فصل نهم

آزمایش‌های میکروبی برخی از مواد غذایی پرمصرف

هدف‌های رفتاری: در پایان این فصل، فراگیر باید بتواند :
۱ ــ آزمایش‌های میکروبی آب را انجام دهد.
۲ــ آزمایش‌های میکروبی مربوط به شیر مایع را انجام دهد.
۳ــ آزمایش مربوط به جستجوی باسیلوس سرئوس در برنج پخته را انجام دهد.
۴ــ آزمایش‌های میکروبی آرد را انجام دهد.
۵ــ آزمایش‌های میکروبی استافیلوکوک طلایی و کوآگولماز مثبت را انجام دهد.
۶ــ آزمایش شمارش سالمونلا در گوشت مرغ را انجام دهد.
۷ــ آزمایش‌های میکروبی ماهی‌های آب شور را انجام دهد.
۸ــ آزمایش‌های میکروبی کمپوت و کنسرو را انجام دهد.

۹ــ آزمایش‌های میکروبی برخی از مواد غذایی پرمصرف

۱ــ۹ــ 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 اهمیّت 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.

۱ــ شمارش تعداد کل میکروب‌های زنده[۱]: که برای ارزیابی وضع بهداشتی آب انجام می‌گیرد، و اگر تعداد آن‌ها از حدّ معینی تجاوز کند آب غیرقابل شرب و مصرف در صنایع غذایی خواهد بود.

۲ــ شمارش کلیفرم‌ها[۲] **و به‌ویژه شمارش اشریشیاکلی**[۳]: که برای تعیین آلودگی جدید با فاضلاب یا محتویات دستگاه گوارش انسان و حیوان انجام می‌گیرد. بدیهی است آلوده نبودنِ 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

۳ــ آزمایش و شمارش کلستریدیوم ولشای[۴]: وجود این باکتری در آب دلیل آلودگی قبلی آن است، زیرا باکتری اسپرساز است و اسپر آن تا مدتها در آب زنده می‌ماند.

۴ــ آزمایش و شمارش استرپتوکوک فکال[۵]: این باکتری، نسبت به کلیفرم‌ها در برابر کلر و ترکیبات آن مقاوم‌تر است، و در آب کلرینه شده، حضور آن دلیل به کافی نبودنِ فرآیند کلرزنی[۶] است.

۱ــ۱ــ۹ــ 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 میلی‌لیتریِ 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 میلی‌گرم 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 به‌وسیله‌ی 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 شیرِ آب برای مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه باز گذاشته شود تا نمونه‌ی واقعی‌تری به‌دست آید. پس از طی این مدت، درِ شیشه‌ی ویژه‌ی نمونه‌برداری با دست ضدعفونی شده، باز می‌شود و از آب شیر پر می‌گردد. آن‌گاه، درِ شیشه تهیه شده، در داخل ظرفِ ویژه‌ی حمل نمونه به آزمایشگاه یا یخدان قرار داده می‌شود و اطراف آن

۱ــ Total viable Count
۲ــ Coliforms
۳ــ E. Coli
۴ــ Clostridium Welchii, Cl. Perfringens
۵ــ Faecal Streptococci
۶ــ Chlorination

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

۲ــ۱ــ۹ــ آزمایش‌های لازم

۱ــ 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 پپتونه با فردار[۱] یا محلول رینگر[۲] را برداشته، با آن‌ها نمونه آب را تا 10^{-5} رقیق می‌کنیم و همزمان پنج عدد پلیت استریل را نیز علامت‌گذاری کرده، به‌ترتیب به هر یک از آن‌ها یک میلی‌لیتر از رقت مربوط را (10^{-1}ــ 10^{-5}) اضافه می‌کنیم و روی هر یک از آن‌ها ده تا پانزده میلی‌لیتر از محیط کشت غذایی آگار[۳] که از پیش آماده شده، سترون و تا حدود $45^{\circ}C$ 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 $25^{\circ}C$ 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 $5^{\circ}C$ و $37^{\circ}C$ قرار داد. پس از ۲۴ ساعت کلنی‌های ظاهر شده روی پلیت‌ها را شمارش می‌کنیم. پلیت‌هایی که روی آن‌ها بیش از ۳۰۰ کلنی رشد کرده، غیرقابل شمارش گزارش می‌کنیم. از روی رقت‌های تهیه شده در این آزمایش و تعداد کلنی‌هایی که روی پلیت‌های هر رقّت رشد کرده، به‌سادگی 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.

۲ــ شمارش کلیفرم‌ها: شمارش کلیفرم‌ها با استفاده از روش شمارش لوله‌هایی از رقت‌های نمونه که در آن‌ها باکتری رشد کرده[۴] صورت می‌گیرد و در آن از محیط کشت مک‌کونکی برات[۵] استفاده می‌شود. روش آزمایش به این ترتیب است که ابتدا ۱۵ لوله آزمایش حاوی محیط کشت استریل شده و لوله دورهام[۶] را برداشته، آن‌ها را به سه گروه ۵تایی 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 لوله گروه دوم یک میلی‌لیتر، و به هر یک از ۵ لوله‌ی گروه سوم ۰/۱ میلی‌لیتر نمونه‌ی آب مورد آزمایش را اضافه می‌کنیم و پس از اتمام کار آن‌ها را در گرمخانه $30^{\circ}C$ 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

۱ــ Buffered Pepton Water
۲ــ Ringer
۳ــ Plate Count Agar
۴ــ Dilution Tube Count
۵ــ Mc. Conkeybroth
۶ــ Durham

دورهام موجود در لوله که به‌صورت 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 آیکمن[1] استفاده می‌شود.

