بسم الله الرحمن الرحیم

عملیات میکروبیولوژی

رشتهٔ صنایع غذایی

گروه تحصیلی کشاورزی

زمینهٔ کشاورزی

شاخهٔ آموزش فنی و حرفه‌ای

شمارهٔ درس ۴۶۲۹

۵۷۶
۹۱۶ ع/
۱۳۹۳

عملیات میکروبیولوژی/ مؤلفان : جعفر شفیع‌آبادی... [و دیگران]. ــ تهران : شرکت چاپ و نشر کتاب‌های درسی ایران، ۱۳۹۳.

۱۱۴ ص. :مصور (رنگی). ــ(آموزش فنی و حرفه‌ای؛ شمارهٔ درس ۴۶۲۹)

متون درسی رشتهٔ صنایع غذایی گروه تحصیلی کشاورزی، زمینهٔ کشاورزی.

برنامه‌ریزی و نظارت، بررسی و تصویب محتوا : کمیسیون برنامه‌ریزی و تألیف کتاب‌های درسی رشتهٔ صنایع غذایی دفتر تألیف کتاب‌های درسی فنی و حرفه‌ای و کاردانش وزارت آموزش و پرورش.

۱. میکروب‌شناسی. الف. طباطبایی، فریده. ب. شرکت چاپ و نشر کتاب‌های درسی ایران. ج. ایران. وزارت آموزش و پرورش. دفتر تألیف کتاب‌های درسی فنی و حرفه‌ای و کاردانش.د. عنوان. هـ. فروست.

۱۳۹۳

همکاران محترم و دانش‌آموزان عزیز :

پیشنهادات و نظرات خود را دربارهٔ محتوای این کتاب به نشانی تهران ـ صندوق پستی شمارهٔ ۴۸۷۴/۱۵ دفتر تألیف کتاب‌های درسی فنی و حرفه‌ای و کاردانش، ارسال فرمایند.

پیام‌نگار (ایمیل) **info@tvoccd.sch.ir**

وب‌گاه (وب‌سایت) **www.tvoccd.sch.ir**

این کتاب با توجه به برنامهٔ سالی ـ واحدی در شهریور ماه سال ۱۳۷۹ در کارگاه ارزشیابی توسط هنرآموزان منتخب سراسر کشور و اعضای کمیسیون تخصصی برنامه‌ریزی و تألیف رشتهٔ صنایع غذایی براساس نتایج ارزشیابی تکوینی مورد بازسازی و تجدیدنظر قرار گرفت.

وزارت آموزش و پرورش

سازمان پژوهش و برنامه‌ریزی آموزشی

برنامه‌ریزی محتوا و نظارت بر تألیف : **دفتر تألیف کتاب‌های درسی فنی و حرفه‌ای و کاردانش**

نام کتاب : **عملیات میکروبیولوژی ـ ۳۵۹/۷۱**

مؤلفان : **جعفر شفیع آبادی، فریده طباطبایی، محسن واعظی و مسلم زحمتکش**

آماده‌سازی و نظارت بر چاپ و توزیع : **ادارهٔ کلّ نظارت بر نشر و توزیع مواد آموزشی**

تهران : خیابان ایرانشهر شمالی ـ ساختمان شمارهٔ ۴ آموزش و پرورش (شهید موسوی)

تلفن : ۹ـ۸۸۸۳۱۱۶۱، دورنگـار : ۸۸۳۰۹۲۶۶، کد پستی : ۱۵۸۴۷۴۷۳۵۹،

وب‌سایت : www.chap.sch.ir

صفحه‌آرا : **فاطمه ناصری**

طراح جلد : **علیرضا رضائی‌کُر**

ناشر : **شرکت چاپ و نشر کتاب‌های درسی ایران : تهران ـ کیلومتر ۱۷جادهٔ مخصوص کرج ـ خیابان ۶۱ (داروپخش)**

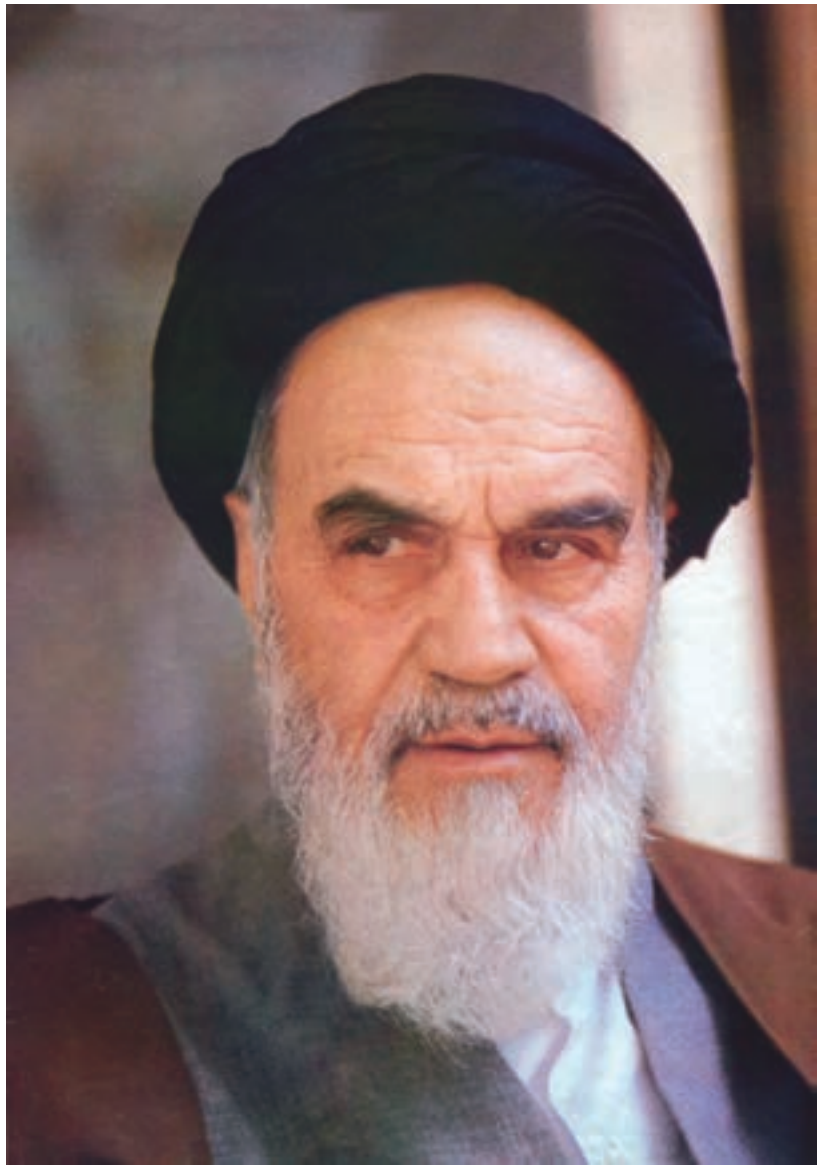
تلفن : ۵ـ۴۴۹۸۵۱۶۱، دورنگار : ۴۴۹۸۵۱۶۰، صندوق پستی : ۱۳۹ـ۳۷۵۱۵

چاپخانه : **خرمی**

سال انتشار : **۱۳۹۳**

حق چاپ محفوظ است.

شابک ۲-۰۳۷۶-۰۵-۹۶۴ **ISBN 964-05-0376-2**



اول باید اخلاصتان را قوی بکنید، ایمانتان را قوی بکنید، ... و این اخلاص و ایمان، شما را تقویت می‌کند و روحیهٔ شما را بالا می‌برد و نیروی شما جوری می‌شود که هیچ قدرتی نمی‌تواند (با شما) مقابله کند.

امام خمینی (ره)

فهرست مطالب

مقدمه	۱
فصل اوّل : مقررات کار در آزمایشگاه میکروب‌شناسی	۲
فصل دوم : وسایل و تجهیزات آزمایشگاه میکروبیولوژی	۷
فصل سوم : نمونه‌برداری	۲۵
فصل چهارم : محیط‌های کشت باکتری‌ها	۴۰
فصل پنجم : روش‌های کشت میکروارگانیسم‌ها	۴۳
فصل ششم : رنگ‌آمیزی میکروارگانیسم‌ها	۵۴
فصل هفتم : سنجش میزان رشد میکروارگانیسم‌ها	۷۶
فصل هشتم : قارچ‌ها (کپک‌ها ــ مخمرها)	۸۵
فصل نهم : آزمایش‌های میکروبی برخی از مواد غذایی پرمصرف	۹۰
منابع و مآخذ	۱۱۳

مقدمه

در گذشته، رقابت اصلی دولت‌ها بر سر تولید سلاح مخرب و کشنده بوده است و آن که سلاح بیشتر و بهتری داشت، از قدرت و امنیت بیشتری برخوردار بود. امّا با رشد افسار گسیختهٔ جمعیت و افزایش آمار قربانی‌های ناشی از فقر غذایی، زنگ‌های خطر به صدا در آمد و مسئلهٔ تأمین غذای سالم و کافی برای مردم، در اولویت برنامهٔ دولت‌ها قرار گرفت. لذا تحقیق و بررسی برای بهینه‌سازی و تولید بیشتر مواد غذایی شروع گردید. صنایع غذایی مورد توجه قرار گرفت و پیشرفت‌هایی در زمینهٔ تولید و تبدیل مواد غذایی به عمل آمد و همچنین روش‌های پیشگیری از انهدام و از بین رفتن آن‌ها شناخته شد.

به تدریج با افزایش سطح فرهنگ و بهداشت در جامعه، آزمایشگاه‌های کنترل کیفی به‌وجود آمد که در آن‌ها مواد غذایی از نظر شیمیایی و میکروبی مورد آزمایش‌های مختلف قرار گرفته، پس از اطمینان از سلامت آن‌ها، اجازهٔ مصرف داده می‌شود. امروزه هر کشوری که بتواند غذای کافی، سالم و با کیفیت بالاتری در اختیار مردمش قرار دهد از امنیت اقتصادی و بهداشتی بالاتری برخوردار است.

کتاب حاضر بر آن است تا هنرجویان گرامی را با چنین آزمایشگاه‌هایی آشنا سازد. امّا به دلیل گستردگی فعالیت آن‌ها و محدودیت برنامه درسی فراگیران سعی شده فقط برخی از آزمایشهای قابل انجام معرفی گردد به‌طوری که هنرجویان عزیز پس از گذراندن این واحد درسی قادر باشند برخی از مواد غذایی پیرامون خود را از نظر میکروبی مورد آزمایش قرار داده، با توجه به استانداردهای موجود، با کمک مربیان مربوطه در مورد مصرف آن‌ها اظهارنظر نمایند.

لازم به ذکر است که توجه به کتاب تئوری میکروبیولوژی و نیز دقت و درایت و همکاری مدرسان ارجمند و تلاش هر چه بیشتر آن‌ها برای انجام آزمایش‌ها، علاقه و انگیزهٔ بیشتری در فراگیران ایجاد خواهد کرد.

مؤلفان

هدف کلی کتاب

آشنایی با اصول کار در آزمایشگاه میکروب‌شناسی و ایجاد توانایی لازم برای انجام آزمایش‌های میکروبی مواد غذایی

فصل اوّل

مقررات کار در آزمایشگاه میکروب‌شناسی

هدف‌های رفتاری: در پایان این فصل، فراگیر باید بتواند :
۱ ــ مقررات کار در آزمایشگاه را رعایت نماید.
۲ ــ به هنگام بروز حادثه در آزمایشگاه، راه‌های مقابله با آن را بکار برد.

۱ ــ مقررات آزمایشگاه

کاربرد موازین ایمنی در آزمایشگاه میکروب‌شناسی مواد غذایی

دنیای میکروب‌ها جهانی زنده ولی غیرقابل رؤیت می‌باشد و به همین منظور، علم میکروب‌شناسی از سایر علوم متمایز است از این روی، کارکردن با میکروب مستلزم رعایت نکات خاصی است تا در ضمن این که رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌های موردنظر صورت می‌گیرد، از آلودگی‌های ثانویه و رشد سایر میکروب‌ها جلوگیری به عمل آید. به همین منظور هر آزمایشگاه باید دارای دستورالعملی حاوی تمام نکات ایمنی کار در آزمایشگاه باشد و قبل از شروع به آزمایش با تصور این که، کلیه میکروارگانیسمهایی که مورد آزمایش قرار می‌گیرند می‌توانند بالفعل و بالقوه بیماری‌زا باشند، مورد مطالعه قرار گیرند. به همین منظور کلیه کشت‌های میکروبی، گسترش‌های تهیه شده و موادی که امکان تماس آن‌ها با میکروارگانیسم زنده وجود دارد باید با دقت و توجه مورد استفاده قرار گیرند تا حتی‌المقدور محیط کار از آلودگی دور نگه داشته شود.

۱ــ۱ــ مقررات کار در آزمایشگاه

۱ــ تمام افراد هنگام حضور در آزمایشگاه باید از روپوش مخصوص و تمیز استفاده کنند و در هنگام لزوم از وسایل محافظت‌کننده مانند دستکش، عینک و پیش‌بند (مخصوصاً هنگام خالی کردن

اتوکلاو، پر کردن کوره مخصوص سوزاندن زباله) بهره بگیرند.

۲ــ روپوش و البسه مشابه باید هنگام خروج از آزمایشگاه تعویض گشته، دقت شود که موقع غذا خوردن و استراحت، روپوش و پیش‌بند و سایر البسه محافظت‌کننده آزمایشگاه بر تن نباشد.

۳ــ از قفسه‌های مناسب که در جوار آزمایشگاه تعبیه گردیده است برای نگهداری البسه استفاده شود.

۴ــ لباس‌های مورد استفاده در آزمایشگاه باید مرتباً شست‌وشو و در صورت لزوم قبل از شستن سترون شود.

۵ــ خوردن، آشامیدن و سیگار کشیدن در آزمایشگاه مجاز نیست، زیرا موجب ورود میکروارگانیسم‌های بیماریزا به بدن می‌شود.

از چشیدن مواد غذایی که به آزمایشگاه ارسال می‌شود، باید خودداری و از ورود غذا و نوشابه به آزمایشگاه و نگهداری آن‌ها در آنجا باید جلوگیری کرد. برای رفع خستگی و غذا خوردن کارکنان باید از محلی جداگانه استفاده شود، برچسب‌ها را مطلقاً نباید با آب دهان مرطوب کرد.

۶ــ قلم، کتاب، کاغذ، کیف دستی و سایر لوازم شخصی را باید در محل جداگانه و مخصوص قرار داد و برای نوشتن نتایج کار و یادداشت کردن بعضی از موارد از محل مخصوص استفاده شود.

۷ــ میزهای کار و سطوحی که روی آن‌ها آزمایش صورت می‌گیرد باید مرتباً شسته و به‌وسیله‌ی مواد ضدعفونی‌کننده سترون شود (می‌توان از الکل ۷۰ درصد و یا فنل استفاده نمود).

۸ــ نمونه‌هایی کــه به آزمایشگاه ارسال می‌شود، حاوی تعداد و انواع نامشخصی از میکروارگانیسم‌ها می‌باشند که باید آن‌ها را خطر بالقوه محسوب کرد، از این رو برای دریافت نمونه، بهتر است محل جداگانه‌ای در نظر گرفته شود. این محل می‌تواند قسمتی از اتاق آزمایشگاه باشد که به قدرکافی روشن و میز و وسایل مورد استفاده در آن از جنس قابل شستشو و تمیز کردن است.

وجود دستشویی در محل دریافت نمونه ضروری است. در صورتی که ظروف حاوی نمونه نشت می‌کند، باید پس از سترون کردن آن‌ها را دور انداخت.

۹ــ وجود سرمها، آنتی‌سرم‌ها، معرف‌ها و محلول‌های مورد استفاده ممکن است آلوده، سمی یا سرطان‌زا باشد و باید درکاربرد آن‌ها نکات ایمنی را رعایت کرد.

۱۰ــ در صورت استفاده از وسیله برای یکنواخت کردن نمونه باید ابتدا آن را کاملاً محکم کرد، سپس وسیله مربوطه را به حرکت درآورد. استفاده از ظروف مذکور در حین حرکت خطرناک است.

۱۱ــ چنانچه انجام آزمایشی منجر به انتشار هاگ قارچ‌ها به محیط گردد، این آزمایش را باید

در اتاق محفوظ و ایمن انجام داد. ذرات حاصل از هاگ قارچ‌ها می‌توانند از راه تنفس، کارکنان آزمایشگاه یا حیوانات آزمایشگاهی را آلوده نمایند و همچنین منبع خطرناک آلودگی ثانویه برای محیط‌های کشت و مواد مورد آزمایش باشند. در پلیت حاوی کشت قارچ را با نوار چسب محکم ببندید تا از انتشار هاگ قارچ جلوگیری به عمل آید و در هنگام استفاده از سانتریفوژ و مخلوط‌کن نهایت دقت باید مبذول گردد. در مواردی که ظروف حاویِ محیط کشت به عللی شکسته، محتویات آن روی میز آزمایشگاه می‌ریزد باید فوراً نسبت به برطرف کَردن آلودگی و سترون کردن محل اقدام گردد. در استفاده صحیح از پیپت، سرنگ، سوزن و حلقه‌ی کشت باید سعی و دقت گردد و توجه شود که حتی با بازکردن درب لوله‌های درپیچ‌دار نیز ممکن است هاگ قارچ‌ها منتشر شود.

۱۲ــ نفوذ میکروارگانیسم‌ها از راه پوست امکان‌پذیر است پس، در مواردی که خطر آلودگی دست‌ها مخصوصاً هنگام کار با حیوانات آزمایشگاهی وجود دارد، باید از دستکش استفاده شود، و دست‌ها قبل و بعد از استفاده از دستکش باید با محلول‌های ضدعفونی‌کننده شسته شود، چون ممکن است منافذ ریزی در دستکش وجود داشته باشد که ورود میکروارگانیسم‌ها را امکانپذیر سازند.

۱۳ــ مکیدن مایعات آلوده و عفونت‌زا به وسیله‌ی پیپت از طریق دهان ممنوع است و باید از پمپ و سرنگ مخصوص برای انجام آن استفاده شود. بعد از اتمام کار باید سوزن سرنگ‌ها را سترون کرد و سپس از بین برد تا دوباره مورد استفاده قرار نگیرند.

۱۴ــ ظروف حاوی کشت میکروارگانیسم‌ها باید به طور روشن و واضح برچسب گذاری شوند و اگر بعد از کشت دادن در پلیت بخار آب جمع گردد، در حمل و نقل آن‌ها کمال دقت باید مبذول گردد زیرا یک منبع شدید آلودگی را به وجود می‌آورد.

۱۵ــ وسایلی که تحت فشار کار می‌کنند (نظیر اتوکلاو) باید مرتباً بازدید شوند و توسط افراد با تجربه و کاردان مورد بررسی قرار گرفته، صحت عمل آن‌ها به وسیله‌ی معرف‌های مناسب کنترل گردد.

۱۶ــ هوای آلوده محیط و هوای آلوده موجود در اتاق‌های کشت را باید به وسیله‌ی هواکش خارج نمود و در صورت امکان قبل از خروج به وسیله‌ی صافی مخصوص تصفیه کرد.

۱۷ــ پیش از کاربرد سوزن کشت و پس از کاربرد نیز لازم است سوزن را به وسیله شعله یا مواد سترون کننده مناسب ضدعفونی نمود.

۱۸ــ برای حمل مواد دور انداختنی و ظروف مصرف شده، حتماً باید از سینی و ظروف مخصوص استفاده کرد. ظروف و محتویات آلوده‌ی آن قبل از شستن باید سترون شوند (دقت شود که

درب این ظروف قبل از ورود به اتوکلاو کمی شل گردد).

۱۹ــ هنگام حمل مواد و وسایل آلوده به عوامل عفونت‌زا دقت شود که از شکستن ظروف جلوگیری به عمل آید. چنانچه در مورد ارسال این مواد مقررات پستی خاصی وجود دارد رعایت آن مقررات الزامی است و بهتر است قبل از ارسال آن، با سازمان مسئول مشورت کرده، از راهنمایی‌های آن‌ها استفاده نمود. هر نمونه باید برچسب و فرم مخصوص درخواست آزمایش را که حاوی اطلاعات مربوط به منشأ، محتوی و زمان نمونه‌برداری است همراه داشته باشد.

۲۰ــ از ورود بی‌رویه و مکرر افراد متفرقه به آزمایشگاه باید جلوگیری به عمل آید.

۲ــ۱ــ مقررات ایمنی

در موقع وقوع هر حادثه‌ای در وهله اوّل باید حفظ سلامتی فرد یا افراد مصدوم یا در معرض خطر، نخستین هدف باشد. کمکهای اولیه و اختصاصی پزشکی را باید در نظر داشت و از حرکت دادن شخص مصدوم حتی‌الامکان جلوگیری کرد، مگر این که فرد مصدوم در معرض خطر دیگری مانند آتش گرفتگی یا خفگی به وسیله‌ی گازهای سمی باشد، یا این که مطمئن باشید که حرکت دادن ، صدمه بیشتری به فرد نمی‌زند.

چنانچه ذرات آئروسل ایجاد و در فضا منتشر شد منطقه آلوده را ترک و تا زمان فرونشستن ذرات روی زمین یا هر سطح دیگر و ضد عفونی محل از رفتن به آنجا خودداری کنید. در صورت ریختن ماده آلوده‌ای در روی سطح میز کار سریعاً و با دقت محل آلوده را ضدعفونی کنید. در مورد ذرات و قطراتی که به طور اتفاقی از کشت مایع به خارج پراکنده می‌گردند می‌توان از محلول ۵درصد فنل استفاده کرد. برای این کار باید دستکش به دست کرده و محلول فنل را در اطراف قطره و محل آلوده ریخته و بگذارید با آن مخلوط شود. از ریختن محلول ضدعفونی‌کننده به طور مستقیم بر روی محل آلوده پرهیز کنید، زیرا این عمل باعث ایجاد آئروسل می‌گردد.

می‌توان از حوله یا پارچه‌ای که در محلول ضدعفونی‌کننده خیسانده شده است به مدت ۳۰ دقیقه روی محل آلوده استفاده کرد. سپس اطراف آن را با محلول ضدعفونی‌کننده پاک و بعد از اتمام کار تمام وسایل و مواد آلوده را در یک سینی گذاشته و در اتوکلاو ستروَن نمود.

پس از وقوع هر حادثه‌ای گزارشی کامل و جامع حاوی تمام جزئیات واقعه تهیه کرده و به مسئول مربوطه ارائه نمایید.

خودآزمایی

۱ــ چرا رعایت مقررات در آزمایشگاه میکروبیولوژی الزامی است؟

۲ــ آیا سیگار کشیدن در آزمایشگاه مجاز است؟ چرا؟

۳ــ برای دریافت نمونه‌های ارسالی به آزمایشگاه چه باید کرد؟

۴ــ برای جلوگیری از انتشار هاگ قارچ‌ها در محیط آزمایشگاه، رعایت چه نکاتی لازم است؟

۵ــ آیا شست‌وشوی دست‌ها پس از کار با دستکش لازم است؟ چرا؟

۶ــ مقررات ایمنی را در برخورد با حوادث ناگوار در آزمایشگاه شرح دهید.

۷ــ در صورت آلوده شدن قسمتی از پوست بدن به میکروب‌ها چه اقداماتی را انجام می‌دهید؟

فصل دوم

وسایل و تجهیزات آزمایشگاه میکروبیولوژی

هدف‌های رفتاری: در پایان این فصل، فراگیر باید بتواند :
۱ــ ظروف مورد استفاده در آزمایشگاه را شناخته، نام ببرد.
۲ــ تجهیزات موجود در آزمایشگاه را شناخته، بتواند از آن‌ها استفاده نماید.
۳ــ طرز کار با اتوکلاو را شرح داده، از آن استفاده نماید.
۴ــ قسمت‌های مختلف یک میکروسکوپ را تشریح نماید.
۵ــ بتواند با تنظیم میکروسکوپ، تصویری واضح بدست آورد.

۲ــ وسایل و تجهیزات آزمایشگاه میکروبیولوژی

۱ــ۲ــ ظروف آزمایشگاه

۱ــ۱ــ۲ــ پیپت

ــ **پیپت‌های شیشه‌ای و پلاستیکی:** این پیپت‌ها از مواد غیرسمی تهیه شده‌اند و دارای دیواره مستقیم، نوک گرد هستند و برای استفاده در آزمایشگاه میکروب‌شناسی بکار می‌روند. حداکثر حجمی را که پیپت در مدت ۴ ثانیه خارج می‌کند مقدار یک میلی‌لیتر با اختلاف ۰/۰۲۵± میلی‌لیتر است، این در صورتی است که آخرین قطره‌ی شیر رقیق نشده موجود در پیپت را با دمیدن در پیپت خارج کنید. پیپت باید طوری درجه‌بندی شده باشد که در خط نشانه ۲۰ دارای ۱/۰۷۵ میلی‌لیتر آب باشد، در مورد پیپت‌هایی که از جنس پلاستیک[۱] می‌باشند درجه‌بندی طوری است که در خط نشانه ۲۰ حاوی ۱/۰۵۵ میلی‌لیتر آب هستند. فقط پیپت‌هایی را باید به کار گرفت که نوک آن‌ها سالم و دارای درجه‌بندی‌های با علامت واضح هستند و با رنگ مایع در رقت‌های مورد استفاده، تضاد

۱ــ Styrene Plastic

داشته باشند. پیپت‌هایی را که به علل مختلف آسیب دیده‌اند از رده خارج کنید.

جای مخصوص پیپت: از جنس فولاد زنگ نزن یا آلومینیوم است برای این منظور، از لوازمی که با مس ساخته می‌شوند نباید استفاده نمود.

توجه: پس از کاربرد هر نوع پیپت بایستی آن را از طرف نوک در داخل یک محلول سترون کننده قرار داد.

۲ــ۱ــ۲ــ پتری دیش (پلیت[۱]): این ظروف دارای حداقل ۸۵ میلی‌متر قطر داخلی و ۱۲ میلی‌متر عمق هستند. سطوح داخلی و خارجی این ظروف باید بدون ضایعه یا خراش و حباب باشد. ظروف پتری از شیشه و یا پلاستیک مناسب ساخته می‌شوند و باید دارای کف صاف باشند.

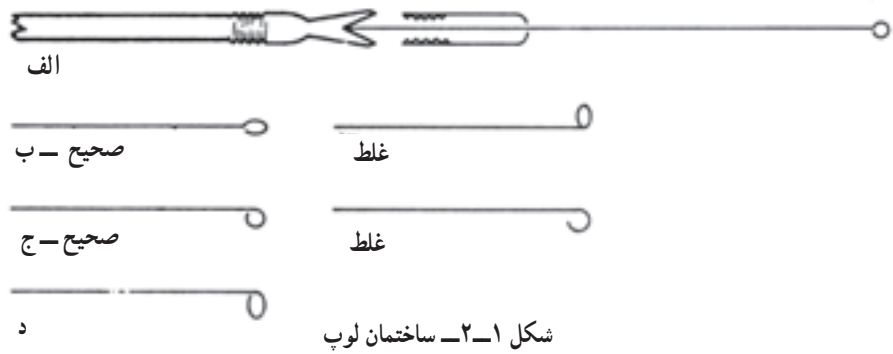
۳ــ۱ــ۲ــ سرنگ فلزی: به منظور انتقال سریع و صحیح مقدار ۰/۰۱ میلی‌لیتر از مواد غذایی مایع می‌توان از سرنگ‌های فلزی استفاده کرد. این سرنگ‌ها دارای یک میله فنری حساس نیمه‌خودکار و یک پیستون مناسب از جنس فولاد زنگ نزن برای لوله‌ای از همین جنس و مدرج می‌باشند. سرنگ‌ها دارای یک سری پیچ هستند که برای نمونه‌برداری مقادیر مختلف مواد غذایی مایع تنظیم می‌گردند. قبل از استفاده باید دقتِ سرنگ را آزمایش کرد و به طور متناوب دقت و صحّت کار آن را بررسی نمود.

تبصره: با این نوع سرنگ‌ها میزان ۰/۰۱ میلی‌لیتر نمونه مایع به طور دقیق برداشته می‌شود. در مورد شیر و خامه‌های سرد و غلیظ هم می‌توان از این سرنگ استفاده کرد.

۴ــ۱ــ۲ــ سیم کشت: این وسیله از یک قطعه سیم که یک طرف آن آزاد و طرف دیگر آن در داخل دستگیره‌ی از جنس شیشه و یا فلز است، ساخته شده است (شکل ۱ــ۲ــ الف). برحسب نوع آزمایش قسمت آزاد ممکن است به صورت حلقه (Loop) و یا بدون حلقه (شکل ۱ــ۲ــ د) باشد. جنس سیم مورد استفاده، معمولاً از لاتین است ولی می‌توان از انواع دیگر نیز استفاده کرد. طول تمام قسمت (دسته و سیم) معمولاً ۲۵ سانتی‌متر و طول سیم حدود ۸ سانتی‌متر است. در شرایطی که انتهای سیم به صورت حلقه است، مطابق (شکل ۱ــ۲ــ ب و ج)، باید آن را به طریق صحیح خم کرد. این وسیله برای انتقال مقدار کمی از محیط جامد یا مایع واجد باکتری به محیط دیگر به‌کار می‌رود. این وسیله یکی از مهم‌ترین وسایل موردنیاز در آزمایشگاه میکروبیولوژی است.

۵ــ۱ــ۲ــ لوله‌ها: لوله‌ی آزمایش گرد ــ انواع متفاوتی از لوله‌های آزمایش تاکنون ساخته شده است. انواعی که در آزمایشگاه باکتریولوژی بیش‌تر مورد استفاده قرار می‌گیرند، باید در مقابل درجه‌ی حرارت زیاد به هنگام استریل کردن محیط کشت مقاوم باشند. قسمت پایین این لوله‌ها مدور

۱ــ Petri Dishe "Plate"

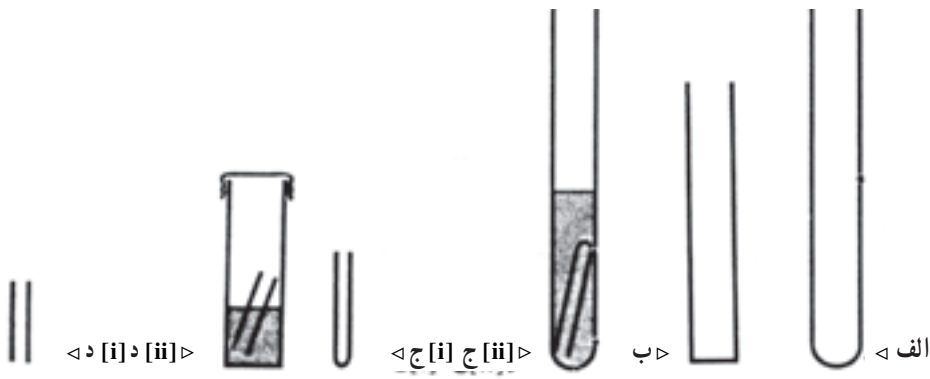


شکل ۱ــ۲ــ ساختمان لوپ

و سر آن‌ها صاف است (شکل ۲ــ۲ــ الف). این لوله‌ها برای حفظ محیط کشت، رشد میکروارگانیسم‌ها و مشاهده‌ی پدیده‌های شیمیایی به‌کار می‌روند.

