فصل ششم

نمونه‌برداری و آماده‌سازی نمونه برای آزمون

نمونه برداری برای آزمون‌های میکروبی

به طور کلی پیش از انجام آزمون‌های میکروبی مواد غذایی و برای آماده‌سازی نمونه‌های غذایی چندین مرحله انجام می‌شود که شامل موارد زیر است :

ـ نمونه‌برداری

ـ جابه‌جایی نمونه مواد غذایی

ـ دریافت و نگهداری نمونه‌ها در آزمایشگاه میکروب شناسی

ـ آماده سازی نمونه‌های مواد غذایی برای انجام آزمون‌های میکروبی

۱ـ۶ـ نمونه‌برداری

با توجه به اهمیت نمونه‌برداری در آزمون‌های میکروبی، آزمایشگاه باید نمونه‌ای را دریافت کند که نماینده سری ساخت[۱] محصول بوده و هنگام جابه‌جایی و نگهداری آسیب ندیده باشد و یا تغییری در آن ایجاد نشده باشد. مسأله مهم در میکروب‌شناسی موادغذایی این است که باکتری‌ها به‌طور معمول به صورت گسترده و غیریکنواخت در فرآورده‌های غذایی پراکنده می‌شوند. برای نمونه در میوه‌ها، سبزی‌ها،گوشت و ماهی میزان انتشار باکتری‌ها روی سطوح در مقایسه با قسمت‌های عمقی بیشتر است. همچنین بهتر است نمونه در برابر آلودگی‌های خارجی ناشی از هوا، ظرف‌های نمونه‌برداری و جابه‌جایی نامناسب حفظ شود. ویژگی‌های نمونه‌های مواد غذایی باید به طور کامل مشخص و ثبت شود. اگر نمونه‌ها به طور صحیح برداشت یا جا به جا نشده باشند، نماینده مناسبی از ماده‌غذایی نبوده و قضاوت در مورد آنها نادرست می‌باشد.

۱ـ۱ـ۶ ـ واژه‌های مهم نمونه‌برداری :

ـ **محموله** : مقدار معینی از کالا که در یک نوبت تحویل داده می‌شوند.

ـ **بهر**[۲] : مقدار معینی از محموله که دارای کیفیت یکسان باشد.

ـ **زیر بهر**[۳] : مقدار معینی از بهر که به طور جداگانه در جایی نگهداری شده باشد.

ـ **نمونه**[۴] : جزیی از بهر مورد آزمون است که باید دارای همه ویژگی‌های بهر مورد نظر باشد. برای نمونه‌برداری نمی‌توان حجم وسیعی از ماده غذایی را برداشت کرد بلکه نمونه باید به صورت واحدهای کوچک به نام Unit که در بیشتر موارد واحدهای ۱۰۰

---

۱ ـ Batch number

۲ ـ Lot

۳ ـ Sub Lot

۴ ـ Sample

گرمی هستند از جاهای مختلف ماده غذایی برداشت شود.

ـ **نمونه اولیه**[1] : ماده جمع آوری شده در نمونه‌برداری است که دست کم باید دو برابر مقدار ماده غذایی لازم برای انجام آزمون‌ها باشد و مقدار اضافی آن برای مواقعی که دوباره به نمونه نیاز است نگهداری شود.

ـ **نمونه نهایی** : عبارت است از مقداری از بهر که از تقسیم دقیق کل نمونه‌ها بوسیله تقسیم کننده مناسب به‌دست آمده باشد.

ـ **نمونه مورد آزمون** : عبارت است از مقداری از بهر که از نمونه نهایی برای آزمون‌های مورد نظر برداشته می‌شود.

ـ **طرح نمونه‌برداری**[2] : نمونه‌برداری باید برابر با استانداردهای ملی عمومی و ویژه هر فرآورده غذایی انجام شود.

برای تهیه نمونه‌های اولیه باید موارد زیر رعایت شود :

الف) نمونه‌برداری باید به وسیله فرد آگاه به تکنولوژی فرآورده‌های مربوطه و آزمون‌های میکروبی انجام شود.

ب) در صورت امکان نمونه‌ها هنگام تخلیه بهر از کشتی، کامیون و هواپیما یا هر وسیله دیگر باید به روش تصادفی از تمام قسمت‌های بهر برداشته شوند. اگر نمونه‌برداری از تمام قسمت‌های بهر امکان پذیر نیست، گاهی از بسته‌هایی که در دسترس هستند، نمونه‌برداری می‌شود که در این صورت یافته‌ها تنها برای بسته‌های مورد نظر قابل تفسیر است و قابل تعمیم به کل بهر غذایی نیست.

پ) برای نمونه‌برداری از کارتن‌های بزرگ دارای بسته‌های کوچک، به روش تصادفی چند کارتن انتخاب شده سپس از هر یک از کارتن‌ها نیز به تعداد مورد نیاز بسته‌های کوچک برداشته می‌شود.

ت) اگر فرآورده‌های غذایی در ظرف‌های بسیار بزرگ قرار دارند که به آسانی به آزمایشگاه منتقل نمی‌شوند، باید نمونه‌های معرف را انتخاب کرده و به طور جدا در ظرف‌های دیگری قرار داده و سپس آنها را به آزمایشگاه منتقل نمود.

یادآوری : هنگام نمونه‌برداری ابتدا باید روی بسته‌های غذایی و ظرف‌های نمونه را با مواد تمیز کننده سالم‌سازی کرده سپس با اتانول ۷۰٪ آن را سترون نمود.

ث) مواد غذایی کنسرو شده باید به همان صورت کنسرو به عنوان نمونه اولیه به آزمایشگاه فرستاده شود.

ج) اگر نمونه غذایی حجم زیادی دارد باید از قسمت‌های مختلف آن نمونه‌برداری شود مگر اینکه به طور کامل یکنواخت شده باشد.

چ) مواد مایع منجمد را باید در یک ظرف سترون شده بزرگ قرار داد و در شرایط سترون آن‌را به تکه‌های کوچک‌تر تقسیم کرد، برای نمونه، درون کیسه‌های پلاستیکی سترون شده و محکم و سپس از تکه‌های خرد شده نمونه‌برداری انجام شود. انجام این کار با استفاده از مته یا اره برقی نیز مقدور است.

ح) دمای هوای اتاق نگهداری نمونه یا وسیله جابه‌جایی و نیز دمای ماده غذایی هنگام نمونه‌برداری باید یادداشت شود.

خ) در مواردی که بسته‌های کوچک باز نشده به آزمایشگاه فرستاده می‌شود لازم است دمای ماده غذایی در بسته یادداشت شود.

د) نمونه‌برداری باید در محیطی دور از گرد و خاک و جریان هوا و رطوبت انجام شود.

ذ) در صورتی که قسمت‌هایی از بهر وضعیتی متفاوت با سایر قسمت‌های آن دارد مانند کارتن‌ها و جعبه‌های شکسته شده نمونه‌برداری باید به صورت تصادفی از آنها هم انجام شود.

ر) در مورد برداشت نمونه از کالاهای بسته بندی شده موجود در انبار یا نمونه‌برداری از کالا در محل فروش و توزیع که بیشتر به دلیل مشکوک بودن صورت می‌گیرد، باید شرایط نگهداری و تاریخ ساخت آن بیشتر مورد توجه قرار گیرد.

---

۱ ـ Increment

۲ ـ Sampling plan

۲ــ۱ــ۶ــ ویژگی‌های وسایل نمونه‌برداری :

ــ ظرف‌های نمونه‌برداری باید خشک، تمیز و سترون باشند و تا زمان استفاده سترون باقی بمانند. برای این منظور می‌توان آنها را در ورق‌های آلومینیومی پیچید و در اتوکلاو سترون نمود. برای سترون کردن بسته‌های پلاستیکی می‌توان از اشعه یونیزه کننده یا محلول‌های شیمیایی سترون کننده استفاده کرد که در این صورت پیش از کاربری مواد شیمیایی سترون کننده باید حذف شوند. همچنین می‌توان از ظرف‌های شیشه‌ای دهان گشاد و در پیچ دار، ظرف فلزی زنگ نزن و کیسه‌های پلاستیکی یکبار مصرف محکم با گنجایش مناسب که بتوان ۲۵۰ــ۱۰۰ گرم نمونه را در آن جای داد استفاده کرد.

ــ در صورتی‌که از کیسه‌های پلاستیکی یکبار مصرف استفاده می‌شود باید پس از نمونه‌برداری آنها را محکم با نخ و سیم به گونه‌ای بست که هیچ منفذی برای ورود و خروج مواد در آن نباشد.

ــ برای برداشت نمونه‌ها باید با توجه به نوع ماده غذایی از وسیله‌های مختلف مانند چاقوهای فولادی زنگ نزن،پنس، قاشک، انبرک، گیره، کاردک،مته‌های مخصوص، در باز کن و قیچی استفاده نمود.

یادآوری : همه وسیله‌های نمونه‌برداری باید از پیش سترون شوند(به فصل سوم مراجعه شود).

۲ــ۶ــ روش نمونه‌برداری از چند ماده غذایی

۱ــ۲ــ۶ــ تخم مرغ کامل : پس از باز کردن کارتن‌های تخم مرغ در صورتی که از نظر ظاهری بدون عیب باشد باید تعدادی از آنها به روش تصادفی انتخاب شده و سپس به آزمایشگاه منتقل شوند. اگر امکان انتقال سریع آنها به آزمایشگاه وجود ندارد باید آنها را تا زمان رسیدن به آزمایشگاه در دمای C ° ۴ــ۰ نگهداری نمود.

۲ــ۲ــ۶ــ گوشت پرنده‌ها (منجمد) : برای این منظور باید از کیسه‌های پلاستیکی به طور جدا برای قسمت‌های مختلف لاشه استفاده شود. به محض رسیدن این نمونه‌ها به آزمایشگاه باید آنها را از کیسه بیرون آورده در یک سینی سترون قرار داد و در یخچال گذاشت تا از حالت منجمد خارج شود.

۳ــ۲ــ۶ــ گوشت دام و پرنده‌های سرد شده : این نمونه‌ها باید به روش فرآورده‌های منجمد، خیلی سریع پس از رسیدن به آزمایشگاه مورد آزمایش واقع شوند. در تهیه نمونه برای آزمون باید از روش تراشیدن استفاده شود.

۴ــ۲ــ۶ــ گوشت خام منجمد : برای نمونه‌برداری از گوشت خام و تکه‌های گوشت بدون استخوان باید با اره و ساطور تمیز و سترون شده، دست کم ۲۵۰ گرم نمونه برداشته و به کیسه پلی اتیلنی منتقل کرد، سپس سر کیسه را گره زده و درون کیسه دیگری قرار داد. با استفاده از مته برقی هم می‌توان از قسمت‌های عمقی برای نمونه‌برداری از نمونه‌های جامد و منجمد استفاده نمود.

یادآوری : غذاهای منجمد باید تا زمان رسیدن به آزمایشگاه همچنان به حالت منجمد باقی بمانند و اگر از حالت انجماد خارج شوند نباید دوباره منجمد گردند.