برای شناسایی کلیفرم‌ها از محیط‌های کشت دیگری هم استفاده می‌شود. برای نمونه محیط‌های کشت ویولت رد بایل آگار[2] که در آن کلیفرم‌ها کلنی‌های قرمز ایجاد می‌کند. محیط برّیان گرین بایل آگار[3] که در آن کلیفرم‌ها کلنی قرمز ایجاد می‌کند و محیط لاکتوز براث[4] که در آن کلیفرم‌ها تغییر رنگ و گاز ایجاد می‌کنند.

هیچ یک از محیط‌های بالا، به تنهایی قادر به جداسازی اشریشیا کلی[5] نیست. برای این منظور، باید از محیط‌ها و روش‌های دیگر برای تکمیل آزمایش استفاده کرد.

۳ــ آزمایش و شمارش استرپتوکوک فکال[6]: نحوه‌ی انجام آزمایش جستجو و شمارش استرپتوکوک فکال شبیه آزمایش کلیفرم است با این تفاوت که در آن از محیط‌های کشت گلوکز آزید براث[7] قوی و معمولی[8] استفاده می‌شود و به لوله دورهام نیازی نیست، چون استرپتوکوک فکال، گاز ایجاد نمی‌کند.

لوله‌های آزمایش تلقیح شده را به مدت ۷۲ ساعت در گرم‌خانه $37^{\circ}C$ 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[9] اضافه می‌نماییم و به مدت ۴۸ ساعت در اتو $45^{\circ}C$ 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.

۴ــ جستجو و شمارش کلستریدیوم پرفرنژان[10] یا ولشای: برای شناسایی این باکتری لازم است ابتدا نمونه‌ی آب تا حدود $75^{\circ}C$ و به مدت ۱۰ دقیقه دما داده شود تا تمام فرم‌های رویشی باکتری‌ها از بین بروند و اسپرها باقی بمانند. سپس با رویشی کردن اسپرها به‌وسیله‌ی شوک دمایی، نسبت به شمارش و شناسایی آن‌ها اقدام شود.

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

جدول ۱ــ۹ ــ ضریب تعداد حداکثر احتمالی با حدود ۹۵ درصد اطمینان

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

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

۲ــ۹ــ آزمایش میکروبی شیر مایع

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

این روش دارای مزایای زیر است :

ــ سهولت انجام

ــ سرعت عمل در دستیابی به نتیجه

ــ امکان انجام همزمان چند نمونه

ــ هزینه‌ی پایین انجام آزمایش

ــ عدم دخالت توده‌های میکروبی[۴]

همزمان، معایبی به شرح زیر هم دارد :

ــ پاسخ به‌دست آمده مربوط به باکتری‌های هوازی است.

ــ دخالت مرحله رشد باکتری‌ها در نتیجه‌ی آزمایش

ــ متغیّر بودن زمان تکثیر باکتری‌ها در طی آزمایش

ــ دخالت عوامل ضدمیکروبی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها

ــ دخالت متغیرهایی مانند نور و مقدار چربی در آزمایش

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

۱ــ Dye Reduction test ۲ــ Redox ۳ــ Oxidation Reduction Potantial (RH)

۴ــ Clump or Closter ۵ــ Methylenblue Dye Reduction

ـ تهیه محلول متیلن‌بلو: برای تهیه این محلول، لازم است ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون و گرم را در شیشه‌ی رنگی مناسب ریخته، یک عدد قرص متیلن‌بلوی استاندارد در آن انداخت. قرص‌های استاندارد متیلن‌بلو دارای ۱۹ میلیگرم رنگ متیلن‌بلوی 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.

۱ـ۲ـ۹ـ تهیه نمونه‌ی شیر مورد آزمایش: برای نمونه‌برداری از شیر مایع اول باید آن را به خوبی مخلوط نمود و سپس ۱۰ میلی‌لیتر 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.

۲ـ۲ـ۹ـ آزمایش‌های لازم: پس از آماده شدن نمونه، باید یک میلی‌لیتر از محلول متیلن‌بلو 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 $۳۷/۵^{\circ}C \mp ۰/۵^{\circ}C$ 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 میلی‌لیتر شیر بدون محلول متیلن‌بلو هم آماده کرده، و به‌جای محلول متیلن‌بلو یک میلی‌لیتر 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 ۰/۵، 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 آزمایشِ حاوی نمونه اصلی شبیه رنگ لوله‌ی آزمایش مشاهده شود، زمان ختم عمل فرا رسیده است.

گزارش نتیجه‌ی آزمایش: این کار، به‌صورت 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 متیلن‌بلو در مورد نمونه مربوط ۳۰دقیقه 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.

۳ــ۲ــ۹ــ آزمون فسفاتاز: از این روش نمی‌توان برای شمارش تعداد میکروب‌های موجود در شیر استفاده نمود.

۳ــ۹ــ جستجو و شمارش میکروب‌های موجود در شیرخشک

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

ــ مراحل آزمایش میکروبی شیرخشک:

نمونه‌برداری: نمونه‌برداری از بهرهای بسته‌بندی شده باید با استفاده از روش استاندارد جمهوری اسلامی ایران به شماره ۲۸۳۶ یا جداول مناسب دیگر انجام گیرد، پس از انجام این مرحله می‌توان بسته‌ها را جداگانه مورد آزمایش میکروبی قرار داد و چنانچه انجام این کار به دلایلی مشکل باشد باید از تمام بسته‌هایی که به‌عنوان نمونه انتخاب شده‌اند نمونه‌برداری شود و نمونه‌ها با همدیگر مخلوط شده، پس از همگن شدن نمونه‌ی اوّلیه، نمونه‌ی مورد آزمایش از آن برداشته شود.