لوله‌ی آزمایش ته صاف، این نوع لوله‌های آزمایش از هر جهت شبیه به نوع قبلی بوده و فقط ته آن‌ها صاف است و به همین علت می‌توان آن‌ها را به آسانی روی میز کار قرار داد (شکل ۲ــ۲ــ ب).

لوله‌ی دورهام ــ این لوله‌ها کوچک و در قسمت پایین مدوراند. قطر داخلی آن‌ها معمولاً ۰/۷ سانتی‌متر و طول آن‌ها حدود ۲/۵ سانتی‌متر است. این لوله برای پی بردن به وجود گازهای تولید شده توسط برخی از میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (شکل ۲ــ۲ــ ج).



شکل ۲ــ۲ــ انواع مختلف لوله‌های مورداستفاده در آزمایشگاه میکروبیولوژی.
الف ــ لوله‌ی گرد؛ ب ــ لوله‌ی پهن؛ ج ــ لوله‌ی دورهام؛ د ــ لوله‌ی کاریجی

لوله‌ی کاریجی ــ این لوله‌ها در دو انتها باز بوده و قطر آن‌ها حدود ۰/۷ سانتی‌متر و طول آن‌ها ۵ سانتی‌متر است و برای مشاهده‌ی حرکت باکتری‌ها از این لوله‌ها استفاده می‌شود (شکل ۲ــ۲ــ د).

لوله‌های ته‌گرد معمولاً در جا لوله‌ای فلزی و یا در زنبیل‌های سیمی (شکل ۳ــ۲) نگهداری می‌شود.

شکل ۳ــ۲ــ زنبیل سیمی مخصوص نگاهداری لوله‌های واجد محیط کشت

۶ ــ۱ــ۲ ــ بطری‌های رقیق کننده: بطری‌هایی از جنس بور و سیلیکات با درپوش‌های پیچ‌دار یا سربطری‌های لاستیکی به گنجایش ۱۵۰ میلی‌لیتر مورد استفاده قرار می‌گیرند. برای جلوگیری از تراوش مایع از درپوش‌های پیچ‌دار می‌توان از واشرهای مناسب و غیر قابل نفوذ استفاده کرد. بطری‌های تهیه رقت را در حجم ۱± ۹۹ میلی‌لیتر می‌توان با مواد مناسب یا وسیله‌ای که پاک نشود علامت‌گذاری کرد. برای از بین بردن باقیمانده‌ی مواد و مایعات از درب‌های لاستیکی مخصوص بطری، لوله یا سایر ظروف، باید ابتدا آن‌ها را در آب معمولی با حرارت $82^{\circ}C$ و یک ماده پاک‌کننده تمیز کرد.

وسایل شیشه‌ای دیگر نظیر ارلن مایر درب پیچ‌دار، بشر، لوله آزمایش درب پیچ‌دار، لام و لامل شیشه‌ای، قاشقک نمونه‌برداری، آنس فلزی برای کشت میکروبی، همگی جزو ظروف مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب‌شناسی می‌باشند.

۲ــ۲ــ تجهیزات آزمایشگاه

۱ــ۲ــ۲ــ گرمخانه (اینکوباتور)[1]: دستگاهی است که برای رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌ها در دمای ثابت مورد استفاده قرار می‌گیرد. ساختمان گرمخانه باید صحیح باشد و مرتباً کنترل شود، دمای داخل گرمخانه نباید از حد تنظیم شده بیش از $\pm 1^{\circ}C$ تغییر نماید. اختلافات دمای داخل گرمخانه را در زمانی که ظرفیت آن پر شده است تعیین و مشخص کنید. گرمخانه باید به صورتی پرشود که فاصله بین

۱ــ Incubator

ردیف پتری دیش‌ها و بین آن‌ها و دیواره‌ی گرمخانه از ۲/۵ سانتی‌متر کمتر نباشد، ظروف قرار داده شده در گرمخانه باید در مدت ۲ ساعت به دمای مورد نظر برسند. اتاق‌های گرم باید به خوبی عایق و مجهز به سیستم‌های مناسب پخش حرارت و گردش هوا (پنکه) باشند. میزان رطوبت داخل آن‌ها باید به نحوی باشد که باعث جمع شدن قطرات آب در روی ظروف و گسترش سریع کشت نگردد. از طرف دیگر رطوبت باید به میزانی باشد که ظروف حاوی آگار بیش از ۱۵ درصد رطوبت‌خود را در مدت ۴۸ ساعت از دست ندهد. گرمخانه باید در مکانی قرار گیرد که دمای آن در مواقع مختلف سال بین $16-27^{\circ}C$ باشد برای استفاده بهتر از گرمخانه، کارکنان آزمایشگاه موظف به انجام موارد زیر هستند.

شکل ۴ ــ۲ ــ نمونه‌ای از اینکوباتور یا اتاقک کشت موجود در آزمایشگاه

الف) ثبت دمای قسمت‌های بالایی و پایینی گرمخانه و اتاق‌های گرم به تعداد دوبار در روز یک مرتبه صبح، بعد از این‌که تمام مدت شب در گرمخانه بسته بوده است و یک مرتبه بعد از پایان کار روزانه.

ب) تنظیم دستگاه تنظیم کننده‌ی گَرما[1]: گرماسنج‌ها را در طبقه‌های پایین و بالا و در صورت لزوم در وسط قرار دهید. قسمت حباب مدور گرماسنج‌ها را در داخل یک آمپول به صورت کاملاً بسته قرار دهید و در آب شناور کنید، زیرا درجه گرمای هوا شاخص مطمئنی برای تعیین درجه گرمای آگار به شمار نمی‌آید در صورت تمایل می‌توان برای کنترل و ثبت حرارت گرمخانه و اتاق‌های گرم از ادوات خودکار تنظیم درجه گرما که رقت آن‌ها قبلاً تعیین شده است استفاده کرد. در فواصل زمانی معین می‌توان دقت این ادوات را با درجات گرماسنج‌های استاندارد کنترل نمود. زمانی که از گرماسنج‌های

۱ــ Thermoregulator

استاندارد استفاده می‌شود ممکن است در هر گرمخانه، گرماسنج‌هایی که حداقل و حداکثر درجه گرما را نشان می‌دهند قرار داد تا انحرافات نامعلوم و درجه آن‌ها تعیین شود. برای ثبت روزانه درجه گرما از قرائت این گرماسنج‌های اختصاصی خودداری کنید. زمانی که برای کنترل و ثبت درجات گرما از ادوات خودکار که دقت آن‌ها قبلاً تعیین شده است و به طور مرتب کار می‌کنند استفاده می‌گردد، احتیاجی به کاربرد گرماسنج‌هایی که حداقل و حداکثر درجه حرارت را نشان می‌دهند نیست.

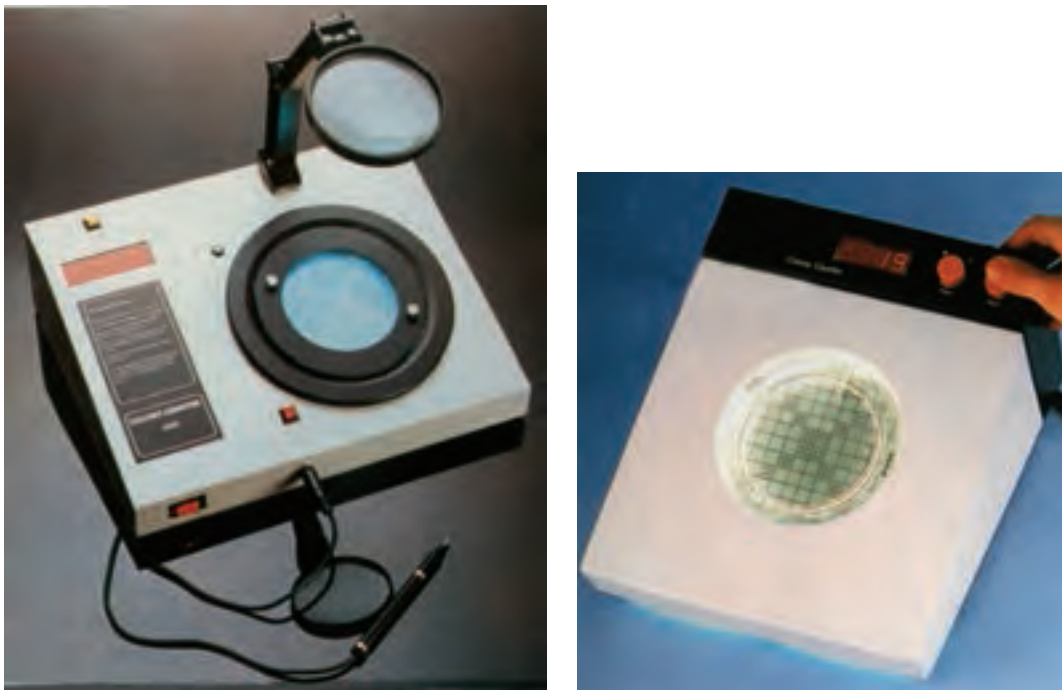
شکل ۵ــ۲ــ نمونه‌ای از ترازوی دیجیتال مخصوص وزن کردن مواد در آزمایشگاه

۲ــ۲ــ۲ــ ترازو: ترازوی با حساسیت ۰/۱ تا ۰/۰۱ گرم و با مقدار ۲۰۰ گرم وزنه مورد نیاز است برای این منظور، ترازوی یک کفه‌ای با ظرفیت ۲ کیلوگرم مناسب‌تر است.

۳ــ۲ــ۲ــ دستگاه کلنی کانتر یا دستگاه پرگنه‌شمار : در مرحله بعد از کشت و طی دوره‌ی رشد و تکثیر، پرگنه (کلنی)های حاصل شده در محیط کشت نشان‌دهنده‌ی تقریبی میزان آلودگی کلی در مقدار کشت داده شده از نمونه می‌باشد و به این صورت که هر یک پرگنه (کلنی) کوچک و یا بزرگ، نمایانگر حداقل یک میکروارگانیسم فعال اولیه در نمونه به‌شمار می‌آید و تعداد کل میکروارگانیسم‌ها براساس تعداد پرگنه (کلنی)ها بر مبنای درجه‌ی دقت نمونه تعیین و محاسبه می‌گردد. برای شمارش تعداد پرگنه (کلنی)ها در محیط کشت معمولاً از دستگاهی به نام کلنی‌کانتر[1]

۱ــ Colony Counter

استفاده می‌شود. این دستگاه از چند قسمت مشخص تشکیل شده است : ذره‌بین، صفحه مدور تقسیم‌بندی شده به اشکال مربع شکل، نمراتور و لامپ برق برای انجام کار، پلیت دارای پرگنه روی صفحه‌ی مدور قرارگرفته، نور چراغ، صفحه را روشن می‌کند فرد شمارش‌کننده با فشار انگشت روی دگمه نمراتور موجب ثبت تعداد پرگنه (کلنی)ها روی قسمت نمراتور می‌گردد. وجود اشکال مربع شکل موجب دقت بیشتر و جلوگیری از خطا در شمردن پرگنه (کلنی)ها می‌گردد.



شکل ۶ــ۲ــ دو نمونه از پرگنه‌شمار یا کلنی‌کانتر آزمایشگاه میکروبیولوژی

۴ــ۲ــ۲ــ بن ماری: در اندازه‌های مختلف و مناسب برای مقاصد آزمایشگاه طرح‌ریزی و از آن‌ها برای نگهداری محیط‌های ذوب شده در $46^{\circ}C-44$ استفاده می‌گردد. در مواقع عدم استفاده از حمام آب، در آن باید بسته باشد. سطح آب داخل آن باید به اندازه‌ای باشد که کاملاً سطح آگار موجود در ارلن یا ظروف دیگر را بپوشاند.

۵ ــ۲ــ۲ــ یخچال: بـرای خنک نگه‌داشتن نمونه‌هـا از یخچال با دمای $4^{\circ}C+$ استفاده می‌شود. این دستگاه، در صورت تمایل برای نگهداری محیط‌های کشت نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد.

شکل ۷ــ۲ــ نمونه‌ای از بن‌ماری یا حمام آب گرم

شکل ۸ــ۲ــ نمونه‌ای از شیکر مخصوص پتری دیش و ارلن آزمایشگاهی

شکل ۹ــ۲ــ نمونه‌ای از همزن مجهز به هیتر در آزمایشگاه

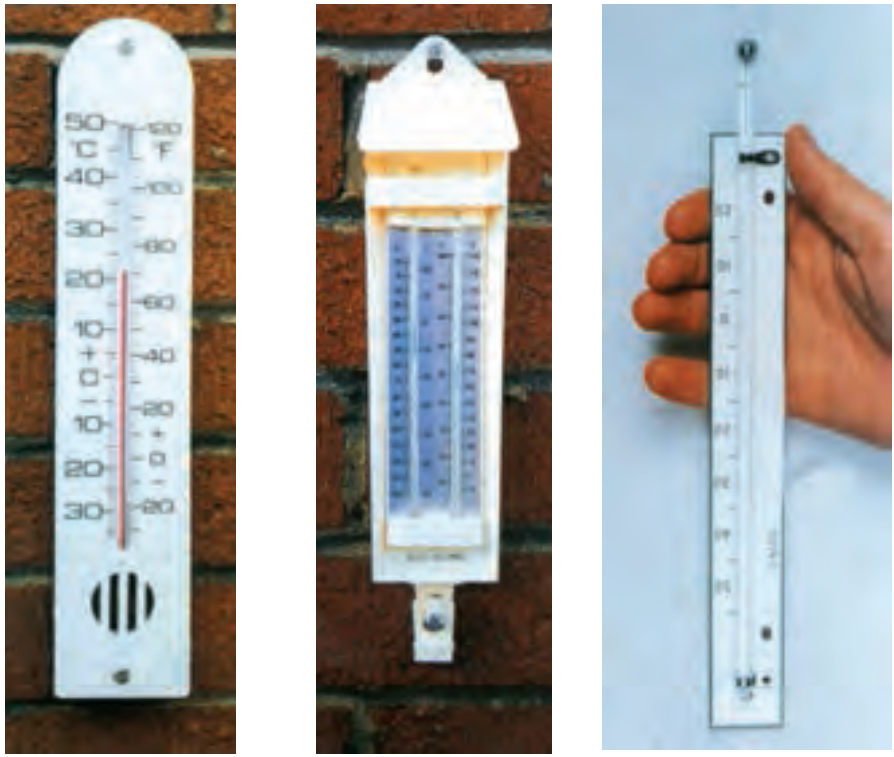
۶ــ۲ــ۲ــ تکان دهنده‌ی مکانیکی[1]: تکان‌دهنده‌های مکانیکی برای یکنواخت کردن محتوای ظروف مناسب می‌باشند و کار آن‌ها شکستن مجموعه‌های میکروبی در لوله و ارلن است. برای این منظور دستگاه باید دارای حرکت چرخشی باشد.

۷ــ۲ــ۲ــ سانتریفوژ: این دستگاه‌ها دارای انواع مختلف می‌باشند که براساس نیروی گریز از مرکز، موادی را که دارای جرم‌های مخصوص متفاوت هستند از یکدیگر تفکیک می‌کنند.

شکل ۱۰ــ۲ــ نمونه‌ای از دستگاه سانتریفوژ آزمایشگاهی

۸ــ۲ــ۲ــ دماسنج‌ها: با درجه‌بندی مناسب (بالا و پایین صفر)، پر شده از جیوه با فاصله درجه بندی حداقل یک درجه سانتی‌گراد هستند. دقت آن‌ها حداقل هر دو سال یک بار با یک گرماسنج تأیید شده از سوی مؤسسه ملی استاندارد (یا نوع دیگر با دقت مشابه) کنترل شود در مواقعی که ثبت درجه‌ای در یخچال، اتوکلاو، کوره با هوای داغ یا گرمخانه مورد نظر است می‌توان از ادوات ثبت درجه گرمای خودکار استفاده کرد. معمولاً دو نوع گرماسنج جیوه‌ای در آزمایشگاه مورد استفاده قرار می‌گیرد : نوعی که به طور کامل در محیط (مثل گرم‌خانه یا یخچال) قرار می‌گیرد تا گرمای محیط را تعیین کند، نوع دیگر که قسمتی از آن در محیط مورد نظر قرار می‌گیرد (حمام آب)

۱ــ Mechanical Shaker



شکل ۱۱ــ۲ــ نمونه‌ای از دماسنج‌های آزمایشگاهی

در نوع دوم در نقطه‌ای که گرماسنج در آب قرار دارد خطی مشخص دور تا دور بدنه گرماسنج کشیده شده است. ساده‌ترین راه برای امتحان گرماسنج‌های آزمایشگاه، مقایسه‌ی آن‌ها با گرماسنج‌های استاندارد در شرایط مشابه مانند حمام آب است.

۹ــ۲ــ۲ــ چراغ الکلی ــ آون و اتوکلاو برای استریل کردن

استریل کردن[۱]: استریل کردن یعنی عقیم کردن و بی‌حاصل نمودن و در اینجا منظور کشتن و از بین بردن کلیه موجودات ذره‌بینی است.

۳ــ۲ــ روش‌های سترون کردن

روش‌های معمول سترون کردن شامل، سترون کردن با دما، صاف کردن[۲]، گاز دادن[۳] و تابش اشعه[۴] می‌باشد.

۱ــ Sterilization ۲ــ Filtration ۳ــ Fumigation
۴ــ Irradiation

الف ــ سترون کردن به وسیله‌ی دما

۱ــ سوزاندن: میکروارگانیسم‌های موجود روی اجسام را (مانند حلقه کشت) بر روی شعله قرار می‌دهند تا زمانی که جسم کاملاً سرخ شود. اگر میکروارگانیسم موجود بر روی حلقه کشت مخصوص انتقال میکروب فوق‌العاده بیماری‌زا باشد، عمل انتقال و سترون کردن حلقه محیط کشت بهتر است در محفظه به خصوصی صورت گیرد. از سوزاندن برای مواد آلوده‌ای را که قابل مصرف دوباره نیستند، استفاده می‌شود.

۲ــ دمای خشک: برای وسایلی مانند پیپت‌ها و تشتک‌های پتری سترون کردن با حرارت خشک انجام می‌شود. همه‌ی وسایل را می‌توان در هوای گرم دستگاه سترون کننده گذاشت و درجه حرارت را به مدت یک ساعت در ۱۷۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشت. برای موادی که به وسیله‌ی حرارت خشک یا حرارت مرطوب بالا خراب می‌شوند سترون کردن متناوب (تیندالیزاسیون[1]) به کار می‌رود. مواد را به مدت ۳۰ دقیقه در سه روز متوالی با جریان بخار آب (۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) حرارت داده، بین مراحل حرارت دادن، بگذارید درجه حرارت آن برابر درجه حرارت آزمایشگاه باشد. این روش سترون کردن به دلیل اشکالات آن در بیشتر موارد رضایت‌بخش نیست.

شکل۱۲ــ۲ــ طریقه‌ی صحیح سترون کردن حلقه محیط کشت

۳ــ دمای مرطوب: برای بیشتر انواع محیط‌های کشت، لباس‌ها، مواد لاستیکی، و سایر موادی که با حرارت خشک خراب می‌شوند، روش سترون کردن به وسیله‌ی حرارت مرطوب و زیر فشار بکار می‌رود. چنین موادی را در حرارت ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ الی ۳۰ دقیقه با بکار بردن بخار آب با ۱۵ پوند فشار اتوکلاو می‌کنند. گاهی زمان لازم برای سترون کردن کامل، برحسب نوع و مقدار مواد به کار رفته تغییر می‌کند.

روش کار با اتوکلاو

هدف: *آشنایی با روش کار دستگاه اتوکلاو و طرز تهیه ظروف، وسایل آزمایشگاهی و محیط کشت استریل*

---

۱ ــ Tyndallization

طرز کار دستگاه سترون کننده فشار ــ بخار یا اتوکلاو

۱ ــ فلاسک‌های حاوی محیط کشت میکروبی را که قبلاً تهیه کرده‌اید در دستگاه سترون کننده قرار دهید.

۲ ــ در دستگاه را بسته، آن را قفل کنید.

۳ ــ شیر دستگاه (دریچه‌ی خروج هوا) را باز کنید تا بخاری که تشکیل می‌شود جانشین هوای داخل دستگاه گردد (تا زمانی که بخار بدون هوا خارج می‌شود).

۴ ــ شیر مربوط به قسمت بخار را ببندید. این کار باعث می‌شود که بخار در داخل اتوکلاو جمع شده، فشار آن افزایش یافته و دما به حد مورد نظر برسد.

توجه: در بعضی از دستگاه‌ها، شیر خروج هوا به طور خودکار به وسیله‌ی تنظیم ترمواستاتیکی[۱] بسته می‌شود.

اتوکلاوهایی که برای سترون کردن در آزمایشگاه‌های معمولی به کار می‌روند اغلب برای ۱۵ پوند بر اینچ مربع[۲] فشار تنظیم شده‌اند که ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد (۲۵۰ درجه فارنهایت) گرما تولید می‌کنند. زمان مناسب برای حرارت دهی در این حد (سترون کردن) بستگی به عوامل مختلف دارد. هنگامی که درجه حرارت به ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد رسید، زمان شروع سترون کردن به حساب می‌آید. توجه داشته باشید که حرارت‌سنج، درجه حرارت بخار را در لوله‌ی خروج بخار اندازه‌گیری می‌کند. اگر هوا به طور کامل از اتوکلاو خارج نشده باشد گرچه فشارسنج ۱۵ پوند بر اینچ مربع فشار را نشان دهد، درجه حرارت به ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد نخواهد رسید. بنابراین شروع سترون کردن را باید لحظه‌ای دانست که حرارت‌سنج به ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد برسد، نه از زمانی که فشارسنج ۱۵ پوند بر اینچ مربع فشار را نشان می‌دهد.

۵ ــ با خاتمه‌ی سترون کردن، برای باز کردن اتوکلاو، کاری را که باید انجام دهید عبارتست از ۱ــ بستن دریچه ورودی ؛ ۲ــ بسته نگه داشتن شیر خروج بخار دستگاه تا هنگامی‌که فشار به صفر نزدیک شود. اگر موادی که سترون می‌شوند حاوی مایعات نباشند می‌توانید برای کاهش دادن سریعتر فشار، شیر خروج بخار را باز کنید. اگر در اتاقک اتوکلاو مایعات وجود داشته باشند، چنین کاهش فشاری، باعث جوش آمدن آن‌ها در ظروف خود شده، پنبه سر درب آن‌ها را خیس کرده، آن‌ها را به خارج پرتاب می‌کند. از این رو در مواقعی که مایعات سترون می‌شوند، همیشه لازم است فشار را به تدریج کاهش داد. بیشتر اتوکلاوهای جدید، که خیلی از آن‌ها کاملاً اتوماتیک هستند دارای قفل‌های

۱ــ Thermostatic ۲ــ PSI

خودکار بر روی در خود می‌باشند، تا وقتی که فشار کاهش نیافته به در اجازه باز شدن نمی‌دهند.

۶ ــ بعد از آن که فشارسنج نشان داد که دیگر هیچگونه فشار مربوط به بخار وجود ندارد می‌توانید دراِاتوکلاو را باز کرده، مواد و وسایل داخل آن را خارج کنید. اگر مواد سترون کردن در اثر حرارت طولانی یا در اثر بخار آب امکان فاسد شدن دارند، آن‌ها را بدون وقفه خنک کنید.

بعضی از عوامل مؤثر در سترون کردن به وسیله‌ی فشار و بخار در دستگاه اتوکلاو

الف ــ درجه حرارت: آندوسپور باکتری‌ها در برابر مرگ در اثر حرارت بیشترین مقاومت را دارند و درجه حرارت کشنده برای آن‌ها فقط هنگامی حاصل می‌شود که بخار آب دارای فشار زیاد باشد. درجه حرارت ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد هنگامی که برای مدت مناسبی ادامه یابد شرایط خوبی را برای سترون کردن ایجاد می‌کند.

ب ــ رطوبت: انعقاد ترکیبات پروتوپلاسم باکتری‌ها (پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و غیره) در دمای اتوکلاو، به‌رطوبت نیاز دارد و هنگامی که رطوبت در محیط نباشد، دمایی که برای انعقاد ضروری است به سرعت افزایش می‌یابد. اگر بخار خیلی گرم شود، خشک‌تر می‌شود، بنابراین درجه حرارت و مدت لازم برای سترون کردن باید افزوده شده، به میزان سترون کردن در هوای خشک (۱۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت) برسد. بنابراین حرارت دادن زیاد بخار می‌تواند مقداری از اثر آن را به عنوان عامل کشنده از بین ببرد. علاوه بر این، افزایش درجه حرارت می‌تواند روی موادی که سترون می‌شوند اثر تخریب کننده داشته باشد.

شکل ۱۳ــ۲ــ نمونه‌ای از دستگاه اتوکلاو مخصوص استریل کردن با بخار تحت فشار

ج ــ فشار: فشار به میزانی که در اتوکلاو به کار می‌رود، هیچ گونه اثری در سترون کردن ندارد. فشار فقط برای رساندن درجه حرارت بخار به بالاتر از ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد لازم است.

د ــ زمان: زمان برای نفوذ بخار آب و گرم کردن مواد تا درجه حرارت سترون کردن ضروری است. حتی، هنگامی که چنین درجه حرارتی حاصل شود، اسپورها و سلول‌های جوان همه یک باره کشته نمی‌شوند. میزان مرگ و میر در یک درجه حرارت مشخص ثابت است و در مقابل یک عامل کشنده، در هر واحد زمانی، نسبت ثابتی از یک تعداد معین میکروبی کشته می‌شوند. (به طور طبیعی در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و گرمای مرطوب) ۲/۵ دقیقه وقت لازم است تا آندوسپور باکتری‌های گرمادوست کشته شوند.

هـ ــ مزاحمت هوا: هوای داخل اتوکلاو در درجه حرارت سترون کردن بیش از دو برابر بخار سنگینی دارد. اگر این هوا خارج نشود، در داخل اتوکلاو چند طبقه تشکیل می‌شود. از آنجا که بخار و هوا به کندی مخلوط می‌شوند تفاوت درجه حرارت لایه بالایی و لایه پایینی ممکن است خیلی زیاد باشد از این رو خارج کردن تمام هوا لازم است. گرماسنجی که در شیر تخلیه قرار دارد وقتی که ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد، مشخص می‌کند که تمام هوای داخل اتوکلاو خارج شده است.

و ــ ماهیت بار اتوکلاو: معمولاً مواد حجیم و تقریباً غیر قابل نفوذ احتیاج به زمان بیشتری برای سترون شدن دارند. بنابراین بهتر است آن‌ها را در واحدهای کوچکتر سترون کرد یا برای مثال به‌جای یک فلاسک ۵ لیتری بهتر است آن‌ها را در ۵ فلاسک یک لیتری قرار داد. موادی‌که در برابر بخار قابلیت نفوذ کم دارند و مواد خیلی حجیمی که نمی‌توان از راه تماس آن‌ها را حرارت داد، احتیاج به زمان طولانی‌تری دارند. سر فلاسک‌ها را باید به وسیله‌ی پنبه یا کاغذ پوشاند. اگر به کار بردن درب لاستیکی، درب پیچی، یا درب پلاستیکی ضرورت دارد، برای این که هوا براحتی خارج شود، همین‌طور برای جلوگیری از شکستن و پرتاب شدن درب و ظروف در اثر خروج بخار، و برای داخل‌شدن و نفوذ بهتر بخار به داخل ظروف نباید سر آن‌ها را محکم بست.

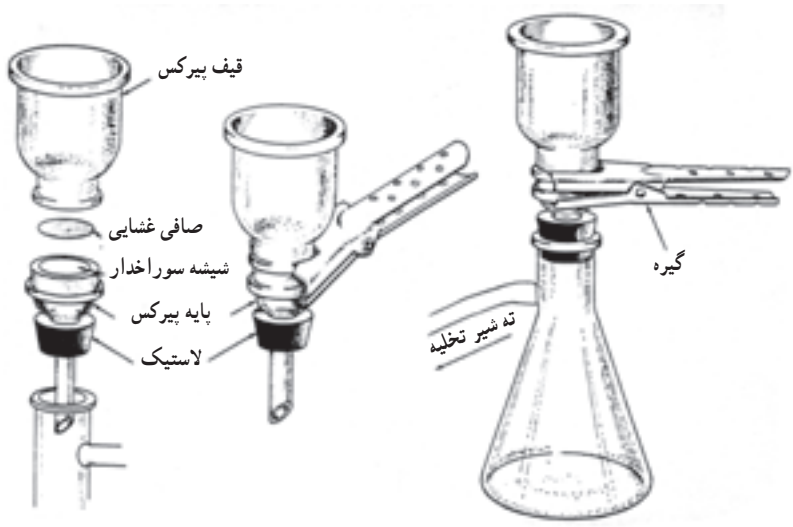
فکر کنید و پاسخ دهید:

۱ــ فرضیه‌ای که براساس آن سترون کردن متناوب پایه‌گذاری شده است چیست؟

۲ــ به عنوان یک عامل سترون کننده، دمای خشک مؤثرتر است یا دمای مرطوب؟ چرا؟

ب ــ صافی‌ها: خیلی از مواد (مثلاً بعضی قندها و سرم‌های خون) در درجه حرارتی که معمولاً برای سترون کردن به کار می‌رود، خراب می‌شوند. برای سترون کردن این مواد حساس به گرما که ممکن است مایع و یا به صورت محلول باشند می‌توان از صاف کردن[1] استفاده کرد. در این روش صافی‌ها به دو طریق باکتری‌ها را می‌گیرند. یکی به وسیله‌ی عمل مکانیکی غربال مانند سوراخ‌های کوچک صافی و دیگری با جذب میکروب‌ها توسط صافی به دلیل تفاوت بار الکتریکی آن‌ها.

