عفونت پارونشیا هم در کارگران کارخانه‌های مواد غذایی شایع است. عامل تمام این عفونت‌ها گونه‌های استافیلوکوک هستند، بدیهی است چنانچه افراد مبتلا به این عفونت به نوعی با مواد غذایی سر وکار داشته باشند موجب آلودگی می‌شوند و این امر به‌ویژه زمانی که این افراد در تماس مستقیم با مواد غذایی مساعد برای رشد این باکتری‌ها باشند دارای اهمیت زیادی است زیرا در چنین مواردی مقادیر بسیار زیادی از مواد غذایی آلوده شده و بین توده‌های جمعیت توزیع گشته و سلامت مردم را به خطر می‌اندازد.

ـــ **دهان، حلق، بینی، گوش و چشم** : در این قسمت از اندام‌های بدن انسان به دلیل بالا بودن رطوبت و دما و باقیمانده‌های مواد غذایی در مورد دهان امکان رشد و نمو و تکثیر میکروارگانیسم‌ها بیشتر است. از میان میکروب‌هایی که در این اندام‌ها رشد می‌کنند می‌توان استافیلوکوک اورئوس را نام برد. این باکتری بویژه از نظر این که از راه تنفس هم امکان انتقال آن وجود دارد مهم است، زیرا گونه‌های این باکتری عامل اصلی سینوزیت و سرماخوردگی است و افراد مبتلا به این بیماری پس از شفا یافتن تا دو سال ناقل میکروب هستند. بنابراین افرادی که مبتلا به عفونت‌های دستگاه تنفس، چشم و گوش هستند و در کارخانه‌های مواد غذایی یا مراکز تغذیه گروهی کار می‌کنند باید مورد مراقبت‌های ویژه باشند و پیش از شفا یافتن از بیماری و گذراندن دوره نقاهت نباید در اموری که لازمه آن تماس با مواد غذایی و سطوح کار است فعالیت نمایند.

ـ **دستگاه گوارش**: در دستگاه گوارش انسان و حیوان گونه‌های مختلف میکروب‌ها زندگی می‌کنند و مجموعه میکروبی دستگاه گوارش افراد سالم در حالت طبیعی یکسان نیست و هر یک از قسمت‌های دستگاه گوارش مجموعه میکروبی ویژه خود را دارد. محیط معده و روده برای رشد میکروب‌ها مساعد نیست اما قسمت‌های پس از آن شامل ناحیه ژژونوم و ایلئوم کم کم برای زیست میکروب‌ها مساعد می‌شوند و به همین جهت در این قسمت میکروب‌های مختلفی وجود دارند و هرچه از قسمت اول روده کوچک به سمت آخر آن پیش برویم به تعداد و نوع میکروب‌ها افزوده می‌شود. مهم ترین میکروب‌های این قسمت شامل کلیفرم‌ها به‌ویژه گونه‌های استرپتوکوک فکال، سالمونلا، اشریشیاکلی، آئروباکتر آئروژنز و گاهی استافیلوکوک است. گاه ممکن است گونه‌هایی از انگل‌های گوارشی هم حضور داشته باشند.

با توجه به این که در بخش‌هایی از دستگاه گوارش مقدار اکسیژن کم است امکان حضور و رشد و نمو و تکثیر گونه کلستریدیوم ولشای یا پرفرنژان وجود دارد، این باکتری بی‌هوازی اختیاری و اسپورساز است و بنابراین از باکتری‌های مشکل‌ساز در صنایع غذایی است.

با توجه به آنچه گفته شد افراد مبتلا به دیسانتری میکروبی و شیگلوز، سالمونلا، دیسانتری آمیبی نباید در بخش‌هایی از مواد غذایی که مواد اولیه و غذاهای بسته بندی نشده در معرض هواست شاغل باشند.

افراد مبتلا به دیسانتری باسیلی و شیگلوز برای مدت کوتاهی ناقل عامل بیماری هستند اما ناقل دایم نمی‌شوند. در مورد سالمونلا و عفونت ناشی از اشرشیاکلی فرد مبتلا برای همیشه ناقل عامل بیماری می‌شود.

همچنین افراد مبتلا به دیسانتری آمیبی پس از شفا یافتن برای همیشه ناقل بیماری می‌شوند. افراد مبتلا به هپاتیت ویروسی برای حدود ۵ سال ناقل هستند.

ـ حیوانات اهلی و دام‌ها از مهم‌ترین عوامل آلوده کننده محیط زیست و محیط کار هستند. استافیلوکوک طلایی، استرپتوکوک فکال، کلستریدیوم پرفرنژان و کلیفرم‌ها در دهان، بینی، دستگاه گوارش، پوست و سایر اندام‌های این موجودات به تعداد زیاد یافت می‌شود. گونه‌های سالمونلا هم ممکن است موجب آلودگی مواد غذایی و اندام‌های انسان، محیط کار و سطوح در تماس با موادغذایی بشود. حیوان‌هایی که زیست جمعی دارند به سادگی میکروب‌های اندام‌های خود را به سایرین منتقل می‌کنند و موجب تشدید آلودگی می‌شوند.

