

### آزمایش‌های میکروبی برخی از مواد غذایی پرمصرف

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

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

### ۹- آزمایش‌های میکروبی برخی از مواد غذایی پرمصرف

#### ۹-۱- آزمایش‌های میکروبی آب

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

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

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

۱- شمارش تعداد کل میکروب‌های زنده<sup>۱</sup>: که برای ارزیابی وضع بهداشتی آب انجام می‌گیرد،

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

۲- شمارش کلیفرم‌ها<sup>۲</sup> و به‌ویژه شمارش اشریشیاکلی<sup>۳</sup>: که برای تعیین آلودگی جدید با

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

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

می‌یابد. اما متابولیت‌های آن‌ها در محیط باقی است

۳- آزمایش و شمارش کلوستریدیوم و لیشای<sup>۴</sup>: وجود این باکتری در آب دلیل آلودگی قبلی

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

۴- آزمایش و شمارش استریتوکوک فکال<sup>۵</sup>: این باکتری، نسبت به کلیفرم‌ها در برابر کلر

و ترکیبات آن مقاوم‌تر است، و در آب کلرینه شده، حضور آن دلیل به کافی نبودن فرآیند کلر زنی<sup>۶</sup> است.

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

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

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

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

کاغذی پیچیده و بسته‌بندی شده باشد.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

۱- Total viable Count

۲- Coliforms

۳- E. Coli

۴- Clostridium Welchii, Cl. Perfringens

۵- Faecal Streptococci

۶- Chlorination

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

## ۲-۱-۹- آزمایش‌های لازم

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

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

۱- Buffered Pepton Water

۲- Ringer

۳- Plate Count Agar

۴- Dilution Tube Count

۵- Mc. Conkeybroth

۶- Durham

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## ۲-۹- آزمایش میکروبی شیر مایع

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

این روش دارای مزایای زیر است:

– سهولت انجام

– سرعت عمل در دستیابی به نتیجه

– امکان انجام همزمان چند نمونه

– هزینه‌ی پایین انجام آزمایش

– عدم دخالت توده‌های میکروبی<sup>۴</sup>

همزمان، معایبی به شرح زیر هم دارد:

– پاسخ به دست آمده مربوط به باکتری‌های هوازی است.

– دخالت مرحله رشد باکتری‌ها در نتیجه‌ی آزمایش

– متغیر بودن زمان تکثیر باکتری‌ها در طی آزمایش

– دخالت عوامل ضد میکروبی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها

– دخالت متغیرهایی مانند نور و مقدار چربی در آزمایش

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

۱- Dye Reduction test

۲- Redox

۳- Oxidation Reduction Potential (RH)

۴- Clump or Cluster

۵- Methyleneblue Dye Reduction

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

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

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

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

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

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





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

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

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

#### ۹-۴- جستجوی باسیلوس سرئوس در برنج پخته

باسیلوس سرئوس، گونه‌ای باکتری مقاوم نسبت به گرما، هوازی و هوازی اختیاری، اسپرساز، گرم مثبت، باسیل کوتاه با انتهای مربع شکل است که به صورت زنجیر کوتاه تا دراز دیده می‌شود. دمای مناسب برای رشد آن حدود  $30^{\circ}\text{C}$  تا  $37^{\circ}\text{C}$  است اما در دماهای  $45^{\circ}\text{C}$  تا  $50^{\circ}\text{C}$  هم قادر به ادامه‌ی زیست بدون تکثیر می‌باشد،  $a_w$  رشد آن بالاتر از  $0/93$  و pH مناسب برای رشد آن  $4/9$  تا  $9/3$  است، باکتری بسادگی تبدیل به اسپیر می‌شود. اسپیر بیضوی، میانی یا متمایل به کناری است که دیواره‌ای نازک دارد. مسمومیت‌های ناشی از این باکتری بیشتر بر اثر مصرف غذاهای پخته بویژه برنج که پس از پخت در شرایط جوانه زدن و رشد باکتری قرار گرفته باشند عارض می‌شود.

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

۱- Phenol Red Egg - Yolk Polymyxine Agar

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

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

## ۹-۵- آزمایش‌های میکروبی آرد

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

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

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

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

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

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

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

## ۹-۶- جستجوی باکتری‌های بی‌هوازی

برای این آزمایش از محیط کشت تیوگیکلالت برات یا RCM استفاده کرده، پلیت‌ها و لوله‌های آزمایش را به مدت سه روز در شرایط بی‌هوازی و در دماهای  $25^{\circ}\text{C}$  و  $37^{\circ}\text{C}$  قرار می‌دهیم

۱- Dextros Trypton Agar or Broth

۲- Thioglycolate broth or Reinforced Clostridial Media (RCM)

۳- Epiphitic

۴- Total Count

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

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

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

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

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

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

۱- Thermo Phyl

۲- Thermoduric

۳- Staphylococcus aureus

۴- Bacteriological filter

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

— جستجوی باکتری استافیلوکوک طلایی کو آگولاز مثبت در نقاط مختلف بدن

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

— محیط کشت اختصاصی رشد این باکتری برد پارکر<sup>۱</sup> است.

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

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

— با پنبه‌ی سترون دسته‌دار<sup>۵</sup> که در نوعی مایع رقیق کننده و از جمله لیتوس میلک<sup>۶</sup> یا آب پیتونه

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

۱- Baird Parker Agar

۲- Pottasium tellurite, Egg - yolk tellurite

۳- Aseptic technique

۴- Bacteriological filter

۵- Swab

۶- Litmus milk

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

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

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

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

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

– پلیت‌های تلقیح شده را به‌صورت وارونه در اتو  $37^{\circ}\text{C}$  قرار می‌دهیم.