صافی‌ای که به طور گسترده در میکروبیولوژی به کار می‌رود صافی غشایی است. صافی غشایی، یک غشای سلولز و یا پلاستیکی است که سوراخ‌های کوچکی دارد (معمولاً ۰/۴۵ میکرون) و می‌تواند باکتری‌ها را از یک مایع گرفته، جدا کند. سایر صافی‌هایی که در سترون کردن به کار می‌روند عبارتند از صافی شیشه‌ای ؛ صافی ساتیز[2] که از پنبه نسوز است ؛ صافی‌های شمعی شکل شامبرلان و سلاس[3] و صافی مندلر[4]. صافی شیشه‌ای را معمولاً از شیشه پیرکس گداخته به ترتیبی تهیه می‌کنند که سوراخ‌دار باشد و اندازه و بار الکتریکی جاذب سوراخ‌ها به اندازه‌ای است که برای گرفتن باکتری‌ها کافی است. صافی‌های ساتیز صفحات گرد فشرده پنبه نسوز هستند که دارای سوراخ‌های کوچک مناسب برای گرفتن باکتری‌ها می‌باشند. صافی‌های شامبرلان و سلاس از سفال بدون لعاب و صافی مندلر از خاک دیاتومه ساخته شده‌اند. سه صافی اخیر، به شکل استوانه‌های دراز

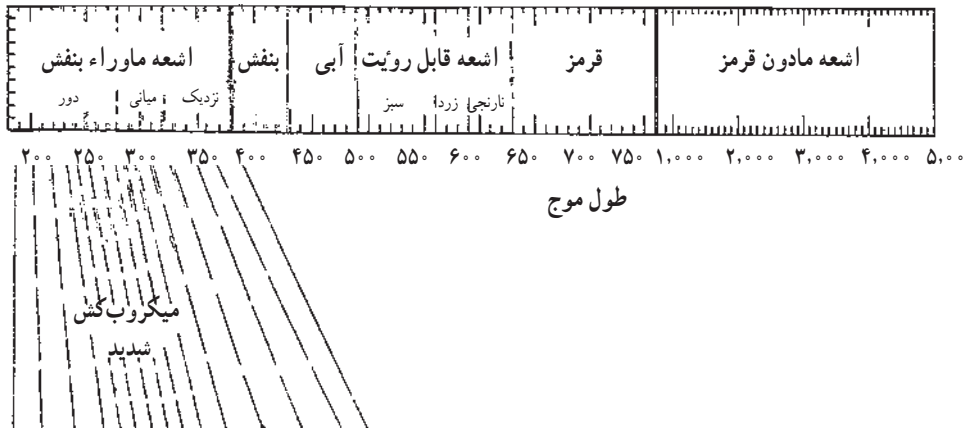


شکل ۱۴ــ۲ــ دستگاه صافی غشایی

۱ ــ filtration ۲ــ Seitz ۳ــ Selas ۴ــ Mandler

و توخالی شبیه شمع هستند که یک طرف آن‌ها باز است. تمام این صافی‌ها را به یک فلاسک مکنده وصل کرده، با به‌کار بردن نیروی مکش مواد مایع را از درون آن‌ها می‌گذرانند و بدین طریق کلیه میکروب‌های آلوده‌کننده را گرفته، از محیط خارج می‌کنند. در شکل زیر نمایش صاف کردن را که یکی از روش‌های سترون‌کردن است ملاحظه کنید.

ج ــ لامپ اشعه U.V: برای سترون سازی محیط آزمایشگاه کاربرد دارد. این لامپ باید زمانی روشن باشد که کارکنان در محل کار حضور ندارند.



شکل ۱۵ــ۲ــ طیف نور در منطقه مؤثر در استریل کردن

خودآزمایی

۱ــ مشخصات ظروف پتری‌دیش را بنویسید.

۲ــ استریل کردن را تعریف نموده، انواع روش‌های آن را نام ببرید.

۳ــ تیندالیزاسیون چیست؟

۴ــ طرز سترون کردن با صافی را شرح دهید.

۵ــ روش کار با اتوکلاو را شرح دهید.

۶ــ نقش فشار بخار در اتوکلاو برای سترون کردن چیست؟

۷ــ وسیله‌ی شمارش تعداد پرگنه‌ها چه نامیده می‌شود و از چه قسمت‌هایی تشکیل شده است؟

۸ ــ کار تکان دهنده‌ی مکانیکی در آزمایشگاه چیست؟

فصل سوم

نمونه‌برداری

هدف‌های رفتاری: در پایان این فصل، فراگیر باید بتواند :
۱ــ ارزش نمونه‌برداری صحیح را بیان نماید.
۲ــ وسایل نمونه‌برداری را شناسایی نماید.
۳ــ بتواند در شرایط متفاوت از آب نمونه‌برداری نماید.
۴ــ بتواند از مواد غذایی نمونه‌برداری نموده، به آزمایشگاه تحویل دهد.
۵ــ طرز آماده نمودن نمونه‌های رسیده به آزمایشگاه را بیان کند.
۶ــ بتواند نمونه‌ای ارسالی به آزمایشگاه را رقیق کرده، برای کشت آماده نماید.

۳ ــ نمونه‌برداری

نمونه‌برداری صحیح یا به عبارتی جمع‌آوری تعداد کافی و مناسب نمونه‌های مختلف مواد غذایی اساس کار بررسی‌های میکروبیولوژیکی است که برای بازرسی و نظارت موادغذایی ضرورت دارند. تصمیم در انتخاب نمونه، تعداد نمونه‌هایی که می‌باید انتخاب شوند، روش نمونه‌برداری و چگونگی راه‌های حمل آن‌ها به‌طوری که تغییر فاحشی در تعداد و کیفیت باکتری‌ها ایجاد نشود حایز اهمیت است. دقت، صحت و کفایت نمونه‌برداری به‌اندازه‌ی سرعت در رساندن آن‌ها به آزمایشگاه و روش‌های آماده کردن و آزمون نمونه‌ها اهمیت دارد و حاصل تمام این کوشش‌ها است که قابل مصرف بودن فرآورده را نشان می‌دهد.

۱ــ۳ــ واژه‌های نمونه‌برداری

نمونه: یک نمونه باید دارای تمام ویژگی‌های ماده‌ای باشد که از آن برداشته می‌شود.

نمونه اولیه: عبارتست از ماده جمع‌آوری شده در نمونه‌برداری، که حداقل باید دو برابر مقدار ماده‌غذایی لازم برای آزمایش باشد. مقدار مازاد آن برای مواقعی که نیاز دوباره به نمونه است نگهداری شود.

۲ــ۳ــ تهیه‌ی نمونه‌های اولیه

ــ برای تهیه نمونه‌های اولیه، نمونه‌برداری باید به‌دست شخص صلاحیت‌دار صورت گیرد.

ــ در صورت امکان، نمونه‌ها در حین تخلیه مواد غذایی (کشتی، کامیون، هواپیما) از تمام قسمت‌های محموله برداشته شوند. چنانچه نمونه‌برداری از تمامی قسمت‌های محموله امکان‌پذیر نیست، از بسته‌هایی که در دسترس هستند نمونه‌برداری شود که در این صورت نتایج فقط برای بسته‌های آن چهارچوب قابل تفسیر می‌باشند و نماینده کل محموله نیستند. امکان طبقه‌بندی محموله باید در نظر گرفته شود و چندین برابر مقدار واقعی لازم برای تجزیه در آزمایشگاه برداشته شود. مقدار اضافی نمونه در شرایطی که به سبب تغییر شرایط میکروبی ماده غذایی نگردد نگهداری شود. تا جای ممکن نمونه‌ها باید از ظرف باز نشده و اصلی به آزمایشگاه فرستاده شود، اگر تمام بسته‌ها در دسترس باشند از آن‌ها به روش تصادفی نمونه‌برداری شود.

ــ در نمونه‌برداری از کارتن‌های بزرگ حاوی بسته‌های کوچک، ابتدا به روش تصادفی چند کارتن را انتخاب کرده، سپس از هر یک از کارتن‌ها به‌طور تصادفی به تعداد موردنیاز از بسته‌های کوچک برداشته شود و در تمام مراحل از جداول ارقام تصادفی استفاده گردد. بهتر است از هر کارتن فقط یک بسته برداشته شود، با این روش بهترین نمونه معرف از محموله بدست خواهد آمد (البته این روش همیشه عملی نیست).

ــ چنانچه فرآورده در ظروف خیلی بزرگ قرار دارد که به‌آسانی قابل حمل به آزمایشگاه نمی‌باشند البته باید آلودگی سطحی روی بسته‌های غذایی و ظرف نمونه را با مواد پاک کننده تمیز کرده سپس با الکل ۷۰درصد سترون کنند سپس تحت شرایط اسپتیک نمونه‌های معرف را انتخاب و به ظروف سترون جداگانه منتقل نمایید.

ــ در مورد بسته‌های کاغذی لازم است لایه خارجی آن‌را برداشته، سپس لاک و مهر بسته‌ها را بدقت با کارد یا قیچی ببرید. به منظور جلوگیری از آلودگی ثانویه، بخصوص در مورد بسته‌های حاوی مواد پودری و مواد تحت فشار باید برای هر بسته از وسیله نمونه‌برداری سترون جداگانه استفاده شود. مواد غذایی کنسرو شده را به‌همان صورت به‌عنوان نمونه اولیه به آزمایشگاه ارسال کنند. چنانچه نمونه

غذایی حجم زیادی دارد باید از قسمت‌های مختلف آن نمونه‌برداری شود. مگر از مخلوط شدن آن اطمینان حاصل شود و یا به تجربه ثابت شده باشد که نمونه‌برداری از عمق بخصوص قابل قبول است. پیش از نمونه‌برداری از دهانه یا سوراخ ظروف، باید مقداری از ماده از آن خارج شود. در هنگام نمونه‌برداری از ظروف یا تانک های بزرگ یا بسته‌های غذایی، همچنین انتقال آن‌ها به ظرف نمونه باید سعی شود آلودگی پیش نیاید. برای تهیه نمونه اولیه متناسب با حالت فیزیکی موادغذایی از وسایل مخصوص استفاده شود. از مته‌های مخصوص برای نمونه‌برداری از پنیرهای سخت و یا پیت برای مایعات. سعی براین باشد که همیشه برای تهیه نمونه‌ی معرف، در صورت امکان موادغذایی مایع یا به‌حالت سوسپانسیون و یا موادی با گرانروانی بالا را تا یکنواخت شدن هم بزنند.

ــ موادی نظیر مایعات منجمد را باید در یک ظرف سترون بزرگ قرار داد و سپس تحت شرایط سترونی به قطعات کوچک‌تر شکست. (در کیسه پلاستیکی محکم) پس از آن از خرد شده‌ها نمونه‌برداری نمود. با وجود نکته‌های گفته شده گاهی ممکن است بازرسان نمونه‌ای را بدون رعایت شرایط سترونی با حجم بزرگ به آزمایشگاه بفرستند مانند یک تکه گوشت منجمد بدون استخوان. در هر حال میکروب‌شناسان می‌توانند یک نمونه سترون از لایه‌های داخلی به‌عنوان نمونه مورد آزمایش بردارند و رئیس آزمایشگاه را از این مطلب آگاه سازند. دمای هوای اتاق نگهداری و یا وسیله‌ی حمل نمونه، همچنین دمای ماده غذایی در هنگام نمونه‌برداری باید یادداشت شود.

ــ دماسنج نباید هیچ‌گاه پیش از نمونه‌برداری وارد ظروف نمونه شود.

ــ در مواردی که بسته‌های کوچک باز نشده به آزمایشگاه فرستاده می‌شود، باید درجه حرارت غذای موجود در بسته یادداشت شود.

یادآوری ۱ــ نمونه‌برداری باید در محیطی دور از گردوخاک و جریان هوا و رطوبت انجام گیرد.

یادآوری ۲ــ در صورتی‌که قسمتی از محموله وضع خاص و غیرمشابهی با سایر قسمت‌های محموله دارد نظیر جعبه و یا کارتن‌های شکسته، له شده و رطوبت دیده نمونه‌برداری باید به‌طور انتخابی صورت گیرد.

یادآوری ۳ــ در مورد برداشت نمونه از کالاهای بسته‌بندی شده موجود در انبار و یا نمونه‌برداری از کالا در محل فروش و یا توزیع که بیشتر به سبب مشکوک بودن صورت می‌گیرد، باید به شرایط نگهداری و تاریخ ساخت آن بیشتر توجه گردد و در صورتی که نقایصی درباره‌ی نگهداری وجود نداشته باشد بررسی بیشتر در مورد تاریخ تهیه، شماره بهر و یا توزیع آن کالا ضرورت خواهد داشت.

۳ــ۳ــ وسایل نمونه‌برداری

ظروف نمونه‌برداری باید خشک، تمیز و سترون باشند. برای این منظور می‌توان از ظروف شیشه‌ای دهان گشاد و درپیچ‌دار (در مورد مایعات از بطری و یا شیشه‌ای در سمباده‌ای) همچنین از ظروف فلزی زنگ نزن و کیسه‌های پلاستیکی یکبار مصرف محکم با گنجایش کافی، به‌طوری که بتوان ۲۵۰ گرم نمونه را در آن جای داد، استفاده کرد. در مورد ظروفی که بیش از یکبار مورد مصرف قرار می‌گیرند باید جنس آن‌ها طوری باشد که تحمل چندین بار شستشو و سترون شدن را دارا باشند. در صورت استفاده از چوب‌پنبه و پوشش پلاستیکی برای بستن در ظروف، باید آن‌ها را در ورقه‌های غیرقابل نفوذ (ورقه‌های آلومینیوم و یا ورقه‌های پلاستیکی) مناسب پوشانده، سپس سترون نموده و مصرف کرد. در صورتی‌که از کیسه‌های پلاستیکی یکبار مصرف سترون شده استفاده می‌شود باید پس از نمونه‌برداری آن‌ها را محکم با نخ و سیم طوری بست که هیچ‌گونه منفذی برای ورود و خروج مایعات در آن نباشد. سایر وسایل نمونه‌برداری عبارت‌اند از : چنگال، قاشق، انبرک، گیره، کارد، کاردک،مته‌های مخصوص، سینی، پیپت، دربازکن، قیچی و ... و چراغ الکلی، چراغ گاز کوچک دماسنج که از $20^{\circ}C$ تا ۱۰۰ درجه را نشان دهد و حساسیت آن حدود ۲ درجه تنظیم شده باشد (کلیه این وسایل باید قبل از مصرف با روش مناسب سترون شده باشند).

۴ــ۳ــ نمونه‌برداری از آب

برای این منظور از شیشه‌های ۱۰۰ میلی‌لیتر در سمباده‌ای یا فلزی استفاده می‌شود. شیشه‌ها را پس از سترون نمودن در کاغذ پیچیده، در موقع برداشت نمونه کاغذ را از سر شیشه باز می‌کنند و با دست چپ شیشه را نگاهداشته، با انگشت کوچک و کف دست راست در شیشه را برمی‌دارند. پس از آنکه دهانه‌ی شیشه را چند لحظه روی شعله نگاه داشتند آن‌را از آب پر کرده، سپس در شرایط سترون در آن بسته می‌شود. اگر برداشت آب از شیر صورت می‌گیرد باید دور دهانه شیر را چند لحظه شعله داده، پس از آن شیر را باز کنند تا آب از شیر برای چند دقیقه جاری شود سپس نمونه‌برداری را انجام دهند. برای برداشت نمونه آب از آب‌های ساکن (استخر، حوض، آب انبار و ...) ابتدا ته شیشه را با دست گرفته و آن را طوری به زیر آب فرو می‌برند که دهانه‌ی آن روبه پایین باشد. درضمن شیشه در عمق ۱۵ تا ۳۰ سانتی‌متری سطح آب قرار گیرد. آنگاه شیشه را کمی کج کرده، از آب پر می‌کنند، هنگام برداشت آب و آب‌های جاری باید دهانه شیشه در جهت مخالف مسیر آب قرار گیرد تا آبی که در نتیجه‌ی تماس با دست، آلوده می‌شود وارد شیشه نگردد و در مواقعی که می‌خواهند از یک چاه نیمه

شکل ۱ــ ۳ــ نمونه‌ای از میکروپیپت مخصوص نمونه‌برداری

عمیق که با وسایل دستی آب از آن می‌کشند نمونه‌برداری کنند. با رعایت نکات بهداشتی ریسمانی به گردن یک بطری بسته، پس از برداشتن در بطری آن‌را داخل چاه می‌کنند. وقتی که شیشه از آب پر شد آن را به کمک ریسمان بالا می‌کشند. پس از برداشت نمونه و بستن و مهروموم کردن، ذکر مشخصات نمونه روی برچسب شیشه الزامی است و شیشه‌های حاوی نمونه را از آب پر نمی‌کنند بلکه $\frac{۳}{۴}$ شیشه را از آب پر می‌کنند تا در موقع آزمایش بتوان آن را مخلوط کرد.

۵ــ۳ــ نمونه‌برداری از موادغذایی

نمونه‌های غذایی باید با وسایل مناسب برداشته شود و به ظروف شیشه‌ای سترون دهان گشاد مجهز به در مناسب با اندازه‌های مختلف و یا کیسه‌های پلی‌اتیلنی دو جداره که بخوبی بسته می‌شوند منتقل گردد. مقدار لازم حدود ۲۵۰ گرم است. وسایل موردنیاز برای نمونه‌برداری از مواد غذایی

شامل چاقو، قیچی، گیره، قاشق، انبرک (پنس)، قوطی‌بازکن، چکش برای غذاهای سخت و منجمد، ساطور، مته، اره، سینی، ظروف شیشه‌ای دهانه گشاد با ابعاد مختلف، کیسه‌های پلی‌اتیلن در ابعاد و اندازه‌های متفاوت می‌باشند. از آنجا که وسایل نمونه‌برداری باید به‌طور مرتب تمیز و سترون شوند بدین جهت باید جنس آن‌ها از موادی با کیفیت خوب و دارای طراحی ساده باشند، تا به راحتی قابل تمیز کردن باشند. (ظروف چوبی مناسب نیستند) موادی که برای شستشو و سترون کردن بکار می‌روند باید از پاک‌کننده‌های قابل سازش با آب، آب‌جوش، هیپوکلریت و الکل ۷۰ درصد باشند.

روش نمونه‌برداری از مواد غذایی

۱ــ *تخم‌مرغ:* تخم‌مرغ به چند شکل به بازار عرضه می‌شود. در این قسمت نمونه‌برداری از تخم‌مرغ به‌شکل کامل و به‌صورت پودر توضیح داده می‌شود.

الف) تخم‌مرغ کامل: پس از باز کردن جعبه‌های حاوی تخم‌مرغ، در صورتی که تمام آن‌ها از نظر ظاهری بدون عیب باشند تعدادی را به‌طور تصادفی انتخاب و برداشت کرده (به‌طوری که تخم‌مرغ‌ها نشکنند) سپس بلافاصله آن‌ها را به‌آزمایشگاه منتقل می‌کنند. چنانچه امکان انتقال فوری نمونه‌ها به‌آزمایشگاه وجود ندارد باید آن‌ها را تا زمان رسیدن به آزمایشگاه و آزمایش در حرارت بین ۴ تا ۱۰ درجه سلسیوس نگهداری نمود.

ب) پودر تخم‌مرغ: برای این منظور توسط وسیله‌ی نمونه‌برداری سترون، از هر بسته در سه نقطه یکی وسط و دو تا از اطراف بسته از قسمت عمقی، نمونه‌برداری می‌شود. سپس هر سه نمونه را که تقریباً باید مساوی باشند به یک ظرف شیشه‌ای سترون منتقل کرده، بلافاصله آن‌را به آزمایشگاه ارسال می‌کنند. نمونه‌ها تا موقع آزمایش باید در دمای مناسب نگاهداری شوند.

۲ــ غذاهای منجمد: این غذاها باید تا زمان رسیدن به آزمایشگاه همچنان به‌حالت منجمد باشند. چنین فرآورده‌هایی اگر از حالت انجماد خارج شده باشند نباید دوباره منجمد گردند (مگر در موارد خیلی اضطراری).

الف) غذاهای دریایی پخته و نپخته منجمد: باید از تمام محموله نمونه‌برداری انجام شود یعنی قسمت‌هایی از بسته‌های بزرگ برداشته و خرد شوند و به کیسه‌های دو جداره پلی‌اتیلنی منتقل گردند.

ب) گوشت خام منجمد (نمونه‌برداری از قطعات گوشت بدون استخوان): برای نمونه‌برداری از گوشت خام باید به کمک اره و یا ساطور تمیز و سترون، حداقل ۲۵۰ گرم نمونه برداشته و به کیسه‌ی پلی‌اتیلنی منتقل شود. سر کیسه را گره زده، در کیسه‌ی دیگری گذاشته و با دقت بسته شود.

ج) نمونه‌برداری از لاشه‌ی کامل: چنانچه گوشت به شکل لاشه‌ی کامل و یا قطعات بزرگ

و یا منجمد باشد در صورتی‌که ترکیب گوشت به‌حالت طبیعی خود باقی مانده باشد، پیش از هر چیز باید از نظر تشخیص آلودگی یا عدم آلودگی مورد بررسی واقع شود. و چون بخش زیادی از آلودگی گوشت سطحی است (به‌جز مواقعی که حیوان در حال بیماری ذبح شده و یا مدتی در شرایط نامناسب نگهداری شده و فاسد شده باشد) باید میزان آلودگی در سطح معینی از لاشه معلوم گردد. اگر لاشه به‌صورت تازه یا منجمد است با وسیله‌ی سترون از سطح معینی به اندازه‌ی ۵۰ گرم برداشته، به آزمایشگاه ارسال می‌شود.

د) گوشت طیور: برای این منظور باید از کیسه‌های پلاستیکی جداگانه برای قسمت‌های مختلف لاشه (لفاف‌دار یا بدون لفاف) استفاده شود. به محض رسیدن این نمونه به‌آزمایشگاه باید آن‌را از کیسه‌ی خارجی درآورده، در یک سینی قرار داده، در یخچال بگذارند تا کمی باز و نرم شود سپس لفاف یا بقایای لفاف را از آن جدا کنند.

۳ــ غذاهای یخچالی : این‌گونه نمونه‌های غذایی نباید پیش از آزمایش منجمد شوند ولی می‌باید در طی نگهداری و جابجایی در دمای حدود ۴+ درجه سانتی‌گراد در ظروف عایق نگهداری شود و به سرعت به آزمایشگاه فرستاده شود.

۴ ــ گوشت دام و طیور سرد شده: نمونه‌های گوشت دام و طیور سرد باید به روش فرآورده‌های منجمد خیلی سریع پس از رسیدن به آزمایشگاه مورد آزمایش واقع شوند. در تهیّه نمونه برای آزمایش باید از روش خراشیدن استفاده شود.

۵ــ پنیر: برای نمونه‌برداری از پنیرهای سخت ونیمه سخت که مشکوک به آلودگی هستند باید به طریق زیر عمل شود. ابتدا باید قسمت سطحی پنیر را به عمق ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متر کنار زد. آنگاه از قسمت داخلی آن با وسیله‌ی مخصوص نمونه‌برداری پنیر (سرنگ مانند) از ۵ نقطه متمایز ۵ نمونه هر کدام به وزن تقریبی ۵ گرم برداشت. نمونه‌های پنیر را باید تا انجام آزمایش در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد یا کمتر نگاهداری کرد. چنانچه از پنیر تازه‌ی بی‌نمک نمونه‌برداری می‌شود باید تا هنگام رساندن آن به آزمایشگاه و انجام آزمایش، نمونه در دمای بین صفر تا ۴ درجه سانتی‌گراد نگاهداری شود. چنانچه نمونه‌برداری به منظور آزمایش‌های شیمیایی انجام می‌گیرد باید طوری باشد که از قسمت سطحی و عمقی هر دو برداشت گردد و مقدار آن باید حدود ۲۰۰ گرم باشد.

۶ــ شیر تازه: برای آزمایش‌های مختلف روی شیر می‌توان از شیر یک رأس دام یا شیر مخلوط شده در یک ظرف کوچک یا بزرگ نمونه‌برداری کرد.

الف) نمونه‌برداری از شیر دام هنگام دوشش: قبل از دوشش باید پستان گاو با آب و صابون

و برس پاک شده، پس از نظافت، با یک پارچه‌ی تمیز خشک گردد. نظافت پستان گاو بیش از دوشش آن حائز اهمیت است زیرا درصورت آلوده بودن آن هنگام دوشیدن، شیر آلوده می‌شود و نتیجه آزمایش صحیح و قابل اطمینان نخواهد بود، بهتر است قطرات اولیه شیر دور ریخته شود زیرا مجرای پستان قبل از دوشش آلوده است و شیر به هنگام عبور از آن آلوده می‌گردد. پس از آن‌که شیر به‌طور کامل دوشیده شد چنانچه تهیه‌ی نمونه بلافاصله صورت گیرد لازم است آن را به خوبی هم زده و نمونه‌برداری کرد. کلیه ظروف و وسایل باید سترون باشند و نمونه‌برداری در شرایط سترونی صورت گیرد. در هنگام استفاده از شیردوش مکانیکی، چون لوله‌ی بعضی از شیردوش‌های مکانیکی به یک مخزن استیل ضدزنگ وصل است. پیش از نمونه‌برداری چند بار شیر موجود در مخزن هم زده شود.

ب) شیر در ظروف بزرگ (تانکر، مخزن، بیدون): در هنگام تهیه‌ی نمونه از این ظروف باید به چندمورد توجه شود.

۱ــ مدتی که شیر در این ظروف مانده است. ۲ــ چگونگی نگهداری. ۳ــ دمای شیر.

با توجه به عوامل بالا پیشنهاد یک روش مشخص برای نمونه‌برداری صحیح نیست. ولی پیشنهاد می‌گردد که در هر صورت قبل از تهیه، نمونه‌ی شیر را با همزن الکتریکی یا همزن دستی یا هوای فشرده و یا هر وسیله‌ی ممکن دیگر یکنواخت کنند. چنانچه از ریختن شیر در این ظروف ۳۰ دقیقه گذشته باشد باید عمل هم‌زدن پنج دقیقه ادامه یابد. استفاده از همزن الکتریکی یا هوای فشرده باید آنقدر ادامه یابد تا شیر همگن شده و نمونه‌های برداشت شده از بالا و پایین یکسان باشند. بدیهی است مدت لازم را با تجربه می‌توان تعیین کرد. با اتمام یکنواخت کردن، از شیر نمونه‌برداری می‌شود مقدار نمونه نباید از ۵۰۰ سانتی‌متر مکعب کمتر باشد.

ــ شیر پاستوریزه و استریلیزه: در مورد شیر پاستوریزه یا استریلیزه باید به تعداد لازم نمونه انتخاب و به آزمایشگاه ارسال شود. کلیه وسایل نمونه‌برداری باید سترون باشند و برای رساندن نمونه‌های شیر به آزمایشگاه باید شرایط دما بین ۲۰ تا ۴ درجه سانتی‌گراد باشد و نمونه هر چه زودتر به آزمایشگاه برسد.

۷ــ خامه: نمونه‌برداری از خامه مانند شیر است. خامه نیز باید پیش از نمونه‌برداری با همزن یکنواخت شود. هنگام بهم‌زدن خامه باید دقت شود که تمام خامه بویژه قسمت‌های موجود در ته و اطراف ظرف به‌هم خورده، یکنواخت شود. در هنگام هم‌زدن همزن را نباید به‌شدت بالا و پایین برد بلکه باید آن‌را در داخل خامه فرو کرد. پس از یکنواخت شدن ۲۰۰ گرم نمونه در شرایط سترونی برداشت شده، با رعایت اصول بهداشتی به آزمایشگاه ارسال می‌گردد.

۸ــ کره: برداشت نمونه از کره ممکن است در محل تولید یا فروشگاه‌ها صورت گیرد.

الف) کره در دستگاه کره‌زنی: پس از آنکه کره در دستگاه کره‌زنی آماده شد، سه نمونه به‌وزن تقریبی هر یک ۱۰ گرم از سه نقطه یکی از وسط و دو نمونه از اطراف برای آزمایش‌های میکروبی برداشت شود. برای آزمایش‌های شیمیایی مقدار بیشتری نمونه لازم است.

ب) کره در ظروف و بسته‌های بزرگ: برای آزمایش میکروبی با وسایل سترون از دو قسمت جداگانه به‌وزن تقریبی هر یک ۱۵ گرم نمونه تهیه شود. اگر از بسته‌های بزرگ کره نمونه تهیه می‌شود، باید قسمتی از پوشش آن کنار زده شود تا سطح کره نمایان گردد. سپس با قاشق یا اسپاتول یا وسیله‌ی مناسب دیگر، نمونه‌برداری صورت گیرد. برداشت نمونه از کنار بسته به‌طوری صورت گیرد که قسمت‌های سطحی از سه طرف برداشته شود.

ج) کره قالبی: کره‌های قالبی در اندازه‌های مختلف تهیه می‌گردد. برای آزمایش‌های میکروبی باید بر طبق روش‌های نمونه‌برداری از تعداد معینی از بسته‌ها نمونه تهیه کرده، به آزمایشگاه ارسال دارند. یا اینکه بسته‌بندی کره را در شرایط سترونی بازکنند تا تمام سطح آن نمایان گردد. پس از مشاهده و اطمینان از یکنواختی آن از سطحی به اندازه‌ی ۸ تا ۱۰ سانتی‌متر مربع حدود ۱۵ گرم را باوسایل سترون برداشت نمایند. نمونه‌برداری باید طوری انجام شود که قسمت‌های سطحی نیز همراه نمونه باشد. پس از تهیه نمونه باید آن‌ها را بلافاصله در حرارت صفر تا ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده، به آزمایشگاه ارسال دارند. آزمایش‌های میکروبی روی کره باید هر چه زودتر انجام شود و فاصله نمونه‌برداری و آزمایش کوتاه باشد.

۹ــ بستنی: برای نمونه‌برداری از بستنی و سایر موادغذایی منجمد، ابتدا با یک چاقو یا وسیله‌ی برنده و تیزِ سترون، سطح نمونه را تا عمق حدود ۲/۵ سانتی‌متر کنار زده و بعد، از آن محل نمونه برداشت شود چنانچه بستنی خیلی سفت و سخت باشد می‌توان از روش‌های مخصوص برای برداشت نمونه استفاده کرد. به هرحال ۵۰ گرم نمونه لازم است. نمونه‌ها پس از برداشت و انتقال به ظروف سترون هرچه سریع‌تر باید به آزمایشگاه ارسال شوند تا در هنگام آزمایش فرآورده از حالت انجماد خارج نشده باشد. چنانچه بستنی ایجاد مسمومیت کرده باشد، بهتراست علاوه بر آن از کلیه مواد اولیه آن در صورت موجود بودن نمونه‌برداری صورت گیرد.