ـ موش و سایر جونده‌ها در فاصله بین تولید تا مصرف و بیشتر در انبارهای نگهداری مواد غذایی موجب آلودگی می‌شوند. جونده‌ها منبع اصلی گونه‌های سالمونلا آنتریدیس و سالمونلا تایفی میوریوم هستند. گاه جونده‌ها غذای پرنده‌ها، انسان و محیط زیست را به میکروب‌های اندام‌های خود آلوده می‌کنند و بنابراین لازم است مواد غذایی و محیط کار از دسترس آنها دور باشند.

ـ حشره‌های محیطی و خانگی به شکل‌های گوناگون موجب آلودگی می‌شوند و چون سرعت تکثیر آنها بسیار زیاد و رفت و آمد آنها در محیط بسیار زیاد است از منابع مهم آلودگی محیط زیست و محیط کار به حساب می‌آیند.

ـ مگس خانگی هر بار ۱۲۰ عدد تخم می‌گذارد. تخم‌ها پس از ۵ تا ۷ روز بالغ و آماده تکثیر می‌شوند. مگس خانگی تخم‌های خود را بر روی زباله‌ها، پساب‌ها، و فضولات حیوانی می‌گذارد و از این محل‌ها برای تغذیه خود هم استفاده می‌کند و برای نرم کردن مواد غذایی مقداری از بزاق دهان خود را روی آنها می‌ریزد و آلودگی را تشدید می‌کند.

ـ سوسک حمام هم دارای گونه‌های زیادی است که همهٔ آنها در محیط کار صنایع غذایی و بویژه محل‌هایی که در آنجا باقیمانده‌های غذایی مانند آب، نشاسته، مواد پروتیینی، پنیر، کاغذ وجود دارد حاضر می‌شوند. سرعت حرکت و جابجایی این حشره خیلی زیاد است و محتویات دستگاه گوارش آن به صورت مایع است که آن را بر روی سطح کار و مواد غذایی ریخته و آنها را آلوده می‌کند.

۲ــ۹ــ روش‌های تشخیص آلودگی میکروبی محیط کار

۱ــ۲ــ۹ــ تشخیص آلودگی هوای محیط کار : برای تشخیص آلودگی میکروبی هوای محیط کار و هوای محیط زیست می‌توان از راه‌های گوناگون استفاده نمود که مهم‌ترین آنها عبارتند از :

الف) روش باز کردن تشتک دارای محیط کشت و قرار دادن یا چرخاندن آن در هوا . برای این منظور لازم است ابتدا بسته به نوع آلودگی، محیط کشت جامد و مناسب را به شرحی که در پیش گفته شد آماده سازی، سترون و در پی‌پت ریخته و به صورت دربسته به حال خود قرار داد تا آگار سفت شود. مهم‌ترین عامل آلوده کنندهٔ هوای محیط کار اسپر کپک‌ها است و برای رشد کپک‌ها محیط Malt Extract Agar یکی از مناسب ترین محیط‌هاست.

پس از سفت‌شدن محیط آگار می‌توان درب آن را باز کرده و برای چند ثانیه در هوای مورد نظر برای تعیین آلودگی میکروبی چرخاند. به این ترتیب اسپورهای معلق در هوا به سادگی روی سطح آگار قرار می‌گیرند و با بستن درب و قرار دادن تشتک‌ها در گرمخانه با دمای مناسب و حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد کلنی کپک‌های آلوده کننده هوا روی سطح آگار ظاهر می‌شوند. برای این منظور زمانی حدود ۴۸ ساعت کفایت می‌کند، اما اگر طی این مدت کلنی‌ها ظاهر نشوند می‌توان گرمخانه‌گذاری را تمدید نمود. به جای چرخاندن تشتک در باز در هوا می‌توان آن را برای چند ثانیه و کمتر از یک دقیقه در معرض هوا قرار داد. به این ترتیب ذرات معلق آلوده به اسپورهای موجود در هوا در اثر وزن خود سقوط کرده و روی سطح محیط قرار می‌گیرند و پس از آن لازم است در تشتک‌ها را بسته و آنها را در گرمخانه با دمای مناسب و زمان لازم قرار داد.