۵ــ۲ــ۶ــ پنیر : برای نمونه‌برداری و آزمون‌های میکروبی پنیرهای سخت و نیمه سخت که مشکوک به آلودگی هستند باید از راه زیر استفاده شود. برای تعیین آلودگی سطحی پنیر می‌توان یک لام ویژه آزمایشگاه میکروب شناسی را پس از سترون کردن روی سطح پنیر چسبانده و یا تکه‌ای از سطح پنیر را بین دو لام ویژه فشرده و پس از جدا کردن ذرات پنیر آن را مورد آزمون قرار داد. درضمن برای جدا کردن پنیر از روی لام لازم است آن را با گزیلن تمیز نمود و برای تعیین آلودگی عمق پنیرابتدا باید قسمت سطحی پنیر را به عمق ۱تا ۱/۵ سانتی متر کنار زد سپس از قسمت داخلی آن با وسیله مخصوص نمونه‌برداری پنیر (مانند چوب پنبه سوراخ کن) از پنج نقطه متمایز، ۵ نمونه ۵ گرمی برداشت. نمونه‌های پنیر را باید تا انجام آزمایش در دمای C ° ۱۰ یا کمتر نگهداری کرد. اگر از پنیر تازه بی‌نمک نمونه‌برداری می‌شود باید تا زمان رساندن نمونه به آزمایشگاه و انجام آزمون، نمونه در دمای بین C ° ۴ــ۰ نگهداری شود.

۶ــ۲ــ۶ ــ شیر تازه :

ــ نمونه‌برداری از شیر دام زمان دوشیدن : پیش از دوشیدن شیر، پستان گاو را باید با آب و صابون شسته و با یک پارچه تمیز خشک کرده و با نوعی ماده سترون کننده آلودگی آن را بر طرف نموده و پس از کمی‌دوشیدن شیر نمونه‌برداری را انجام داد. پس از دوشیدن کامل شیر لازم است آن را به خوبی هم زده و نمونه‌برداری کرد.

یادآوری :

الف) تمیز کردن پستان گاو بسیار مهم است زیرا آلوده بودن آن زمان دوشیدن می‌تواند منجر به آلودگی شیر شده و بنابراین یافته‌های آزمون قابل اطمینان نخواهد بود.

ب) بهتر است قطره‌های اولیه شیر دور ریخته شود زیرا مجرای پستان پیش از دوشیدن ممکن است آلوده باشد و شیر هنگام عبور از آن آلوده شود.

پ) همه وسایل نمونه‌برداری و ظرف‌های نگهداری شیر دوشیده شده باید سترون باشند و نمونه‌برداری نیز در شرایط سترون انجام شود.

ت) هنگام استفاده از شیر دوش مکانیکی، چون لوله بعضی از این شیر دوش‌ها به یک مخزن استیل ضد زنگ متصل است پیش از نمونه‌برداری باید چند بار شیر موجود در مخزن، هم زده شود.

ــ نمونه‌برداری از شیر در تانکرها و مخزن‌ها : هنگام نمونه‌برداری از این ظرف‌ها باید به نکته‌هایی مانند، مدتی که شیر در ظرف مانده است و چگونگی نگهداری و دمای شیر توجه نمود. پیش از نمونه‌برداری نمونه شیر با همزن دستی و الکتریکی یکنواخت می‌شود. اگر ۳۰ دقیقه از ریختن شیر در این ظرف‌ها گذشته باشد باید عمل هم‌زدن ۵ دقیقه ادامه یابد. عمل هم‌زدن باید تا آنجا ادامه یابد که شیر همگن شده و قسمت‌های بالا و پایینی نمونه یکسان باشد.

یادآوری : مقدار نمونه نباید از ۵۰۰ میلی لیتر کمتر باشد.

۷ــ۲ــ۶ ــ شیر پاستوریزه و استریلیزه : برای نمونه‌برداری از این بهرها با استفاده از جداول نمونه‌برداری از بهرهای فرایند شده لازم است به تعداد لازم نمونه انتخاب شده و به آزمایشگاه منتقل شوند. همه وسایل نمونه‌برداری باید سترون باشند و برای رساندن نمونه‌های شیر به آزمایشگاه، شرایط دما باید بین C ° ۴ــ۰ بوده ونمونه سریع به آزمایشگاه فرستاده شود.

۸ــ۲ــ۶ ــ خامه : نمونه‌برداری از خامه مانند شیر است. هنگام هم‌زدن خامه باید دقت شود که همه خامه به ویژه قسمت‌های موجود در ته و اطراف ظرف همگن و یکنواخت شود. پس از یکنواخت شدن باید ۲۰۰ گرم نمونه در شرایط سترون برداشت شده و با همان شرایط نگهداری شیر به آزمایشگاه فرستاده شود.

یادآوری : همزن دستگاه را نباید با شدت به بالا و پایین برد بلکه باید آن را داخل خامه فرو کرد و حرکت داد.

۹ــ۲ــ۶ ــ کره :

الف) نمونه‌برداری از کره در دستگاه کره زنی : پس از آن که کره در دستگاه آماده شد، باید سه نمونه هر یک به وزن تقریبی هریک ۱۰ گرم از سه نقطه یکی از وسط و دو نمونه از اطراف برای آزمایش‌های میکروبی برداشته شود. در این نمونه‌برداری فاصله نقاط از بالا به پایین و اطراف باید معین باشد.

ب) کره در ظرف‌ها و بسته‌های بزرگ : با وسایل سترون باید از دو قسمت جدا هر یک به وزن تقریبی ۱۵ گرم نمونه، برداشت شود. اگر از بسته‌های بزرگ کره نمونه تهیه می‌شود، باید قسمتی از پوشش آن کنار زده شده تا سطح کره نمایان شود. سپس با قاشق سترون شده نمونه‌برداری صورت گیرد. برداشت نمونه کره از کنار بسته طوری صورت می‌گیرد که از سه طرف قسمت‌های سطحی برداشت شود.

پ) نمونه‌برداری از کره بسته بندی شده : باید با روش‌های نمونه‌برداری استاندارد به شماره ۲۸۳۶ از بهرهای فرایند شده انجام گیرد، برای این منظور باید تعداد معینی بسته نمونه انتخاب کرده، به آزمایشگاه فرستاده شده یا در شرایط سترون بسته را باز کرده و ۱۵ گرم نمونه با قاشقک استریل برداشت، نمونه‌ها را در دمای C °۴ـ۰ به آزمایشگاه فرستاده می‌شوند.

۱۰ـ۲ـ۶ ـ بستنی : برای نمونه‌برداری از بستنی ابتدا با یک چاقو و یا به وسیله برنده سترون، سطح نمونه را تا عمق ۲/۵ سانتی‌متری کنار زده و از آن محل نمونه برداشت. مقدار نمونه لازم حدود ۵۰ گرم است. نمونه‌ها پس از برداشت و نگهداری در ظرف‌های سترون باید فوری به آزمایشگاه فرستاده شوند تا هنگام آزمون، از حالت انجماد خارج نشود.

یادآوری : اگر بستنی ایجاد مسمومیت کرده لازم است از تمام مواد اولیه آن هم نمونه‌برداری شود.

۱۱ـ۲ـ۶ ـ شیر خشک : اگر شیر خشک به صورت بسته‌های کوچک است باید با روش استاندارد ملی به تعداد مناسب از بسته‌ها نمونه برداشته شود ولی اگر بسته‌ها بزرگ باشند باید از بین آنها تعدادی انتخاب و مقدار لازم نمونه از آنها برداشته شود. نمونه‌ها باید به سرعت به ظرف‌های شیشه‌ای و سترون منتقل و درب ظرف بسته شود.

یادآوری : چون شیر خشک به سرعت رطوبت را جذب می‌کند، در محل نمونه‌برداری نباید رطوبت هوا زیاد باشد.

۱۲ـ۲ـ۶ ـ کنسرو ها و کمپوت‌ها : برای نمونه‌برداری از این بهرها هم لازم است از روش استاندارد ملی جمهوری اسلامی ایران به شماره ۲۸۳۶ برای نمونه‌برداری استفاده شود. برای این منظور باید سطح قوطی‌ها با آب گرم و ماده شوینده به خوبی شسته شده و با پنبه آغشته به الکل سترون شود. به دلیل احتمال وجود مقداری گاز درون قوطی‌های با محتوای فاسد ممکن است هنگام سوراخ کردن، گاز سبب پخش ماده غذایی به اطراف شود و به سر و صورت نمونه‌بردار برخورد کند. برای رفع این مشکل باید قیف سترونی را که اندازه آن مناسب با اندازه قوطی کنسرو باشد به طور وارونه روی قوطی قرار داد، سپس میخ بلند و سترونی را از جهت باریک قیف داخل کرده و با ضربه قوطی را سوراخ کرد. در مورد قوطی‌های سالم می‌توان با استفاده از در بازکن سترون در قوطی را به اندازه کافی باز کرده سپس با وسیله فلزی توخالی و سترون که تا عمق قوطی وارد می‌شود، نمونه‌برداری کرد. بدیهی است سطح خارجی بسته پیش از نمونه‌برداری باید با الکل اتیلیک ۷۰٪ سترون شده باشد.

یادآوری : اگر ماده درون قوطی مایع است، باید پس از یکنواخت کردن با پی‌پت سترون مقدار نمونه لازم برداشت شده و به یک ظرف سترون منتقل و به آزمایشگاه فرستاده شود.

۱۳ـ۲ـ۶ ـ نمونه‌برداری از آب : به طور کامل در فصل ۸ قسمت آزمایش‌های میکروبی آب شرح داده خواهد شد.

۳ـ۶ ـ جابه جایی نمونه‌ها

ـ نمونه‌ها باید در شرایطی به آزمایشگاه فرستاده شوند که تا جای ممکن در تعداد میکروارگانیسم‌های موجود در آنها تغییری ایجاد نشود.

ـ تحویل نمونه‌ها به آزمایشگاه باید سریع بوده و تا حد امکان با حفظ شرایط نگهداری اصلی نمونه باشد و در صورت نیاز روی برچسب نمونه شرایط نگهداری آن مشخص شود.

ـ نمونه‌ها باید به گونه‌ای بسته‌بندی شوند که از نشتی شدن و ریختن آنها روی محیط، وسایل جابه جایی و اندام‌های کارکنان جلوگیری گردد.

ـ نمونه‌هایی که نیاز به نگهداری در یخچال یا فریزر ندارند را می‌توان در ظرف‌های مناسب بسته بندی کرد.

ـ هنگام جابه جایی نمونه‌ها دماهای زیر بر اساس نوع فرآورده پیشنهاد می‌شود :

۱ـ اگر نمونه‌ها خشک یا به صورت کنسرو شده باشند نیازی به شرایط ویژه دما برای نگهداری آنها نیست و اما دما نباید از

C ° ۴۵ تجاوز کند. به این نمونه‌های غذایی، نمونه پایدار[۱] می‌گویند.

۲ــ فرآورده‌های منجمد باید تا زمان آزمایش، همچنان به حالت انجماد نگهداری‌شوند و دمای نگهداری آنها باید کمتر از C ° ۱۸- باشد.

۳ــ فرآورده‌های ناپایدار[۲] و غیر منجمد باید در ظرف‌های عایق به آزمایشگاه فرستاده شوند و تا هنگام آزمون در دمای C ° ۴ــ۰ نگهداری شوند.

۴ــ۶ ــ دریافت و نگهداری نمونه‌ها در آزمایشگاه

مسئول آزمایشگاه باید شرایط نمونه را در زمان دریافت بررسی نموده و در صورت وجود شرایط نامطلوب یا کافی نبودن تعداد نمونه، از پذیرش آن خودداری کند. ظرف‌های نمونه‌برداری را باید از نظر نقص فیزیکی و ظاهری کنترل کرد. هنگام دریافت نمونه توجه به نکات زیر ضروری است :

- تاریخ دریافت نمونه
- جزییات نمونه‌برداری (زمان نمونه‌برداری، نمونه‌بردار، هدف از نمونه‌برداری و آزمون مورد نظر)
- نام و آدرس محل نمونه‌برداری

در صورت امکان نمونه‌ها پس از دریافت، باید به سرعت آزمایش شوند بهتر است فاصله زمان دریافت نمونه و انجام آزمون کمتر از ۲۴ ساعت باشد.