۱۰ــ شیر غلیظ شده[1]: این شیرها را معمولاً در بسته‌های فلزی بسته‌بندی می‌کنند.

تهیه نمونه از بسته‌های کوچک: ابتدا قوطی‌ها را از نظر وضع ظاهری مورد آزمایش قرار

۱ــ Condensed Milk

می‌دهند. چنانچه برخی از آن‌ها دارای سوراخ بوده و یا وضع ظاهری مشکوک داشته باشد این قبیل قوطی‌ها از قوطی‌های سالم جدا می‌شوند و از هر یک به‌طور جداگانه به تعداد لازم نمونه برداشته می‌شود. (نمونه‌های قابل فساد باید در شرایط مناسب به آزمایشگاه فرستاده شوند) تهیه نمونه از بسته‌های بزرگ به همان صورت نمونه‌برداری از بسته‌های کوچک است و پس از یکنواخت نمودن محتویات ظرفها، از هر یک جداگانه حدود ۲۵۰ گرم نمونه برداشته می‌شود.

۱۱ــ شیرخشک: در محل نمونه‌برداری از شیرخشک به هیچ‌وجه نباید رطوبت هوا زیاد باشد اگر شیرهای خشک به‌صورت بسته‌های کوچک است، به تعداد مناسب از بسته‌ها انتخاب و برداشت می‌شود.

ولی اگر بسته بزرگ باشد از بین آن‌ها تعدادی انتخاب و سپس مقدار لازم از آن‌ها برداشته شود. چون شیرخشک خیلی سریع رطوبت را جذب می‌کند، نمونه‌برداری از ظروف باید خیلی سریع انجام شده، بلافاصله نمونه به ظروف سترون و شیشه‌ای منتقل شود و مهروموم گردد. چنانچه امکان آلودگی در بعضی از قسمت‌های بسته زیادتر به‌نظر می‌رسد، باید از آن قسمت‌ها به‌طور جداگانه برداشت شود و مشاهدات و علل نمونه‌برداری در گزارش قید گردد.

۱۲ــ مواد شکل‌دهنده: مواد شکل‌دهنده مانند ژلاتین، پکتین، آگار و غیره که به موادغذایی افزوده می‌گردد چنانچه آلوده باشند، منبع مهمی برای آلودگی فرآورده‌های غذایی می‌باشند. بنابراین مواد شکل‌دهنده نیز قبل از مصرف، اگر مشکوک به‌نظر می‌رسند باید نمونه‌برداری و آزمایش شوند. پس از انتخاب بسته‌های لازم، در شرایط سترونی و در محلی که رطوبت زیاد نباشد، در آن‌ها باز شده، با استفاده از نمونه‌بردار سترون از هر بسته حدود ۲۵۰ گرم از نقاط مختلف برداشته، به یک ظرف سترون منتقل می‌شود، چنانچه مقدور باشد، بهتر است کلیه‌ی مواد موجود در بسته در یک ظرف بزرگ سترون خالی شده، پس از یکنواخت کردن از آن نمونه‌برداری گردد.

۱۳ــ مواد غذایی بسته‌بندی شده در قوطی (کنسروها و کمپوت‌ها): ابتدا تعداد لازم قوطی به روش تصادفی و با استفاده از جداول نمونه برداری استاندارد انتخاب می‌گردد. سپس سطح قوطی‌ها با آب نیم‌گرم و صابون خوب شسته و با پنبه‌ی آغشته به الکل سترون می‌شود. چون ممکن است مقداری گاز در داخل قوطی تولید شده باشد که در هنگام سوراخ کردن سبب پخش ماده‌ی غذایی به اطراف و برخورد آن به سر و صورت آزمایش‌کننده گردد، همچنین برگشت آن روی قوطی ممکن است سبب آلودگی ثانوی شود. باید قیف سترونی را که اندازه‌ی آن متناسب با اندازه‌ی قوطی کنسرو باشد به‌طور واژگون روی قوطی قرار داده، سپس میخ بلند و سترونی را از جهت باریک قیف

داخل کرده، با ضربه قوطی را سوراخ کرد. در مورد قوطی‌های سالم می‌توان با استفاده از دربازکن سترون در قوطی را به‌اندازه‌ی کافی باز کرده، سپس با وسیله‌ی فلزی توخالی و سترون که تا عمق قوطی وارد می‌شود نمونه تهیه کرد. چنانچه ماده موجود در قوطی مایع است با پیپت سترون مقدار نمونه‌ی لازم تهیه و به یک ظرف سترون منتقل می‌شود و به آزمایشگاه ارسال می‌گردد.

۶ــ۳ــ نشانه‌گذاری[۱] ظروف حاوی نمونه

تمام ظروف باید قبل و یا بلافاصله پس از نمونه‌برداری نشانه‌گذاری شوند. بهتر است برای جلوگیری از کنده شدن و افتادن احتمالی برچسب در طول عملیات بعدی آن‌را محکم چسباند. برچسب‌ها شماره‌گذاری شده، اطلاعات ضروری در مورد نمونه روی آن‌ها قید گردد. چنانچه نمونه اولیه از یک ظرف بزرگ مانند کیسه یا کارتن برداشته شده باشد ظرف حاوی نمونه با شماره روی کیسه یا کارتن مشخص شود.

گزارش نمونه‌برداری: گزارش نمونه‌برداری باید توسط نمونه‌بردار امضا گردد.

گزارش نمونه‌برداری از هر نمونه باید شامل اطلاعات زیر باشد :

۱ــ نام و آدرس نمونه‌بردار ۲ــ نام و آدرس نماینده‌ی کالا و یا صاحب کالا ۳ــ تاریخ، محل و زمان نمونه‌برداری ۴ــ علت نمونه‌برداری ۵ــ مشخصات ماده غذایی ۶ــ نام تولیدکننده، واردکننده، فروشنده، خریدار و در صورت لزوم سایر اطلاعات ضروری ۷ــ تعداد و اندازه واحدهای تشکیل‌دهنده‌ی‌بهر ۸ــ شماره و علامت بهر ۹ــ شماره فاکتور و بارنامه ۱۰ــ روش نمونه‌برداری (روش تصادفی از بهر یا انتخابی از واحدهای در دسترس) ۱۱ــ کلیه‌ی مدارک مربوط به حمل و نقل ــ گواهی بهداشت و استاندارد کشور مبدأ ۱۲ــ در صورتی که نمونه‌برداری از یک واحد بزرگ صورت گیرد کلیه داده‌ها روی بسته‌بندی بزرگ، ویژگی‌های کالا، اندازه و تعداد روی بسته کوچک قید گردد. ۱۳ــ چگونگی و کیفیت حمل نمونه‌ها به آزمایشگاه ۱۴ــ در مواردی که فروشنده و خریدار تقاضای آزمایش دارند خودشان باید آزمایش‌های موردنظر را ذکر کنند. ۱۵ــ شرایطی که ممکن است در نمونه‌برداری و یا وضعیت نمونه‌ها تغییر ایجاد نماید.

۷ــ۳ــ جابه‌جایی و نگهداری نمونه‌ها

در جابه‌جایی نمونه‌ها باید کوشش شود که شرایط میکروبیولوژیکی ماده‌ی غذایی تغییر نکند.

۱ــ Labling

از این‌رو باید تا جای ممکن به فوریت نمونه‌ها را پس از برداشتن مورد آزمایش قرارداد و یا اینکه از وسایلی مانند یخدان، یخچال و فریزر استفاده شود که امکان تغییر شرایط ماده غذایی در طول جابه‌جایی و نگهداری وجود نداشته باشد. ارسال نمونه‌ها به آزمایشگاه تا حد ممکن باید سریع صورت گیرد. چنانچه نمونه‌ی موردنظر از غذاهای خشک و کنسروها باشد، در این موارد احتیاطات خاصی لازم نیست فقط درجه حرارت نباید از ۴۵ درجه سانتی‌گراد تجاوز کند. چنانچه نمونه‌ی غذایی فاسد شدنی و غیرمنجمد باشد باید تا هنگام آزمایش در ۰ تا ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود و با ظروف عایق‌دار به آزمایشگاه ارسال گردد. نمونه‌های غذایی منجمد را باید تا هنگام آزمایش همچنان به‌حالت انجماد نگاهداری نمود. برای این منظور باید آن‌ها را در ظروف نمونه‌برداری عایق که در فریزر قرار داشته و سرد شده‌اند قرار داد و با استفاده از یخ خشک یا وسیله‌ی مناسب دیگری در تمام مدت حمل و نقل یا نگهداری درجه حرارت نمونه را پایین‌تر از صفر نگاه داشت.

۸ ــ۳ــ آماده کردن نمونه‌های مورد آزمون

پس از رسیدن نمونه‌های جمع‌آوری شده، باید بلافاصله اقدام به آزمایش کرد.

۱ــ ۸ ــ۳ــ چنانچه نمونه‌های رسیده به آزمایشگاه **منجمد** باشد باید به یکی از سه روش زیر آماده شوند.

الف) نمونه در ظرفی که به آزمایشگاه رسیده است برای ۱۸ ساعت در یخچالی که ۵ ــ۲ درجه سانتی‌گراد حرارت دارد قرار داده شود.

ب) چنانچه نمونه به آسانی قابل خرد شدن باشد باید آن‌را خرد کنند.

پ) نمونه‌هایی که بسهولت از حالت انجماد خارج می‌شوند باید به مدّت کمتر از یک‌ربع ساعت در حرارت ۳۵ درجه‌ی سانتیگراد قرار داده شوند.

۲ــ ۸ ــ۳ــ در صورتی که نمونه غذایی **مایع** یا به‌حالت **سوسپانسیون** و یا **جامد** باشد درهرحال قبل از باز کردن، ظرف دارای نمونه باید خوب تکان داده شود.

ــ هنگام باز کردن درب ظرف دارای نمونه باید از آلوده شدن آن جلوگیری شود. به این منظور روی درب و اطراف و محلی که از آنجا ظرف باز می‌شود باید ضدعفونی گردد.

ــ در مورد غذاهای بسته‌بندی شده برای از بین بردن آلودگی از شعله دادن یا پاک کردن با الکل ۷۰درصد و یا هوای خشک گرم استفاده می‌شود.

ــ هنگام باز کردن ظروف حاوی نمونه‌های غذایی پودری شکل باید دقت شود تا از آلودگی

اطراف و محل کار و سایر نمونه‌ها جلوگیری گردد.

۳ــ ۸ ــ۳ــ هنگامی که نمونه‌ها متشکل از چندین ترکیب یا لایه هستند مانند کیک‌های خامه‌ای یا ژله‌ای به‌ویژه اگر به‌صورت قسمت‌ها و لایه‌های جداگانه تهیه شده‌اند باید نمونه‌های جداگانه از هر بخش برداشت شود. به‌طوری‌که بر اثر اختلاط با یکدیگر آلودگی پخش نشود. سپس همه قسمت‌ها به ظروف جداگانه منتقل شوند.

در تهیه‌ی رقت‌ها و یکنواخت کردن نمونه غذایی رعایت شرایط سترونی الزامی است.

ــ هرگونه شکل و یا وضعیت غیرعادی نمونه باید یادداشت شود.

ــ ظروف دارای باقیمانده نمونه‌های جمع‌آوری شده در یخچال یا فریزر برای تکرار آزمایشها نگاه داشته شوند. برای جداسازی و شمارش میکروب‌ها در ماده‌ی غذایی غیرمایع و یا موادغذایی که دارای لایه‌ی ژلاتینی و خشک هستند نخست باید مخلوطی یکنواخت از ماده‌ی غذایی در محیط مایع تهیه شود سپس رقت‌های لازم از آن بدست آید. برای این منظور ماده‌ی غذایی باید خرد شود ولی هنگام خردکردن آن و تهیه مخلوط اولیه باید به نکات زیر توجه داشت :

مدت عمل خرد کردن نباید طولانی شود زیرا باعث بالا رفتن دما و در نتیجه از بین رفتن بعضی از باکتری‌ها خواهد شد، همچنین سرعت بیش از حد مخلوط کن ممکن است باعث آسیب مکانیکی و در نتیجه از بین رفتن باکتری‌ها گردد و در شمارش تعداد باکتری‌ها باعث اشتباه شود، کم‌بودن زمان مخلوط کردن باعث می‌شود که تمامی میکروب‌های موجود در ماده‌ی غذایی در محیط آزاد نشود. چون در هنگام خرد کردن ماده‌ی غذایی خطر انتشار میکروب‌های بیماریزا در هوا وجود دارد باید این عمل در زیر هود انجام گیرد.

۹ــ۳ــ روش رقیق کردن نمونه

در بسیاری موارد میزان آلودگی در نمونه موردنظر در حد بالایی قرار دارد لازم است قبل از کشت دادن نمونه در محیط کشت آن‌را با رقیق کننده‌های استریل به نسبت معین رقیق نمود تا بتوان براحتی و با دقت بیشتر آلودگی موجود در نمونه را تعیین کرد. این عمل در اساس به‌خاطر این است که برابر استاندارد بین‌المللی بعد از کشت نمونه‌ها در محیط کشت و قرار گرفتن محیط‌ها به‌مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در اینکوباتور با دمای معین، تعداد پرگنه‌های ناشی از تکثیر میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه می‌باید در حد۳۰ تا ۳۰۰ قرار داشته باشد. محلول‌های رقیق‌کننده متداول عبارت‌اند از : آب مقطر استریل، سرم فیزیولوژی، محلول سیلین (محلول ۹ گرم در لیتر نمک طعام) و محلول رینگر.

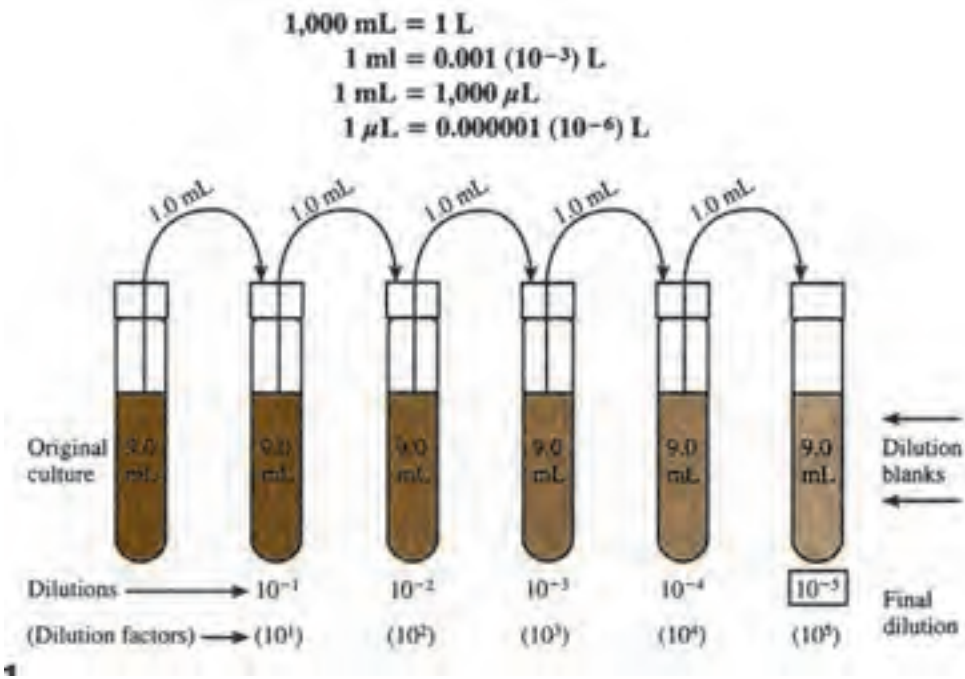
این مواد علاوه بر رقیق‌کنندگی نمونه مورد آزمایش دو نقش اساسی دیگر نیز دارا می‌باشند :

۱ــ جدا کردن میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه از آن و هدایت آن‌ها به داخل رقیق کننده سترون شده.

۲ــ جدا و پراکنده نمودن میکروارگانیسم‌ها از یکدیگر.

بدین ترتیب هنگامی‌که از محلول‌های رقیق‌کننده عمل کشت دادن در محیط‌های جامد (در پتری‌دیش) صورت می‌گیرد، میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه با وضعیت مناسب و شرایط آماده‌تری شروع به تغذیه و رشد و تکثیر می‌نمایند.

طرز رقیق کردن: ابتدا ظرف خالی و سترون مخلوط‌کن را توزین کرده، ۱۰ گرم از نمونه یکنواخت شده را داخل آن وزن می‌کنند. ۹۰ میلی‌لیتر رقیق‌کننده‌ی آب پپتونه یا بافرفسفات به آن افزوده و مخلوط‌کن را با سرعت کم راه می‌اندازند و سرعت را به صورت یکنواخت افزایش داده، مدت ۲ــ۱ دقیقه با سرعت بالا عمل مخلوط کردن را ادامه می‌دهند تا مخلوطی یکنواخت از نمونه با رقت یکدهم بدست آید. برای رقیق کردن نمونه مورد آزمایش ابتدا به تعداد لازم لوله‌های حاوی ۹ میلی‌لیتر مایع رقیق‌کننده را به ترتیب با $\frac{۱}{۱۰}$ ، $\frac{۱}{۱۰۰}$ ، $\frac{۱}{۱۰۰۰}$ و ... مشخص کرده سپس به کمک پیپت



شکل ۲ــ ۳ــ مراحل رقیق کردن نمونه‌های آزمایشگاهی

یک میلی‌لیتر از رقت (نمونه‌های مایع) یا از رقت $\frac{۱}{۱۰}$ (نمونه‌های جامد) برداشته، به اولین لوله حاوی مایع رقیق‌کننده بیفزایید و چندبار با پر و خالی کردن پیپت آن‌را هم بزنید. سپس با یک پیپت یک‌میلی‌لیتری دیگر، یک میلی‌لیتر از آن‌را به دومین لوله‌ی حاوی محلول رقیق‌کننده اضافه کنید و به همین ترتیب عمل رقیق کردن را تا بیشترین رقت موردنظر ادامه دهید ($\frac{۱}{۱۰۰۰۰۰۰}$ یا بیشتر و یا کمتر) باید دقت داشت که هر پیپت فقط در یک رقت فرو رود و هرگز با رقت‌های دیگر تماس پیدا نکند ولی چنانچه کشت یک رقت، در چند محیط موردنظر باشد می‌توان از یک پیپت استفاده کرد. کلیه عملیات رقیق کردن باید در کنار شعله در شرایط سترونی صورت گیرد.

خودآزمایی

۱ــ نمونه و نمونه‌ی اولیه را تعریف کرده، طرز تهیه‌ی آن‌ها را بنویسید.
۲ــ از مایعات منجمد چگونه نمونه‌برداری می‌شود؟
۳ــ ویژگی ظروف نمونه‌برداری را بنویسید.
۴ــ از آب‌های ساکن مثل مخازن و چاه و ... چگونه نمونه‌برداری می‌شود؟
۵ــ نمونه‌ای از آب محل زندگی خود را تهیه کنید و همراه با گزارش به آزمایشگاه تحویل دهید.
۶ــ طرز آماده کردن نمونه‌های منجمد در آزمایشگاه چگونه است؟
۷ــ به هنگام خرد کردن نمونه‌ی مواد غذایی جامد رعایت چه نکاتی الزامی است؟
۸ــ روش رقیق کردن نمونه‌های مختلف را توضیح دهید.
۹ــ محلول‌های رقیق‌کننده را نام برده، خواص دیگر آن‌ها را بنویسید.
۱۰ــ قبل از باز کردن درب ظروف نمونه‌برداری شده، رعایت چه نکاتی الزامی است؟
۱۱ــ نحوه‌ی نمونه‌برداری از پودر تخم‌مرغ را توضیح دهید.
۱۲ــ نمونه‌برداری از گوشت خام منجمد چگونه انجام می‌گیرد؟
۱۳ــ هنگام نمونه‌برداری شیر از ظروف بزرگ به چه مواردی باید دقت نمود؟
۱۴ــ چرا نمونه‌برداری از شیرخشک باید خیلی سریع انجام گیرد؟
۱۵ــ چرا برای جابه‌جایی و نگهداری نمونه‌ها از وسایلی مانند یخدان، یخچال یا فریزر استفاده می‌شود؟

فصل چهارم

محیط‌های کشت باکتری‌ها

هدف‌های رفتاری: در پایان این فصل، فراگیر باید بتواند :
۱ــ اهمیت محیط‌های کشت و تفاوت بین انواع آن‌ها را بیان نماید.
۲ــ محیط‌های کشت آماده را در آزمایشگاه تهیه نماید.

۴ــ محیط‌های کشت باکتری‌ها

۱ــ۴ــ تعریف

منظور از محیط کشت مخلوطی متعادل از مواد مغذی موردنیاز برای رشد میکروارگانیسم‌ها می‌باشد به نحوی که بتواند از لحاظ مواد غذایی، رطوبت و pH شرایط رشد میکروب موردنظر را تأمین نماید.

۲ــ۴ــ انواع محیط‌های کشت[۱]

در میکروبیولوژی انواع متعددی از محیط‌های کشت بکار می‌رود این محیط‌ها برحسب نیازهای مخصوص میکروارگانیسم‌های مورد نظر از یکدیگر متفاوتند. از لحاظ فرم فیزیکی محیط کشت شامل انواع جامد و مایع هستند. از نظر ترکیب نیز شامل محیط کشت‌های عمومی (ساده)، افتراقی و اختصاصی می‌شوند.

۱ــ۲ــ۴ــ محیط‌های کشت عمومی: این محیط‌ها به نحوی گزینش می‌شوند که بتوانند مواد مغذی لازم برای رشد و نمو تمام میکروارگانیسم‌های آلوده‌کننده را فراهم سازند. مهم‌ترین نمونه‌های این نوع محیط کشت عبارتند از نوترنیت آگار (جامد)[۲] و نوترنیت براث (مایع)[۳] که بیشتر

۱ــ Media ۲ــ Nutrienta gar ۳ــ Nutrient broth

برای شمارش تعداد کل میکروارگانیسم‌های آلوده‌کننده مواد غذایی به‌کار می‌روند، بدیهی است شرایط کشت میکروبی با استفاده از این محیط‌ها تابع نوع میکروارگانیسم‌ها است و برای نمونه چنانچه لازم باشد تعداد کل میکروارگانیسم‌های بی‌هوازی شناسایی و شمارش شوند. محیط کشت تلقیح شده باید در شرایط بی‌هوازی قرار گیرد.

۲ــ۲ــ۴ــ محیط کشت اختصاصی[۱]: به گروهی از محیط کشت‌ها می‌گویند که به دلیل دارا بودن یک سری از ترکیبات خاص فقط اجازه رشد به یک و یا تعداد محدودی از باکتری‌ها را می‌دهند.

۳ــ۲ــ۴ــ محیط کشت افتراقی[۲]: این گروه از محیط‌های کشت دارای ترکیباتی هستند که با توجه به متابولیسم مختلف باکتری‌ها باعث تفکیک و یا جدایی گروه‌های مختلف باکتری‌ها از هم می‌شوند مثل Blood Agar که به کمک آن میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا از هم تشخیص داده می‌شود.

۳ــ۴ــ آماده سازی محیط‌های کشت

هنگامی که بخواهیم باکتری‌ها را روی یک محیط کشت جامد رشد دهیم معمولاً از یک ماده جامدکننده به‌نام آگار در محیط کشت استفاده می‌شود. (آگار یک پلی‌ساکارید پیچیده است که از جلبک دریایی گرفته شده است و به‌عنوان یک قوام‌دهنده‌ی ژله، بستنی و ... مدت‌های طولانی مورد استفاده بوده است) آگار با خواص مهمی که دارد برای میکروبیولوژی باارزش است. تاکنون جانشین مطلوبی برای آگار پیدا نشده است. تعداد کمی از باکتری‌ها می‌توانند آگار را تجزیه کنند بنابراین آگار جامد باقی می‌ماند. آگار در حدود نقطه‌ی جوشِ آب ذوب می‌شود و در موقع سرد کردن تا $40^{\circ}C$ مایع باقی می‌ماند که این خاصیت بسیار مهمی است. برای آزمایشگاه از آگاری استفاده می‌شود که در حمام‌های آب گرم با دمای $50^{\circ}C$ نگهداری می‌شود. در این دما اگر آگار بر روی یک مایع تلقیح میکروبی ریخته شود به آن‌ها آسیب نمی‌رساند.

در مواردی که محیط کشت مورد نظر به‌صورت پودر است به اندازه مناسب از آن وزن نموده (مقدار مناسب در روی بسته مشخص شده است)، در داخل ارلن بریزید و بعد از افزودن آب مقطر به اندازه‌ی تعیین شده و حل کردن محیط کشت (به کمک حرارت) و قرار دادن درپیچ و یا درپوش پنبه‌ای و بستن دهانه آن با کاغذ آلومینیومی، ارلن را داخل اتوکلاو قرار دهید و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد

۱ــ Selective media ۲ــ Differentional media

و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع (15PSI) آن را برای مدت حداقل ۱۵ دقیقه استریل نمایید. در مرحله بعد پتری‌دیش و ظرف کشت‌های استریل شده را که مورد نیاز هستند از آون خارج نموده، داخل لوله فلزی پوششی یا کاغذ آلومینیومی باقی بگذارید تا سرد شوند. سپس محلول محیط کشت استریل شده بعد از قدری سرد شدن (حدود ۴۵ درجه سانتی‌گراد) آماده استفاده است. در این موقع میز کار را با پارچه تمیز نموده، با پنبه‌ی الکلی آلودگی سطح آن را پاک نمایید. بعد از چیدن پلیت بر روی میز و نوشتن نام محیط کشت بر روی درب آن‌ها با بلند کردن دربشان در هر کدام به اندازه‌ای که تمام سطح پلیت را بپوشاند از محلول محیط کشت ریخته، سپس درب آن‌ها را برای مدتی به حالت زاویه‌دار روی لبه آن‌ها قرار دهید. بعد از افزودن مواد محیط کشت به تمام پلیت، درب آن‌ها را به حالت اول برگردانید تا از ورود میکروب‌ها به داخل پلیت جلوگیری شود. پس از سرد شدن و بسته شدن محیط کشت، آن‌ها را تا زمان استفاده داخل یخچال قرار دهید.

خودآزمایی

۱ــ آیا تنظیم pH محیط کشت ضروری است؟ چرا؟

۲ــ چرا رشد بعضی از انواع میکروارگانیسم‌ها روی یک محیط مشخص غیرممکن است؟

۳ــ منظور از محیط کشت چیست و به‌طورکلی چند نوع محیط کشت موجود است؟

۴ــ محیط‌های کشت متمایزکننده را شرح دهید.

۵ــ معمول‌ترین محیط کشت میکروارگانیسم‌ها چیست و از چه موادی ساخته می‌شود؟

۶ــ آگار چیست و چه استفاده‌ای از آن در میکروبیولوژی بعمل می‌آید؟

۷ــ طرز تهیه و آماده‌سازی محیط‌های کشت پودری موجود در بازار را بنویسید.

فصل پنجم

روش‌های کشت میکروارگانیسم‌ها

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

۱ــ روش پورپلیت یا استاندارد را برای شمارش باکتری‌های فعال انجام دهد.

۲ــ سایر روش‌های شمارش باکتری‌ها را انجام داده، آن‌ها را با یکدیگر مقایسه نماید.

۳ــ وسایل و تجهیزات آزمایشگاهی لازم برای شمارش میکروارگانیسم‌ها را شناسایی نماید.

۴ــ نمونه‌ای از مواد غذایی اطراف خود مانند آب آشامیدنی را مورد آزمون قرار دهید.

۵ــ روش‌های کشت بی‌هوازی باکتری‌ها را شرح دهد.

۵ــ روش‌های کشت میکروارگانیسم‌ها

۱ــ۵ــ کشت میکروارگانیسم‌های هوازی

برای شمارش میکروارگانیسم‌ها چندین روش وجود دارد که بترتیب توضیح داده می‌شوند.