در مورد بهرهایی که به‌صورت فله هستند نمونه‌برداری باید از نقاط مرکزی و جوانب مختلف انجام گیرد و این نمونه‌ها با هم مخلوط شده، نمونه مورد آزمایش از آن انتخاب گردد. بدیهی است در هر مورد، نمونه‌برداری باید با ابزارهای سترون و شرایط بدون آلودگی دوباره انجام شود.

ــ آماده‌سازی محیط و محلول رقیق‌کننده:

تهیّه‌ی محلول رقیق‌کننده: برای این آزمایش محلول رینگر مناسب‌تر است. برای تهیه این محلول، ۰/۹ گرم کلرورسدیم، ۰/۰۴۲ گرم کلرور پتاسیم، ۰/۰۴۸ گرم کلرورکلسیم هیدراته، ۰/۰۲ گرم بیکربنات سدیم و ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر را باید بخوبی مخلوط کرده، در شیشه‌های مناسب یا به مقدار ۹ میلی‌لیتر به‌طور مستقیم در لوله‌های آزمایش ریخت و سترون نمود، به‌جای محلول بالا از محلول آب پپتونه با فردار هم می‌توان استفاده کرد.

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

۱ــ Nutrient Agar ۲ــ Multen Agar

ـ ***آماده‌سازی نمونه:*** برای آماده‌سازی نمونه لازم است ۲۵ گرم از آن را با ۲۲۵ میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده را نشانه‌گذاری نموده (10^{-5} تا 10^{-2})؛ سپس به طریق سترون ۱ میلی‌لیتر از رقت اوّلیه‌ی تهیه شده و یکنواخت شده را به آن‌ها اضافه کرد و سرانجام از هر یک از رقت‌های تهیه شده به روش بالا به‌وسیله پیپت استریل یک میلی‌لیتر برداشت و روی محیط کشت پلیت‌های نشانه‌گذاری شده ریخته و با میله شیشه‌ای سترون، آن را به‌طور یکنواخت روی تمام سطح محیط کشت پلیت‌ها پخش کرد و پلیت‌های تلقیح‌شده را در دمای $37^{\circ}C$ ـ $31^{\circ}C$ قرار داد. پس از ۷۲ـ ۲۴ ساعت پرگنه‌ها را شمارش نمود. برای دست یافتن به دقت بیشتر، بهتر است آزمایش دو بار تکرار شود.

این روش، روش شمارش کلّی میکروب‌ها بر روی محیط آگار در پلیت است. به‌جای آن، می‌توان یک میلی‌لیتر از رقت‌های مورد نظر را به پلیت سترون افزود و روی آن‌ها حدود ۱۰ تا ۱۵ میلی‌لیتر محیط سترون و ذوب شده در دمای حدود $45^{\circ}C$ 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 به‌طور یکنواخت در پلیت پخش شوند.

۴ـ۹ـ 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 به‌صورت زنجیر کوتاه تا دراز دیده می‌شود. دمای مناسب برای رشد آن حدود ۳۰ تا $37^{\circ}C$ است اما در دماهای $45^{\circ}C$ تا $50^{\circ}C$ هم قادر به ادامه‌ی زیست بدون تکثیر می‌باشد، a_W رشد آن بالاتر از ۰/۹۳ و pH مناسب برای رشد آن ۴/۹ تا ۹/۳ است، باکتری بسادگی تبدیل به اسپر می‌شود. اسپر 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.

۱ـ۴ـ۹ـ مراحل انجام آزمایش: محیط کشت مناسب برای کشت این باکتری فنل‌رد حاوی امولسیون زرده تخم‌مرغ و پلی‌میکسین[1] است که باید برابر دستور شرکت سازنده آماده گردد و امولسیون

۱ـ Phenol Red Egg - Yolk Polymyxine Agar

تخم‌مرغ و پلی‌میکسین به آن اضافه شود (طرز تهیه امولسیون تخم‌مرغ قبلاً شرح داده شده است).

برای آماده کردن نمونه، ۲۵ گرم از آن را به مخلوط‌کن اضافه کرده، ۲۲۵ گرم محلول آب پپتونه 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 ۰/۲۵ میلی‌لیتر به دو پلیت حاوی محیط کشت فنل‌رد محتوای امولسیون زرده تخم‌مرغ و پلی‌میکسین اضافه کرده، با میله شیشه‌ای سترون بخوبی روی سطح پلیت پخش می‌کنیم و در گرمخانه $30^{\circ}C$ 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 مشخّص و مجزّا، یک لوپ کوچک برداشته رنگ‌آمیزی نمود و به‌دنبال آن آزمایش‌های بیوشیمیایی شامل احیای نیترات، هیدرولیز نشاسته مایع کردن ژلاتی، سنتز اسید از مانیتول و حرکت را انجام داد و از روی نتیجه به‌دست آمده قضاوت نهایی را اعمال کرد.

۵ــ۹ــ آزمایش‌های میکروبی آرد

مجموعه‌ی میکروبی آرد بسیار متنوّع 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 شست‌وشو 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.

۱ــ۵ــ۹ــ شمارش میکروبی آرد: همواره شمارش میکروبی آرد با روش به‌کار 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 $37^{\circ}C$ حدود ۵۰٪ کمتر از شمارش میکروبی همان آرد روی محیط کشت نوترین ژلاتین و دمای رشد $20^{\circ}C$ گزارش شد. بنابراین انتخاب روش باید به‌گونه‌ای باشد که کم‌ترین خطا را به

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

۱ــ *تهیه و آماده کردن محیط کشت:* برای شمارش کلّی تعداد میکروارگانیسم‌های موجود در آرد از محیط کشت دکستروز ترپیتون آگار یا دکستروز تریپتون براث[۱] استفاده می‌شود و برای جستجو و شمارش باکتری‌های بی‌هوازی از محیط تیوگیکلات براث یا محیط رینفور سدکلسترید یال[۲].