نکته : برای فرآورده‌های بسیار فاسد شدنی (آبزیان خوراکی) باید تا ۲۴ ساعت از زمان نمونه‌برداری، مورد آزمون‌های لازم قرار گیرند. برای فرآورده‌های فاسد شدنی مانند شیرخام تا ۳۶ ساعت از زمان نمونه‌برداری باید آزمون‌های لازم انجام شود.

برای نگهداری نمونه‌ها تا زمان انجام آزمون باید نمونه‌ها در شرایطی نگهداری شوند که در تعداد میکروارگانیسم‌های موجود در آنها تغییری ایجاد نشود (مانند شرایط نگهداری نمونه‌ها هنگام جا به جایی).

۵ــ۶ ــ آماده‌سازی نمونه برای آزمون‌های میکروبی

۱ــ۵ــ۶ ــ رعایت نکته‌های بهداشتی پیش از انجام آزمون :

ــ پیش از باز کردن بسته‌بندی نمونه‌های معمولی باید اطراف محل باز کردن با پنبه آغشته به اتانول ۷۰٪ سترون شود.

ــ پیش از شروع آزمون لازم است مکان و سطوح انجام آزمون با مواد سترون‌کننده مناسب تمیز و سالم‌سازی شود.

ــ دست‌ها پیش از انجام آزمون باید با یک ماده شوینده مناسب شسته شوند.

ــ وسایل انجام آزمون‌های میکروبی باید سترون بوده و از قرار گرفتن در معرض آلودگی پیش از استفاده حفظ شوند.

۲ــ۵ــ۶ ــ آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه و تهیه رقت‌های اعشاری بعدی[۳] :

الف) تهیه سوسپانسیون اولیه : برای تهیه سوسپانسیون اولیه از نمونه‌های جامد که به آزمایشگاه فرستاده می‌شود باید سه کار انجام شود :

۱ــ وزن کردن نمونه

۲ــ رقیق کردن نمونه

---

۱ ــ Stable

۲ ــ Non stable

۳ ــ Further decimal dilutions

۳ــ یکنواخت کردن نمونه

۱ــ وزن کردن نمونه : نمونه‌های غذایی جامد باید با استفاده از چاقو، قاشقک و پنس‌های سترون شده، به وزن ۱۰ تا ۲۵ گرم برداشته شوند.

مواد و وسایل مورد نیاز

- ترازو
- قاشقک
- پنس
- ظرف‌های شیشه‌ای

روش کار

الف) ابتدا ترازو را روشن کرده و روی آن وسیله مناسب برای توزین نمونه قرار داده می‌شود.

نکته : بهتر است بر روی ظرف‌های شیشه‌ای یک فویل آلومینیومی پیچیده و ظرف را همراه با کاغذ آلومینیومی در آون سترون کرد سپس کاغذ را روی ترازو قرار داده و نمونه وزن شده را روی آن گذاشت.

ب) پس از قرار دادن کاغذ روی ترازو باید آن‌را روی صفر تنظیم نمود.

پ) با استفاده از چاقو و قاشقک سترون شده از نمونه غذایی مورد نظر به اندازه مناسب نمونه (۱۰ یا ۲۵ گرم) برداشته و روی کاغذ آلومینیومی گذاشته می‌شود.

نکته‌ها

✓ همه مراحل کار باید در شرایط سترون انجام شود.

✓ قاشقک و چاقو تا زمان پیش از آزمون باید درون ظرفی که دارای محلول سترون کننده اتانول ۷۰٪ است قرارداده شوند و هنگام استفاده ابتدا یک بار از روی شعله عبور داده شده تا اتانول روی آن تبخیر شود.

✓ هرگز نباید نمونه را با دست برداشت و روی ترازو قرار داد.

✓ از نمونه‌هایی که بر روی میز کار و یا زمین می‌افتند نباید استفاده کرد.

۲ــ رقیق کردن نمونه : عمل رقیق کردن با استفاده از رقیق کننده‌ها انجام می‌شود. مهم‌ترین رقیق کننده‌هایی که در آزمایشگاه میکروب شناسی به کار می‌روند شامل موارد زیر هستند :

ــ آب بافر فسفات (kH_2p_4 ۰/۶ مولار، pH ۷/۲)

ــ سرم فیزیولوژی (کلرید سدیم ۹ در ۱۰۰۰)

ــ آب پپتونه (۰/۱٪پپتون)

ــ محلول رینگر

ــ سیترات سدیم

(دستور ساخت برخی از این رقیق کننده‌ها در هر آزمون ماده غذایی گفته خواهد شد)

نوع رقیق کننده بسته به نوع ماده غذایی متفاوت است. برای نمونه، کره را نمی‌توان با آب مقطر یا سرم فیزیولوژی رقیق کرد بلکه تنها با سیترات سدیم رقیق می‌شود یا برای رقیق کردن شیر از محلول رینگر استفاده می‌شود.

رقیق کننده‌ها به سه منظور استفاده می‌شوند :

الف) رقیق کردن و مایع کردن نمونه‌های جامد

ب) جدا کردن میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه و هدایت آنها داخل رقیق کننده

پ) جدا کردن میکروارگانیسم‌ها از یکدیگر در نمونه رقیق کننده

بنابراین پس از کشت محلول‌های رقیق شده دارای نمونه غذایی بر روی محیط‌های جامد، میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه با وضعیت مناسب و شرایط آماده‌تری شروع به رشد و تکثیر می‌کنند.

مواد و وسایل مورد نیاز

- وسیله تعیین حجم (استوانه مدرج یا حجم مناسب)
- رقیق کننده مناسب با ماده غذایی و سترون شده

روش کار

الف) در شرایط سترون با استفاده از استوانه مدرج یا پی‌پت به اندازه مناسب از رقیق‌کننده برداشته و به ظرف دارای نمونه غذایی وزن شده اضافه کنید.

نکته‌ها

✓ حجم رقیق کننده استفاده شده باید همیشه **۹ برابر وزن نمونه** باشد. اگر وزن نمونه مورد آزمون ۱۰ گرم باشد، حجم رقیق‌کننده باید ۹۰ میلی لیتر و اگر وزن نمونه ۲۵ گرم است، حجم رقیق کننده باید ۲۲۵ میلی لیتر باشد.

✓ در صورت وجود ذرات درشت، سوسپانسیون باید مدتی به حالت سکون قرار دهید تا ذرات شناور ته‌نشین شوند.

✓ مواد غذایی وزن شده را باید درون ظرف‌های شیشه‌ای دهان گشاد که از پیش در آون سترون شده‌اند و دارای گنجایش مناسب هستند قرار داده شوند و سپس رقیق کننده به میزان مناسب به آن‌ها اضافه کنید.

✓ خطای حجمی و وزنی می‌تواند تا ۵٪± باشد.

۳ــ همگن کردن نمونه : مواد درون ظرف‌های سترون که دارای نمونه و رقیق کننده هستند باید با یک مخلوط کن با دور کم به مدت ۱ تا ۲ دقیقه مخلوط و یکنواخت شوند. برای نمونه‌هایی که می‌توانند به راحتی یکنواخت شوند می‌توان آنها را با تکان دادن یکنواخت کرد.

مواد و وسایل مورد نیاز

- میله شیشه ای صاف
- همزن

روش کار : با استفاده از یک همزن صاف در شرایط سترون محلول ماده غذایی و رقیق کننده باید به خوبی یکنواخت شود.

نکته‌ها

✓ میله شیشه ای صاف تا پیش از آزمون باید درون محلول اتانول ۷۰٪ باشد تا سترون شود.

✓ محلولی که به ترتیب بالا تهیه می‌شود دارای رقت 10^{-1} است زیرا رقت کلی نمونه برابر است با نسبت حجم نمونه به حجم کل (حجم نمونه و رقیق کننده) که به صورت زیر است :

$10^{-1}=1/10=10/100=10/10$ گرم نمونه +۹۰ میلی لیتر رقیق کننده

✓ زمانی که ماده غذایی جامد است، ۱ گرم نمونه غذایی برابر با ۱ میلی لیتر نمونه در نظر گرفته می‌شود.

یادآوری : مدت زمان بین پایان آماده سازی سوسپانسیون اولیه و ریختن آن در محیط کشت جامد باید تا جای ممکن کوتاه باشد تا از تکثیر احتمالی میکروب‌ها و خطاهای آزمون جلوگیری شود.

ب) تهیه رقت‌های اعشاری بعدی : برای دقت در شمارش تعداد میکروارگانیسم‌های نمونه غذایی، کلنی‌های تشکیل شده

روی سطح تشتک‌های دارای محیط کشت را باید پس از ۴۸ـ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شمارش کرد. بنابراین لازم است تهیه رقت‌ها به گونه ای باشد که میکروارگانیسم‌ها به هم نچسبیده باشند و تعداد آنها بین ۳۰۰ـ۳۰ عدد در هر تشتک باشد. برای کاهش تعداد میکروارگانیسم‌ها در واحد حجم، رقت‌های اعشاری 10^{-1} تا 10^{-5}تهیه و پس از کشت، گرمخانه‌گذاری و تکثیر میکروارگانیسم‌ها در لوله یا تشکیل کلنی‌ها و در تشتک‌ها شمارش می‌شود. به این رقت‌ها، رقت‌های اعشاری بعدی یا رقت‌های متوالی گفته می‌شود.

مواد و وسایل مورد نیاز

- رقیق کننده مناسب
- نمونه غذایی آماده شده
- لوله‌های آزمایش در پوش دار با حجم مناسب
- مخلوط کن یا همزن
- پی‌پت‌های ۱ و ۱۰میلی لیتری سترون شده
- گرمخانه با دمای مناسب $37^{\circ}C$، $44^{\circ}C$ و $55^{\circ}C$
- وسایل لازم برای سترون‌سازی خشک (آون) و مرطوب (اتوکلاو)
- ظرف شیشه‌ای، ارلن و یا بطری با گنجایش مناسب و سترون شده

روش کار

الف) تهیهٔ رقت 10^{-1} : همانطور که در قسمت تهیه سوسپانسیون اولیه گفته شد، ابتدا باید درون یک ظرف شیشه‌ای سترون شده از نمونه غذایی رقت 10^{-1} تهیه شود به این ترتیب که با۱۰ گرم ماده غذایی وزن شده و در ۹۰ میلی لیتر رقیق کننده مناسب ریخته شده، با مخلوط کن یکنواخت می‌شود، سپس ۱۵دقیقه به حال خود گذاشته می‌شود تا ذرات نمونه موجود در آن ته نشین شوند.

نکته‌ها

✓ برای جلوگیری از آسیب به میکروارگانیسم‌ها در اثر تغییرات ناگهانی دما،دمای محلول رقیق کننده هنگام آزمایش باید نزدیک به دمای محیط باشد.

✓ برای شمارش اسپور باکتری‌ها باید اسپور را از حالت خفته به رویشی تبدیل کرد، برای این منظور لازم است مخلوط را با سرعت در برابر شوک گرمایی (دمای $80^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه) قرار دهید.

ب) به تعداد رقت‌های مورد نظر لوله آزمایش سترون آماده شده، برچسب زده شده و به ترتیب رقت مورد نظر ردیف کنید.