۱ــ۱ــ ۵ ــ روش کشت پورپلیت یا استاندارد پلیت‌کانت[۱]:

این روش به‌طور وسیعی در موارد مختلف کنترل بهداشتی و صنعتی و استاندارد کردن بکار می‌رود و به اعتقاد متخصصان، دقیق‌ترین روش برای تعیین تعداد باکتری‌های فعال قادر به رشد در محیط کشت بکار رفته می‌باشد (البته روش‌های اتوماتیک و جدیدی با استفاده از تکنیک‌های پیش‌رفته ارائه شده‌اند که ادعا می‌شود از دقت بسیار زیادی برخوردارند ولی هنوز این روش‌ها عمومیت نیافته‌اند). در روش پورپلیت با توجه به رقت‌های مختلف تهیه شده از نمونه‌ی غذایی برای هر رقت ۲

۱ــ Standard plate count (SPC)

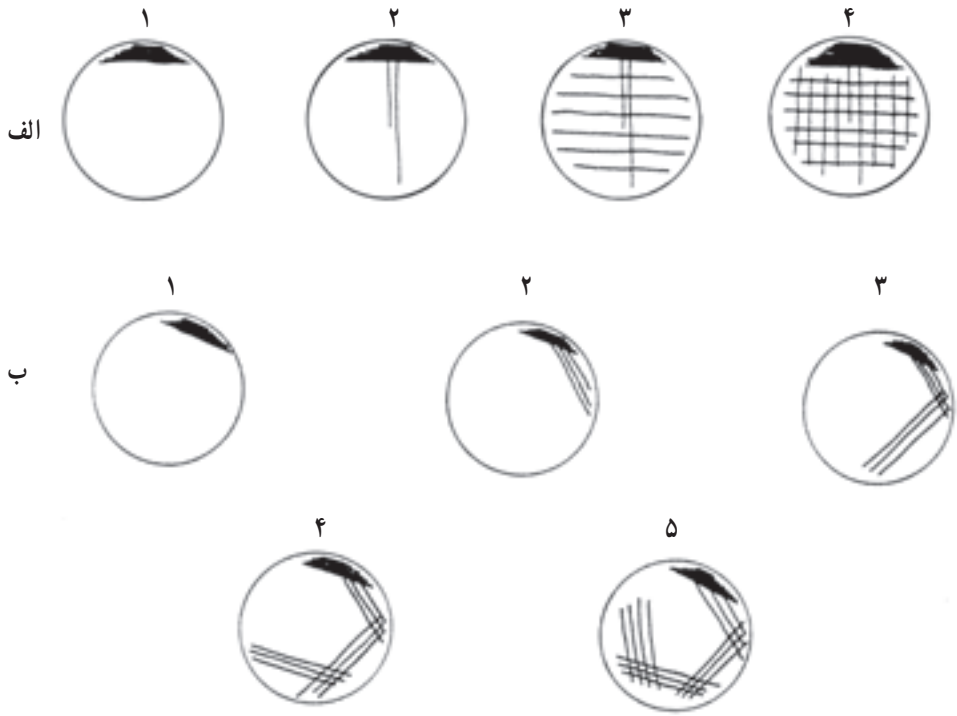
تا ۴ ظرف پتری اختصاص داده می‌شود و یک ظرف نیز به‌عنوان کنترل برای اطمینان از سترون بودن پلیت‌ها و محیط کشت درنظر گرفته می‌شود. روی ظروف پتری را با شماره‌ی نمونه، رقت و تاریخ آزمایش مشخص کرده، در هر دو یا چهار ظرف پتری از رقت مربوط، یک میلی‌لیتر قرار می‌دهند (می‌توان با یک پیپت از رقیق‌ترین لوله شروع کرده، هر بار پس از ریختن نمونه داخل ظرف پتری، پیپت را در رقت دوم خوب شستشو داد و از آن برداشت کرد) به این‌ترتیب با استفاده از یک پیپت، کلیه‌ی رقت‌ها به پلیت منتقل می‌شوند. محیط کشت مناسب ذوب و در حمام ماری ۴۵°C درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود پس از ریختن رقت‌های مختلف ماده غذایی به داخل پلیت، به هر ظرف حدود ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مذاب که دمای آن بیشتر از ۴۵°C نباشد اضافه می‌شود (در مورد باکتری‌های ترموفیل دمای محیط کشت می‌تواند بیشتر باشد) پس از آن بلافاصله در ظرف را بسته، آن را ۵ بار از عقب به جلو، ۵ بار در جهت حرکت عقربه‌های ساعت، ۵ بار از چپ به راست و بالاخره ۵ بار در جهت خلاف حرکت عقربه‌های ساعت به‌آرامی حرکت می‌دهند تا نمونه و محیط کشت بخوبی مخلوط شوند. کمی صبر کنید تا محیط ببندد. بعد، از محیط مایع که همچنان در حمام ماری نگهداری شده مقدار کمی روی هر پلیت می‌ریزند به‌طوری که لایه نازکی از محیط سطح پلیت را بپوشاند. درنتیجه‌ی این عمل از آلوده شدن سطحی جلوگیری می‌شود و همچنین تا اندازه‌ای شرایط بی‌هوازی برای نشان دادن حالات تخمیری برخی از باکتری‌ها ایجاد می‌گردد. پس از بسته شدن لایه دوم، پلیت را به‌طور واژگون در گرمخانه با توجه به درجه دما مناسب رشد باکتری مربوط قرار می‌دهند (باکتری‌های سرماگرا در ۵°C – ۰ و باکتری‌های مزوفیل ۳۷°C – ۲۵ و باکتری‌های گرمادوست در ۵۵°C) دمای انتخابی با توجه به هدفی که از شمارش باکتری مورد نظر است انتخاب می‌شود. در مورد غذاهایی که در حالت انجماد نگهداری می‌شوند دمای (۵ ــ ۰) و ۳۵°C هر دو را انتخاب می‌کنند تا ضمن شمارش باکتری‌های سرمادوست، میکروب‌های بیماری‌زا نیز مشخص گردند. ولی چنانچه هدف شمارش آلوده‌کننده‌های گرمادوست باشد که در کارخانه‌ها از راه پمپ‌ها و دستگاه‌ها وارد مواد غذایی می‌شوند باید دمای ۵۵ را انتخاب کرد. به هرحال انتخاب دما به دلیل اهمیتی که دارد باید درنتیجه آزمایش قید گردد. کشت‌ها را مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه نگهداری می‌کنند و پس از این مدت به کمک دستگاه پرگنه شمار، پرگنه‌های ظاهر شده در پلیت را که بین ۳۰۰ ــ ۰ پرگنه دارند می‌شمارند. ۲۴ ساعت دیگر ظروف را در گرمخانه قرار داده، پس از این مدت یک‌بار دیگر نیز تعداد پرگنه‌ها را می‌شمارند. میانگین تعداد پرگنه‌های شمارش شده در دو یا چهار پلیت با در نظر گرفتن رقت آن تعداد میکروارگانیسم‌های موجود در ماده‌ی غذایی را تعیین می‌کند. در ظرفی که به‌عنوان

کنترل سترون بودن درنظر گرفته شده نباید هیچ پرگنه ظاهر گردد. مدت گرمخانه‌گذاری در مورد باکتری‌های گرمادوست[1] و میان‌دمادوست[2] ۲۴ تا ۴۸ ساعت و در مورد سرمادوست‌ها[3] بیشتر می‌باشد ولی برای قارچها و مخمرها ممکن است یک هفته یا بیشتر ادامه یابد.

۲ــ۱ــ ۵ ــ روش کشت سطحی: در این روش باید ظروف پتری حاوی محیط کشت تهیه شده باشند و سطح محیط با قراردادن آن‌ها در گرمخانه ۵۵°C – ۵۰ به مدت نیم تا دو ساعت خشک شود. در این مدت باید در پلیت باز و سطح محیط رو به پایین باشد و یا می‌توان محیط‌های کشت را با در بسته به‌مدت ۴ ساعت در گرمخانه ۳۷°C قرار داد تا خشک شوند. سپس با توجه به رقت‌های تهیه شده، برای هر رقت ۲ تا ۴ پلیت انتخاب نمود و یک ظرف به عنوان کنترل منفی در نظر گرفت. روی هر ظرف پتری را با شماره‌ی نمونه رقت و تاریخ کشت مشخص می‌کنند و پس از تهیه رقت‌ها، از رقیق‌ترین آن‌ها به کمک پیپت ۰/۱ میلی‌لیتری برداشت کرده، در سطح محیط می‌ریزند و بعد همان پیپت را در رقت بعدی که ۱۰ برابر بیشتر است سه بار شسته و ۰/۱ از آن را برداشته، در پلیت مربوط می‌ریزند. به همین ترتیب ادامه داده می‌شود تا آخرین رقت، سپس برای هر رقت از یک پخش‌کننده‌ی شیشه‌ای سترون استفاده کرده، نمونه را بخوبی در سطح پلیت می‌گسترانند. (برای تهیه پخش‌کننده، یک میله شیشه‌ای را به کمک شعله تحت زاویه ۹۰ درجه خم کرده، سترون می‌کنند). نحوه حرکت میله شیشه‌ای یا آنس پلاتین روی سطح محیط کشت باید به‌گونه‌ای باشد که از زخمی کردن سطح محیط کشت جلوگیری کند. انجام این کار با استفاده از میله شیشه‌ای سترون آسان‌تر می‌باشد. سپس پلیت را مانند روش قبل با توجه به انتخاب و زمان گرمخانه‌گذاری، مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۵±۱°C قرار داده، پس از ۲۴ ساعت ظروفی را که بین ۳۰۰ ــ ۰ پرگنه دارند می‌شمارند. دوباره ظروف را برای ۲۴ ساعت دیگر گرمخانه‌گذاری کرده، پس از آن پرگنه‌ها را شمارش می‌کنند و میانگین شمارش را بدست می‌آورند تعداد باکتری‌ها در یک گرم از ماده‌ی غذایی با توجه به میانگین پرگنه‌ها و رقت بکار رفته محاسبه می‌شود.

۳ــ۱ــ ۵ ــ روش کشت قطره‌ای: در این روش از پیپت‌های پاستور کالیبره که حجم قطرات آن‌ها مشخص می‌باشد استفاده می‌شود (پیپت‌هایی که ۲۰، ۲۵ یا ۴۰ قطره آن‌ها یک میلی‌لیتر است) ظروف پتری حاوی محیط کشت به‌همان ترتیب روش شمارش سطحی تهیه و سطح آن‌ها خشک می‌شود. سپس با ماژیک یا مداد روغنی ظروف پتری را در قسمتی که حاوی کشت می‌باشد به سه قسمت مساوی تقسیم می‌کنند. پس از قید شماره، هر یک از سه بخش را به یک رقت

۱ــ Termophylic ۲ــ Mesophylic ۳ــ Psychrophylic



شکل ۱ــ ۵ ــ حرکت آنس روی سطح پلیت با دو روش

اختصاص می‌دهند. (رقت $۱۰^{-۱}$، $۱۰^{-۲}$ و $۱۰^{-۳}$ که نماینده‌ی رقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ می‌باشد) بدین‌ترتیب برای هر رقت دو تا چهار ظرف درنظر گرفته می‌شود. بعد به کمک یک پیپت پاستور کالیبره که سر آن به یک حباب لاستیکی مجهز است از رقیق‌ترین لوله مقداری برداشت کرده، در سطح پلیت در همان بخشی که با علامت رقت مربوط مشخص شده، دو قطره جدا از هم قرار می‌دهند. سپس بقیه را در لوله خودش خالی کرده، در لوله بعدی که حاوی نمونه‌ی ۱۰ برابر غلیظ‌تر است سه بار پیپت را شسته، از آن برداشت می‌کنند و به همان ترتیب قبل دو قطره در بخش مربوط محیط کشت قرار می‌دهند. و به همین ترتیب تا کم‌ترین رقت ($۱۰^{-۱}$) عمل می‌شود. پلیت را درحالی که درشان بسته است به همان وضعیت در گرمخانه قرار می‌دهند تا قطره‌های موجود در سطح محیط کشت خشک شوند. بعد آن‌ها را به‌طور واژگون (به منظور جلوگیری از تداخل قطرات در یکدیگر) مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه در حرارت مناسب با نوع آزمایش قرار می‌دهند. پس از این مدت پلیت را که حاوی حداکثر ۲۰ پرگنه در هر قطره می‌باشد شمارش می‌کنند. پلیت‌ها دوباره به مدت ۲۴

ساعت گرمخانه‌گذاری و پس از آن شمارش نمایند. این روش از نظر صرفه‌جویی در محیط کشت مناسب است و برای شمارش استافیلوکوک و باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری مانند کلستریدیوم پرفرنژانس که مشخصات پرگنه در سطح محیط کشت در شمارش اهمیت دارد بکار می‌رود. می‌توان از محیط‌های اختصاصی مانند محیط بردپارکر برای استافیلوکوک و یا محیط ژلوزخون‌دار که سطح آن با نئومایسین آغشته شده برای کلستریدیوم پرفرنژانس استفاده نمود.

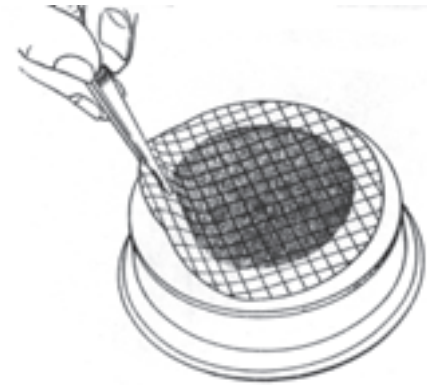
۴ــ۱ــ ۵ ــ روش اتوماتیک: برخی کارخانجات محیط‌های کشت آماده را، در ظروف مخصوص تهیه کرده‌اند که با فرو بردن آن‌ها در رقت معینی از نمونه و سپس قرار دادن در گرمخانه می‌توان با شمارش پرگنه‌های ظاهر شده، تعداد باکتری‌ها و حتی بعضی از انواع آن‌ها را تشخیص داد. همچنین دستگاه‌های خودکاری ساخته شده که از نمونه‌ی ماده غذایی رقت‌های مختلف (یک یا چند رقت) تهیه می‌کند و به وسیله‌ی سوزن مخصوص رقت تهیه شده را در سطح پلیت با روندِ گفته شده می‌گستراند که پس از گرمخانه‌گذاری با استفاده از جداول خاص و یا حتی با استفاده از دستگاه‌های مجهز به چشم الکترونیکی تعداد باکتری‌ها در نمونه بدست می‌آید. از دستگاه‌های مشابه کولتر کانتر[۱] که در پزشکی برای شمارش گلبول‌های خون بکار می‌رود برای شمارش باکتری‌ها در مواد غذایی مانند شیر استفاده می‌شود.

۵ــ۱ــ ۵ ــ کشت باکتری‌ها به کمک کاغذ صافی: کاغذهای صافی مخصوص میکروب‌شناسی در صنعت ساخته شده است 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 حرارت استفاده می‌شود. بعضی از کارخانه‌های[۲] سازنده وسایل آزمایشگاهی از این نوع کاغذها با قیف‌های مخصوص که در برابر حرارت مقاوم‌اند و قابل سترون شدن می‌باشند برای شمارش و جست‌وجوی باکتری‌ها در آب و فرآورده‌های دارویی ساخته‌اند و حتی بعضی از سازندگان پلیت مخصوص که قطر آن‌ها متناسب با کاغذهای صافی است و محیط‌های کشت آماده در آمپول‌های کوچک برای یک‌بار کشت و حتی گرمخانه‌های کوچک که با برق اتومبیل و یا با باتری کار می‌کنند برای عملیات صحرایی تهیه و عرضه کرده‌اند. از این صافی‌ها برای جستجو و شمارش میکروب‌ها در آب معدنی و دیگر آشامیدنی‌هایی که تعداد باکتری‌های آن‌ها کم است و لازم می‌باشد که حجم زیادی از نمونه برای شمارش و جستجوی باکتری بکار رود استفاده می‌شود ؛ به این ترتیب که مقدار کافی نمونه

۱ــ Coulter Counter

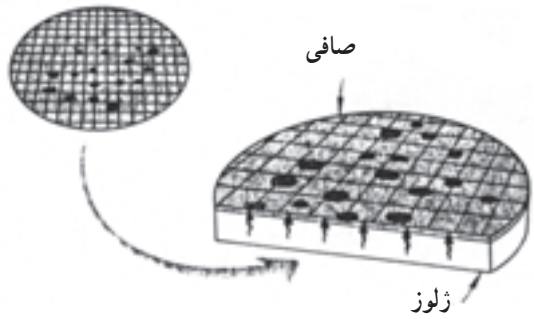
۲ــ کارخانه میلی‌پور آمریکا و سوتر آلمان

از صافی عبور داده می‌شود تا کلیه باکتری‌های موجود در آن حجم در منافذ کاغذ به دام بیفتند سپس کاغذ صافی روی محیط کشت جامد قرار داده می‌شود و در صورت لزوم ممکن است روی آن نیز با یک لایه‌ی نازک از محیط کشت مذاب که حرارت آن کمتر از $45^{\circ}C$ است پوشانده شود. سپس این ظرف گرمخانه‌گذاری شده پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تعداد پرگنه‌های مورد نظر شمارش می‌شود. اگر منظور فقط جستجوی یک نوع میکروب، مانند سالمونلا، در یک آشامیدنی مانند آب باشد می‌توان حجم مناسبی از نمونه را از کاغذ صافی گذرانید سپس کاغذ صافی را در محیط کشت مایع قرار داد و پس از گرمخانه‌گذاری از آن محیط برای جستجو و تشخیص میکروب مورد نظر استفاده نمود. از این روش در کارخانه‌های داروسازی برای کنترل سترونی محلول‌های دارویی مانند محلولهای تزریقی استفاده می‌شود. همچنین این روش، در بهداشت محیط و کنترل آب و فاضلاب و بررسی‌های همه‌گیری شناسی بسیار ارزشمند می‌باشد.



۱ــ برداشتن صافی از روی دستگاه صاف‌کننده

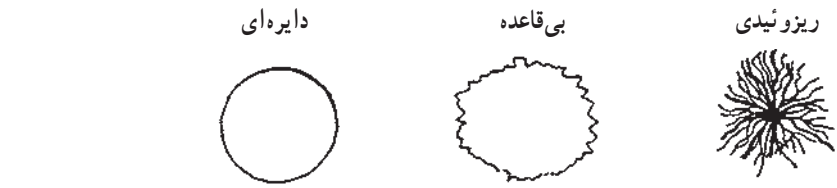
۲ــ گذاشتن صافی روی تشتک ژلوزدار



۳ــ انتشار مایع به‌طرف صافی

شکل ۲ــ۵ــ نمایش شمارش میکرو ارگانیسم‌ها به کمک صافی

۱. شکل



۲. سطح

۳. لبه، کناره

شکل ۳ــ ۵ ــ شکل کلنی‌ها روی محیط جامد

۲ــ ۵ ــ روش‌های تأمین شرایط بی‌هوازی

۱ــ استفاده از گرمخانه بی‌هوازی که در آن دمای مناسب رشد و شرایط بی‌هوازی هم زمان تأمین می‌شود این گرمخانه‌ها اکسیژن داخل محفظه را با پمپ خلأ خارج کرده و به جای آن گاز کربنیک یا ازت وارد می‌کنند.

۲ــ جار بی‌هوازی دو نوع شیشه‌ای و پلاستیکی دارد که نوع پلاستیکی بهتر است زیرا سبک بوده و نمی‌شکند.

برای ایجاد شرایط بی‌هوازی در این جار از بسته‌های تولید کننده‌گاز[۱] استفاده می‌شود که در بیشتر موارد تولید گاز هیدروژن می‌نماید که این گاز با اکسیژن داخل جار در حضور کاتالیزور پالادیوم ترکیب شده و تولید چند قطره آب می‌نماید.

برای تأیید شرایط بی‌هوازی درون جار از معرف استفاده می‌شود.

۳ــ استفاده از محیط‌های کشت احیاء کننده : در فرمول برخی از محیط‌های کشت مانند

۱ــ Gaspak

تیوگلیکولات براث ترکیباتی احیاکننده مانند سیستیئن و تیوگلیکولات وجود دارند که با اکسیژن محلول در آن واکنش داده و آن را از دسترس میکروب‌ها خارج می‌کنند.

مصرف بی‌هوازی شدن این نوع محیط‌های کشت متیلن‌بلو یا رزازورین[1] می‌باشد.

۴ــ استفاده از دسیکاتور و شمع : در مواردی که به روش‌های یاد شده دسترسی نباشد می‌توان از یک دسیکاتور و شمع یا گازپک برای ایجاد شرایط بی‌هوازی استفاده نمود. برای این منظور لازم است پلیت‌ها و لوله‌های کشت شده را داخل جار قرار داده روی آن یک شمع روشن قرار داده درب دسیکاتور را می‌بندیم. شمع در حال سوختن به تدریج بخش زیادی از اکسیژن داخل محیط را مصرف می‌کند چنانچه لازم باشد شرایط بی‌هوازی مطلق ایجاد شود لازم است از گاز پک استفاده شود.

شکل ۴ــ۵ــ جار بی‌هوازی

۱ــ Resozurin

۳ــ۵ــ روش کشت بی‌هوازی

۱ــ لوله‌های حاوی تیوگلیکولات جوشانده و سردکرده را با میکروب بی‌هوازی تلقیح کنید.

۲ــ تمام کشت‌ها را در گرمخانه $37^{\circ}C$ بگذارید. در وقت بعدی آزمایشگاه آن‌ها را ملاحظه کنید. از روش گلوکز شیک برای بررسی کلنی‌های تولید شده استفاده کرده، محل تشکیل آن‌ها را در لوله یادداشت کنید. آیا هیچ گونه نشانی از تولید گاز وجود دارد؟

شکل ۵ــ۵ــ رابطه بین تراکم اکسیژن و رشد میکروب‌ها در محیط جامد

فکر کنید و پاسخ دهید:

۱ ــ چرا اکسیژن محلول در آبگوشت تیوگلیکولات‌دار باعث وقفه در رشد میکروب‌های بی‌هوازی می‌شود؟

۲ ــ آیا دو نوع از کلستریدیوم‌های مختلف، در یک محیط یکسان، به یک شکل رشد می‌کنند؟

۳ــ چه ماده‌ای را اکسیدکننده‌ی قوی و چه ماده‌ای را احیاکننده قوی می‌نامند؟

۴ــ شرایط رشد باکتری‌های بی‌هوازی از نظر نیروی اکسیدوردوکسیون محیط چگونه است؟

۴ــ ۵ ــ روش شمارش مستقیم

از این روش به‌دلیل سرعت زیاد می‌توان در موارد فوری مانند تحویل گرفتن شیر در کارخانه‌ها استفاده نمود. البته دقت این روش به مراتب از روش‌های قبلی کمتر است.

الف) در روش شمارش مستقیم می‌توان از لام‌های مخصوص نئوبار[1] و یا لام توما[2] که برای شمارش گلبول‌های خون بکار می‌رود استفاده نمود. بدین‌ترتیب که نمونه مورد آزمایش به نسبت‌های

۱ــ Neubar ۲ــ Thoma

معین با آب مقطر و یا سرم فیزیولوژی و یا هر رقیق کننده‌ی مناسب دیگر، رقیق می‌شود (برای واضح‌تر دیدن میکروارگانیسم‌ها به مایع رقیق‌کننده مواد رنگی نظیر متیلن بلو و یا ویوله ژانسین و یا رنگ دیگری افزوده می‌شود) بعد از رقت تهیه شده روی لام توماریخته، یک لامل روی آن قرار می‌دهند. چند دقیقه صبر کرده، سپس در زیر میکروسکوپ با عدسی بزرگ‌نمایی ۴۰ میکروارگانیسم‌ها را در حجم معینی (۰/۱ میلی‌متر مکعب یا بیش‌تر) شمارش می‌کنند و با توجه به رقت نمونه ــ تعداد میکروارگانیسم‌ها در هر گرم و یا سانتی‌مترمکعب ــ بدست می‌آید.

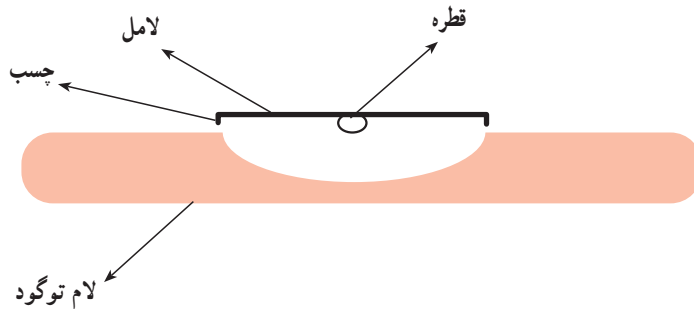
ب) سوسپانسیونی از مخمر که در زیر میکروسکوپ به وضوح قابل تشخیص‌اند و در محلول‌ها به‌خوبی به حالت تعلیق درمی‌آیند تهیه می‌شود و به روش فوق تعداد مخمرهای آن در میلی‌لیتر تعیین می‌گردد. سپس از این تعلیق با حجم مساوی به رقت‌های تهیه شده از نمونه غذایی می‌افزایند بنابراین در محلول به دست آمده تعداد مخمر یا دیاتمه به $\frac{۱}{۲}$ تقلیل می‌یابد. حال اگر یک قطره از این محلول را در زیر میکروسکوپ قرار داده، در یک یا چند میدان تعداد مخمرها را بشمارند و تعداد میکروب‌ها را به‌دست آورند تعداد باکتری‌ها در ماده‌ی غذایی به‌دست می‌آید.

۵ــ ۵ ــ آزمون حرکت در باکتری

جهت آزمایش حرکت در باکتری‌ها بهتر است از کشت روی محیط نوترین برات یا آگار خوابیده در لوله به مدت ۱۸ ساعت استفاده شود.

برای این منظور لازم است از یک لام آزمایشگاهی مقعر یا توگود[۱] استفاده شود، نحوه انجام آزمون به این ترتیب است که یک قطره کوچک از رقت مناسب محتوی باکتری مورد آزمون را وسط یک لامل قرار داده و در چهار گوشه آن مقدار کمی وازلین گذاشته و آن را روی لام توگود قرار می‌دهیم به این ترتیب که قطره درست در وسط گودی لام قرار گیرد بعد مجموعه را زیر میکروسکوپ گذاشته یک قطره روغن سدر پشت لامل که زیر آن قطره قرار گرفته ریخته و با درشت‌نمایی ۱۰۰

۱ــ Cavity slide



مشاهده می‌کنیم در این آزمون باید از گرم شدن قطره جلوگیری شود تا حرکت ذرات محتوی مایع با حرکت باکتری اشتباه نشود.

خودآزمایی

۱ــ روش مناسب برای شمارش میکروارگانیسم‌ها کدام است؟ توضیح دهید.

۲ــ چگونه می‌توان با یک پیپت از کلیه‌ی رقت‌ها، نمونه را به ظروف کشت منتقل کرد؟

۳ــ در روش شمارش استاندارد، درجه حرارت گرمخانه چگونه انتخاب می‌شود؟

۴ــ مدت گرمخانه‌گذاری برای باکتری‌ها و قارچ‌ها، پس از کشت، چگونه است؟ (در روش استاندارد)

۵ ــ تفاوت روش شمارش سطحی و استاندارد را بیان کنید.

۶ ــ مزایای روش شمارش قطره‌ای میکروارگانیسم‌ها چیست؟

۷ــ روش شمارش باکتری‌ها با کاغذ صافی چه مزایایی دارد و بیشتر در چه مواردی به‌کار می‌رود؟

۸ ــ روش مستقیم شمارش میکروارگانیسم‌ها را در مورد باکتری‌ها و مخمرها شرح دهید.

۹ــ کلیه‌ی روش‌های شمارش میکروارگانیسم‌ها را نام ببرید.

۱۰ــ چگونه می‌توان با جوشاندن محیط کشت اکسیژن آن را خارج نمود؟

۱۱ــ آیا می‌توانید به کمک یک شمع محیط بسته‌ای را فاقد اکسیژن نمایید؟ چگونه؟

۱۲ــ مراحل کشت بی‌هوازی باکتری‌ها را شرح دهید.

فصل ششم

رنگ‌آمیزی میکرو ارگانیسم‌ها

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

۱ــ گسترشی تهیه و آن را رنگ‌آمیزی نماید و باکتری‌ها را زیر میکروسکوپ مورد مشاهده قرار دهد.

۲ــ تئوری رنگ‌آمیزی و اهمیت آن را بیان نماید.

۳ــ یک نوع رنگ‌آمیزی ساده را انجام دهد.

۴ــ یک نوع رنگ‌آمیزی تشخیصی انجام دهد.

۶ــ رنگ‌آمیزی میکرو ارگانیسم‌ها

۱ــ۶ــ اهمیت رنگ‌آمیزی باکتری‌ها

مورفولوژی باکتری‌ها را به دوطریق می‌توان مورد بررسی قرار داد :

۱ ــ به وسیله‌ی مشاهده‌ی موجودات زنده و بدون رنگ‌آمیزی.

۲ ــ به وسیله‌ی مشاهده‌ی سلول‌های مرده و رنگ شده با مواد رنگی.

باکتری‌های زنده بی‌رنگ‌اند، و تضاد کافی با آبی که در آن معلق هستند ندارند و در نتیجه خوب دیده نمی‌شوند. رنگ‌آمیزی موجودات باعث می‌شود که بین آن‌ها و محیط اطرافشان تضاد رنگی حاصل شود و بدین طریق بهتر دیده بشوند. همینطور بعضی از رنگ‌هایی که بکار می‌روند، می‌توانند ساختمان‌های داخلی سلول را که به‌طور طبیعی غیرقابل رؤیت هستند، مشخص کنند. اگر چه باکتری‌ها با محیط اطرافشان اختلاف زیادی نشان نمی‌دهند، ولی از نظر شیمیایی از محیط خود متفاوت هستند. این اختلاف شیمیایی ما را در تشخیص باکتری‌ها به وسیله‌ی رنگ‌آمیزی توانا می‌سازد، زیرا رنگ یا ماده به‌طور معمول با سلول باکتری واکنش ایجاد می‌کند، در حالی که روی زمینه لام اثری

ندارد. بنابراین، مزایای اصلی رنگ‌آمیزی عبارت است از ۱ــ ایجاد تضاد بین میکروارگانیسم‌ها و زمینه‌ی آن‌ها، که در نتیجه باعث تمایز اشکال مختلف می‌شود. ۲ــ امکان بررسی ساختمان‌های داخلی سلول باکتری‌ها، مثل دیواره‌ی سلولی، واکوئول[۱]، یا ضمائم هسته[۲] را فراهم می‌نماید. ۳ــ به باکتری‌شناس امکان می‌دهد که از درشت‌نمایی بیشتر استفاده کند.

۲ــ۶ــ تئوری رنگ‌آمیزی

برای درک این‌که یک ماده رنگی سلول باکتری‌ها را رنگ می‌کند، ابتدا باید بدانید که یک ماده‌ی رنگی چیست. مواد رنگی اغلب املاحی هستند که یکی از یون‌های آن‌ها رنگی است یک ملح یا نمک ترکیبی است که از یک یون با بار الکتریکی مثبت و یک یون با بار الکتریکی منفی تشکیل شده است ماده رنگی ساده متیلن‌بلو در حقیقت ملح کلرورمتیلن‌بلو می‌باشد که تجزیه آن به شرح ذیل است

$$\text{کلرور}^- + \text{متیلن بلو}^+ \rightarrow \text{کلرورمتیلن‌بلو}$$

قسمت رنگی این ماده در یون مثبت متیلن‌بلو قرار دارد. سلول باکتری‌ها هنگامی که در محیطی قرار بگیرد که دارای pH حدود خنثی باشد ــ که به طور معمول چنین است ــ، دارای بار الکتریکی منفی مختصری خواهند بود. سلول باکتری با بار الکتریکی منفی با یون متیلن‌بلو با بار الکتریکی مثبت ترکیب شده و در نتیجه سلول رنگ می‌شود. در حقیقت تفاوت بار الکتریکی است که باعث گرایش بین ماده رنگی و سلول باکتری می‌شود.

۳ــ۶ــ روش‌های رنگ‌آمیزی

امروزه تعداد زیادی مواد رنگی در اختیار باکتری‌شناسان است که به اشکال متفاوت در روش‌های رنگ‌آمیزی اصلی به‌کار می‌روند.

الف) رنگ‌آمیزی‌های ساده: شامل رنگ‌آمیزی با مواد رنگی قلیایی، مواد رنگی اسیدی و موادرنگی خنثی می‌باشد

۱ــ رنگ‌های اسیدی: رنگ‌هایی هستند که قسمت رنگی آن‌ها (کروموفور) دارای بار منفی می‌باشد و با قسمت‌هایی از سلول که بار مثبت دارند مثل پروتئین‌ها ترکیب می‌شوند مثل اسید پیکریک و نیگروزین و فوشین اسیدی

۲ــ رنگ‌های قلیایی: قسمت رنگی (کروموفور) این گروه دارای بار مثبت می‌باشد و با

۱ــ Vacuole ۲ــ Nuclearbodies

قسمت‌هایی از سلول که بار منفی دارند مثل اسیدهای نوکلئیک ترکیب می‌شوند از این گروه می‌توان به کریستال ویوله (بنفش)، متیلن بلو سافرانین و فوشین بازی اشاره کرد.