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

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

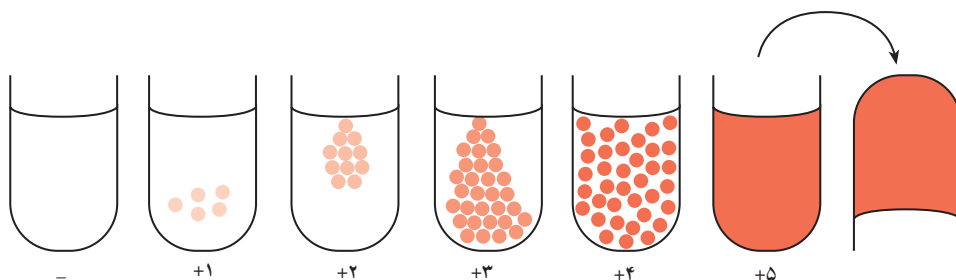
– کلنی‌های مجزا و مشکوک به استافیلوکوک کوآگولاز مثبت را به‌وسیله‌ی لوپ برداشته، به محیط کشت برین‌هات اینفیوژن برات<sup>۱</sup> آماده و سترون شده اضافه می‌کنیم و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه  $37^{\circ}\text{C}$  قرار می‌دهیم.

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

– به لوله‌های آزمایش حاوی  $3/0$  میلی‌لیتر پلاسما‌ی خون خرگوش،  $1/0$  میلی‌لیتر از محیط کشت برین‌هات اینفیوژن برات اضافه کرده، در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  –  $35$  قرار می‌دهیم.

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

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



شکل ۱-۹

## ۹-۷- جستجو و شمارش سالمونلا<sup>۱</sup> در گوشت مرغ

گونه‌های سالمونلا در خانواده‌ی آنتروباکتریا<sup>۲</sup> سه<sup>۳</sup> قرار دارند، باکتری‌های این جنس گرم منفی، باسیلی‌شکل، بدون اسپر، هوازی و هوازی اختیاری و دارای حرکت هستند.

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

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

۱- Salmonella

۲- Enterobacteriaceae



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

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

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

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

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

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

۱- Tetrathionate broth

۲- Selenit cystein broth

۳- Tergitol No.7

۴- Loop

۵- Salmonella Shigella Agar (SSA)

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

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

**۴-۷-۹- مرحله‌ی تشخیص:** برای تشخیص نهایی لازم است از هر یک از محیط‌های کشت SSA، BSA و BGA پنج پرگنه مشخص و مشکوک را از روی سطح آگار برداشته، در عمق و روی سطح محیط تریپل شوگرآیرون آگار<sup>۱</sup> که به صورت خوابیده در لوله آزمایش قرار دارد، کشت داد. و در گرمخانه  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  گذاشت. در صورت رشد سالمونلا در محیط TSI در قسمت شیب‌دار آن رنگ مایل به ارغوانی ایجاد می‌شود که مربوط به قلیایی شدن محیط است. در قسمت میانی محیط، بر اثر اسیدی شدن آن، رنگ زرد حاصل می‌شود. قسمت عمقی محیط هم به علت سنتز  $\text{SH}_2$  تیره رنگ می‌شود. (پاره‌ای از گونه‌های سالمونلا  $\text{SH}_2$  سنتز نمی‌کنند).

**۵-۶-۹- مرحله‌ی تأیید:** در این مرحله، ابتدا با مقداری از محیط TSI که باکتری روی آن رشد کرده، مقداری سرم فیزیولوژی یک سوسپانسیون میکروبی تهیه می‌کنیم و بعد آن را با یک قطره سرم پلی‌والان مخلوط کرده، با چشم غیرمسلح تشکیل یا تشکیل نشدن لخته و انعقاد را مشاهده می‌نماییم. برای این منظور، از درشت‌نمایی  $10^\circ$  تا  $40^\circ$  برابر هم می‌توان استفاده کرد و بهتر است یک لام شاهد هم تهیه شود.

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

## ۸-۹- آزمایش میکروبی ماهی‌های آب شور

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

۱- Triple sugar Iron Agar (TSI)

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

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

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

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

### — نمونه برداری از گوشت عضله ماهی

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

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

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

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

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

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

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

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

برای رشد باکتری‌های سرما دوست، مزوفیل و گرمادوست است.

## ۹-۹-۹-۹ آزمایش میکروبی کمپوت و کنسرو

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

### ۹-۹-۹-۱ اتوگذاری مقدماتی<sup>۱</sup>: در این مرحله دو سری از نمونه‌ی قوطیهای کنسرو انتخاب

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

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

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

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

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

باید به صورت زیر انجام گیرد:

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

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

#### ۴-۹-۹- آزمایش‌های پیشنهادی:

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

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

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

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

— برای جستجوی مخمرها و کپک‌ها از محیط مالت اکستراکت آگار<sup>۱۳</sup> یا محیط مایکولوژیکی<sup>۱۴</sup> استفاده می‌شود.

---

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

## خودآزمایی

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

## منابع و مأخذ

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

۶- Essays in Applied Microbiology

J.R Norris

M.H Richmond

1981

۷- MICROBIOLOGY IN HEALTH AND DISEASE

Forbisher and Fuerst's

1983

۸ - MICROBIOLOGY AND INFECTION DISEASE

BRIODY

1974

۹- BACTERIOLOGY

PRINCIPLES AND PRACTICE

H. BR YAN



A. BR YAN

G. BR YAN

1962

۱۰- MICROBIOLOGY MICHAEL J. PELCZAR. JR.

ROGERD . REID

1972

۱۱- THE MICROBES LECHEVALIER PRAMER

1971

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

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

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

سوم ۱۳۸۵.

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

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