پ) با پی‌پت ۱۰ میلی‌لیتری، درون همه لوله‌های آزمایش ۹ میلی‌لیتر ماده رقیق کننده ریخته و لوله‌های دارای رقیق کننده را درون اتوکلاو سترون کنید.

ت) برای تهیه رقت دوم یعنی رقت 10^{-2}، پس از همگن کردن سوسپانسیون اولیه با پی‌پت، ۱میلی‌لیتر از آن را به لوله اول که دارای ۹ میلی لیتر رقیق کننده است افزوده و پس از همزدن به مدت ۵ تا ۱۰ ثانیه، برای مرحله پس آماده کنید.

ث) برای تهیه رقت بعدی یعنی 10^{-3}، ۱میلی لیتر از لوله اول برداشته و به لوله دوم دارای ۹ میلی لیتر رقیق کننده اضافه کنید.

ج) رقت‌های بعدی نیز به همین ترتیب تهیه می‌شوند. ۱ میلی لیتر از هر لوله به لوله بعدی دارای ۹ میلی لیتر افزوده می‌شود.

در شکل(۱ـ۶) تهیه رقت‌های متوالی از یک نمونه غذایی **جامد** نشان داده شده است.

نکته‌ها

✓ از تماس پی‌پت‌های دارای سوسپانسیون اولیه با محلول رقیق کننده سترون شده جلوگیری نمایید.

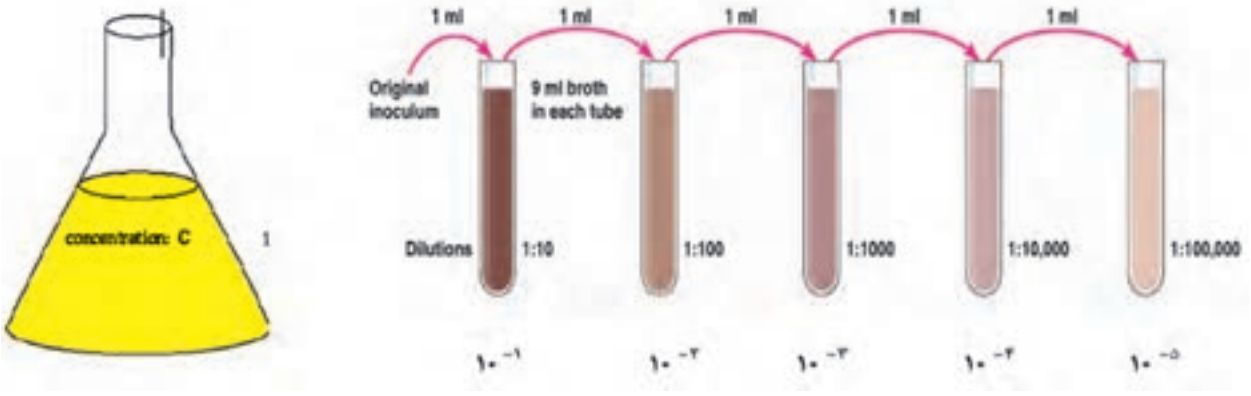
✓ برای تهیه هر رقت باید از یک پی‌پت جدید استفاده شود.

✓ آزمون باید در شرایط سترون انجام شده و همه لوازم مورد نیاز نیز از پیش سترون شده باشند.

✓ مدت زمان کل آزمون از زمان آغاز آماده سازی نمونه (سوسپانسیون اولیه و تهیه رقت‌های متوالی) تا تلقیح در محیط کشت مورد نظر نباید بیشتر از ۳۰ دقیقه طول بکشد.

✓ در صورت بالا بودن دمای محیط آزمایشگاه، مدت زمان‌ها باید کوتاه تر شوند.

✓ اگر نمونه غذایی، مایع باشد نیازی به تهیه سوسپانسیون اولیه نیست زیرا همان نمونه به عنوان نمونه اولیه ولی با رقت ۱ در نظر گرفته می‌شود نه 10^{-1}. مراحل تهیه رقت‌های اعشاری بعدی همان است که در بالا گفته شد.



شکل۱ــ۶ــ تهیه رقت‌های اعشاری. لوله اول با رقت 10^{-1} غلیظ ترین (پررنگ ترین) و لوله آخر رقیق ترین(کم رنگ ترین) نمونه نشان داده شده است.

فصل هفتم

روش‌های کشت میکروارگانیسم

شمارش میکروب‌ها در محیط‌های کشت جامد بر اساس توانایی برخی از میکروارگانیسم‌ها در تشکیل کلنی روی سطح محیط‌های کشت جامد یا درون آنها می‌باشد که با استفاده از چشم غیر مسلح (بدون میکروسکوپ) و با وسایل بزرگنمایی ساده مانند پرگنه شمار قابل تشخیص و شمارش است. قابل توجه این که روش کشت میکروارگانیسم‌های بی‌هوازی با هوازی متفاوت است. برای همهٔ روش‌های کشت و شمارش میکروب‌ها نکته‌های زیر دارای اهمیت زیادی است.

نکته‌ها

- ✓ روی تشتک‌های دارای محیط کشت شماره نمونه، رقت، تاریخ و اطلاعات لازم باید درج شود.
- ✓ برای اطمینان از به دست آوردن تعداد مناسبی از کلنی در تشتک‌ها باید رقت‌های مناسب انتخاب شود.
- ✓ برای انتقال رقت‌ها به محیط‌های کشت باید از پی‌پت‌های سترون جدا استفاده کرد.
- ✓ در شمارش میکروبی مواد غذایی برای هر رقت دو تشتک باید مورد استفاده قرار گیرد.

۱ــ۷ــ روش‌های کشت میکروارگانیسم‌های هوازی در محیط جامد

ــ کشت آمیخته[1] یا پورپلیت و یا روش استاندارد

ــ کشت سطحی[2]

ــ کشت قطره‌ای

ــ کشت با کمک کاغذ صافی

به دلیل اهمیتی که روش‌های کشت سطحی و استاندارد برای شمارش میکروبی مواد غذایی دارند در این فصل روش‌های انجام این دوکشت و چگونگی بررسی یافته‌های آن به صورت مشروح و روش‌های دیگر کشت، به طور خلاصه ارائه شده است.

۱ــ۱ــ۷ــ کشت آمیخته (استاندارد) : این روش برای تعیین تعداد میکروارگانیسم‌های مواد غذایی به کار می‌رود و نشانگری برای تعیین آلودگی میکروبی و زمان قابلیت نگهداری مواد غذایی است. کشت آمیخته با عنوان شمارش کلی نیز شناخته می‌شود.

در کشت آمیخته مانند همه روش‌های بر پایه کشت میکروبی، نتیجه‌های به دست آمده با تغییر شرایط کشت تحت تأثیر قرار می‌گیرد. اگر شرایط تغییر کند، رشد میکروارگانیسم‌ها نیز متفاوت می‌شود. در روش استاندارد ۱ میلی لیتر از رقت‌های نمونه غذایی توسط پی‌پت به تشتک‌های خالی افزوده می‌شود. سپس ۲۰ میلی لیتر محیط کشت آگار ذوب شده با دمای $45^{\circ}C$ به تشتک افزوده می‌شود.

---

۱ ــ Standard plate count

۲ ــ Surface plate count

مواد و وسایل مورد نیاز

- وسایل سترون سازی با گرمای خشک (آون) و گرمای مرطوب (اتوکلاو) برای سترون کردن وسایل شیشه‌ای و محیط‌های کشت
- پی‌پت‌های ۱ و ۱۰ میلی لیتری سترون شده
- لوله‌ها و بطری‌های در پیچ دار برای تهیه رقت‌ها
- تشتک‌های سترون شده یا یکبار مصرف
- محیط کشت **پلیت کانت آگار**[1] ذوب شده

روش کار

الف) از نمونه غذایی مورد نظر سوسپانسیون اولیه را تهیه کنید. (برای مهارت بیشتر به فصل۴ مراجعه کنید.)

ب) رقت‌های متوالی مناسب را آماده کنید. (برای توضیح بیشتر به فصل ۶ مراجعه کنید.)

پ) درِ تشتک‌ها را تنها به اندازه‌ای که دهانه پی‌پت وارد آن شود باز کرده سپس با پی‌پت سترون شده مناسب از هر رقت ۱میلی‌لیتر به تشتک‌های خالی اضافه کنید.

نکته‌ها

- ✓ برابر شکل ۱ـ۷ برای هر رقت باید دو تشتک در نظر گرفته شود.
- ✓ برای هر رقت و کشت آن باید یک پی‌پت مجزا در نظر گرفته شود.
- ✓ لوله‌های دارای رقت‌های مورد نظر نباید بیش از ۳ دقیقه در شرایط معمول بمانند. اگر بیشتر از ۳ دقیقه طول بکشد دوباره باید به دقت آن را تکان داد.

ت) زمانی که همه رقت‌ها درون تشتک‌ها ریخته شد، باید ارلن دارای محیط کشت ذوب شده که برابر با روش‌های فصل ۳ آماده شده را از حمام بخار آب خارج کرده و به آرامی به تمام تشتک‌ها ۲۰ـ ۱۸ میلی لیتر محیط کشت اضافه نمود.

نکته‌ها

- ✓ ضخامت محیط کشت در حدود ۳ میلی متر کافی است.
- ✓ آگار مذاب را باید به طور مستقیم روی نمونه درون تشتک ریخت.

ث) درپوش تشتک‌های دارای محیط و نمونه غذایی باید بسته شده و در شرایط آزمایشگاه قرار داده می‌شود تا سفت شوند. پیش از سفت شدن آگار درون تشتک باید مواد درون آن به خوبی با هم مخلوط شوند. برای این منظور تشتک دارای ماده تلقیح شده و آگار ذوب شده راروی سطح صاف قرار داده و به آرامی‌به صورت عدد ۸ لاتین به مدت ۵ ثانیه دوران می‌دهند. یا پنج بار شمارش در جهت عقربه‌های ساعت، پنج بار شمارش در جهت خلاف عقربه‌های ساعت و پنج بار شمارش در جهت بالاو پایین و پنج بار شمارش در جهت چپ و راست تشتک‌ها را می‌چرخانند.

دوران تشتک روی سطح صاف باید به آرامی‌انجام شود تا از ریختن مواد درون آن به بیرون یا روی در تشتک جلوگیری شود. زیرا این مسأله دقت آزمون را کاهش داده و نتیجه شمارش را تغییر می‌دهد.