۳ــ رنگ‌های خنثی: رنگ‌هایی هستند که قسمت رنگی آن‌ها فاقد بار الکتریکی می‌باشد و با قسمت‌های بدون بار الکتریکی سلول مثل چربیها، ترکیب می‌شوند مثل سودان سیاه

ب) رنگ‌آمیزی‌های تشخیصی[۱]: شامل رنگ‌آمیزی گرم[۲] و رنگ‌آمیزی اسید فست[۳]

ــ طرز تهیّه و تثبیت باکتری‌ها برای رنگ‌آمیزی

پیش از رنگ‌آمیزی باید باکتری‌هایی را که می‌خواهید مورد بررسی قرار دهید تثبیت کنید، یعنی آن‌ها را به لام شیشه‌ای که باید رنگ شود بچسبانید. اگر یک نمونه تثبیت نشده باشد لایه‌ی سلولی در حین عملیات مربوط به رنگ‌آمیزی شسته شده، از بین خواهد رفت. روشی که در این آزمایش ذکر می‌شود، خیلی معمول است و به عنوان کار اولیه در بیشتر روش‌های رنگ‌آمیزی باکتری‌ها بکار می‌رود. در این آزمایش، از حرارت برای کشتن و چسباندن سلول‌ها به لام استفاده می‌شود.

۱ــ با یک سوزن کشت حلقه‌ای، یک قطره کوچک از هرکدام از کشت‌های موردنظر را برداشته و روی لام‌های جداگانه تمیز قرار دهید لازم است لام‌ها تمیز باشد. روشی که برای تمیز کردن پیشنهاد می‌شود عبارتست از الف) یک قطره گزیلول (xylol) روی سطح لام قرار دهید. ب) به کمک کاغذ مخصوص عدسی یا پارچه آن را پاک کنید. ج) لام تمیز شده را از میان شعله چراغ عبور داده و بگذارید تا سرد شود. یا اگر نمونه از روی محیط جامد برداشته می‌شود، یک قطره کوچک آب روی لام گذاشته، آن را با یک تکه کوچک از کشت باکتری به‌طور کامل مخلوط کنید.

۲ــ قطره روی لام را گسترده و پخش کنید تا یک لایه‌ی نازک و یکنواخت تشکیل شود. توجه داشته باشید که اگر گستره کلفت باشد شمارش را دچار اشکال می‌کند.

۳ــ مقداری بزاق را در یک لوله آزمایش استریل جمع‌آوری کنید. به کمک یک حلقه استریل یک حلقه از آن را روی لام تمیز قرار داده، آن را گسترده کنید، تا یک لایه نازک را تشکیل بدهد.

۴ــ لام‌ها را در هوا و یا با نگهداشتن در قسمت بالای شعله گاز خشک کنید.

۵ــ هنگامی که لایه‌های میکروبی خشک شد، لام را سه بار از درون شعله گاز عبور دهید. به‌طوری که قسمت لایه‌ی میکروبی به طرف بالا باشد. توجه کنید که گرمای زیاد باعث تغییر شکل ساختمان طبیعی میکروارگانیسم‌های رنگ شده خواهد شد. اگر لام گرم شده را پشت دست قرار دهیم، باید گرمای آن حس شود ولی داغ و سوزنده نباشد. منظور از تثبیت عبارتست از کشتن میکروارگانیسم‌ها،

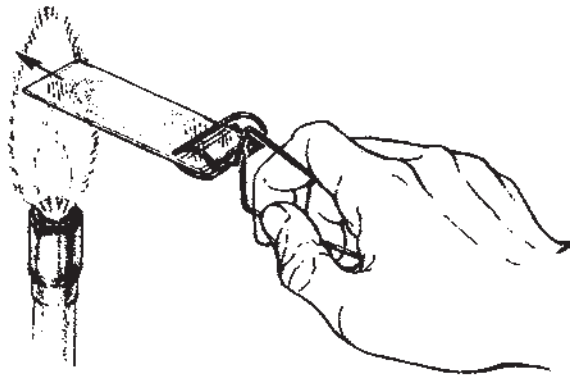
۱ــ Differential ۲ــ Gram stain ۳ــ Acid fast stain

۱ــ یک قطره آب استریل بر روی لامل تمیز شده قرار دهید.

۲ــ یک قطره از کشت میکروبی را به آن اضافه کنید.

۳ــ قطره را با ضخامت کم در سطح لام پخش کنید.

۴ــ آن را در هوا خشک کنید.



۵ ــ آن را با سه بار گذراندن از روی شعله تثبیت کنید.

شکل ۱ــ۶ــ تهیه گستره و تثبیت میکروارگانیسم ها برای رنگ آمیزی

انعقاد پروتوپلاسم سلول‌ها، و همینطور که گفته شد، چسباندن آن‌ها به لام. یک عامل تثبیت کننده مناسب، ساختمان‌های سلول را به همان شکل و موقعیت ویژه خود بدون اینکه ایجاد تغییرات (ساختمان‌هایی که در سلول زنده وجود ندارد) بکند حفظ می‌نماید. به‌طور معمول برای تثبیت از روش گرم کردن ملایم استفاده می‌شود، ولی از عوامل الکل و مواد شیمیایی دیگر هم می‌توان استفاده کرد.

۱ــ۳ــ۶ــ رنگ‌آمیزی‌های ساده

الف) رنگ‌آمیزی با رنگ‌های قلیایی: رنگ‌آمیزی با رنگ‌های قلیایی متیلن‌بلو، کریستال ویوله[1] و کربول‌فوشین[2] حدود ۳۰ تا ۶۰ ثانیه وقت لازم دارد. کریستال ویوله دارای قدرت واکنش بیشتر است و به‌طور معمول برای رنگ کردن احتیاج به حدود ۱۰ ثانیه وقت دارد. کربول فوشین که مخلوطی از فوشین وفنل است رنگ قویتری می‌باشد و به‌طور معمول ۵ ثانیه وقت لازم دارد. قدرت واکنش کربول فوشین آنقدر بالاست که ممکن است به دلیل زیاد رنگ کردن مشکلاتی ایجاد کند، به‌ویژه در نمونه‌هایی که حاوی مقدار زیادی مواد و عناصر آلی باشند.

ب) مراحل رنگ‌آمیزی:

۱ــ لام‌هایی را که در قسمت اول آزمایش تثبیت کردید روی صفحه سیمی مخصوص رنگ‌آمیزی که روی ظرف مخصوص مایعات زائد است قرار دهید.

۲ــ هریک از لایه‌های میکروبی تثبیت شده را با تقریباً ۵ قطره از یکی از رنگ‌ها آغشته کرده، بگذارید تا با گذشت زمان رنگ‌آمیزی انجام شود، در مورد متیلن بلو، ۳۰ ثانیه، کریستال‌ویوله، ۱۰ ثانیه، و کربول فوشین ۵ ثانیه.

۳ــ نمونه‌های رنگ شده را با آب فشان شستشو دهید.

۴ــ لام‌ها را بین کاغذ آب‌خشک کن بدون وارد کردن فشار روی لامل یا در هوای بالای شعله خشک کنید.

۵ ــ نمونه‌های رنگ شده را زیر میکروسکوپ گذاشته و با عدسی روغنی ایمرسیون مشاهده کرده، از یک میدان میکروسکوپی خوب، اشکال میکروبی را رسم کنید. اگر گسترش‌های میکروبی کلفت تهیه کرده باشید، در این مرحله مشخص خواهد شد. در لایه‌های میکروبی کلفت توده‌ای از مواد رنگ شده دیده می‌شود که ممکن است در آن تعدادی هم سلول جدا و منفرد وجود داشته باشد.

تفاوت‌های مشخص مربوط به اندازه‌ی سلول‌ها، شکل و ترتیب آن‌ها را به دقت مورد ملاحظه قرار دهید. در بزاق رنگ شده انواع زیاد و گوناگونی سلول دیده می‌شود. چندین نوع باکتری و قارچ،

۱ــ Crystal Violet ۲ــ Carbol fuchsin

سلول‌های اپی‌تلیال[1]، ذرات بزاقی، و گلبول‌های سفید خون، بیشتر بار الکتریکی یک باکتری (یا یک پروتئین) مربوط به اسیدی بودن محیط است اگر اسیدیته کاهش پیدا کند (بالا رفتن pH) بار الکتریکی منفی سلول افزایش یافته، و در نتیجه گرایش آن به رنگ‌های قلیایی قویتر می‌شود. در مورد رنگ‌های اسیدی، عکس این مطلب صادق است. بنابراین رنگ‌های قلیایی در pHهای پایین و رنگ‌های اسیدی در pHهای بالا دارای قدرت رنگ‌آمیزی ضعیفی هستند.

فکر کنید و پاسخ دهید:

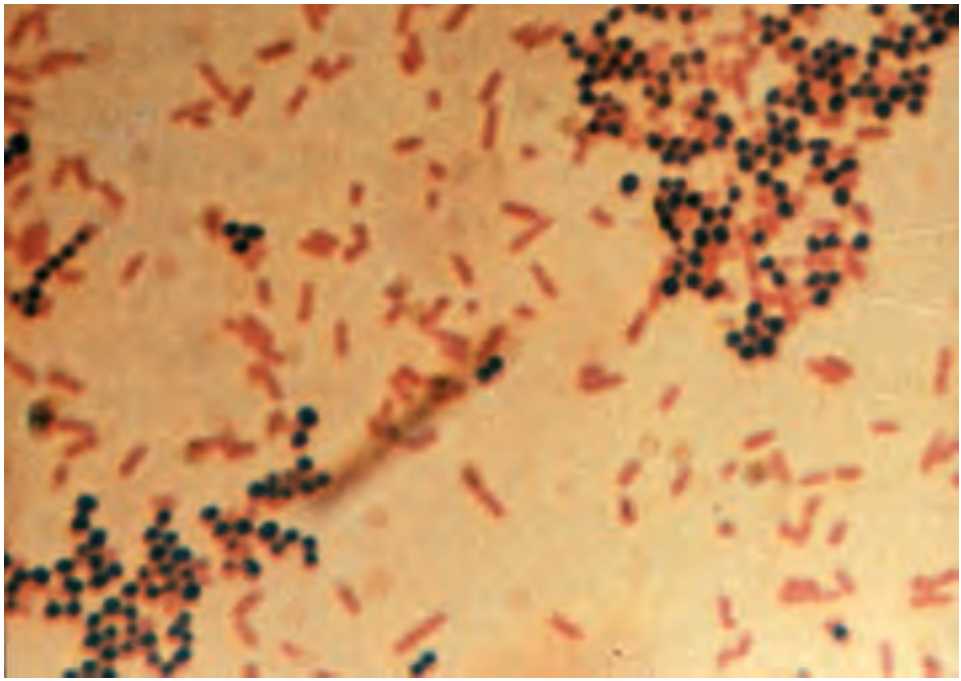
آیا می‌توانید بگویید که تمام باکتری‌های جداشده کشت خالص هستند؟

۲ ــ۳ــ۶ــ روش‌های رنگ‌آمیزی تشخیصی[2] : اساس رنگ‌آمیزی‌های ساده بر این حقیقت بنا شده است که سلول باکتری‌ها از نظر شیمیایی از محیط اطرافشان متفاوت است و بنابراین می‌توانند پس از رنگ‌آمیزی از محیط خود متمایز شوند. خود میکروارگانیسم‌ها هم دارای اختلافات شیمیایی و فیزیکی هستند و بدین‌طریق در مقابل یک روش رنگ‌آمیزی معین واکنش‌های متفاوتی نشان می‌دهند. این اصلی است که براساس آن رنگ‌آمیزی‌های تشخیصی بنا شده است. بنابراین رنگ‌آمیزی تشخیصی روشی است که با آن انواع باکتری‌ها را می‌توانیم مشخص کنیم.

الف) رنگ‌آمیزی گرم[3]: رنگ‌آمیزی گرم که بیشتر از هر روش دیگری در باکتریولوژی به‌کار می‌رود رنگ‌آمیزی تشخیصی است. با به‌کار بردن این روش می‌توان باکتری‌ها را به دو گروه تقسیم کرد : گرم مثبت و گرم منفی.

تصور می‌شود که این تمایز رنگی مربوط به اختلاف لایه‌ی سطحی یا دیواره‌ی سلولی این دو نوع می‌باشد. به‌طور کلی میکرو ارگانیسم‌های گرم مثبت و گرم منفی در مقابل بسیاری از عوامل فیزیکی و شیمیایی واکنش‌های مختلفی نشان می‌دهند. در رنگ‌آمیزی گرم چهار محلول مختلف مورد نیاز است. یک رنگ قلیایی، یک دندانه[4] یک عامل رنگ‌بر[5] و یک رنگ دوم. درباره رنگ قلیایی بحث شده است. دندانه ماده‌ای است که گرایش یا جذب ماده رنگی را به سلول افزایش می‌دهد، یعنی به شکلی، تثبیت رنگ را در روی سلول تسهیل می‌کند. اسیدها، قلیایی‌ها، املاح‌معدنی و ید را می‌توان به عنوان دندانه مثال زد. سلولی که روی آن ریخته شده دندانه بیشتر و بهتر رنگ می‌شود.

۱ــ Epithelial
۲ــ Differential Staining
۳ــ Gram Stain
۴ــ Mordant
۵ــ Decolorizing Agent



شکل ۲ــ۶ــ رنگ‌آمیزی گرم. باکتری‌های گرم مثبت به رنگ بنفش یا ارغوانی و باکتری‌های گرم منفی به رنگ صورتی

همین‌طور بعد از به‌کاربردن دندانه شستن و از بین بردن رنگ دشوارتر است. عامل رنگ‌بر، همان‌طور که از اسمش معلوم است، ماده‌ای است که رنگ را از یک سلول رنگ شده خارج می‌کند. بعضی از سلول‌های رنگ‌شده راحتتر از سلول‌های دیگر بی‌رنگ می‌شوند. در رنگ‌آمیزی گرم و در سایر روش‌های رنگ‌آمیزی تشخیصی از این تفاوت در میزان بی‌رنگ شدن استفاده کرده، انواع مختلف باکتری‌ها را از یکدیگر متمایز می‌کنیم. رنگ دوم، یک ماده رنگی قلیایی است که از نظر رنگ با ماده رنگی اولیه متفاوت است. منظور از به‌کارگیری رنگ دوم عبارتست از رنگ کردن سلول‌های بی‌رنگ شده به وسیله‌ی رنگی که با رنگ اولیه متفاوت است. میکرو ارگانیسم‌هایی که رنگ اولیه خود را از دست نداده‌اند رنگ قلیایی اولیه را نگه می‌دارند و آن‌هایی که رنگ خود را از دست داده‌اند رنگ دوم را جذب می‌کنند. رنگ‌آمیزی گرم در مرحله اول عبارتست از رنگ شدن سلول‌ها با یک رنگ قلیایی. این عمل با مجاور کردن سلول‌های رنگ شده با یک دندانه مثل ید، دنبال می‌شود. سپس سلول‌ها را با یک ماده رنگ‌بر مثل الکل مجاور می‌کنند. سلول‌هایی که بعد از رنگ‌بری، رنگ قلیایی خود را حفظ کنند گرم مثبت خوانده می‌شوند و آن‌هایی که بی‌رنگ شده‌اند گرم منفی هستند که

می‌توانند با رنگ دوم که از رنگ اول متفاوت است دوباره رنگ شوند.

روش کار:

۱ــ گستره مخلوط باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را تهیه کنید. این گستره‌ها را به کمک حرارت تثبیت کنید.

۲ــ گستره‌ها را به مدت ۳۰ ثانیه با کریستال ویوله رنگ کنید.

۳ــ گستره‌ها را با آب فشان بشویید.

۴ــ به گستره‌ی آماده شده ید اضافه کنید، بگذارید تا ۳۰ ثانیه مانده و اثر کند.

۵ــ گستره‌ها را با آب فشان بشویید.

۶ــ گستره‌ها را به وسیله‌ی الکل ۹۵٪ بی‌رنگ کنید. برای بی‌رنگ کردن یک گسترش نازک ۱۰ تا ۲۰ ثانیه کافی است، بعد از گذشت زمان مناسب، قطرات الکلی که از لام خارج می‌شود بی‌رنگ خواهد بود.

۷ ــ گستره‌ها را با آب فشان بشویید.

۸ ــ گستره‌ها را با فوشین یا سافرانین به مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه رنگ کنید.

۹ ــ گستره‌ها را با آب فشان شسته و خشک کنید.

۱۰ ــ روی هر یک از گستره‌ها یک قطره روغن سدر[1] بریزید و آن را با عدسی با بزرگنمایی ۱۰۰ مشاهده کنید.

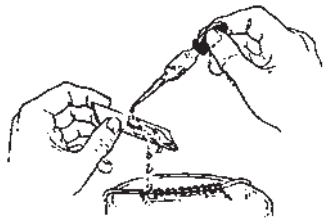
شکل میکروب‌ها را رسم کنید. در هر مرحله از این روش چه اتفاقی حادث می‌شود؟ اگر بعد از هر مرحله، سلول‌های گرم مثبت و گرم منفی را بررسی کنیم، می‌توانیم نتایجی را که در جدول ۱ــ۶ خلاصه شده است ملاحظه کنیم. برای بحث درباره اساس تمایز بین باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، همینطور برای شناختن فرضیاتی که مکانیسم واکنش گرم را تشریح می‌کنند، به یک کتاب درسی یا مقاله‌ای درباره سیتولوژی میکروبی مراجعه کنید.

روش کار:

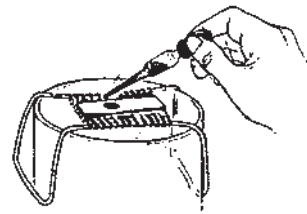
گستره‌ای مخلوط از باکتری‌های گرم مثبت و منفی تهیه کرده، آن را فیکس نموده و برابر شکل رنگ‌آمیزی آن را کامل کنید.

۱ــ Immersion Oil

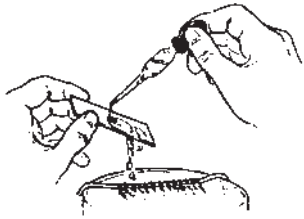
۱ــ گستره را با کریستال ویوله به مدت حدود ۳۰ ثانیه رنگ کنید.



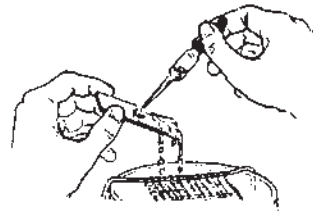
۲ــ آن را با آب بشویید.



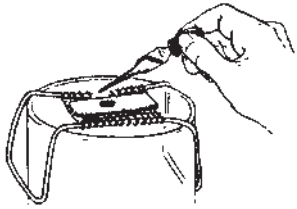
۳ــ گستره را با محلول ید گرم به مدت حدود ۳۰ ثانیه بپوشانید.



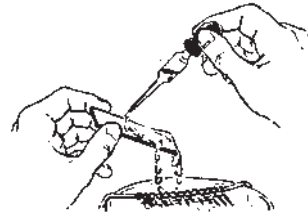
۴ــ آن را با آب بشویید.



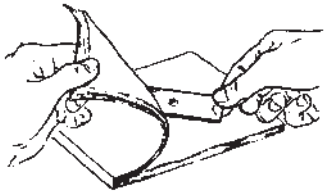
۵ــ گستره را به مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه با الکل ۹۵٪ بی‌رنگ کنید.



۶ــ گستره را با رنگ متفاوت سافرانین به مدت حدود ۲۰ ثانیه رنگ کنید.



۷ــ آن را با آب بشویید.



۸ــ گستره را خشک کنید.

شکل ۳ــ۶ــ مراحل رنگ‌آمیزی گرم

جدول ۱ــ۶ــ مراحل رنگ‌آمیزی گرم

مرحله	روش کار	نتایج حاصل	
		گرم مثبت	گرم منفی
رنگ اولیه	کریستال ویوله به‌مدت ۳۰ ثانیه	به رنگ بنفش ارغوانی	به رنگ بنفش ارغوانی
دندانه رنگ‌بری	ید به‌مدت ۳۰ثانیه الکل اتیلیک ۹۵٪ به‌مدت ۱۰تا۳۰ ثانیه	رنگ بنفش‌ارغوانی باقیمانده رنگ بنفش ارغوانی باقیمانده	رنگ‌بنفش ارغوانی باقیمانده بی‌رنگ می‌شود.
رنگ دوم	سافرانین به مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه	رنگ بنفش ارغوانی باقیمانده	به رنگ سرخ

فکر کنید و پاسخ دهید:

۱ــ آیا می‌توان رنگ اولیه و رنگ دوم را تغییر داد؟

۲ــ اگر ید را با سایر عوامل اکسیدکننده عوض کنید چه تغییراتی حاصل خواهد شد؟

۳ ــ آیا الکل‌های دیگر نیز به خوبی الکل اتیلیک می‌توانند به عنوان عوامل رنگ‌بر به‌کار روند؟

۴ــ اثر pH روی واکنش گرم چیست؟

ب) رنگ‌آمیزی اسید فست[1] : رنگ‌آمیزی اسید فست، رنگ‌آمیزی تشخیصی است که میزان و درجه مقاومت سلول‌های رنگ شده را در برابر رنگ‌بری اسیدها تعیین می‌کند. خاصیت مقاومت در برابر اسیدها در بعضی مایکوباکتریوم‌ها[2] و اکتینومیست‌ها[3] بستگی به مقدار زیادی لیپید دارد که در آن‌ها موجود است. برای رنگ‌آمیزی این باکتری‌ها حرارت و رنگی که دارای گرایش قوی به سلول این باکتری‌ها دارد مورد نیاز است. این باکتری‌ها، بعد از یک‌بار رنگ شدن، به دشواری ممکن است بی‌رنگ شوند. در این روش از کربول فوشین گرم برای رنگ‌آمیزی، و از محلول اسید ــ الکل به‌عنوان عامل بی‌رنگ کننده استفاده و بعد هم رنگ‌آمیزی دوم سلول باکتری‌ها عملی می‌شود. باکتری‌های اسید فست، کندتر از سایر میکروارگانیسم‌ها، در برابر اسید ــ الکل بی‌رنگ شده، بعد از رنگ‌آمیزی دوم، رنگ اولیه

۱ــ Acid fast stain ۲ــ Mycobacterium ۳ــ Actinomycete

خود را حفظ می‌کنند. این رنگ‌آمیزی در درجه اول برای تشخیص و بررسی بیماری‌هایی که به وسیله‌ی میکروب‌های اسید فست، مثل سل و جذام تولید می‌شود، مورد استفاده قرار می‌گیرد. همین‌طور این روش به عنوان یک رنگ‌آمیزی تشخیصی، در مورد تعدادی از میکروبهای ساپروفیت[1] و بی‌آزار اسید فست هم بکار می‌رود.

روش کار:

۱ــ یک گستره میکروبی شامل مخلوطی از کشت‌های مایکوباکتریوم و اشریشیا تهیه کنید.

۲ــ گستره را در هوا خشک کرده، با حرارت تثبیت کنید.

۳ــ در حدود ۱/۵ سانتیمتر آب در یک ظرف کوچک ریخته، آن را بجوش آورید، یک صفحه سیمی روی لبه ظرف قرار داده، لام میکروبی را روی این صفحه بگذارید.

۴ــ گستره را به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه با کربول فوشین رنگ کنید، بدین شکل که ابتدا یک تکه کوچک کاغذ خشک‌کن یا پارچه حوله‌ای روی گستره گذاشته، آن را با ماده‌ی رنگی بپوشانید. توجه کنید که درحین رنگ‌آمیزی، نگذارید گستره خشک شود. از زیاد شدن ماده رنگی روی گستره جلوگیری کنید.

۵ــ نمونه را با آب بشویید.

۶ــ نمونه را با اسیدالکل (الکل اتیلیک ۹۵٪ حاوی اسیدنیتریک ۲/۵٪) به مدت ۱۰ تا ۳۰ ثانیه بی‌رنگ کنید.

۷ــ نمونه را با آب بشویید.

۸ــ رنگ‌آمیزی دوم را با متیلن‌بلو به مدت ۳۰ ثانیه انجام دهید. (بدون حرارت)

۹ــ نمونه را با آب شسته، با کاغذ خشک‌کن بدون وارد کردن فشار خشک کنید.

۱۰ــ نمونه را با عدسی روغنی ایمرسیون ملاحظه کرده، اشکال میکروبی را رسم کنید.

با بکار بردن روش رنگ‌آمیزی اسید فست، خلط یک بیمار مسلول را که در اتوکلاو قرار داده‌اید (به وسیله‌ی بخار و زیر فشار استریل شده است) رنگ‌آمیزی کنید. برای تهیه‌ی گستره میکروبی، خلط را در بین دو لام گذاشته و با فشار، یک لایه‌ی نازک میکروبی ایجاد کنید. بعد از رنگ‌آمیزی، به جستجوی میکروب‌های اسید فست بپردازید دقت کنید که از نظر ظاهر چه اختلافی بین آن‌ها و سایر میکروارگانیسم‌های خلط وجود دارد. میکروارگانیسم‌های اسید فست، با اسیدالکل بی‌رنگ نمی‌شوند و به رنگ قرمز دیده می‌شوند. سایر میکروبها به رنگ آبی خواهند بود.

۱ــ Saprophyte

۳ــ۳ــ۶ــ رنگ‌آمیزی ساختمان‌های سلولی: برای به دست آوردن تضادی که در دیدن ساختمان‌های مختلف سلول باکتری‌ها به وسیله‌ی میکروسکوپ نوری ضروری است، باید روش‌های رنگ‌آمیزی مخصوصی را به کار برد این آزمایش بعضی از رنگ‌آمیزی‌های ساختمانی را نشان می‌دهد.

روش کار:

الف) رنگ‌آمیزی اندوسپور[۱]: انواع جنس باسیلوس[۲] و کلستریدیوم‌ها[۳] در برابر عوامل نامساعد تبدیل به شکل اندوسپور خوانده می‌شود. اندوسپور برخلاف سلول جوان به‌وجودآورنده‌ی آن، دارای جسم بسیار مقاومی است و می‌تواند، به مدتی طولانی، حتی در محیطی که به دلیل درجه حرارت بالا یا مواد شیمیایی سمی نامساعد شده است، زنده بماند. اندوسپور در برابر رنگ‌آمیزی مقاومت نشان می‌دهد و بعد از یک‌بار رنگ شدن هم به سختی رنگ خود را از دست داده، یا رنگ زمینه را می‌پذیرد. از این خاصیت برای نمایش میکروسکوپی اندوسپورها استفاده شده است. در شرایط معمولی اندوسپور باکتری‌ها با میکروسکوپ الکترونی قابل مشاهده است که تصویر آن در شکل ۴ــ۶ نمایش داده شده است. دو روش رنگ‌آمیزی در این‌جا ذکر می‌شود :

۱ــ *روش دورنر*[۴]*:* در روش دورنر، از کربول فوشین گرم برای نفوذ به اندوسپور مقاوم استفاده می‌شود. نیگروزین هم به عنوان عامل بی‌رنگ کننده و هم به عنوان رنگ منفی گستره بکار می‌رود. بعد از رنگ‌آمیزی با این روش، اندوسپورها به رنگ قرمز و قسمت‌های جوان سلول‌ها به‌صورت بی‌رنگ در یک زمینه‌ی تیره دیده می‌شوند. مراحل رنگ‌آمیزی به شرح زیر است :

۱ــ ۵ قطره آب استریل در دو لوله‌ی آزمایش ریخته، در این دو لوله دو سوسپانسیون غلیظ از باسیلوس سرئوس[۵] و کلستریدیوم اسپوروژنس[۶] بسازید.

۲ــ به دو سوسپانسیون میکروبی به مقدار مساوی کربول فوشین بیفزایید.

۳ــ رنگ‌آمیزی را به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش انجام دهید.

۴ــ نمونه‌ها را با عدسی شیئی ایمرسیون مشاهده کرده، شکل آن‌ها را بکشید.

۲ــ *روش شافر و فولتون*[۷]*:* در روش رنگ‌آمیزی شافر و فولتون از رنگ گرم سبزمالاشیت[۸] به‌عنوان رنگ قوی که بعد از شستشو از اندوسپور جدا نمی‌شود و از سافرانین به عنوان رنگ دوم استفاده می‌شود. بنابراین اندوسپور به رنگ سبز درمی‌آید ولی بقیه سلول‌ها (یا سلول بدون اندوسپور) به رنگ قرمز کمرنگ خواهند بود.

۱ــ Endospore ۲ــ Bacillus ۳ــ Clostridium ۴ــ Dorner

۵ــ Bacillus cereus ۶ــ Cl.Sporogenes ۷ــ Schaeffer and fulton ۸ــ Malachite green

شکل ۴ــ۶

ــ روش رنگ‌آمیزی با رنگ سبزمالاشیت:

۱ــ گستره باسیلوس سرئوس یا کلستریدیوم اسپوروژنس را تهیّه کرده، گستره‌ها را در هوا خشک کنید و آن‌ها را با حرارت تثبیت نمایید.

۲ــ لام‌ها را روی پایه‌ی مخصوص رنگ‌آمیزی که روی ظرف آب جوش قرار دارد بگذارید.

۳ــ گستره‌ها را با قطعات کوچک کاغذ خشک‌کن پوشانده، و با سبزمالاشیت آغشته کنید تا به صورت اشباع درآمده (محلول آبی ۵٪) و حرارت دادن را به مدت ۵ دقیقه ادامه دهید.

۴ــ گستره‌ها را بآرامی با آب بشویید.

۵ــ رنگ‌آمیزی را به مدت ۳۰ ثانیه با سافرانین به عنوان رنگ دوم انجام دهید.

۶ــ گستره‌ها را با آب شسته، با خشک‌کن خشک کنید.

۷ــ گستره‌ها را با عدسی شیئی روغنی ایمرسیون مشاهده کرده، شکل آن‌ها را بکشید.

برای دیدن اندوسپور بدون رنگ‌آمیزی می‌توان از میکروسکوپ فازکنتراست استفاده کرد که در

شکل ۶ــ۶

شکل ۵ــ۶ــ بخار دادن به لام در حین رنگ‌آمیزی اسپور باکتری‌ها

این مورد اندوسپور به صورت یک ساختمان سفید کلفت در داخل سلول دیده می‌شود. اگر میکروسکوپ فاز کنتراست در دسترس باشد، اندوسپورهای کشت باسیلوس سرئوس و کلستریدیوم اسپوروژنس را زیر آن مشاهده کنید. (شکل ۵ــ۶ حرارت دادن لام را در حین رنگ‌آمیزی اسپورباکتری‌ها نشان می‌دهد.)