محیط‌های کشت بالا را باید از پیش، به روش توصیه شده از سوی سازنده یا مراجع علمی تهیه، سترون و در پلیت‌ها و لوله‌ها به تناسب ریخت و برای مصرف آماده نمود.

۲ــ *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 میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده (محلول ۰/۱ درصد آب پپتونه سترون) ریخت و برای این‌که عملِ یکنواخت کردن به شیوه‌ی مطلوب‌تری انجام گیرد. مقداری ماسه تمیز و سترون هم به محلول رقیق‌کننده و نمونه اضافه کرد و به مدت ۲۰ دقیقه مخلوط‌کن را روشن گذاشت تا تعداد بیشتری از باکتری‌ها و کپک‌های چسبیده به ذرّات آرد جدا شوند. این کار در مورد آرد گندم لازم است، زیرا گونه‌هایی از باکتری‌های چسبیده به ذرّات آرد که اپی‌فیتیک[۳] نامیده می‌شوند روی آرد رشد کرده، رطوبت مورد نیاز خود را از هوا و مواد غذایی مورد نیاز خود را از ذرات آرد می‌گیرند و در این وضعیت، به سادگی از آرد جدا نمی‌شوند، پس از مخلوط شدن نمونه و محلول رقیق‌کننده، سوسپانسیون حاصل را تا 10^{-4} یا بیشتر (در صورت لزوم) رقیق کرده، بر روی رقت‌های به‌دست آمده، آزمایش‌های میکروبی زیر را انجام می‌دهیم.

شمارش کلی تعداد میکروب‌ها[۴]: برای این آزمایش از محیط دکستروزترپیتون آگار و شمارش پرگنه‌ها و یا از محیط دکستروزترپیتون براث و کاربرد جداول MPN استفاده می‌کنیم. طبق معمول سه سری لوله آزمایش پنج‌تایی انتخاب می‌کنیم. به ۵ تای اول ۱۰ میلی‌لیتر، به ۵ تای دوم ۱ میلی‌لیتر و به ۵ تای سوم ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت مورد نظر اضافه کرده، پلیت‌ها و لوله‌های آزمایش را به مدت سه روز در گرمخانه $32^{\circ}C$ قرار می‌دهیم و پس از آن به شمارش میکروبی اقدام می‌کنیم.

۶ــ۹ــ جستجوی باکتری‌های بی‌هوازی

برای این آزمایش از محیط کشت تیوگلیکلات براث یا RCM استفاده کرده، پلیت‌ها و لوله‌های آزمایش را به مدت سه روز در شرایط بی‌هوازی و در دماهای $25^{\circ}C$، $37^{\circ}C$ و $55^{\circ}C$ قرار می‌دهیم

۱ــ Dextros Trypton Agar or Broth
۲ــ Thioglycolate broth or Reinforced Clostridial Media (RCM)
۳ــ Epiphitic
۴ــ Total Count

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

جداسازی اسپرها: در مورد جداسازی اسپرترموفیل‌ها[1] 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 $80^{\circ}C$ 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 حاویِ محیط کشت جامد یا لوله‌ی حاوی محیط کشت مایع ریخته، در گرمخانه با دمای $37^{\circ}C$ قرار می‌دهیم. این آزمایش باید برای شرایط کشت بی‌هوازی تکرار شود.

در مورد جداسازی اسپرترمودوریک‌ها[2] لازم است نمونه را به مدت ۵ دقیقه در حمام آب گرم با دمای $100^{\circ}C$ قرار داد و بلافاصله سرد کرد و مانند روش بالا مراحل بعدی را ادامه داد.

۱ــ۶ــ۹ــ جستجوی استافیلوکوک[3] طلایی، کوآگولاز مثبت[4]: گونه‌های جنس استافیلوکوک، باکتری‌هایی هستند هوازی تا هوازی اختیاری بدون حرکت و دارای تجمّع خوشه‌ای، توده‌ای، زنجیری کوتاه و کوکسی شکل و گرم مثبت، که نقش بسیار مهمی در مسمومیت‌های غذایی دارند، زیرا قادرند سموم و آنزیم‌های 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 اهمیّت 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 طلایی را به‌طور طبیعی دارا هستند. بنابراین، افراد آلوده به این باکتری اگر در برابر موادّ 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.

۱ــ Thermo Phyl
۲ــ Thermoduric
۳ــ Staphylococcus aureus
۴ــ Bacteriological filter

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

ـ جستجوی باکتری استافیلوکوک طلایی کوآگولاز مثبت در نقاط مختلف بدن

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

ـ محیط کشت اختصاصی رشد این باکتری برد پارکر[1] است.

محیط کشت برد پارکر به‌صورت 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 $45^{\circ}C$ است باید مقداری امولسیون زرده‌ی تخم‌مرغ و تلّوریت پتاسیوم[2] به آن اضافه شود. برای تهیه امولسیون تخم‌مرغ لازم است به تعداد نیاز، تخم‌مرغ تازه و سالم را مدتی حدود یک ساعت در الکل قرار داد تا پوسته‌ی خارجی آن سترون شود، بعد تخم‌مرغ را از الکل خارج کرده، در معرض هوا یا نزدیک شعله یا جای گرم قرار داد تا الکل باقیمانده بر روی پوسته تبخیر شود، سپس به‌وسیله‌ی پنس سترون انتهای آن را سوراخ کرده، به آرامی سفیده آن را خارج نمود و زرده‌ی خالص را در ظرف مدرج سترون ریخت و معادلِ حجم آن، به آن سرم فیزیولوژی سترون اضافه نموده، به‌وسیله‌ی همزن شیشه‌ای یکنواخت کرد و به میزان ۵ درصد به محیط کشت آماده و سترون شده قبلی اضافه نمود.