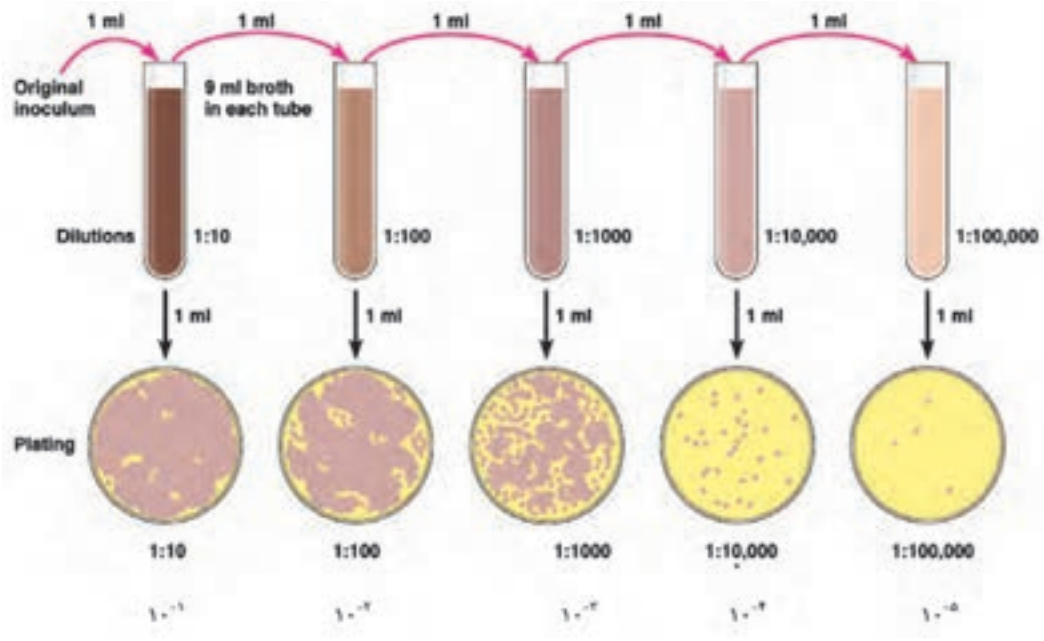
ج) پس از سفت شدن آگار، تشتک‌ها را وارونه کرده و به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه و دمای $35^{\circ}C$ـ$37^{\circ}C$ قرار می‌دهند.

چ) پس از ۴۸ ساعت تشتک‌ها راز درون گرمخانه خارج کرده و شمارش کلنی‌ها را برابر با آنچه در قسمت‌های بعدی شرح داده خواهد شد انجام می‌دهند.

---

۱ ـ Plate count agar

پس از بیرون آوردن تشتک‌ها از گرمخانه تا زمان انجام شمارش می‌توان آنها را در یخچال نگهداری کرد.



شکل ۱ــ۷ــ روش کشت استاندارد. باید توجه کرد که برای هر رقت دو تشتک در نظر گرفته می‌شود. همانطور که در شکل نشان داده شده هر چه رقت‌ها بیشتر باشد(از چپ به راست)امکان به دست آوردن تشتک‌هایی که دارای کلنی‌های قابل شمارش باشند نیز بیشتر می‌شود.

۲ــ۱ــ۷ــ کشت سطحی : این روش تنها برای ایجاد کلنی‌های سطحی روی تشتک‌های دارای محیط کشت آگاردار طراحی شده است. مشاهده شکل ظاهری کلنی‌های سطحی آسان تر بوده و باعث تشخیص انواع مختلف کلنی‌ها می‌شود. چون در روش کشت سطحی میکروارگانیسم‌ها در برابر گرمای ناشی از محیط کشت ذوب شده قرار نمی‌گیرند، ممکن است در شمارش کلنی‌ها تعداد بیشتری به دست آید. در روش کشت سطحی حجم نمونه غذایی ۰/۱ میلی لیتر بوده که روی محیط کشت جامد درون تشتک ریخته می‌شود. در جدول ۱ــ۷ همه تفاوت‌های بین دو روش استاندارد و سطحی شرح داده شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز

- وسایل سترون‌سازی مانند آزمون پیش
- پی‌پت‌های سترون شده ۱ میلی لیتری
- لوله‌ها و بطری‌های در پیچ دار برای تهیه رقت‌های بعدی
- تشتک‌های دارای محیط کشت جامد مناسب
- قاشقک پخش کننده شیشه‌ای یا میله شیشه‌ای سرکج

روش کار

الف) از نمونه غذایی مورد نظر سوسپانسیون اولیه را تهیه کنید. (مانند روش‌های فصل ۴)

ب) رقت‌های متوالی بعدی را تهیه کنید. (مانند فصل ۶ از رقت 10^{-1} تا 10^{-5})

پ) با پی‌پت سترون از هر رقت ۰/۱ میلی لیتر برداشته و به تشتک دارای محیط کشت جامد اضافه نمایید.

نکته‌ها

✓ مانند شکل ۲ــ۷ برای هر رقت باید دو تشتک در نظر گرفته شود.

✓ برای هر رقت و کشت آن باید یک پی‌پت مجزا در نظر گرفته شود.

✓ بر خلاف کشت استاندارد که از محیط کشت جامد تشتک کانت اگار ذوب شده استفاده می‌شود. در روش کشت سطحی محیط کشت جامد بر اساس باکتری مورد نظر انتخاب می‌شود. مثلاً برای شمارش باکتری استافیلوکوکوس ائورئوس از محیط کشت برد پارکر آگار استفاده می‌شود.

ت) برای پخش رقت‌های نمونه غذایی ریخته شده روی سطح محیط جامد از میله شیشه‌ای سر کج یا قاشقک پخش سترون استفاده می‌شود.

نکته‌ها

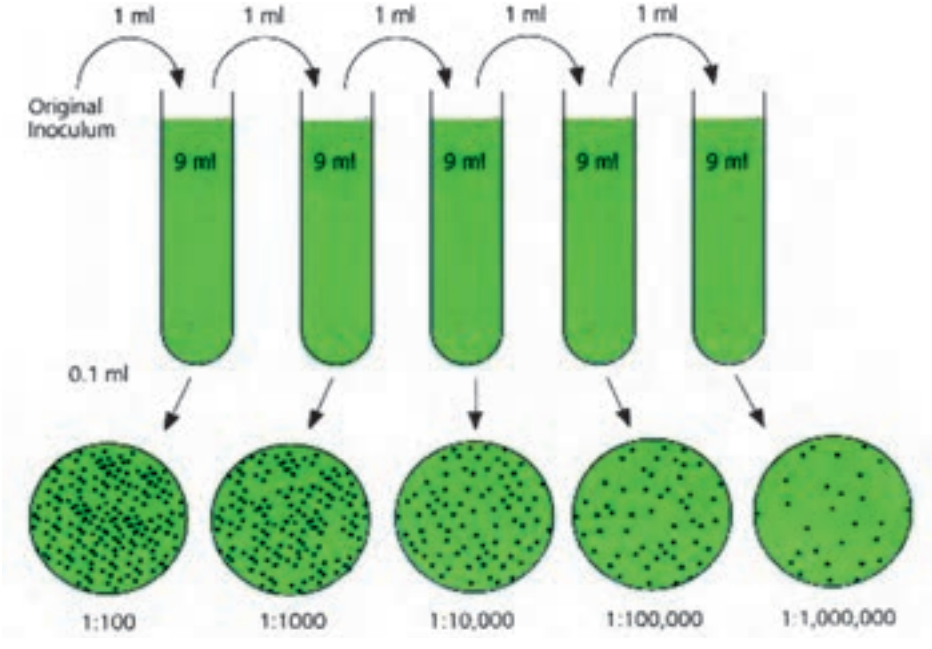
✓ برای سترون سازی میله شیشه‌ای یا قاشقک تا زمان کار آنها را در محلول الکل اتانول ۷۰٪ قرار می‌دهند. در زمان انجام آزمون میلهٔ شیشه‌ای را یکبار از روی شعله عبور داده و سپس خنک می‌کنند. هرگز نباید پخش کننده را در حالت داغ در ظرف دارای الکل قرار داد.

✓ برای کشت هر رقت در دو تشتک و پخش نمونه روی آن می‌توان از یک میله شیشه ای استفاده کرد ولی برای رقت‌های دیگر باید پس از هر بار سترون کردن میله شیشه‌ای از آن استفاده نمود.

ث) پس از چند دقیقه که همه تشتک‌ها تلقیح شد و نمونه روی آنها هم به خوبی پخش شد باید تشتک‌ها را چند ثانیه به همان حالت نگه داشت تا سوسپانسیون نمونه غذایی به طور کامل جذب محیط کشت شود. سپس تشتک‌ها به صورت وارونه در گرمخانه با دمای $37^{\circ}C$ ــ ۳۵ قرار داده می‌شوند.

چ) پس از ۴۸ ساعت تشتک‌ها را از درون گرمخانه خارج کرده و شمارش کلنی‌ها را برابر با آنچه در قسمت‌های بعدی شرح داده خواهد شد انجام می‌دهند.

پس از خروج تشتک‌ها از گرمخانه تا زمان انجام شمارش باید آنها را در یخچال نگهداری کرد.



شکل۲ــ۷ــ روش کشت سطحی. توجه شود که برای هر رقت دو تشتک در نظر گرفته شود. همانطور که در شکل نشان داده شده است با روش کشت سطحی برخلاف استاندارد شمارش بیشتری را می‌توان به دست آورد.

جدول ۱ــ۷ــ مقایسه روش‌های کشت استاندارد و سطحی

کشت استاندارد	کشت سطحی
ــ شکل ظاهری کلنی مشاهده نمی‌شود زیرا اغلب کلنی‌ها درون آگار هستند. ــ کلنی‌ها هم در عمق و هم در سطح محیط تشکیل می‌شوند. ــ کلنی‌ها تمایل به انتشار در تشتک ندارند. ــ استفاده از آگار ذوب شده با دمای C ° ۴۵ مانع از رشد برخی میکروارگانیسم‌ها می‌شود. ــ حجم نمونه غذایی تلقیح شده ۱ میلی لیتر است. ــ محیط کشت استفاده شده تشتک کانت آگار است.	ــ شکل ظاهری کلنی‌ها به آسانی مشاهده می‌شود زیرا کلنی‌ها در سطح هستند. ــ کلنی‌ها تنها در سطح محیط تشکیل می‌شوند. ــ کلنی‌ها گاهی به هم چسبیده و به صورت منتشر مشاهده می‌شوند که هنگام شمارش به عنوان ۱ کلنی در نظر گرفته می‌شوند. ــ به دلیل عدم نیاز به محیط ذوب شده به صورت مایع تعداد بیشتری میکروارگانیسم قابل شمارش است. ــ حجم نمونه غذایی تلقیح شده ۰/۱ میلی لیتر است. ــ محیط کشت استفاده شده بر اساس نوع باکتری مورد نظر متفاوت است.

● ***نکته‌های مهم در استفاده از گرمخانه برای گرمخانه گذاری تشتک‌های دارای محیط کشت جامد تلقیح شده :***

۱ــ برای گرمخانه گذاری تشتک‌ها بهتر است بیش از ۶ عدد روی هم انباشته نشوند.

۲ــ تشتک‌ها باید جدا از هم و با فاصله ۲۵ میلی متر از دیواره گرمخانه قرار داده می‌شوند.

۳ــ پس از پایان گرمخانه‌گذاری تشتک‌ها باید بررسی شوند. (حداکثر تا ۴ ساعت پس از خارج شدن از گرمخانه)

۴ــ نگهداری طولانی مدت تشتک‌ها در یخچال تنها تا زمانی مجاز است که روی ظاهر و تعداد کلنی‌ها تأثیری نداشته باشد.

۵ــ دمای گرمخانه باید مناسب با رشد میکروارگانیسم تنظیم شود.

محاسبه و تفسیر یافته‌های به دست آمده از کشت‌های استاندارد و سطحی :

الف) شمارش کلنی‌ها : اولین کار برای محاسبه تعداد باکتری‌ها در دو روش استاندارد و سطحی شمارش کلنی‌های موجود در محیط‌های کشت جامد است. بهترین وسیله برای شمارش کلنی‌ها پرگنه شمار است.(به فصل۲مراجعه شود.)

● **نکته‌های مهم در شمارش کلنی‌ها :**

ــ برابر استاندارد ملی ایران تنها تشتک‌هایی که دارای کمتر از ۳۰۰ کلنی هستند باید شمارش شوند.