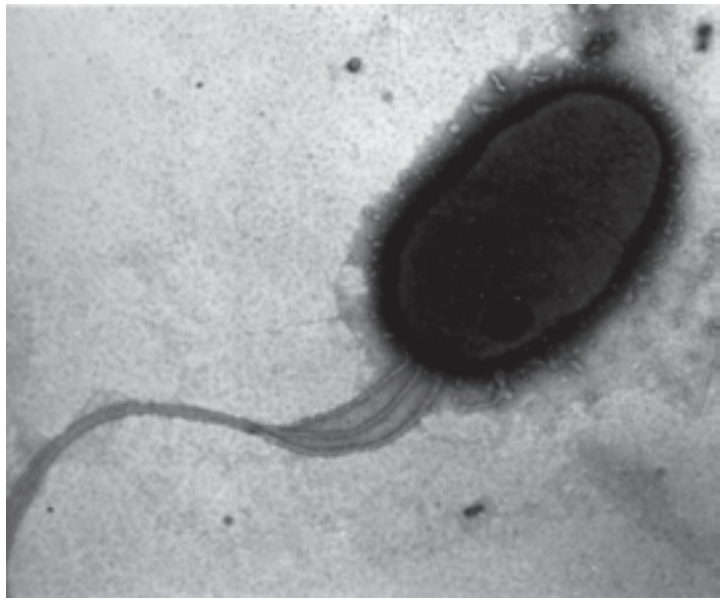
برای مطالعه

ب) رنگ‌آمیزی دیواره‌ی سلولی[1]: به دلیل نازکی و مقاومت در برابر رنگ‌آمیزی، دیواره‌ی سلولی سخت باکتری‌های حقیقی را به‌طور طبیعی به سختی می‌توان از بقیه قسمت‌های سلول تشخیص داد اما این قسمت با میکروسکوپ الکترونی به راحتی قابل مشاهده است که تصویر آن در شکل ۶ــ۶ نمایش داده شده است. به

۱ــ Cellwall

هرحال، با به کار بردن بعضی دندانه‌ها امکان رنگ‌آمیزی و دیدن این ساختمان امکان‌پذیر است. برای مثال، با مجاور کردن دیواره‌ی سلولی با یک عامل کاتیون سطحی، می‌توان آن را، دارای بار الکتریکی مثبت کرد، که بعد این ساختمان می‌تواند با یک رنگ اسیدی رنگ‌آمیزی شود، سیتوپلاسم بار الکتریکی منفی خود را حفظ کرده، می‌تواند به وسیله‌ی یک رنگ قلیایی متضاد رنگ‌آمیزی شود. نمونه‌ای را که برای نشان دادن رنگ‌آمیزی دیواره‌ی سلولی برایتان تهیه شده است به وسیله‌ی عدسی شیئی روغنی ایمرسیون میکروسکوپ نوری خود مشاهده کنید. توجه کنید که برای دیدن این رنگ‌آمیزی نورپردازی دقیق ضروری است.

برای این آزمایش با استعمال ستیل‌پیریدینیوم کلراید[1] دیواره‌ی سلولی دارای بار



شکل ۷ــ۶ــ تاژک باکتری‌ها که با رنگ‌آمیزی مشخص گردیده است.

الکتریکی مثبت شده است، که این ماده در آب به صورت کاتیون ستیل پیریدینیوم با بار الکتریکی مثبت و یون کلرور با بار الکتریکی منفی تجزیه شده است. در نتیجه جذب کاتیون ستیل پیریدینیوم، سطح، یا دیواره، سلول باکتری دارای بار الکتریکی مثبت شده است. سپس دیواره با رنگ اسیدی کنگو[2] به رنگ قرمز و سیتوپلاسم با رنگ متیلن‌بلو[3]

۱ــ Cetyl Pyridinium chloride ۲ــ Congo ۳ــ Methylene blue

به رنگ آبی رنگ‌آمیزی می‌شوند.

ج) رنگ‌آمیزی تاژک[1]: ابعاد تاژک باکتری‌ها کمتر از حد بزرگ‌نمایی میکروسکوپ نوری است. بنابراین تا قبل از استفاده از میکروسکوپ الکترونی، رؤیت مستقیم این ساختمان‌ها غیرممکن بود، ولی به هرحال با روش‌های رنگ‌آمیزی مخصوص یعنی با پوشاندن سطح تاژک‌ها با یک دندانه (رسوب دادن نمک‌های مختلف) و بدین‌طریق افزایش ابعاد قابل رؤیت آن‌ها، می‌توان تاژک‌ها را در حدود درشت‌نمایی میکروسکوپ نوری قرار داد.

آزمایش: رنگ‌آمیزی تاژک باکتری‌ها

مواد مورد نیاز:

۱ــ کشت ۲۴ ــ ۱۸ ساعته باسیلوس‌سابتیلیس[2] در محیط کشت نوترینت آگار که به صورت شیب‌دار کشت داده شده است.

۲ــ الکل اتیلیک ۹۵٪

۳ــ رنگ تاژک‌لیفسون (Liefson's) محلول A، B و C

۴ــ محلول متیلن‌بلو

۵ ــ لوله‌های آزمایش استریل

۶ــ محلول تمیزکننده‌ی بی‌کرومات

۷ــ لوله‌های دارای آب مقطر استریل

روش کار:

۱ــ ابتدا به مدت یک هفته لام‌های مورد استفاده برای رنگ‌آمیزی تاژک را در محلول تمیزکننده‌ی بی‌کرومات قرار داده، بعد از طی مدت مذکور آن‌ها را با الکل ۹۵٪ شست‌وشو دهید و بگذارید خشک شود. (بدون پاک کردن)

سعی کنید در برداشتن لام‌های مزبور از محلول تمیزکننده، کناره‌های آن‌ها را بگیرید تا از آلوده و کثیف شدن سطح لام‌ها جلوگیری شود.

۲ــ مدت چند ثانیه لام را روی شعله‌ی چراغ‌الکلی به جلو و عقب حرکت دهید.

۳ــ بگذارید لام‌ها در هوای آزمایشگاه سرد شوند.

۴ــ درب لوله دارای کشت باکتری باسیلوس سابتیلیس را باز نموده، ۳ــ۲

۱ــ Flagellum ۲ــ Bacillus subtilis

میلی‌لیتر آب مقطر استریل روی سطح شیب‌دار محیط بریزید و بعد از بستن درب لوله بآرامی آن را تکان دهید.

۵ــ با پیپت استریل یک قطره از سطح بالای محلول (جایی که باکتری‌های متحرک فراوان هستند) برداشته، در یک طرف لام نزدیک یک لبه‌ی آن قرار دهید.

۶ــ با کمی شیب دادن به لام، اجازه دهید مواد قطره‌قطره به سمت دیگر لام جریان یابد. (تاحدی که در سطح لام پخش شود)

۷ــ بدون آن که با حرارت گسترش را ثابت کنید، بگذارید تا در هوای اتاق خشک شود.

۸ــ محلول‌های A، B و C لیفسون را به مقدار مساوی (هرکدام ۲ میلی‌لیتر) با یکدیگر مخلوط نموده، به وسیله‌ی پیپت استریل، یک قطره از مخلوط فوق را روی سطح گسترش قرار دهید و بگذارید به مدت ۱۰ دقیقه باقی بماند.

۹ــ بعد از گذشت مدت مزبور، بدون آن که رنگ‌های اضافه را دور بریزید، لام را زیر جریان ملایم آب معمولی گرفته، شست‌وشو دهید.

۱۰ــ رنگ متیلن‌بلو (۱ درصد) را افزوده، بگذارید یک دقیقه باقی بماند.

۱۱ــ لام را زیر جریان ملایم آب معمولی شستشو داده، بگذارید تا در هوای آزمایشگاه خشک شود و سپس مورد مشاهده‌ی میکروسکوپی قرار دهید.

۱۲ــ تاژکها را به رنگ قرمز و سلول باکتری را به رنگ آبی خواهید دید.

د) رنگ‌آمیزی کپسول[1]: خیلی از باکتری‌ها به وسیله‌ی یک لایه‌ی صمغی با ضخامتهای مختلف احاطه شده‌اند که به نام کپسول خوانده شده، نسبت به سلول با شدّت کمتری رنگ‌آمیزی می‌شوند چون اغلب اوقات کپسول‌ها به صورت یک محوطه‌ی رنگ نشده در اطراف سلول‌های رنگ شده ظاهر می‌شوند، بنابراین می‌توانند با مواد خارجی رنگ نشده مثل محوطه خالی حاصل از مچاله و منقبض شدن سلول‌ها، اشتباه شوند، بنابراین برای نشان دادن کپسول‌ها مهم‌ترین روش رنگ‌آمیزی، روش رنگ‌آمیزی منفی است که مراحل آن در شکل ۲ــ۶ مشخص شده است. با کمک رنگ‌های منفی، نظیر نیگروزین، می‌توانید نمونه‌هایی را برای مشخص کردن کپسول باکتری‌ها تهیه نمایید و با بکار بردن عدسی شیئی روغنی ایمرسیون میکروسکوپ نوری مشاهده کنید.

۱ــ Capsul

گاهی ممکن است کپسول‌ها با مواد روشن اطراف سلول باکتری اشتباه شوند. چنان‌که سطح روشن اطراف سلول‌ها ممکن است نشان دهنده‌ی کپسول نباشد ولی صرفاً رنگ‌آمیزی غیرصحیح و یا کم‌رنگ موجب چنین اشتباهی می‌شوند. به این جهت کپسول‌ها باید به طریقی رنگ شوند که به خوبی از سلول باکتری تمیز داده شوند.

روش رنگ‌آمیزی کپسول باکتری‌ها:

مواد و لوازم مورد نیاز:

۱ــ کشت شیب‌دار ۴۸ساعته باکتری کلبسیلا نمونیا[1]

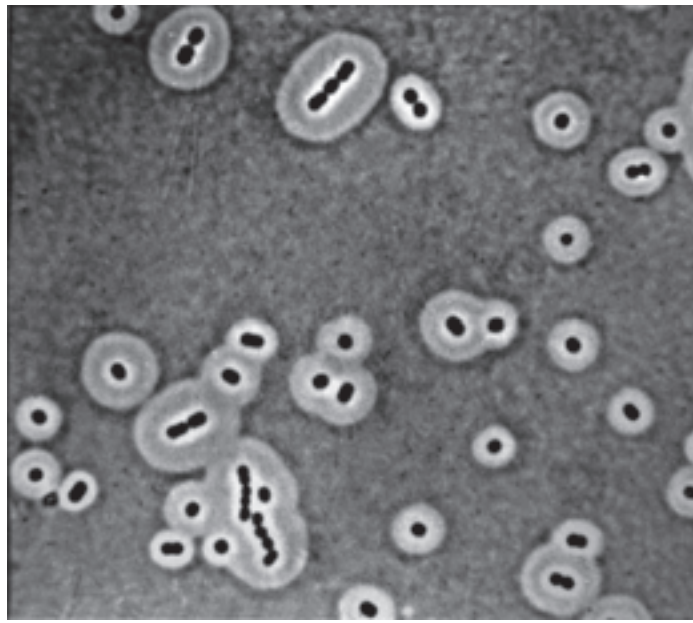
۲ــ محلول یک درصد کریستال ویوله

۳ــ محلول ۲۰٪ سولفات مس

روش کار:

۱ــ از پرگنه‌کلبسیلانمونیا روی یک لام تمیز گستره تهیه نموده، بگذارید در هوای آزمایشگاه خشک شود.

۲ــ از حرارت دادن لام برای ثابت نمودن گستره خودداری نمایید.



شکل ۸ــ۶ــ کپسولهای رنگ شده در زیر میکروسکوپ معمولی

۱ــ Klebsiela pneumonia

۳ــ از محلول کریستال ویوله مقداری روی گستره ریخته، بگذارید مدت دو دقیقه باقی بماند.

۴ــ لام را با محلول ۲۰٪ سولفات مس شستشو داده، بگذارید در هوای آزمایشگاه خشک شود.

۵ــ لام را مورد مشاهده‌ی میکروسکوپی قرار دهید. سلول باکتری به رنگ آبی تیره و کپسول به‌رنگ آبی بنفش دیده می‌شود.

۴ــ۳ــ۶ ــ رنگ‌آمیزی مواد ذخیره‌ای سلول باکتری: سلول میکروب‌ها، در مراحل مختلف رشد خود دارای مواد ته‌نشین یا گرانول‌هایی[۱] هستند که اغلب تصور می‌شود مواد ذخیره‌ای سلول باشند. یک منبع ساکاریدی که اغلب در سلول مخمرها و بعضی از سلول باکتری‌ها یافت می‌شود گلیکوژن است. به نظر می‌آید که این ماده شبیه کربوهیدرات ذخیره‌ای سلول حیوانات باشد، زیرا با یُد به رنگ قرمز مایل به قهوه‌ای درمی‌آید. منابع لیپیدی هم که مهم‌ترین آن‌ها اسید پلی‌ــ بتا ــ هیدروکسی بوتیریک[۲] است، در خیلی از باکتری‌ها وجود دارد. اگرچه این مواد را نمی‌توان با رنگ‌های معمولی به سهولت رنگ‌آمیزی کرد، ولی می‌توان آن‌ها را با رنگ‌های محلول در چربی نشان داد، که احتمالاً بدین‌طریق یک لایه‌ی لیپیدی اطراف این منابع رنگ می‌شوند. یکی از بهترین انواع این رنگ‌ها سودان‌سیاه‌ب[۳] می‌باشد. بعضی از منابع ذخیره‌ای باکتری‌ها را اغلب به نام ولوتین[۴] می‌خوانند که با رنگ‌های قلیایی به‌شدت رنگ‌آمیزی می‌شود. این مواد گرانول‌های پلی‌متا ــ فسفاتی[۵] هستند. (تصویر گرانول‌های ذخیره‌ای که به کمک میکروسکوپ الکترونی تهیه شده در شکل ۹ــ۶ به نمایش گذاشته شده است.)

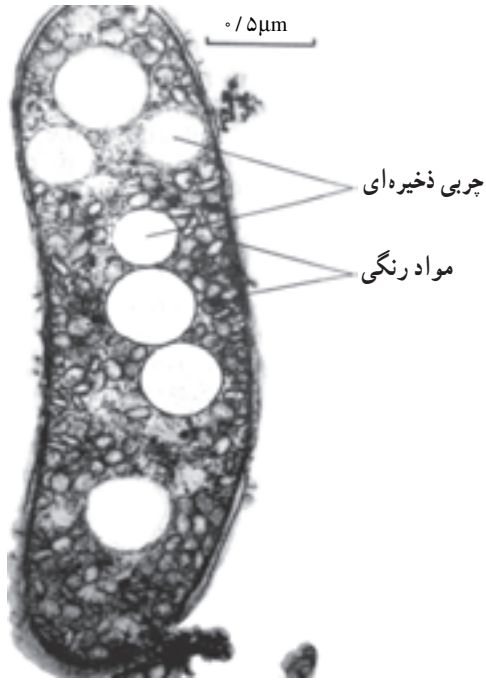
روش کار: (گلیکوژن)

۱ــ با به‌کار بردن سیم مخصوص تلقیح مقداری سلول مخمر ساکارومیسس سرویسیه[۶] را به یک قطره آب که روی یک لام تمیز قرار دارد انتقال داده، بآرامی آن را در آب مخلوط کنید تا یک سوسپانسیون حاصل شود.

۲ــ یک قطره یُد لوگل اضافه کرده، آن‌ها را به‌آرامی در روی لام مخلوط کنید.

۱ــ Granule ۲ــ poly Beta hydroxybutyric acid ۳ــ Sudan black - B

۴ــ Volutin ۵ــ Polymetapho sphate ۶ــ Saccharomyces cerevisiae



شکل ۹ــ۶ــ تصویر میکروسکوپ الکترونی اندوسپور

۳ــ یک لامل روی نمونه گذاشته، آن را با عدسی شیئی روغنی ایمرسیون مشاهده کنید.

برای این آزمایش، محیط کشت باید اسیدی باشد. اگر کشت قلیایی است، قبل از افزودن ید آن را اسیدی کنید، بعضی از باکتری‌ها، مخصوصاً گروهی از باکتری‌های بی‌هوازی اسپوردار، حاوی کربوهیدرات ذخیره‌ای دیگری به نام یوژن[۱] یا گرانولوز[۲] هستند که با یُد به رنگ آبی درمی‌آید. اسید پلی ــ بتا ــ هیدروکسی بوتیریک.

۱ــ تعدادی سلول باسیلوس مگاتریوم[۳] را به یک قطره‌ی آب که در روی یک لام تمیز قرار دارد انتقال داده، مخلوط کنید.

۲ــ یک قطره محلول سودان سیاه ب اضافه کرده، مخلوط کنید.

۳ــ یک لامل روی نمونه‌ی حاصل گذاشته، آن را با عدسی شیئی روغنی ایمرسیون مشاهده کنید.

۱ــ Iogen ۲ــ Granulose ۳ــ Bucillus megaterium

یادداشت: چون سلول‌ها باستثنای جدار اطراف پلی ــ بتا ــ هیدروکسی بوتیریک بی‌رنگ هستند، از این‌رو برای افزایش تضاد، مقدار نور را کاهش دهید.

ولوتین

۱ــ گستره‌ای از باسیلوس سرئوس تهیه کنید. بگذارید تا خشک شده، آن را با حرارت تثبیت کنید.

۲ــ یک قطره محلول آبی اسیدی شده متیلن‌بلو اضافه کنید.

۳ــ روی نمونه حاصل یک لامل گذاشته، آن را با عدسی شیئی روغنی ایمرسیون مشاهده کنید.

بیشتر محتویات سلولی، مثل پروتئین‌ها، با رنگ‌های قلیایی فقط هنگامی رنگ می‌شوند که pH محیط اطرافشان بالاتر از نقطه‌ی ایزوالکتریک[1] آن‌ها باشد. موادی که دارای نقطه‌ی ایزوالکتریک خیلی اسیدی هستند با یک رنگ قلیایی اسیدی شده (pH = ۲ – ۳) رنگ‌آمیزی می‌شوند. بنابراین، ولوتین که از مواد اسیدی تشکیل شده با یک رنگ قلیایی حتی در کمتر از pH ۴ هم‌رنگ می‌شود. ولوتین یک پلی‌فسفات است که ظاهراً در سنتز اسیدهای نوکلئیک و در تأمین انرژی سلول‌ها وارد عمل می‌شود.

۱ــ Isoelecterie Point

خودآزمایی

۱ــ اثر تغییردادن رنگ اول و دوم چیست؟ همین‌طور با حذف حرارت چه تغییری حاصل خواهد شد؟

۲ــ آیا میکروارگانیسم‌های اسید فست گرم مثبت و یا گرم منفی هستند؟

۳ــ مزایای رنگ‌آمیزی باکتری‌ها چیست؟

۴ــ انواع روش‌های رنگ‌آمیزی باکتری‌ها و رنگ‌های مورد استفاده در آن‌ها را بنویسید.

۵ــ منظور از تثبیت باکتری‌ها قبل از رنگ‌آمیزی چیست؟ از چه عواملی برای آن استفاده می‌شود؟

۶ــ روش تثبیت باکتری‌ها را بنویسید.

۷ــ رنگ‌های قلیایی و اسیدی هریک چگونه باعث رنگ‌آمیزی باکتری‌ها می‌شوند؟

۸ــ اساس رنگ‌آمیزی‌های تشخیصی چیست؟

۹ــ به‌طور خلاصه رنگ‌آمیزی گرم را شرح دهید.

۱۰ــ از رنگ‌آمیزی اسید فست به چه منظورهایی استفاده می‌شود؟

۱۱ــ برای رنگ‌آمیزی اندوسپور باکتری‌ها از چه روش‌ها و رنگ‌هایی می‌توان استفاده کرد؟

فصل هفتم

سنجش میزان رشد میکروارگانیسم‌ها

هدف‌های رفتاری: در پایان این فصل، فراگیر باید بتواند :
۱ــ روش‌های مختلف تعیین تعداد باکتری‌ها را توضیح دهد.
۲ــ روش‌های تعیین توده‌های سلولی را بیان نماید.
۳ــ باکتری‌های چند نمونه‌ی ماده‌ی غذایی و آب را با کشت تعیین نماید.
۴ــ تأثیر عوامل مختلف محیطی بر کشت و حیات باکتری‌ها را مورد بررسی قرار دهد.

۷ــ سنجش میزان رشد میکروارگانیسم‌ها

عملاً در هر مرحله از میکروبیولوژی، برای اندازه‌گیری رشد میکروب‌ها به روش‌هایی نیاز است . در این مورد تعداد سلول‌ها و یا توده‌ی سلول‌ها اندازه‌گیری می‌شود. روش‌هایی که تعداد سلول‌ها را تعیین می‌کند به‌خصوص برای شمارش موجودات تک سلولی مثل باکتری‌ها و مخمرها قابل استفاده می‌باشد. در حالی که روش اندازه‌گیری توده سلول‌ها را می‌توان برای تمام انواع میکروب‌ها از جمله انواع رشته‌دار بلند مثل کپک‌ها که نمی‌توان آن‌ها را با روش تعیین تعداد سلول‌ها اندازه گرفت به کار برد. معمول‌ترین روش اندازه‌گیری تعداد سلول‌ها روش پلیت یا شمارش کلنی‌هاست. این روش بر اساس فرضیّه‌ایست که طبق آن یک سلول باکتری ایجاد یک کلنی کرده، در نتیجه تعداد کلنی‌های تشکیل شده روی پلیت ژلوز معادل تعداد باکتری‌های اصلی است. در شمارش با رقت[۱]، یک سری نمونه با رقت‌های متفاوت تهیه کرده، آن‌ها را در یک سری لوله حاوی محیط مایع ــ به‌جای کشت در پلیت ــ تلقیح می‌کنیم. پس از قرار دادن در گرم‌خانه تمام لوله‌های حاوی سلول، به دلیل

۱ــ Dilution Count

تکثیر میکروب‌ها، کدر خواهد شد و بعضی از لوله‌ها با رقت زیاد ممکن است شفّاف باشند. دلیل این امر، آن است که در نمونه‌ی تلقیحی هیچ‌گونه باکتری زنده‌ای وجود نداشته است. از رقیق‌ترین نمونه‌ای که در آن تکثیر صورت گرفته است تعداد میکروب‌ها اندازه‌گیری می‌شود. در آزمایش برای تعیین تعداد باکتری‌ها در نمونه‌های آب، روش و شمارش با رقت تغییر یافته‌ای را به کار خواهید برد. همین‌طور، برای شمارش کلنی‌ها می‌توان از صافی‌های غشایی استفاده کرد. با عبور دادن یک نمونه از درون صافی غشایی گیرنده باکتری‌ها، می‌توانید سلول‌ها را در سطح صافی به‌دست آورید. سپس با به‌کار بردن یک محیط کشت مناسب، سلول‌ها روی سطح صافی رشد کرده، تعداد کلنی‌های حاصل نشان‌دهنده تعداد باکتری‌هاست. استعمال صافی‌های غشایی در تعیین باکتری‌های مدفوع در آب می‌باشد. در این روش‌های کشت سلول‌های زنده‌ای که در محیط‌های آماده شده تکثیر می‌یابند اندازه‌گیری می‌شوند. تعدادی روش‌های دیگر وجود دارد که می‌توان در آن‌ها مستقیماً تمام سلول‌های زنده و مرده‌ی نمونه را اندازه‌گیری کرد. این روش‌های مستقیم ارزش روش‌های کشت را ندارند، ولی وقت کمتری می‌گیرند. یکی از معمول‌ترین این روش‌ها عبارتست از شمارش مستقیم میکروسکوپی، که در آن حجمی معیّن از یک نمونه را روی یک سطح معین لام پخش می‌کنند. با شمارش میکروب‌ها در یک سطح مشخص و ضرب آن در ضریب مخصوص، می‌توانید تعداد میکروب‌های نمونه‌ی اصلی را محاسبه کنید. برای راحت‌کردن عملیات، لام‌های مخصوصی برای شمارش وجود دارد (برای مثال لام پتروف ــ هازر[1]) که دارای یک گودی با عمق و حجم مشخص است، و به مربعهایی تقسیم شده است. تعداد میکروب‌ها در یک حوزه‌ی معین (مثلاً در ۵۰ یا ۱۰۰ مربع) شمارش شده، با درنظر گرفتن این که نسبت حجم کلی به حجم محاسبه شده معین است می‌توان تعداد کل باکتری‌ها را در نمونه محاسبه کرد. در روش برید[2]، حجمی معین از نمونه را در یک سطح یک سانتی‌متر مربعی لام پخش کرده، آن‌را خشک و تثبیت و رنگ می‌کنند. بعد تعداد میکروارگانیسم‌ها را در حوزه‌های متعدد میکروسکوپی تعیین می‌کنند. از آنجایی که مساحت حوزه میکروسکوپی مشخص است، شمارش باکتری‌ها را می‌توان محاسبه کرد. روش برید را برای تعیین تعداد باکتری‌های شیر در آزمایش به‌کار خواهید برد. نمونه‌ای از لام‌های مدرج شمارش میکروارگانیسم‌ها در شکل ۱ــ۷ مشخص شده است. سلول‌ها و عناصر دیگر را می‌توان به وسیله‌ی الکترونیکی هم محاسبه کرد. در شمارش‌گر کولتر[3] نمونه‌ای را از یک سوراخ کوچک عبور داده، از روی تغییری که در مقاومت الکتریکی ایجاد می‌شود، نه تنها تعداد عناصر، بلکه اندازه‌ی آن‌ها را هم می‌توان مشخص کرد. به هر حال چون این

۱ــ Petroff - Hauser slide ۲ــ Breed ۳ــ Coulter Counter

روش تمام عناصر یک نمونه را اندازه می‌گیرد، فقط برای سوسپانسیون‌های آبی میکروب‌ها قابل استفاده است و نمی‌توان آن‌را برای تعیین تعداد مثلاً میکروارگانیسم‌ها در خاک به کار برد. در اندازه‌گیری توده‌ی سلولی یک کشت میکروبی مقدار کل پروتوپلاسم سلولی در میلی‌لیتر محیط کشت محاسبه می‌شود. برای تعیین توده‌های سلولی، معمول‌ترین روش‌ها عبارت است از : ۱ــ انتشار نور یا روش‌های کدورت‌سنجی، ۲ــاندازه‌گیری شیمیایی محتویات سلولی، ۳ــروش‌های وزن خشک و ۴ــروش‌های حجم سلولی.

روش‌های کدورت سنجی[۱]، اغلب در اندازه‌گیری توده سلولی به‌کار می‌رود. این روش‌ها بر این واقعیت بنا شده است که سلول‌های یک محیط کشت مایع بر حسب توده‌ی کل آن درکشت مانع از عبور نور می‌شوند یا آن‌را پخش می‌کنند. سنجش شیمیایی، توده‌ی سلولی به وسیله‌ی اندازه‌گیری مقدار بعضی از محتویات مخصوص سلول‌ها مثل، ازت سلولی، پروتئین، فسفر یا DNA، انجام می‌شود. در شرایط استاندارد مقدار این مواد می‌تواند یک سنجش دقیق از پروتوپلاسم محیط کشت به‌دست دهد. وزن خشک، سلول‌ها یا میسلیوم‌ها[۲]ی حجم معینی از محیط کشت می‌تواند مشخص‌کننده‌ی مقدار توده سلولی باشد. برای چنین سنجشی، کشت میکروبی به وسیله‌ی سانتریفوژ یا صاف کردن جمع‌آوری شده، سلول‌ها شسته، بعد از خشک کردن وزن آن‌ها اندازه‌گیری می‌شود. حجم سلولی، با قرار دادن مقدار استاندارد یک محیط کشت در لوله سانتریفوژ مدرج و اندازه‌گیری حجم مرطوب ته‌نشین بعد از سانتریفوژ سنجیده می‌شود.