همزمان برای تهیه محلول تلّوریت پتاسیوم، لازم است یک گرم از آن را در شرایط عاری از آلودگی[3] وزن نموده، به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه کرد و به خوبی به هم زد تا به‌طور کامل حل شود. سپس محلول را از روی صافی جداکننده‌ی میکروب[4] 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 تخم‌مرغ و تلّوریت پتاسیوم و یکنواخت شدن محیط کشت آن را به مقدار ۱۰ تا ۱۵ میلی‌لیتر در پلیت‌های سترون ریخته، پلیت‌های حاوی محیط کشت سفت شده را به شکل وارونه در سبد مخصوص قرار داده سپس جهت استریل در داخل اتوکلاو گذاشته می‌شود تا برای مراحل بعدی آماده گردد.

ـ با پنبه‌ی سترونِ دسته‌دار[5] که در نوعی مایع رقیق‌کننده و از جمله لیتموس‌میلک[6] یا آب پپتونه خیس شده است، اندام مورد نظر برای جستجوی باکتری را مرطوب کرده، چند بار بآرامی روی آن

۱ـ Baird Parker Agar
۲ـ Pottasium tellurite, Egg - yolk tellurite
۳ـ Aseptic technique
۴ـ Bacteriological filter
۵ـ Swab
۶ـ 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.)

ــ پنبه‌ی دسته‌دار را که اکنون به باکتری‌های پوست دست آلوده شده، در شیشه‌ی دردار 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.

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

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

ــ 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.

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

ــ پس از ۲۴ ساعت کلنی‌های تشکیل شده روی سطح آگار را شمارش می‌کنیم. کلنی‌های استافیلوکوک روی محیط بردپارکر به رنگ سیاه برآمده دارای حاشیه‌ی سفید نازک و اطراف روشن و پهن هستند. در برخی موارد به علت تغییرات امولسیون زرده‌ی تخم‌مرغ 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.

ــ **آزمایش کوآگولاز:** این آزمایش برای تشخیص باکتری استافیلوکوک طلایی که دارای قدرت بیماری‌زایی و مسمومیت‌زایی شدیدتری است انجام می‌گیرد. روش انجام آن به‌ترتیب زیر است :

ــ کلنی‌های مجزا و مشکوک به استافیلوکوک‌کوآگولاز مثبت را به‌وسیله‌ی لوپ برداشته، به محیط کشت برین‌هارت اینفیوژن براث[1] آماده و سترون شده اضافه می‌کنیم و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه $37^{\circ}C$ قرار می‌دهیم.

ــ ۰/۳ میلی‌لیتر پلاسمای خون خرگوش را در لوله‌های آزمایش کوتاه ویژه‌ی انجام این آزمایش می‌ریزیم.

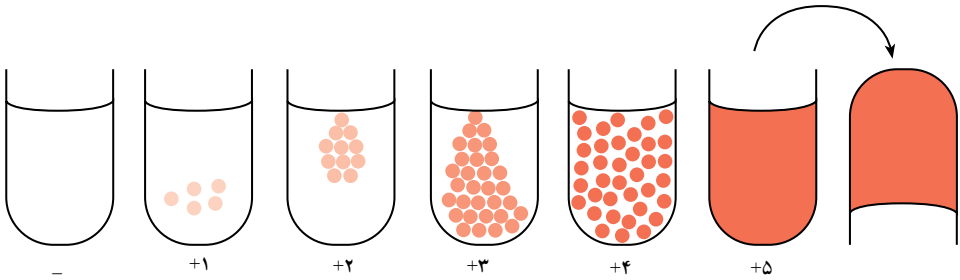
ــ به لوله‌های آزمایش حاوی ۰/۳ میلی‌لیتر پلاسمای خون خرگوش، ۰/۱ میلی‌لیتر از محیط کشت برین‌هارت اینفیوژن برات اضافه کرده، در دمای $37^{\circ}C$ ــ ۳۵ قرار می‌دهیم.

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

۱ــ Brain heart infusion broth

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 ۱ــ۹

۷ــ۹ــ جستجو و شمارش سالمونلا[۱] در گوشت مرغ

گونه‌های سالمونلا در خانواده‌ی آنتروباکتریا سه[۲] 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 به‌ویژه مرغ است. امّا بر روی گیاهان هم زندگی می‌کند. دمای مناسب برای رشد آن‌ها حدود $37^{\circ}C$ است اما دماهای ۵/۵ تا $45^{\circ}C$ را تحمل کرده، به رشد کند خود ادامه می‌دهد. سالمونلاها بیشتر از طریق آب آلوده، میوه‌ها و سبزی‌ها، گوشت طیور، گوشت قرمز، تخم‌مرغ، 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 بسرعت 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 به‌صورت 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

۱ــ Salmonella ۲ــ Enterobacteriacae

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

۱ــ۷ــ۹ــ 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 ۰/۵ درصد یا سرم فیزیولوژی و یا محلول آب پپتونه با فردار به آن اضافه می‌کنیم و ظرف حاوی نمونه را به مدت ۲۴ تا ۱۸ ساعت در گرمخانه $37 \mp 1^{\circ}C$ قرار می‌دهیم. بدیهی است چنانچه نمونه جامد باشد باید آن را در مخلوط‌کن سترون ریخته، یکنواخت نمود.