ــ در برخی موارد ممکن است شمارش کلنی‌ها مشکل باشد، مانند کلنی‌های پخش شده پروتئوس[1] که در این حالت کلنی‌های منتشر شده را باید ۱ کلنی در نظر گرفت.

ــ در صورتی که در کمتر از ۱/۴ تشتک‌ها کلنی‌ها پخش شده باشند،باید کلنی‌های قسمتی را که پخش شده‌اند شمارش کرده و از روی آنها تعداد کلنی را برای همه تشتک محاسبه کرد.

ــ اگر کلنی در بیش از ۱/۴ تشتک پخش شده باشد هرگز نباید آن را شمارش کرد.

---

۱ ــ Proteus

ـ کلنی‌های دوتایی، سه تایی، زنجیره‌ای و خوشه‌ای که به هم چسبیده‌اند را باید ۱ کلنی در نظر گرفت.

ـ اختلاف شمارش دوباره یک تشتک با شمارش اولیه آن نباید از ۵٪ بیشتر باشد. اگر تغییرات بیشتر از این حدود باشند ممکن است علت‌های مختلفی مانند ضعف دید، اشکال در تشخیص و شمارش کلنی‌های ریز و یا اشکال در تفکیک پرگنه‌ها باشد.

ب) محاسبه : برای محاسبه تعداد باکتری‌ها از فرمول زیر استفاده می‌شود.

$$N = \Sigma c / V \times d \times ۱/۱$$

که در آن :

N : تعداد میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه غذایی آزمایش شده.

Σc : مجموع کلنی‌های شمارش شده روی دو تشتک از دو رقت پشت سرهم که دست کم یکی از آنها دارای ۱۰ کلنی باشد.

V : حجم نمونه تلقیح شده در هر تشتک بر حسب میلی لیتر.

d : رقت معادل یا اولین رقت شمارش شده.

نکته اول : باید توجه نمود که حجم نمونه تلقیح شده در روش استاندارد ۱میلی لیتر و در روش سطحی ۰/۱ میلی لیتر می‌باشد.

نکته دوم : اگر فرآورده غذایی مایع، رقیق نشده باشد رقت ۱ درنظر گرفته می‌شود.

واحد شمارش باکتری‌ها CFU [۱] بر گرم یا میلی لیتر می‌باشد.

پس از محاسبه، نتیجه را باید تا دو رقم معنی دار گرد نمود. برای این کار اگر رقم سوم کمتر از ۵ باشد نباید رقم پیش را تغییر داد، اگر رقم سوم بیشتر از ۵ یا مساوی ۵ باشد باید یک واحد به رقم پیش اضافه کرد و در آخر نتیجه را به صورت عدد توان مناسبی از ۱۰ بیان نمود.

مثال : شمارش یافته‌های به دست آمده در دو رقت پشت سرهم ($۱۰^{-۲}$) و($۱۰^{-۳}$) به صورت زیر است :

در اولین رقت انتخابی شمارش کلنی‌ها در رقت $۱۰^{-۲}$: ۱۶۸ عدد بوده است.

در دومین رقت انتخابی شمارش کلنی‌ها در رقت $۱۰^{-۳}$: ۱۴ عدد بوده است.

تعداد میکروب در هر میلی لیتر یا گرم نمونه چقدر است؟

محاسبه : $N = \Sigma c / V \times d \times ۱/۱$

$$N = \frac{۱۴ + ۱۶۸}{۰/۰۱ \times ۱/۱} = ۱۶۵۴۵$$

که اگر نتیجه گرد شود به صورت ۱۷۰۰۰ یعنی $۱۰^{۴} \times ۷/۱$ در هر میلی لیتر یا گرم نمونه غذایی خواهد بود.

راهنمای محاسبه تعداد باکتری‌ها :

- ***راهنمای شماره ۱ :*** هر یک از کلنی‌هایی را که از لحاظ فیزیکی به هم چسبیده‌اند باید یک کلنی در نظر گرفت.
- ***راهنمای شماره ۲ :*** تنها تشتک‌های دارای کمتر از ۳۰۰ عدد کلنی باید شمارش شوند و از تشتک‌های با رقت مشابه که دارای این محدوده قابل قبول هستند باید میانگین گرفته شود و با استفاده از فرمول تعداد باکتری‌ها محاسبه شود.
- ***راهنمای شماره ۳ :*** اگر تنها یکی از دو تشتک دارای تعداد قابل قبول کلنی بود، باز هم می‌توان هر دو تشتک را شمارش و میانگین گرفت.
- ***راهنمای شماره ۴ :*** اگر رقت‌های پشت سرهم دارای ۳۰۰ـ۱۰ کلنی بودند باید مانند مثالی که گفته شد تعداد باکتری‌ها

---

۱ ـ Colony forming unite

محاسبه شود.

● ***راهنمای شماره ۵ :*** اگر همه تشتک‌ها بیشتر از ۳۰۰ کلنی داشتند. باید رقیق ترین نمونه(آخرین رقت) را انتخاب کرده و تعداد باکتری را در این رقت محاسبه نمود.

● ***راهنمای شماره ۶ :*** اگر همه تشتک‌ها دارای کمتر از ۱۰ عدد کلنی بودند باید اولین رقت را انتخاب کرده و تعداد را بر اساس آن محاسبه نمود.

● ***راهنمای شماره ۷ :*** اگر هیچ کلنی روی تشتک‌ها تشخیص داده نشد باید شمارش تخمینی را به صورت کمتر از یک برابر فاکتور اولین رقت گزارش داد. برابر نمونه اگر از رقت 10^{-3} تا 10^{-7} تشتک تهیه شده ولی هیچ کلنی روی آنها مشاهده نشد باید به صورت $CFU/g < 10^{3}$ گزارش نمود.

نکته : فاکتور رقت همان عکس عدد رقت است یعنی اگر عدد رقت 10^{-3} باشد عکس آن 10^{3} است.

۳ــ۱ــ۷ــ کشت قطره‌ای : در این روش از پی‌پت‌های کالیبره شده پاستور که حجم آنها مشخص می‌باشد استفاده می‌شود (پی‌پت‌هایی که ۲۵یا ۴۰ قطرهٔ آنها به اندازه ۱ میلی لیتر است). تشتک‌های دارای محیط کشت مناسب باید همانطور که برای روش کشت سطحی تهیه می‌شدند آماده شده و سطحشان خشک شود. سپس با ماژیک یا مداد روغنی تشتک‌ها در طرفی که دارای محیط هستند به سه قسمت مساوی تقسیم کرده پس از قید شماره، هر یک از سه بخش را به یک رقت اختصاص می‌دهند. (10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}) به این صورت برای هر رقت دو تا چهار تشتک در نظر گرفته می‌شود. سپس با کمک یک پی‌پت پاستور کالیبره که سر آن به یک حباب لاستیکی مجهز است از رقیق‌ترین لوله مقداری برداشته و در سطح تشتک همان بخشی که با علامت رقت مربوطه مشخص شده، دو قطره جدا از هم قرار می‌دهند. سپس باقی مانده را در لوله خودش خالی کرده و در لوله بعدی که دارای نمونه ۱۰ برابر غلیظ‌تر است سه بار پی‌پت را پر و خالی کرده و از آن برداشت می‌کنند و به همان ترتیب که پیشتر گفته شد دو قطره در بخش مربوطه محیط کشت قرار می‌دهند. این عمل تا کمترین رقت انجام می‌شود. تشتک‌ها را در حالی که دربشان بسته است به همان وضعیت در گرمخانه قرار داده تا قطره‌های موجود در سطح محیط کشت خشک شوند. سپس آنها را به طور وارونه به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه و در گرمای مناسب با نوع آزمون و باکتری قرار می‌دهند. پس از این مدت زمان تشتک‌هایی را که دارای حداکثر ۲ کلنی در هر قطره باشند شمارش می‌کنند. تشتک‌ها رادوباره به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری کرده و شمارش می‌کنند. این روش از نظر صرفه جویی در محیط کشت مناسب است و برای شمارش استافیلوکوک‌ها و باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری مانند کلستریدیوم ولشای که مشخصات کلنی در سطح محیط کشت برای تشخیص آن اهمیت دارد به کار می‌رود. توجه شود که برای هر باکتری باید محیط کشت مناسب آن استفاده شود. مانند محیط ژلوز خون دار برای رشد کلستریدیوم ولشای که سطح آن با نئومایسین آغشته شده است.

۴ــ۱ــ۷ــ کشت حلقه‌ای : این روش برای مواد غذایی مایع و غیر ویسکوز که دارای شمارش کلی میکروبی بیش از ۳۰۰۰ در هر میلی لیتر بوده یا برای مواد غذایی ویسکوز یا جامدی که دارای شمارش کلی بیش از ۳۰۰۰۰ در هر میلی لیتر می‌باشند، مناسب است. در این روش نمونه‌های ماده غذایی را پس از آماده کردن رقیق می‌کنند. پیش از کشت، حلقه کشت را به وسیله شعله سترون کرده و ۱۵ ثانیه می‌گذارند که خنک شود سپس در داخل رقت مورد نظر وارد می‌کنند. سپس سرپوش تشتک‌ها را برداشته و مایع درون حلقه را به داخل آن منتقل می‌کنند و مقدار ۱۵ میلی لیتر محیط کشت ذوب شده به آن اضافه می‌کنند و در گرمخانه قرار می‌دهند. برای محاسبه و شمارش کلنی‌ها در صورتی که از حلقه کشت ۰/۰۱ میلی لیتر استفاده شود مقدار نمونه داخل تشتک باید معادل ۱۰۰ بار رقیق کردن باشد یعنی اگر ۰/۰۱ میلی لیتر از رقت 10^{-1} استفاده شود رقت نهایی 10^{-3} خواهد بود.

۵ــ۱ــ۷ــ کشت با کمک کاغذ صافی : کاغذهای صافی مخصوص میکروب‌شناسی در صنعت ساخته شده‌اند که به دلیل

داشتن منافذ بسیار ریز، میکروب‌ها را در خود نگه می‌دارند. از این کاغذ صافی‌ها برای سترون کردن مایعات و محلول‌های مختلف حساس به گرما استفاده می‌شود. بعضی از کارخانه‌های سازنده وسایل آزمایشگاهی از این نوع کاغذها با قیف‌های مخصوص که در برابر گرما مقاوم‌اند و قابل سترون شدن می‌باشند برای شمارش و جستجوی باکتری‌ها در آب و فرآورده‌های دارویی استفاده می‌کنند. از این صافی‌ها برای جستجو و شمارش میکروب‌ها در آب آشامیدنی و دیگر آشامیدنی‌هایی که تعداد باکتری‌های آنها کم است و لازم است حجم زیادی از نمونه برای شمارش و جستجوی باکتری به‌کار رود استفاده می‌شود روش کار به این صورت است که مقدار کافی نمونه از صافی عبور داده می‌شود تا کلیه باکتری‌های موجود در آن حجم در منافذ کاغذ به دام بیفتد سپس کاغذ صافی روی محیط کشت جامد قرار داده شده و در صورت لزوم ممکن است روی آن نیز با یک لایه نازک از محیط کشت ذوب شده که گرمای آن کمتر از $45^{\circ}C$ است پوشانده شود. سپس این تشتک‌ها گرمخانه گذاری شده و پس از ۴۸ـ۲۴ ساعت تعداد کلنی‌های ظاهر شده روی سطح شمارش می‌شود. اگر منظور جستجوی یک میکروب خاص مانند سالمونلا در آب آشامیدنی باشد می‌توان حجم مناسبی از نمونه را از کاغذ صافی گذرانده سپس کاغذ صافی را در محیط کشت مایع قرار داده و پس از گرمخانه‌گذاری از آن محیط برای جستجو و تشخیص میکروب مورد نظر استفاده نمود. این روش در بهداشت محیط و کنترل آب و فاضلاب و بررسی‌های همه‌گیری‌شناسی بسیار ارزشمند است.