ب) فیلتره کردن هوا : برای این منظور می‌توان با نصب فیلتر با منافذ ریزتر از اسپورکپک‌ها جلوی خروجی هواکش و عبور هوا از فیلتر برای حدود ۵ ثانیه و قرار دادن فیلتر روی سطح محیط کشت آگار، شرایطی فراهم کرد که اسپرهای معلق در هوا آسان تر روی محیط کشت قرار گرفته و آماده تکثیر و و تشکیل کلنی شوند.

لازم به یادآوری است که فیلترها را می‌توان در محل هوای ورودی قرار داد.

در هر دو روش بالا پس از ظاهر شدن کلنی‌ها می‌توان ضمن شمارش آنها در صورت نیاز آزمون‌های مربوط به شناسایی گونه‌ها را با روش مربوط انجام داد که شرح آن در فصل ۷ ارایه شده است.

چنانچه مشکوک به آلودگی هوای محیط کار با سایر میکروارگانیسم‌ها باشیم لازم است به جای محیط کشت ویژه کپک‌ها از محیط‌های کشت اختصاصی میکروب‌های مورد نظر استفاده شود و برای شناسایی گونه میکروبی از آزمون‌های تأییدی استفاده به‌عمل آید که در جای خود در این کتاب به آنها اشاره شده است.

۲ــ۲ــ۹ــ تشخیص آلودگی میکروبی سطوح در تماس با مواد غذایی : سطوح در تماس با مواد غذایی شامل، دست و پوست کارکنان، میزهای کار، لوله‌های انتقال، زمین، دیوار، درب، پنجره و سقف است.

الف) دست و پوست کارکنان، برای این منظور از روش سواب‌گیری[۱] (پنبه استریل دسته‌دار) استفاده می‌شود، پنبه استریل دسته‌دار را در محلول رقیق کننده مناسب مانند سرم فیزیولوژی، محلول رینگر، محیط کشت نوترین براث خیس کرده و اطراف آن را روی سطح پوست مورد نظر مانند انگشتان دست، کف دست یا هر جای دیگر کشیده و سپس آن را وارد محلول رقیق کننده کرده و دسته اضافی آن را با شکستن خارج نموده و با استفاده از شیکر محتوی محلول رقیق کننده را یکنواخت نموده، سپس آن را تا حد لازم رقیق کنید (مطابق با روش تهیه رقت‌های متوالی در فصل ششم) و به محیط کشت مورد نظر انتقال دهید، بدیهی است محیط کشت برای شناسایی، باکتری‌های گوناگون متفاوت است اما در بیشتر موارد لازم است آلودگی دست به میکروارگانیسم‌های طبیعی

۱ــ P essu e p a e

مانند استافیلوکوک طلایی و استافیلوکوک اپیدرمیس و کلی‌فرم‌ها به عنوان شاخص آلودگی دست با دستگاه گوارش مورد ارزیابی قرارگیرد.

ب) سطوح محیط کار و دستگاه‌ها، این سطوح را می‌توان به دو دسته سطوح افقی و عمودی تقسیم کرد، برای سطوح افقی و در مواردی که رطوبت نسبی هوا زیاد بوده و موجب تبخیر آب محیط کشت نمی‌شود می‌توان بسته به نوع میکروب تعدادی محیط کشت جامد عمومی و یا اختصاصی را روی سطح معینی از محل ریخته و به حال خود قرار داد تا میکروارگانیسم‌ها در صورت حضور تکثیر کرده و تشکیل کلنی بدهند. برای سقف و حتی کف می‌توان محیط کشت آگار را در تشتک ریخته و منتظر شد که سفت شود، سپس تکه‌ای از آن را بریده و روی سطح مورد نظر برای تشخیص آلودگی چسباند.

در مواردی که سطوح مورد نظر برای تشخیص آلودگی در جای خشک یا سرد قرار داشته باشند دو روش بالا عملی نیست و لازم است با استفاده از سواب میکروب‌های سطح معینی از محیط کار نمونه برداری شده و به محلول‌های رقیق کننده و یا محیط‌های کشت انتقال یافته و در گرمخانه قرار داده شود.

پ) دیوارها، پنجره و سطوح عمودی دستگاه‌ها و مخازن را هم می‌توان با سواب نمونه‌برداری کرده و یا تکه آگار محیط کشت جامد مورد نظر را روی آن چسباند. استفاده از تکه آگار زمانی امکان پذیر است که پیش از تکثیر میکروب‌ها و ظاهر شدن کلنی‌ها آنها خشک نشود.

ت) لوله‌های انتقال باز شونده و کوتاه را می‌توان با ریختن محیط کشت جامد روی سطح معینی از آن و یا با جاری کردن محیط کشت مایع از داخل آن و یا با جاری کردن ماده رقیق کننده از داخل آن و یا جاری کردن ماده رقیق کننده از داخل آن نمونه‌برداری و مورد آزمون قرار داد؛ نحوه رقیق کردن نمونه و گزینش محیط کشت برای شناسایی میکروارگانیسم‌ها در جای دیگر این مجموعه مورد بحث قرار گرفته است.