۲ــ۷ــ۹ــ 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 ۵۰۰ گرم منتقل می‌کنیم. سپس به یکی از آن‌ها ۲۲۵ میلی‌لیتر تتراتیونات برات[۱] و به دیگری همین مقدار سلنیت سیستئین برات[۲] اضافه می‌نماییم. اگر مقدار چربی نمونه زیاد باشد بهتر است ۶ میلی‌لیتر محلول ۱۰٪ ترژیتول[۳] (سدیم هپتادسیل سولفات) به آن اضافه کنیم و پس از بستن در آن، محتویات بسته را بشدت به هم زده، به مدت ۲۴ ساعت در اتو $35 \mp 2^{\circ}C$ قرار دهیم. دمای مناسب برای این مرحله را برخی از محققان تا $43^{\circ}C$ ذکر کرده‌اند. استفاده از محیط‌های غنی‌کننده‌ی 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 یکنواخت‌کننده‌ی مناسب با دور ۱۵۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰ استفاده شود.

۳ــ۷ــ۹ــ مرحله‌ی کشت روی پلیت: برای اجرای این مرحله یک لوپ[۴] پر از کشت مرحله بالا را برداشته، روی محیط‌های سالمونلا شیگلا آگار[۵]، بیسموت سولفیت آگار[۶]، بریان گرین آگار[۷] کشت می‌دهیم. به نحوی که در صورت حضور سالمونلا در قسمتی از پلیت کلنی‌های مجزا تشکیل شود. پلیت‌ها را به مدت ۲۲ تا ۲۴ ساعت در گرمخانه $35 \mp 1^{\circ}C$ قرار می‌دهیم. پرگنه‌های سالمونلا روی محیط کشت سالمونلا شیگلا آگار معمولاً بیرنگ است.

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

۱ــ Tetrathionate broth ۲ــ Selenit cystein broth ۳ــ Tergitol No.7
۴ــ Loop ۵ــ Salmonella Shigella Agar (SSA)
۶ــ Bismuth sulphite Agar (BSA) ۷ــ Brilliant green Agar (BGA)

شرایط نامساعد رشد و بعد از ۲۴ ساعت، حدود ۵ میلی‌لیتر 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.

۴ــ۷ــ۹ــ 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[۱] که به‌صورت خوابیده در لوله آزمایش قرار دارد، کشت داد. و در گرمخانه $35\mp2^{\circ}C$ 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 شدنِ آن، رنگ زرد حاصل می‌شود. قسمت عمقی محیط هم به علت سنتز SH_2 تیره رنگ می‌شود. (پاره‌ای از گونه‌های سالمونلا SH_2 سنتز نمی‌کنند.)

۵ــ۷ــ۹ــ 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 ۱۰ تا ۴۰ برابر هم می‌توان استفاده کرد و بهتر است یک لام شاهد هم تهیّه شود.

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

۸ــ۹ــ آزمایش میکروبی ماهی‌های آب شور

ماهی، از فسادپذیرترین مواد غذایی، و مسمومیت‌ها و عفونت‌های حاصل از مصرف ماهی آلوده و فاسد، از بزرگ‌ترین و شدیدترین عارضه‌های میکروبی است. آلودگی ماهی از راه‌های گوناگون مانند محیط زیست، ابزارهای صید، وسایل حمل و نقل و نگهداری، اندام‌های کارکنان و موارد مشابه انجام می‌گیرد، از طرفی pH ماهی، رطوبت آن و فعالیت‌های آنزیمی آن به‌گونه‌ای 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.

۱ــ Tr p e sugar Iron Agar (TSI)

۱ــ۸ــ۹ــ نمونه‌برداری و آماده کردن نمونه: نمونه‌برداری ممکن است از نقاط مختلف بدن ماهی انجام گیرد، برای مثال، نمونه‌برداری از سطح بدن ماهی، به چند شکل زیر انجام می‌شود : یکی روش شست وشوی سطح بدن ماهی[۱] است که برای ماهی درسته با شکم خالی یا پر و با وزن کمتر از ۲ کیلوگرم یا فیله ماهی انجام می‌گیرد. برای این منظور ابتدا با ابزارهای مناسب پولک‌های ماهی را جدا کرده، نمونه را در کیسه‌ی نایلونی محکم و سترون قرار می‌دهیم و ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ درصد آب پپتونه سترون به آن اضافه نموده تا سرحد امکان هوای کیسه را خالی می‌کنیم. آن‌گاه، برای مدت دو دقیقه آن را بشدت ماساژ داده، تکان می‌دهیم. در این مرحله تمام سطح بدن ماهی باید ماساژ داده شود تا میکروب‌های تمام قسمت‌های سطح بدن ماهی جدا شود. پس از این عمل مایع رقیق‌کننده را به ظرف اوّلیه آن برگردانده، آن را تا 10^{-4} یا حد دلخواه رقیق می‌کنیم و مورد آزمایش‌های لازم قرار می‌دهیم.

در صورتی که هدف، جداسازی سالمونلا باشد لازم است به‌جای محلول رقیق‌کننده بالا از محلول رقیق‌کننده‌ی آب پپتونه ۱٪ با فردار استفاده شود.

ــ روش نمونه‌برداری با پنبه سترون دسته‌دار[۲]: در این روش یک پنبه سترون از جنس آلژینات کلسیم را در محلول رقیق‌کننده خیس کرده، بخوبی روی سطحی معادل ۱۰ سانتیمتر مربع از بدن ماهی بمالید. سپس پنبه‌ی دسته‌دار را وارد لوله‌ی آزمایش حاوی مایع رقیق‌کننده کرده، از حدود ۰/۵ سانتیمتری بالای قسمت پنبه پیچ شده بشکنید و پس از ورود آن به داخل محلول رقیق‌کننده، حدود ۵۰ بار آن را بشدت تکان دهید. (برای این منظور می‌توانید از تکان‌دهنده‌ی الکتریکی استفاده کنید.) بعد تا حد دلخواه رقیق می‌نماییم.