۲ـ۷ـ کشت میکروارگانیسم‌های بی هوازی[۱]

برای کشت میکروارگانیسم‌های بی‌هوازی که تنها در غیاب اکسیژن رشد می‌کنند باید طوری شرایط را فراهم کرد که محیط رشد آنها بدون اکسیژن باشد. برای این منظوراز روش‌های مختلفی به شرح زیر برای تأمین شرایط بی‌هوازی استفاده می‌شود :

۱ـ۲ـ۷ـ گرمخانه بی‌هوازی : در این نوع گرمخانه دمای مناسب با رشد و شرایط بی هوازی به طور همزمان تأمین می‌شود. درگرمخانه‌های بی هوازی اکسیژن درون محفظه با پمپ خلاء خارج شده و به جای آن گاز کربنیک یا ازت وارد می‌شود.

۲ـ۲ـ۷ـ جار بی‌هوازی شیشه‌ای و پلاستیکی : مانند شکل ۳ـ۷ در این جار یا محفظه برای ایجاد شرایط بی هوازی می‌توان به دو روش عمل نمود :

الف) استفاده از دسیکاتور و شمع : در این روش تشتک‌ها و لوله‌های آزمایش کشت شده را داخل جار یا دسیکاتور قرار داده و روی آنها یک شمع روشن قرار می‌دهند. سپس درب جار را بسته و به حال خود قرار می‌دهند. شمع در حال سوختن به تدریج بخش زیادی از اکسیژن داخل ظرف را مصرف می‌کنند. در این روش شرایط بی هوازی اختیاری بوجود می‌آید و این روش برای تأمین شرایط بی هوازی مطلق مناسب نیست.

ب) استفاده از سیستم گاز پک (بسته‌های تولید کننده گاز) : همانطور که در فصل دوم آشنایی با وسایل گفته شد این سیستم شامل یک جار یا محفظه، یک سری بسته یا پوشش‌های پخش کننده گاز و رسوبات کاتالیزوری (پالادیوم) است (شکل ۱۲ـ۲). تشتک‌ها یا لوله‌های کشت شده را درون جار قرار می‌دهند و بسته به اندازه جار، ۱ تا ۳ بسته پخش کننده گازی به صورت عمودی در آن قرار می‌دهند. سپس به هر کدام از بسته‌ها حدود ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه می‌کنند و در آخر درپوش را می‌بندند.

مکانیسم عمل بسته‌های گاز پک : با اضافه کردن آب به بسته‌ها آب با ماده درون آنها به نام سدیم بور هیدرید واکنش داده و هیدروژن تولید می‌کند که با اکسیژن ترکیب شده و در حضور کاتالیزور پالادیوم تولید آب می‌کند. با این واکنش همه اکسیژن از محیط حذف شده و به آب تبدیل می‌شود که به صورت قطره در محفظه جار ظاهر می‌شود.

---

۱ ـ Anaerobic microorganism

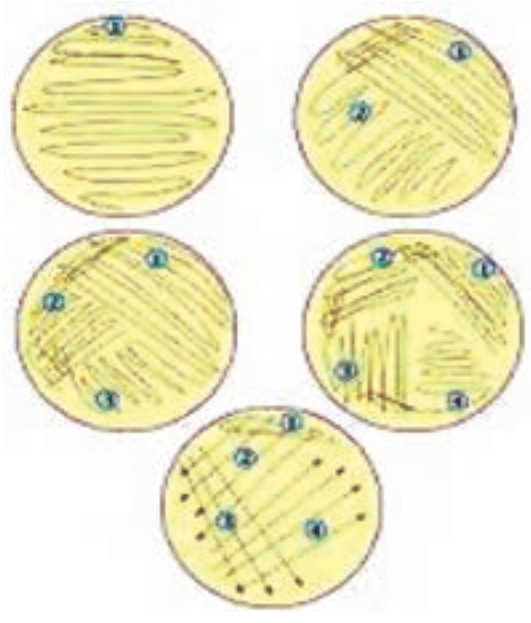
شکل۳ــ۷ــ جار بی هوازی

۳ــ۲ــ۷ــ کشت بی‌هوازی در محیط مایع : در این روش از محیط کشت مایع تیو گلیکولات برات که دارای ترکیبات احیاء کننده مانند سیستئین و گلیکولات است استفاده می‌شود. تیوگلیکولات با اکسیژن محلول در آب واکنش داده و اکسیژن را از دسترس باکتری‌ها خارج می‌کند. در این روش لوله‌های دارای تیوگلیکولات جوشانده و سرد شده را با میکروب بی‌هوازی تلقیح کرده و سپس همه کشت‌ها را در گرمخانه با دمای مناسب $35^{\circ}C$ قرار می‌دهند. لوله‌ها را می‌توان برای رشد باکتری‌های بی‌هوازی بررسی نمود.

۴ــ۲ــ۷ــ پارافین مایع : با ریختن پارافین مایع روی سطح محیط کشت به صورت مایع یا جامد هم می‌توان از ورود هوا به آن جلوگیری نمود و چنانچه محیط جوشانده شود هوای آن خارج شده و به این ترتیب شرایط بی هوازی دست کم برای رشد کلستریدیوم ولشای فراهم می‌شود.

۳ــ۷ــ کشت خطی[۱]

هدف از انجام کشت خطی روی محیط‌های کشت جامد، رقیق کردن کشت باکتری‌ها برای به دست آوردن کلنی‌های مجزای باکتری‌ها است. کلنی‌های تک و مجزا برای تشخیص شکل ظاهری کلنی باکتری‌ها و تعیین خصوصیات بیوشیمیایی باکتری‌ها به کار می‌روند. همانطور که در شکل (۴ــ۷) نشان داده شده است، کشت خطی به صورت‌های مختلفی انجام می‌شود ولی روشی که بیشتر در آزمایشات میکروبی برای کشت باکتری‌ها در محیط جامد به کار برده می‌شود روش کشت خطوط کج است.



شکل۴ــ۷ــ انواع مختلف کشت خطی

۱ ــ Streak plate

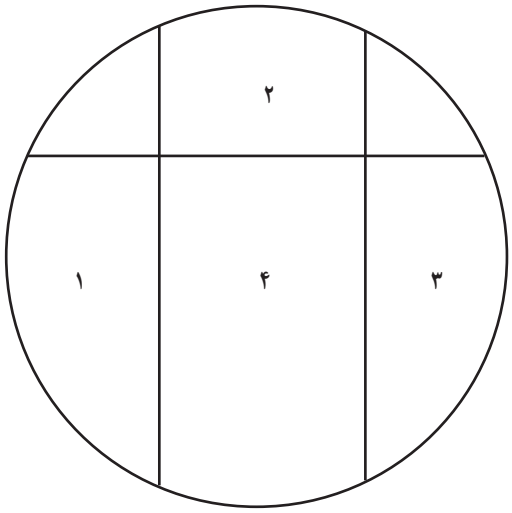
۱ــ۳ــ۷ــ کشت خطی کج راه[1] :

مواد و وسایل مورد نیاز

- تشتک‌های دارای محیط کشت جامد (برای تهیه محیط کشت به فصل سوم مراجعه شود).
- حلقه کشت یا لوپ
- محیط کشت میکروبی (دارای باکتری رشد کرده)
- گرمخانه
- چراغ گازی

روش کار

الف) یک تشتک دارای محیط کشت جامد مناسب (آگار مغذی) را روی سطح میز کار قرار دهید به طوری که درب آن رو به بالا قرار گیرد. روی در تشتک را برچسب زده و اطلاعات لازم مانند نام هنرجو و شماره گروه روی آن نوشته شود. سپس با ماژیک پشت تشتک را به ۴ قسمت مانند شکل (۵ــ۷) تقسیم کنید.



شکل۵ــ۷ــ تقسیم تشتک به چهار قسمت

ب) لوپ را در قسمت آبی شعله چراغ گازی فرو برده تا گداخته و سترون شود.

پ) در این مرحله بسته به نوع کشت میکروبی که ممکن است جامد یا مایع باشد برداشت نمونه جهت کشت خطی از آنها نیز متفاوت است.

ــ اگر نمونه میکروبی در محیط مایع پنبه گذاری شده باشد، ابتدا باید با یک دست، لوله و با دست دیگر لوپ را نگه داشت و با انگشت کوچک و کف دست پنبه در لوله برداشته شود. سپس لوپ را در سوسپانسیون میکروبی فروبرده و نمونه‌برداری کرد. چنانچه نمونه میکروبی در محیط مایع و در شیشه‌ای در پیچ دار مک کارتنی باشد، برای باز کردن در شیشه باید از انگشت شست و سبابه همان دستی که شیشه را نگهداشته استفاده شود.

ــ اگر کشت خطی از محیط کشت جامد میکروبی انجام شود ابتدا لوپ را داغ کرده و آن را در قسمت کشت نشده تشتک خنک می‌کنند. سپس لوپ را روی کلنی‌های تک باکتری قرار داده و از آن باکتری برداشت می‌کنند.

ت) لوپ دارای باکتری در قسمت ۱ محیط کشت جامد قرار داده می‌شود و در این ناحیه کشت خطی داده می‌شود به طوری‌که لوپ چندین بار به عقب و جلو برده و روی محیط کشیده می‌شود. این کار باید به گونه‌ای انجام شود که از بریده شدن محیط آگار جلوگیری شود.

نکته : این ناحیه باید متراکم‌ترین ناحیه کشت باشد که رشد میکروبی در آن سنگین تر است ولی در مراحل بعدی کمتر خواهد شد.

ث) دوباره باید لوپ سترون شود و در محیط کشت خنک شود.

ج) لوپ سترون شده را باید در انتهای ناحیه ۱ قرار داده و مانند شکل خطوط کج و ممتد را از انتهای ناحیه ۱ به ناحیه۲ ادامه

---

۱ ــ Undulating Line Quadraut

داد (شکل۶ــ۷).

نکته : تنها برای مرحله ۱ از محیط کشت میکروبی برداشت می‌شود.

چ) لوپ حرارت داده و خنک می‌شود.

ح) لوپ سترون شده باید در انتهای ناحیه ۲ قرار داده شده و همان خطوط کج به سمت ناحیه ۳ امتداد داده شود تا منطقه ۳ کشت داده شود (شکل ۷ــ۷).

خ) از ناحیه ۳ با لوپ خط‌هایی مانند شکل برای کشت منطقه ۴ در آن ناحیه کشیده می‌شود.

د) در آخر در تشتک‌ها گذاشته شده و به صورت وارونه در گرمخانه با دمای $37^{\circ}C$ ــ۳۵ به مدت ۴۸ــ۲۴ ساعت قرار داده می‌شوند.

نکته‌ها

✓ همه مراحل گفته شده باید در کنار شعله و با فاصله ۳۰ سانتی‌متری از آن انجام شود.