ث) استفاده از تشتک‌های فشاری،این امکان وجود دارد که محیط کشت عمومی یا اختصاصی را در تشتک‌های یکبار مصرف ریخته و بطور کامل پر کرده و پس از سفت شدن آن را روی سطح مورد نظر برای تعیین آلودگی چسباند تا میکروب‌ها به سطح محیط کشت منتقل شوند و با گرمخانه گذاری رشد کرده و کلنی‌های قابل شمارش و شناسایی تشکیل دهند.

۳ــ۲ــ۹ــ روش پیشرفته و دستگاهی برای ارزیابی آلودگی محیط کار : در بسیاری از موارد برای ارزیابی سلامت محیط کار درکارخانه‌های مواد غذایی فرصت‌ها اندک بوده و مجال برای انجام کار با روش‌های یاد شده نیست زیرا در بیشتر روش‌های یاد شده کمینه زمان مورد نیاز حدود ۴۸ ساعت است و برای تشخیص نهایی گاه لازم است مراحل تکمیلی با نیاز به زمان بیشتر انجام گیرد. در چنین شرایطی لازم است ارزیابی با روش‌های سریع انجام گیرد. این روش‌ها از سال‌ها پیش در کشورهای پیشرفته به مرحلهٔ اجرایی رسیده که چند مورد از آنها در اینجا برای آشنایی مقدماتی ارائه می‌شود.

۱ــ روش شمارنده الکتریکیCoulter Counter : در این روش با استفاده از سواب‌گیری محل‌های مورد نظر نمونه‌برداری شده، در صورت نیاز رقت‌های مورد نیاز تهیه شده و وارد مخزنی می‌شود که در آن لوله مویینی قرار دارد. رقت‌های تهیه شده به ترتیب وارد این مخزن می‌شوند و از داخل لوله مویین و از زیر چشم الکتریکی عبور می‌کنند. چشم الکترونیکی به صورت دیجیتال، میکروب‌های عبور کرده از لوله مویین و زیر چشم الکترونیکی را شمارش می‌کند.

۲ــ روش اندازه گیری آدنوزین تری فسفات : این روش بر اساس این وضعیت طراحی شده که بین مقدار ATP موجود در یک محلول و تعداد سلول میکروبی رابطهٔ مستقیمی‌برقرار است و هرچه بار آلودگی میکروبی محیطی بیشتر باشد مقدار ATP آن هم بیشتر است زیرا سلول‌های میکروبی هم کم و بیش دارای مقدار معینی ATP هستند و با تعیین مقدار ATP در هر محیط می‌توان عدد حاصل را بر مقدار ATP یک سلول تقسیم کرد تا تعداد میکروب تعیین شود. مقدار ATP یک سلول $۲۲/۶۶ \times ۱۰^{-۱۰}$ میکروگرم است.

کتابنامه

1 The Bacteriological Examination of water supplies, Her Majestys stationery office.

2 Harrigan W.F. 1996, Laboratory Methods in microbiology Academic press.

3 Frazier W.C.1997, Food Microbiology, McGraw Hill Book company.

4 Thatcher R.S. and clarrk. D.S. 1988, Microorganisms in Foods. University of Toronto press.

5 Principles of microbiology for students of Food Technology, Hutchinson Educational.

6 Stanier R.Y. etal 1996, General Microbiology Macmillan.

7 Davis B.D. etal 1988, Principles of microbiology and Immunology, A Harper International Edition.

8 Food´ Microbiology, 2005, Neelaw Khetrpaul.

9 Food Microbiology laboratory, 2005, linne Mac Landzbrough.

۱۰ــ رسول پایان ۱۳۵۶. جزوه آزمایشگاه میکروب‌شناسی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۱۱ــ رسول پایان، ۱۳۹۰، مبانی کنترل کیفیت درصنایع غذایی (ویرایش چهارم چاپ دوم) انتشارات آییژ

۱۲ــ رسول پایان ۱۳۸۸، کنسروسازی (ویرایش سوم) انتشارات آییژ

۱۳ــ رسول پایان ۱۳۸۰، مقدمه‌ای بر تکنولوژی فرآورده‌های غلات (ویرایش سوم) انتشارات آییژ

۱۴ــ سحر هنرمند جهرمی ۱۳۸۷، آزمایشات میکروب‌شناسی مواد غذایی

۱۵ــ دکتر گیتی کریم، آزمون‌های میکروبی مواد غذایی

۱۶ــ دکتر رضویلر ۱۳۷۵، میکروب‌های بیماری‌زا در مواد غذایی

۱۷ــ استانداردهای ملی ایران در رابطه با کلیه آزمون‌های ارائه شده در کتاب