ــ نمونه‌برداری از گوشت عضله ماهی

روش اول: در این روش، قسمتی از سطح بدن ماهی را با صفحه‌ی فلزی داغ سترون نموده، ابعاد معیّنی از آن را (برای نمونه طول و عرض ۴ و عمق ۲ سانتی‌متر) بریده، وارد محلول رقیق‌کننده می‌کنیم و به‌وسیله‌ی مخلوط‌کن برقی آن را یکنواخت کرده، از آن نمونه برمی‌داریم.

روش دوم: در این روش، سطح بدن ماهی را به‌وسیله‌ی پنبه دسته‌دار خیس شده در الکل سترون کرده یا مقداری الکل روی آن ریخته، آتش می‌زنیم. بدین‌ترتیب بدون داغ شدن گوشت ماهی سطح آن سترون می‌شود. سپس قسمتی از آن را، به طول و عرض ۴ و عمق ۲ سانتی‌متر، بریده، داخل محلول رقیق‌کننده ریخته، به‌وسیله‌ی مخلوط‌کن برقی یکنواخت می‌کنیم. بدیهی است چنانچه شمارش

۱ــ Rinse Method ۲ــ Swab Method

تعداد مطرح باشد، مقدار وزنی عضله زیر پوست و مقدار محلول رقیق‌کننده باید ۲۵ و ۲۲۵ میلی‌لیتر باشد و با روش‌های معمول رقت‌های لازم تهیه شود. محلول‌های رقیق‌کننده برای جست‌وجوی میکروارگانیسم‌های مختلف متفاوت است و به شرح زیر پیشنهاد می‌شود :

ــ برای جست‌وجوی سالمونلا محلول ۱٪ آب پپتونه با فردار

ــ برای جست‌وجوی ویبریدپارا همولیتیکوس محلول ۳٪ کلورسدیم

ــ برای سایر موارد محلول ۰/۱ درصد آب پپتونه با فردار یا محلول رینگر

۲ــ۸ــ۹ــ آزمایش‌های لازم: شمارش میکروارگانیسم‌های سطح عضله، امعا و احشا، به تفکیک و روی محیط‌های خاص آن‌ها باید انجام شود.

ــ تعداد کل میکروب‌های زنده با استفاده از محیط کشت پلیت کانت آگار

ــ شمارش میکروب‌های تحمل‌کننده‌ی نمک[1] با استفاده از محیط کشت پلیت گانت آگار به‌اضافه ۱۵٪ کلورسدیم که برای این دسته از میکروارگانیسم محلول رقیق‌کننده هم محلول ۳٪ کلورسدیم است.

ــ شمارش کلیفرم‌ها با استفاده از محیط کشت مک‌کونکی، لوریل تریپتون برات و روش Dilution tube count، مناسب‌تر است.

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

ــ 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 میلی‌لیتر از رقت مورد نظر را روی آن به‌طور یکنواخت پخش می‌کنیم و روی این قسمت یک لایه محیط کشت بدون امولسیون زرده تخم‌مرغ اضافه می‌کنیم و پلیت‌ها را در شرایط بی‌هوازی مانند جار بی‌هوازی قرار می‌دهیم و سرانجام جار حاوی پلیت‌های آماده شده به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه $37^{\circ}C$ 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 بی‌هوازی یا حداقل بی‌هوازی اختیاری می‌کند که برای رشد باکتری مناسب است.

دمای مناسب برای اتوگذاری پلیت‌ها و لوله‌های آزمایشگاهی ۵، ۱۵، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد

۱ــ Halophiles

برای رشد باکتری‌های سرمادوست، مزوفیل و گرمادوست است.

۹ــ۹ــ آزمایش میکروبی کمپوت و کنسرو

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

۱ــ۹ــ۹ــ اتوگذاری مقدماتی[۱]: در این مرحله دو سری از نمونه‌ی قوطیهای کنسرو انتخاب شده با روشهای آماری درست را برداشته، یک سری از آن‌ها را به مدت یک هفته در دمای C° ۳۷ ــ ۳۳ قرار می‌دهیم تا در صورت آلودگی احتمالی، میکروب‌ها رشد کرده، تعداد آن‌ها به حدّ 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.

۲ــ۹ــ۹ــ باز کردن قوطی‌های کنسرو به منظور انجام آزمایش‌های میکروبی: برای این منظور، سر یا ته قوطی مورد نظر را با پنبه خیس شده در الکل سترون نموده، مقدار کمی (حدود ۱ میلی‌لیتر) الکل روی آن می‌ریزیم و پس از مدت کوتاهی آن را آتش می‌زنیم تا الکل تبخیر شود، سپس با درب بازکن دوار استریل، سوراخی با حداقل قطر بر روی در قوطی ایجاد نموده، چنانچه محتویات قوطی مایع است، به‌وسیله‌ی پیپت سترون، مقداری از آن را برمی‌داریم و در صورت نیاز رقیق نموده، در غیر این‌صورت، به‌طور مستقیم به محیط کشت منتقل می‌نماییم.

چنانچه محتوای قوطی جامد باشد باید از قسمتهای مختلف آن نمونه‌برداری شود، به‌طوری که نمونه گزینش شده معرّف خوبی از کل محتوای بسته باشد. در مواردی که آلودگی مشهود نیست حداقل ۲۵ گرم از نمونه باید با ماده رقیق‌کننده رقیق شده، رقت‌های بعدی از آن آماده شود.

۳ــ۹ــ۹ــ باز کردن درب قوطی‌های باد کرده: در مورد قوطی‌های باد کرده، نمونه‌برداری باید به‌صورت زیر انجام گیرد :

ابتدا یک تشت انتخاب نموده، مقداری آب حاوی مواد ضدعفونی‌کننده 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 تیزِ سترون وارد کرده، به‌وسیله‌ی 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

۱ــ Pre - Incubation

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 نمونه‌برداری را انجام می‌دهیم.