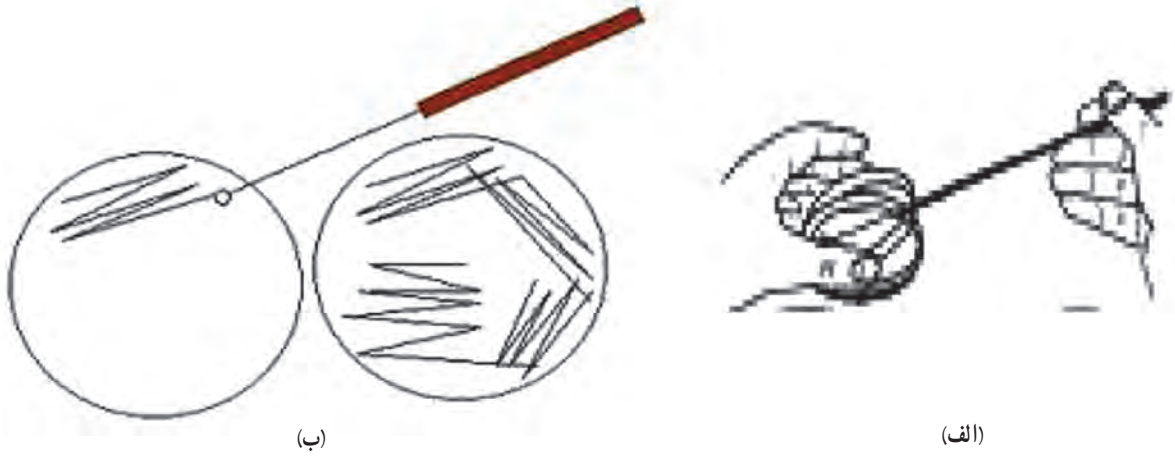
✓ لوپ را باید طوری روی محیط کشت کشید که خراش و بریدگی در محیط ایجاد نشود. برای این کار لوپ را باید با زاویه 45° با سطح محیط قرار داده و به آرامی کشت داد (شکل۶ــ۷ــ ب).

✓ در مدت زمان انجام کشت بهتر است از صحبت کردن در کنار تشتک‌ها خودداری شود.

✓ در همه مراحل باید از لوپ سترون شده استفاده نمود.

✓ از قسمت ۱ که به سمت قسمت‌های بعدی کشت داده می‌شود باید میزان خط‌های کشت را کمتر کرد.

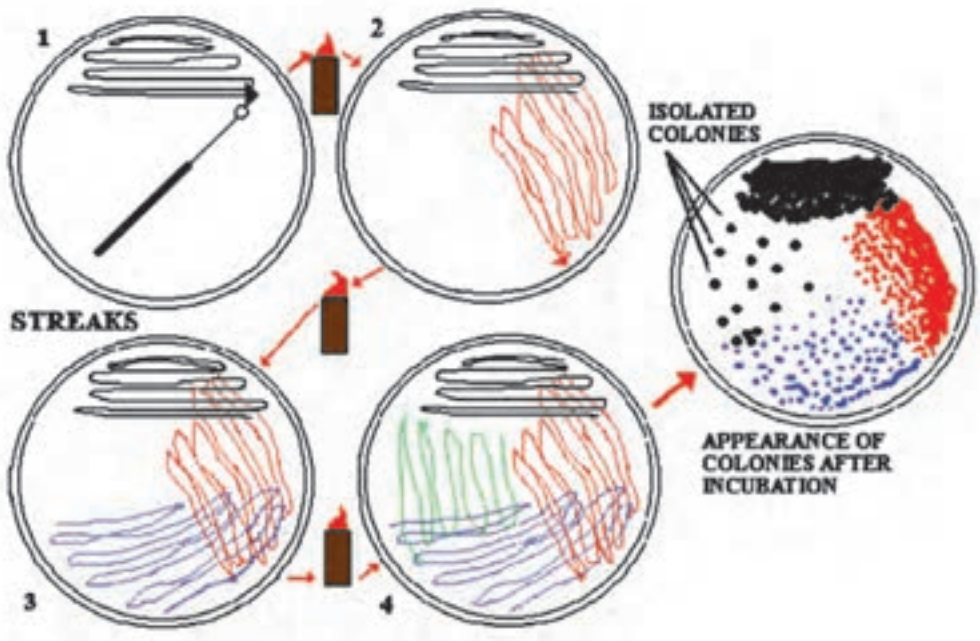
✓ درپوش تشتک را نباید در هر مرحله کشت روی سطح میز قرار داد. بهتر است با دست چپ درپوش و تشتک را نگه داشت و با دست راست توسط لوپ کشت را انجام داد (شکل ۶ــ۷ــ الف).



(ب) (الف)

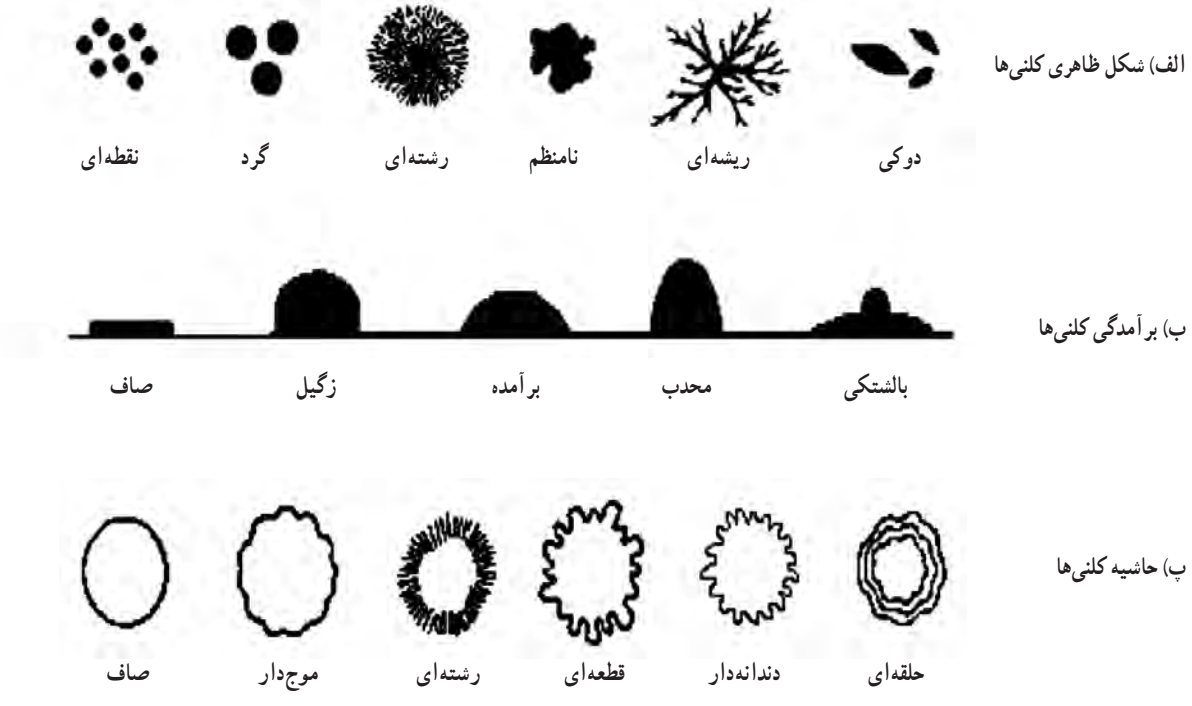
شکل۶ــ۷ــ (الف)طرز صحیح گرفتن لوپ و باز کردن درب تشتک برای انجام کشت خطی. (ب)زاویه لوپ با سطح محیط

به طوری که گفته شد مهم‌ترین هدف کشت خطی مشاهده کلنی‌های تک باکتری‌ها برای بررسی شکل ظاهری آنها است که گاهی می‌تواند در تشخیص باکتری‌ها کمک زیادی کند. کلنی گونه‌های باکتری‌ها دارای شکل‌های گوناگون است که در شکل (۷ــ۷) نشان داده شده‌اند.



شکل۷ــ۷ــ مراحل انجام کشت خطی کج راه را نشان می‌دهد. همان طور که در سمت راست شکل نشان داده شده پس از رشد باکتری‌ها در ناحیه۳و۴ می‌توان کلنی‌های تک ومجزای باکتری‌ها را مشاهده نمود.

مشخصات کلنی‌های باکتری‌ها : همان طور که در شکل (۸ ــ۷) نشان داده شده است. کلنی باکتری‌ها را بر اساس شکل ظاهری، برآمدگی فرورفتگی و شکل حاشیه به صورت زیر تقسیم می‌کنند :



شکل ۸ــ۷ــ ویژگی‌های انواع کلنی باکتری‌ها (الف)زمانی که سطح تشتک از بالا مشاهده می‌شود. (ب)زمانی که از کنار تشتک مشاهده می‌شود. (پ)زمانی که کنار وحاشیه کلنی‌ها مشاهده می‌شود.

۴ــ۷ــ شمارش مستقیم میکروسکوپی[۱] یا گسترش برید[۲]

این روش برای اولین بار توسط برید ابداع شد و برای تشخیص کیفیت میکروبی شیر خام و سایر فرآورده‌های لبنی و آزمون‌های سریع میکروبی فرآورده‌های خشک و منجمد استفاده می‌شود. اساس روش شمارش میکروسکوپی، شمارش مستقیم میکروارگانیسم‌ها در حجم معلومی‌از یک نمونه ماده غذایی می‌باشد. در این روش چون رنگ‌آمیزی سلول‌های زنده و مرده به طور یکسان انجام می‌گیرد، کلیه میکروب‌ها شمارش می‌شود. این روش به عنوان یک روش سریع برای شمارش کلی میکروب‌های موجود در شیر هنگام تحویل گرفتن شیر در کارخانه‌ها استفاده می‌شود و دارای مزیت‌ها و عیب‌هایی است.

مزیت‌ها :

ــ شمارش کلی از همه میکروب‌های موجود در شیر ارائه می‌دهد.

ــ دارای سرعت عمل و سادگی است.

ــ می‌توان گستره را نگهداری نمود و در مواقع ضروری به آن مراجعه کرد.

عیب‌ها :

ــ به دلیل اینکه نمونه رنگ آمیزی می‌شود میکروب‌های مرده هم رنگ آمیزی شده و شمارش می‌شود. بنابراین به اندازه روش‌های کشتی که بر پایه رشد میکروب‌های زنده در محیط کشت جامد عمل می‌کنند دقت کافی ندارد.

ــ این روش برای آن دسته از موادغذایی که دارای تعداد زیاد میکروارگانیسم هستند مناسب است.

ــ تنها مقدار کمی از ماده غذایی (۰/۰۱ یا ۰/۰۰۱ میلی لیتر) مورد آزمایش قرار می‌گیرد، بنابراین دقت روش محدود است.

ــ تشخیص اجزای غذایی از میکروارگانیسم‌ها دشوار است.

ــ امکان عدم پذیرش رنگ توسط برخی از سلول‌ها و رنگ نشدن آنها وجود دارد.

در روش شمارش مستقیم می‌توان از لام‌های مخصوص به نام لام نئوبار[۳] یا لام توما که برای شمارش گلبول‌های قرمز خون به کار می‌رود، استفاده نمود. برای این کار نمونه مورد نظر به نسبت معین با آب مقطر و سرم فیزیولوژی رقیق می‌شود، سپس برای دیدن میکروارگانیسم‌های موجود در آن با مواد رنگی مانند متیلن بلو و کریستال ویوله رنگ آمیزی می‌شود. روش انجام آزمون در آزمون شمارش مستقیم میکروسکوپی شیر (فصل هشتم) شرح داده خواهد شد.

---

۱ ــ Direct Microscopic Count

۲ ــ Bread

۳ ــ Neobar