۴ـ۹ـ۹ـ آزمایش‌های پیشنهادی:

ـ ***شمارش مستقیم میکروسکوپی:*** آزمایش عمومی، برای انجام این آزمایش از شش سری محیط کشت دکستروزتریپتون آگار[۱] با معرف پرموکرازول ارغوانی استفاده کرده، پلیت‌های تلقیح شده[۲] را در دماهای $25^{\circ}C$ ـ ۲۲ و $37^{\circ}C$ ـ ۳۵ و $60^{\circ}C$ ـ ۵۵ به‌صورت هوازی و بی‌هوازی به مدت ۳۶ـ۲۴ ساعت در گرمخانه می‌گذاریم و پس از طی این مدت، پرگنه‌های تشکیل شده را مورد مراحل شناسایی بعدی قرار می‌دهیم.

ـ ***شمارش و شناسایی اسپرها:*** برای این آزمایش از دو سری از رقت‌های تهیه شده در لوله آزمایش دردار یا شیشه مک‌کارتنی درپیچی را یکی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای $80^{\circ}C$ و دیگری ۵دقیقه در دمای $100^{\circ}C$ قرار می‌دهیم و پس از سرو نمودن تدریجی به محیط کشت اختصاصی منتقل می‌نماییم، همچنین برای اسپر گونه‌های کلستریدیوم[۳] از محیط[۴] SPS و برای گونه‌های باسیلوس از محیط تریپتون سوی براث[۵] استفاده می‌نماییم.

ـ برای جستجوی کلستریدیاها از محیط‌های کشت آگار خون‌داربا نئومایسین[۶] SPS، روبرتسون کوکدمیت[۷]، لیور براث[۸]، تیوگلیکولات براث[۹] و قرار دادن لوله‌ها و پلیت‌های تلقیح شده در شرایط بی‌هوازی استفاده می‌شود.

ـ برای جستجوی گونه‌های باسیلوس، از محیط کشت TSB استفاده می‌شود.

ـ برای جستجوی کلیفرم‌ها از محیط‌های لوریل تریپتون براث[۱۰]، مک کانکی[۱۱] یا وایولت رد بایل آگار[۱۲] استفاده می‌شود.

ـ برای جستجوی مخمرها و کپک‌ها از محیط مالت اکستراکت آگار[۱۳] یا محیط مایکولوژیکی[۱۴] استفاده می‌شود.

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

خودآزمایی

۱ــ شمارش هر یک از موارد تعداد کل میکروب‌های زنده، کلیفرم‌ها، استرپتوکوک فعال و کلستریدیوم پرفرنژان یا ولشای در آب، به چه منظور انجام می‌گیرد؟

۲ــ محاسن آزمایش احیای رنگ برای شناسایی وضعیت آلودگی شیر را بنویسید.

۳ــ آماده کردن نمونه باسیلوس سرئوس چگونه انجام می‌گیرد؟

۴ــ مجموعه‌ی میکروبی آرد را نام ببرید.

۵ــ جداسازی اسپرها در آزمایش میکروبی آرد چگونه انجام می‌شود؟

۶ــ مرحله غنی‌سازی در آزمایش سالمونلا را شرح دهید.

۷ــ نمونه‌برداری از بدن ماهی به چند طریق انجام می‌گیرد؟ توضیح دهید.

۸ــ نمونه‌برداری از قوطی‌های باد کرده چگونه انجام می‌شود؟

منابع و مآخذ

۱ــ اسماعیل خلیل، میکروبیولوژی عملی، چاپ فارابی، ۱۳۶۴.

۲ــ کریم گیتی، آزمون‌های میکروبی مواد غذایی، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۷۴.

۳ــ کازرونی تیمسار جهانگیر (ترجمه)، فعالیت میکروب‌ها (روش‌های آزمایشگاهی میکروبیولوژی عمومی)، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۵۸.

۴ــ روح بخش عباس و دیگران، کنترل بهداشتی مواد خوراکی (نمونه‌برداری، آزمایش، تفسیر)، انتشارات چهر، ۱۳۶۹.

۵ــ مرتضوی علی، اطلس میکروبیولوژی مواد غذایی، انتشارات گلنشر، ۱۳۷۱.

6_ Essays in Applied Microbiology
J.R Norris
M.H Richmond
1981

7_ MICROBIOLOGY IN HEALTH AND DISEASE
Forbisher and Fuerst's
1983

8 _ MICROBIOLOGY AND INFECTION DISEASE
BRIODY
1974

9_ BACTERIOLOGY
PRINCIPLES AND PRACTICE
H. BRYAN
A. BRYAN

G. BR YAN
1962
10_ MICROBIOLOGY MICAEL J. PELCZAR. JR.
ROGERD . REID
1972
11_THE MICROBES LECHEVALIER PRAMER
1971
۱۲ــ لوئیس بیشایر ۱۹۸۳ ترجمه شایسته سپهر و دیگران، ۱۳۷۱ خودآموز میکروب‌شناسی عملی مرکز نشر دانشگاهی شماره ۶۳۹.
۱۳ــ پایان رسول، کنسروسازی، انتشارات آییژ، ویرایش سوم ۱۳۸۵.
۱۴ــ پایان رسول، مقدمه‌ای بر تکنولوژی فرآورده‌های غلات، انتشارات نوپردازان، ویرایش سوم ۱۳۸۵.
۱۵ــ پایان رسول، مبانی کنترل کیفیت در صنایع غذایی، چاپ دوم، ویرایش سوم، انتشارات آییژ.
۱۶ــ آل‌محمد، محمد مهدی، میکروب شناسی عملی، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۶۵.