روش‌های کمی کشت روی پلیت

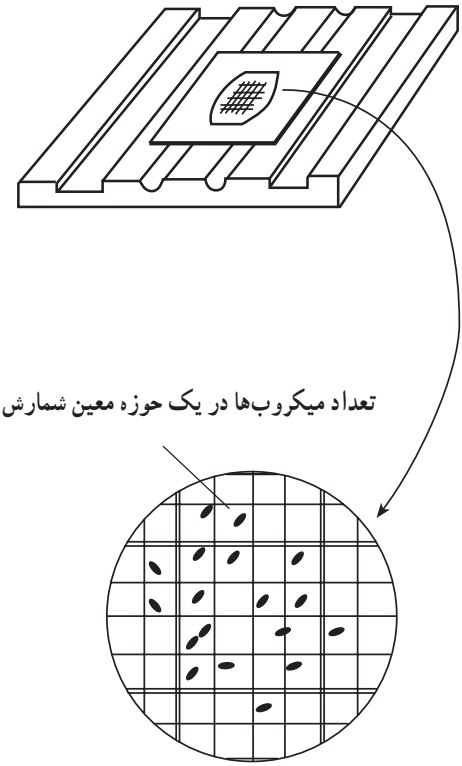
در آزمایش برای جداکردن باکتری‌ها، کشت روی پلیت را به کار بردید و دیدید که هر سلول باکتری زنده یک کلنی قابل رؤیت از سلول‌های دختر را تشکیل می‌دهد. از آنجا که هر سلول باکتری یک کلنی تشکیل می‌دهد، می‌توانید از کشت روی پلیت برای تعیین شماره‌ی باکتری‌ها دریک ماده مثل یک نمونه آب استفاده کنید. برای شمارش باکتری‌ها نمونه را رقیق کرده، روی پلیت کشت می‌دهند، و بعد از قرار دادن در گرمخانه، کلنی‌های ایجاد شده را می‌شمارند. پس از آن، تعداد باکتری‌های نمونه‌ی اصلی را با ضرب کردن تعداد کلنی‌های تشکیل شده در درجه رقت (ضریب رقت) پلیت مخصوصی که شماره شده است تعیین می‌کنند. رقت را اغلب اوقات با علامت منفی نشان می‌دهند. برای مثال، به جای ۱۰۰۰۰۰، 10^{5} بکار برده می‌شود. برای رقیق کردن کمی یک نمونه، اغلب یک گرم یا یک میلی‌لیتر

۱ ــ Turbidimetric ۲ــ Mycelium

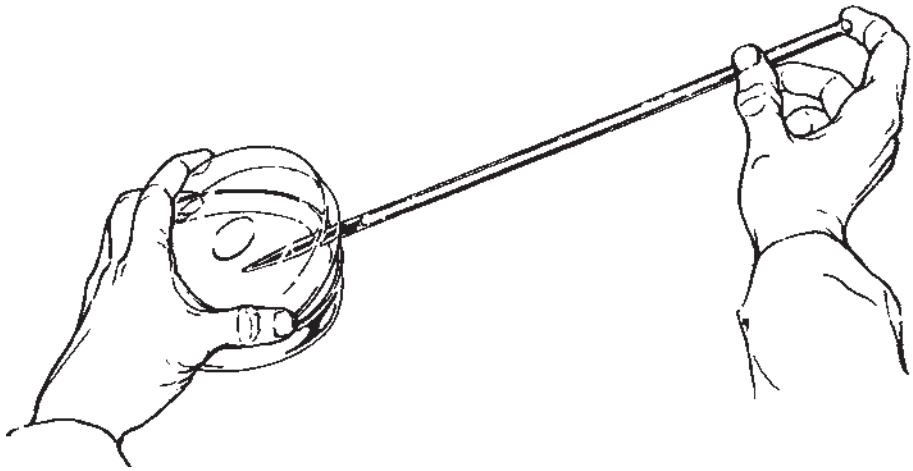
نمونه با یک سری لوله آزمایش یا بطری‌هایی که حاوی مقدار معینی آب استریل یا محلول تامپون است به تدریج رقیق می‌شود. در این آزمایش یک میلی‌لیتر از نمونه‌ی آب را به ۹۹ میلی‌لیتر آب استریل اضافه کرده، در نتیجه دارای رقت یک صدم از نمونه اصلی خواهید شد. با ادامه‌ی تدریجی این عمل یعنی با بکاربردن بطری‌های اضافی برای عمل رقیق کردن، می‌توانید نمونه‌هایی با رقت $۱۰^{۴}$، $۱۰^{۶}$ و غیره بدست آورید. سپس، با کشت دادن یک میلی‌لیتر و ۰/۱ میلی‌لیتر از هرکدام از رقت‌ها می‌توانید پلیت‌هایی با رقت $۱۰^{-۱}$، $۱۰^{-۲}$، $۱۰^{-۳}$، $۱۰^{-۴}$ و بیش‌تر به‌دست آورید.

روش کار:

دو نمونه آب الف و ب فراهم شده است. نمونه‌ی الف دارای کیفیّتی خوب و حاوی تعداد کمی باکتری است. نمونه‌ی ب نمونه‌ای ناخالص است که حاوی مقدار زیادی باکتری است. بنابراین برای تهیه پلیت‌های قابل شمارش باید بیش از نمونه الف رقیق شود.



شکل ۱ــ۷ــ لام‌های مخصوص مدرج شمارش میکروب‌ها که اسامی مختلفی دارند (روش مستقیم شمارش) و برای تعیین افزایش تعداد میکروارگانیسم‌ها در هر میلی‌لیتر به‌کار می‌روند.



شکل ۲ــ۷ــ نخستین کشت در پلیت به وسیله‌ی پیپت

در شروع کار، پلیت‌های پتری و نمونه‌های آب را مرتب کنید. پلیت‌ها و نمونه‌های آب را برحسب رقت آن‌ها علامت‌گذاری نمایید. همین‌طور پلیت‌هایی را هم که ممکن است ضروری باشد علامت‌گذاری کنید و رقت‌های دلخواه را تهیه کنید. دقت کنید که برای هر رقت پیپت عوض شود.

۱ــ پنج لوله حاوی ژلوز غذایی را ذوب کنید (در هرکدام ۱۵ میلی‌لیتر). آن‌ها را تا $45^{\circ}C$ خنک کنید و تا هنگامی‌که رقت‌ها تهیه می‌شوند آن‌ها را برای مصرف آماده نگهدارید. فاصله‌ای که نمونه‌ها را درپلیت‌های پتری می‌ریزند تا موقعی که آن‌ها را با ژلوز مخلوط می‌کنید، نباید بیش از چند دقیقه باشد.

۲ــ با یک پیپت استریل، ۱/۱ میلی‌لیتر از نمونه‌ی الف را برداشته و ۰/۱ میلی‌لیتر آن را در یک پلیت پتری استریل بریزید. یک میلی‌لیتر نمونه‌ی باقی‌مانده را در یک پلیت پتری استریل دیگر بریزید. پلیت اول را با الف ــ 10^{-1} و پلیت دوم را با الف ــ ۱ علامت‌گذاری کنید.

۳ــ نمونه‌ی ب را که حاوی مقادیر زیادی باکتری است نمی‌توان به‌طور مستقیم آن‌طور که در مورد نمونه‌ی الف عمل شده کشت داد، بلکه باید آن را با آب استریل رقیق کرد. با یک پیپت استریل یک میلی‌لیتر از نمونه‌ی ب را برداشته، آن را با ۹۹ میلی‌لیتر آب مخلوط کنید. چنین مخلوطی حاوی یک میلی‌لیتر از نمونه‌ی اصلی است که ۱۰۰ بار رقیق شده است، بنابراین یک میلی‌لیتر از این محلول رقیق شده معادل ۰/۰۱ میلی‌لیتر از نمونه اصلی می‌باشد.

۴ــ بطری حاوی مخلوط میکروبی را ۲۵ دفعه به شدت تکان دهید، به‌طوری‌که مچ دستتان در یک قوس حدود ۷۵ سانتیمتر حرکت کند. این عمل برای این است که اختلاط یکسانی در نمونه ایجاد شده، باکتری‌هایی که ممکن است به صورت چسبیده به هم و معلق باشند از یکدیگر جدا شوند.

۵ــ با یک پیپت استریل دیگر، مقدار ۱/۱ میلی‌لیتر از بطری حاوی نمونه‌ی رقیق شده (با رقت 10^{-2}) را برداشته و مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر آن را در یک پلیت پتری استریل (با رقت 10^{-3} نسبت به نمونه‌ی اصلی) بریزید و روی آن را با ب 10^{-3} علامت‌گذاری کنید. یک میلی‌لیتر باقی‌مانده را در یک پلیت پتری استریل دیگر ریخته (با رقت 10^{-2} نسبت به نمونه‌ی اصلی)، آن را با ب 10^{-2} علامت‌گذاری کنید.

۶ــ با همان پیپت قبلی یک میلی‌لیتر از بطری حاوی محلول با رقت $\frac{1}{100}$ را برداشته، آن را با ۹۹ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کنید. مخلوط را به همان شکلی که قبلاً شرح داده شد ۲۵ دفعه تکان داده، یک میلی‌لیتر از این نمونه مخلوط شده را بردارید و در یک پلیت پتری بریزید. این پلیت را با ب 10^{-4} علامت‌گذاری کنید.

۷ــ ژلوزذوب و سرد شده را وارد پلیت‌های پتری کرده، نمونه را به طور کامل با ژلوز مخلوط کنید. یکی از بهترین راه‌ها برای اختلاط نمونه و ژلوز عبارتست از کج کردن ملایم پلیت به طوری که ژلوز و نمونه چندین بار در اطراف پلیت به حرکت درآیند. دقت کنید که ژلوز روی لبه پلیت ریخته نشود.

۸ــ پلیت‌های پتری را در یک سطح صاف قرار دهید. پس از سرد شدن، آن‌ها را به طور وارونه در گرم‌خانه $30^{\circ}C$ قرار دهید.

۹ــ در پلیت‌هایی که در آن‌ها تعداد کلنی‌ها بین ۳۰ تا ۳۰۰ می‌باشد شمارش کلنی کنید.

پلیت‌های شمارش، کلنی‌های تشکیل شده در پلیت‌های ژلوزه را می‌توان در دستگاه‌هایی مثل شمارگر کلنی کُبِکْ[1] که در آن یک منبع نورانی غیرمستقیم و یک ذره‌بین تعبیه شده است، شمرد. پلیت را به طور وارونه روی شمارگر قرار دهید. برای ممانعت از دوباره شمردن کلنی‌ها، هر کلنی شمرده شده را با یک مداد چرب یا قلم در روی پلیت علامتگذاری کنید. اگر پلیت‌های زیادی را باید شماره کرد، ماشین حساب می‌تواند مفید باشد. کلنی‌هایی که به نام کلنی‌های پخش[2] خوانده می‌شوند، اغلب در لایه‌ی مرطوب سطح ژلوز یا بین ژلوز و ته پلیت پتری تشکیل می‌شوند. اگر کلنی‌های پخش بزرگ هستند و سایر کلنی‌ها را می‌پوشانند، پلیت را دور بریزید. غالباً کلنی‌های پخش کوچک، خاکستری و نازک هستند. اگر این کلنی‌ها کوچک و مشخص باشند می‌توان آن‌ها را به عنوان یک کلنی مجزّا شماره کرد.

محاسبه شمارش پلیت‌ها

تعداد باکتری‌ها در میلی‌لیتر نمونه اصلی (که شمارش پلیت می‌باشد) به وسیله‌ی ضرب کردن تعداد کلنی‌ها در درجه رقت به‌دست می‌آید. برای مثال، اگر در پلیت با رقت 10^{-3} تعداد ۱۵۰ کلنی

۱ــ Quebec ۲ــ Spreader

شمردید، می‌توانید چنین محاسبه کنید ۱۵۰۰۰۰=۱۰۰۰×۱۵۰ یعنی در هر میلی‌لیتر نمونه‌ی اصلی ۱۵۰۰۰۰ باکتری وجود دارد. معمولاً پیشنهاد می‌شود که برای هر رقت دو پلیت تهیه شود. از شمارش پلیت‌های دوگانه معدل گرفته، بدین طریق به تعداد واقعی کلنی‌ها نزدیک‌تر خواهد بود. میانگین ۱۴۸ و ۱۵۴ در دقت 10^{-3} عبارتست از ۱۵۱ و ۱۵۱۰۰۰ باکتری در میلی‌لیتر گزارش داده می‌شود. افزایش تعداد باکتری‌ها در هر میلی‌لیتر در واحد زمان و در ساعت‌های متمادی که از نمونه برداشت می‌شود، می‌تواند مبین میزان رشد باکتری در زمان باشد.

فکر کنید و پاسخ دهید:

۱ــ چرا فقط پلیت‌هایی که بین ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی دارند شمارش می‌شوند؟
۲ــ آیا کلنی‌های توده‌های مجتمع باکتری بهتر از سلول‌های تک، تشکیل می‌شوند؟
۳ــ چرا بین رقت‌ها باید پیپت‌ها عوض شود؟

تأثیرات محیطی

میکروب‌ها، شبیه تمام جانداران عمیقاً تحت تأثیر محیط اطراف خود هستند. عوامل محیطی به سه دسته کلی تقسیم می‌شوند : **فیزیکی** (اثرات حرارت یا فشار قوی)، **شیمیایی** (احتیاج به غذاها و عکس‌العمل در برابر سموم) و **بیولوژیکی** (در اساس شیمیایی مثل اثرات متقابل انواع مختلف موجوداتی که با همدیگر زندگی می‌کنند). برای هر نوع میکروبی مانند هر نوع گیاه یا حیوان، شرایط محیطی مناسب ویژه‌ای وجود دارد، ولی به طور کلی حدود تحمل سلسله میکروب‌ها، نسبت به جانداران عالی بیش‌تر است. مثلاً بدن انسان دارای یک حرارت طبیعی $37^{\circ}C$ (۹۸/۶ درجه فارنهایت) است که به دقت تنظیم یافته، می‌تواند به رغم حرارت و یا سرمای شدید ثابت بماند. سلول باکتری دارای حرارت تنظیم یافته بدنی نیست، بلکه درجه حرارت محیط خارج را می‌پذیرد. عکس‌العمل باکتری در برابر سرما و یا خشکی زیاد فقط وقفه فعالیت‌های آنزیمی است، و بر خلاف جانداران عالی‌تر الزاماً نمی‌میرد. اگرچه اکثریت اشکال میکروبی به همان شرایطی نیاز دارند که برای سلول بیشتر گیاهان و حیوانات نافع است، ولی میکروارگانیسم‌هایی را یافته‌اند (افراطی) که می‌توانند (و یا حتی احتیاج دارند) در شرایطی که نسبت به استانداردهای طبیعی نامناسب هستند زنده بمانند. در تمام گروه‌های بزرگ سلولی تنها سلول‌هایی به‌وسیله‌ی محیط انتخاب می‌شوند که می‌توانند به زندگی خود در شرایط تحمیل شده ادامه دهند. ولی حتی میکروب‌ها هم نمی‌توانند با دو دشمن کشنده موجودات زنده ــ حرارت شدید و بعضی سموم

شیمیایی ــ سازگار شوند. هر دوی این نیروها، آنزیم‌ها و سایر پروتئین‌ها را که بدون وجود آن‌ها زندگی نابود می‌شود، هدف قرار می‌دهند. در جدال دائمی بشر برای کنترل میکروارگانیسم‌های مضر و مفید، قوی‌ترین وسیله، کنترل عوامل محیطی میکروب‌ها بوده است. بشر برای حفاظت مواد مختلف در مقابل رشد میکروب‌ها، از حرارت، فشار اسمزی و کمبود اکسیژن استفاده کرده است، ولی همانطور که انتظار می‌رود، کنترل میکروارگانیسم‌ها به دلیل قدرت زیاد سازگاری و قابلیت تغییر شدید آن‌ها دشوار است.

نوشابه‌های تخمیری

تخمیر نه تنها می‌تواند باعث نگه‌داری بعضی از غذاها شود، بلکه در موارد دیگر طعم و ارزش غذایی بعضی از آن‌ها را بهبود می‌بخشد. بیش‌تر غذاهای تخمیری به رشد و فعالیت یک یا چند گونه از باکتری‌های اسیدلاکتیکی، و یا مخمرها و یا ترکیب این دو نیاز دارند. نوع تخمیری که در یک غذا صورت می‌گیرد در درجه اول، با محتوای کربوهیدرات و pH آن معین می‌شود. وجود کربوهیدرات‌ها، اسیدیته بالا و ضعیف بودن غذاهای تامپونه باعث می‌شوند که عمل تخمیر الکلی به وسیله‌ی مخمرها صورت گیرد، در حالی‌که وجود کربوهیدرات‌ها، اسیدیته پایین و وجود غذاهای تامپونه قوی باعث می‌شود که تخمیر اسیدلاکتیکی انجام شود. در این آزمایش به بررسی میکروفلور بعضی از غذاهای تخمیری می‌پردازیم.

روش کار: (باترمیلک[1] کشت شده)

باترمیلک کشت شده عبارتست از دوغ یا پس‌آب کره که به وسیله‌ی باکتری‌های اسیدلاکتیکی تخمیر شده، در نتیجه در آن اسیدلاکتیک و مواد فرّار تولید می‌شود. این عمل باعث انعقاد شیر می‌شود و به همراه آن بو و طعم مطبوعی در شیر ایجاد می‌گردد. به علت عدم دسترسی به باترمیلک برای تهیه آن شیر بدون چربی یا کم‌چربی را با مخلوطی از کشت باکتری‌های اسیدلاکتیکی که به نام باکتری‌های آغازگر[2] خوانده می‌شود مخلوط می‌کنند. در نتیجه‌ی این عمل، شیر ترش خواهد شد. هنگامی‌که در کشت در حدود ۰/۸ تا ۰/۹ درصد اسیدلاکتیک ایجاد شد، عمل تخمیر را با سرد کردن کشت متوقّف کرده با حرکت، لخته‌های شیر منعقده را خرد می‌کنند. باکتری‌های آغازگر تجارتی، معمولاً شامل استرپتوکوکوس لاکتیس[3]، لوکونوستوک دکسترانیکوم[4] و لوکونوستوک سیتروروم[5]

۱ــ Buttermilk
۲ــ Starter
۳ــ Streptococcus Lacteis
۴ــ Leuconostoc Dextranicum
۵ــ Leuconostoc Citrovorum

هستند. میکروب‌های مختلف‌گونه لوکونوستوک اسید سیتریک شیر را تجزیه کرده، دی‌استیل[1] تولید می‌کنند که قسمتی از بوی مشخص شیر تخمیر شده مربوط به آن است.

۱ــ یک لوله بزرگ و یا یک فلاسک شیر بدون چربی پاستوریزه را با ۰/۰۱ حجم خود، از کشت خمیرمایه[2] تلقیح کنید. مایه تلقیح شدنی را با چرخاندن لوله در بین دو دست و یا با تکان دادن فلاسک در تمام قسمت شیر پخش کنید.

۲ــ شیر تلقیح شده حاصل را تا وقت بعدی آزمایشگاهی در حرارت آزمایشگاه (روی میز کار خود) بگذارید. (بهتر است آن را به مدت ۱۲ تا ۱۸ ساعت در حرارت $21^{\circ}C$ قرار دهید.)

۳ــ شیر ترش بدست‌آمده را تکان دهید تا لخته‌های آن خرد شود، بو و مزه باترمیلک کشت شده حاصل را مورد توجه قرار دهید.

شرکت‌های مختلف، کشت‌های آغازگر را به صورت گرد خشک در دسترس قرار می‌دهند. این خمیرمایه‌ها را باید چندین بار به شیر منتقل کرد تا در آخر نوع متناسب آن حاصل شود.

خودآزمایی

۱ــ برای تعیین تعداد باکتری‌ها از چه روش‌هایی می‌توان استفاده کرد؟ نام ببرید.

۲ــ برای تعیین باکتری‌های مدفوع در آب از چه روشی استفاده می‌شود؟

۳ــ روش‌های تعیین توده‌های سلولی را نام ببرید.

۴ــ روش تعیین کمی باکتری‌ها را به کمک کشت به‌طور خلاصه بیان نمایید.

۵ــ کار شمارش‌گر کُبِکْ را توضیح دهید.

۶ــ طرز محاسبه‌ی باکتری‌ها به کمک شمارش پلیت‌ها را با ذکر یک مثال توضیح دهید.

۷ــ منظور از نفلومتری و توربیدیمتری در سنجش رشد میکروب‌ها چیست؟

۸ــ عوامل محیطی مؤثر بر زندگی باکتری‌ها را دسته‌بندی نموده، بگویید چرا کنترل میکروارگانیسم‌ها عملاً دشوار است؟

۹ــ عوامل مؤثر بر نوع تخمیر مواد غذایی را بنویسید.

۱۰ــ باترمیلک چیست و چگونه تهیه می‌شود؟

۱ــ Diacetyl

۲ــ از ماست پاستوریزه تازه به عنوان استارتر می‌توان استفاده کرد که در این صورت دمای انکوباسیون $42^{\circ}C$ به مدت ۳ تا ۶ ساعت خواهد بود.

فصل هشتم

قارچ‌ها (کپک‌ها ــ مخمرها)

هدف‌های رفتاری: در پایان این فصل، فراگیر باید بتواند :
۱ــ کپک‌ها را با توجه به وضعیت ظاهری رشد آن‌ها، مورد شناسایی قرار دهد.
۲ــ مخمرها را با توجه به خصوصیات ظاهری آن‌ها شناسایی کند.

۸ــ قارچ‌ها (کپک‌ها ــ مخمرها)

۱ــ۸ــ مقدمه

همه، رشد قارچ‌هایی را که شبیه پنبه و نمد بوده، در روی مواد غذایی و سایر مواد تولید می‌شوند و معمولاً کپک نام دارند مشاهده کرده‌اند. اگر کپک‌ها با یک ذره‌بین ساده مورد بررسی قرار گیرند، توده‌ای رشته شاخه شاخه و درهم مشاهده می‌شود که میسلیوم[۱] کپک نامیده می‌شوند. اگر یک رشته تنهای میسلیوم را که هیف[۲]خوانده می‌شود مورد دقت قرار دهیم، خواهیم دید که دارای ابعادی از حدود ۵ تا ۱۰ بار بزرگ‌تر از سلول باکتری‌های حقیقی[۳] که قبلاً دیدیم، می‌باشد. بیشتر میسلیوم‌های یک کپک در داخل و یا در سطح محیط کشت رشد کرده، مواد غذایی لازم را جذب می‌کنند. مخمرها قارچ‌های تک‌سلولی هستند و با کپک‌ها ارتباط نزدیکی دارند. سلول مخمرها، شبیه گوی، تخم‌مرغی و یا استوانه‌ای بوده، از نظر اندازه چندین بار بزرگتر از سلول باکتری‌های متوسط و تقریباً به اندازه‌ی هیف کپک‌ها می‌باشند. به دلیل بزرگی در داخل سلول مخمرها، تعدادی ساختمان و ضمایم سلولی[۴] وجود دارد که با میکروسکوپ نوری قابل رؤیت‌اند. هسته مخمرها را هم می‌توان با رنگ‌آمیزی‌های مخصوص

۱ــ Mycelium ۲ــ Hypha ۳ــEubacterial
۴ــ Inclusion

مثل رنگ‌آمیزی فولکن مشاهده کرد.

۲ــ۸ــ شناسایی وضعیت ظاهری کپک‌ها

کپک‌ها را از روی اختلاف شکل و نحوه‌ی تولیدمثل آن‌ها بررسی و طبقه‌بندی می‌کنند. برای مطالعه کپک‌ها از تفاوت‌های ۱ــ کلنی کپک‌ها، ۲ــ میسلیوم رونده و جوان، ۳ــ ساختمان‌های مخصوص تولیدمثل چه جنسی و چه غیرجنسی، استفاده می‌کنیم. کلنی‌ها از نظر اندازه، شکل ظاهری و رنگ متفاوت‌اند. برای مثال، قارچ‌های رده اسکومیست یک کلنی مشخص و محدود را تشکیل می‌دهند. درحالی‌که قارچ‌های رده فیکومیست بعد از رشد در تمام سطح پلیت گسترده شده، در نتیجه شباهتی به کلنی ندارند بلکه بیشتر شبیه یک توده‌ی رشته‌ای نازک هستند که فقط دیواره‌ی پلیت پتری است که گسترش آن‌ها را محدود می‌کند. قارچ پنی‌سیلیوم[1] پس از رشد در روی شیر یا پنیر به رنگ آبی متمایل به سبز خودنمایی می‌کند.

شناسایی شکل ظاهری کپک‌ها

کشت چندگونه از کپک‌ها که در روی پلیت و لام شیشه‌ای (محفظه مرطوب) انجام شده است، دراختیارتان قرار می‌گیرد.

۱ــ کشت‌های روی پلیت را از نظر خصوصیات رشد کلنی‌ها، اندازه، رنگ و ظاهر هرگونه، مورد مطالعه قرار دهید.

۲ــ کشت هریک از کپک‌ها را که در روی محیط کشت جامد به‌عمل آمده است به کمک میکروسکوپ و استفاده از عدسی شیئی بررسی کنید. میکروسکوپ را روی لبه کلنی‌ها میزان کرده، ساختمان آن را مطالعه کنید. یک لامل در روی کلنی قرار داده، به کمک عدسی شیئی آن را بررسی کنید. مشخصات هیف‌ها، سلول‌های مخصوص تولیدمثل و اسپورها را مورد دقت قرار دهید. به دلیل بزرگی نسبی اندازه‌ی کپک‌ها، در هر میدان میکروسکوپی، فقط یک ساختمان و یا یک قسمت از یک ساختمان آن را مشاهده خواهید کرد. بنابراین برای بررسی میکروسکوپی به وسیلهٔ عدسی شیئی خشک باید سعی کنید طوری میکروسکوپ را میزان کرده، میدان دید را انتخاب کنید که بتوانید یک ساختمان کامل را مشاهده کنید.

۳ــ از ترکیب مشاهدات خود در پلیت و در لام تصویر کلنی‌ها، میسلیوم‌های رونده و ساختمان‌های مخصوص تولیدمثل را رسم کنید.

۱ــ Penicillium

۳ــ۸ــ کشت کپک‌ها برای شناسایی گونه‌های مربوطه

شناسایی کپک‌ها بیشتر براساس شکل، ساختمان و نحوه اسپرسازی آن‌ها صورت می‌گیرد که در فصل نهم کتاب میکروبیولوژی درباره آن‌ها بحث شده است.

برای مشاهده شکل ساختمانی و نحوه اسپرسازی کپک‌ها روش‌های معمولی رنگ‌آمیزی باکتری‌ها مناسب نیست زیرا در این حالت هنگام انجام ثابت کردن و رنگ‌آمیزی تغییراتی در نحوه آرایش کپک و اسپرهای آن ایجاد می‌شود که کار شناسایی را مشکل می‌کند.

روش مناسب و کاربردی برای این کار اسلاید کالچر[۱] نامیده می‌شود. این کار با روش‌های مختلفی انجام می‌گیرد که ساده‌ترین آن‌ها روش بلوک یا قطعه آگار[۲] است مراحل انجام این آزمایش به‌شرح زیر است :

ــ ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مناسب کپک را در یک پلیت ریخته و به حال خود می‌گذاریم تا سفت شود، بدیهی است محیط کشت و پلیت هر دو باید سترون شده باشند.

ــ یک پلیت سترون برداشته، کف آن یک کاغذ فیلتر سترون قرار داده و روی کاغذ فیلتر یک میله شیشه‌ای U شکل سترون قرار می‌دهیم و روی این میله شیشه‌ای یک لام سترون می‌گذاریم.

ــ یک قسمت مربع شکل به ابعاد یک سانتی‌متر یا کمی بیشتر به اندازه لامل‌های در دسترس را از محیط کشت آماده شده بریده (در شرایط بودن امکان آلودگی دوباره) روی لام قرار می‌دهیم.

ــ به‌وسیله نوک آنس پلاتین، گوشه‌ای از یک کلنی مجزای کپک مشکوک را برداشته و به‌وسط قطعه آگار روی اسلاید منتقل می‌کنیم و یک لامل سترون روی آن می‌گذاریم.

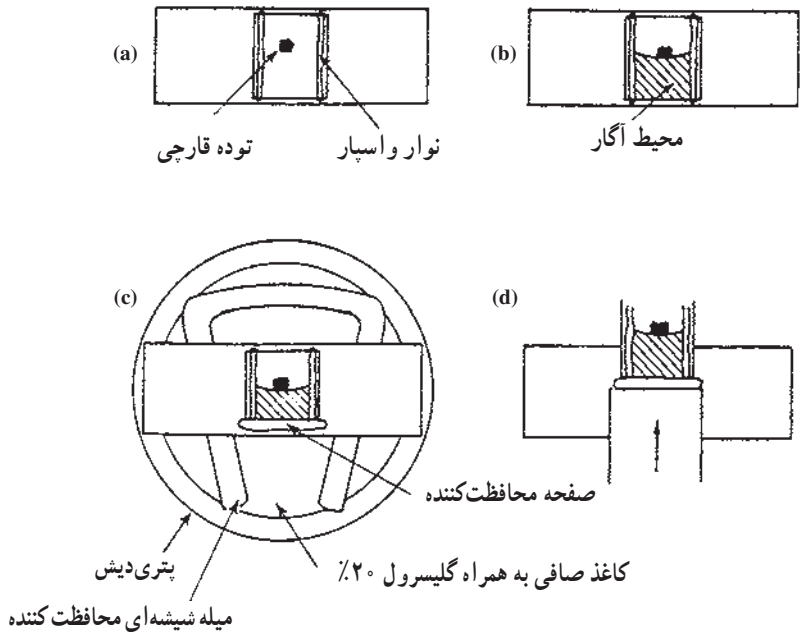
ــ کاغذ فیلتر را با محلول گلیسرول ۲۰٪ سترون خیس می‌کنیم تا از خشک شدن قطعه آگار در زمان گرمخانه‌گذاری جلوگیری شود.

ــ مجموعه را در گرمخانه $25^{\circ}C$ قرار داده و پس از حدود ۲۴ ساعت با عدسی خشک و با درشت‌نمایی بالا آن را مشاهده می‌کنیم و چنانچه لازم باشد زمان گرمخانه‌گذاری را زیاد می‌کنیم تا شکل کپک به‌طور کامل مشخص شود.

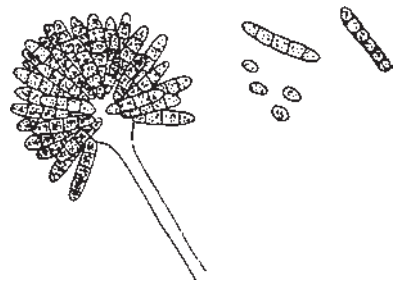
ــ در مرحله آخر به آرامی لامل را از روی قطعه آگار برداشته وارد محلول لاکتوفنل[۳] یا لاکتوفنل‌کتون بلو[۴] یا لاکتوفنل پیکریک اسید کرده و زیر میکروسکوپ شکل کپک را مشاهده می‌نماییم و آن را رسم می‌کنیم و از آن برای شناسایی کپک استفاده می‌کنیم.

۱ــ Slide Culture Method ۲ــ Agar block ۳ــ Lactophenol

۴ــ Lactophenol Cottonblue



شکل ۱ــ۸



شکل ۲ــ۸

۴ــ۸ــ شناسایی وضعیت ظاهری مخمرها

بیشتر مخمرها به وسیله‌ی عمل غیرجنسی جوانه‌زدن[1] تولیدمثل می‌کنند، بدین ترتیب که از سلول اصلی یک قسمت به صورت جوانه خارج شده، بعد از کامل شدن به صورت یک سلول دختر از آن جدا می‌شود. در بعضی از مخمرهای حقیقی (که با تولید اسپورهای جنسی مشخص می‌شوند) تولیدمثل جنسی صورت می‌گیرد، بدین طریق که ابتدا دو اسکوسپور با یک‌دیگر ترکیب شده، یک سلول رونده دیپلوئید[2] تولید می‌کنند. هسته‌های حاصل این سلول به چهار هسته یا بیش‌تر تقسیم

۱ــ Budding ۲ــ Diploid

شده، هریک از این هسته‌ها بعد از کامل شدن به یک اسکوسپور تبدیل می‌گردد و اطراف آن‌ها با مواد ذخیره‌ای و یک پوشش اسپوری احاطه می‌شود. اسکوسپورها در سلول اصلی یا آسکیوس[1] باقیمانده و بالاخره پس از پاره شدن آزاد می‌شوند. اسکوسپورها در شرایط مناسب دوباره ترکیب شده، با جوانه‌زدن به سلول‌های رونده تبدیل می‌شوند و بدین طریق چرخه تولیدمثل آن‌ها تکرار می‌شود، دراین آزمایش، شکل و نحوه‌ی تولیدمثل غیرجنسی مخمرها نشان داده می‌شود.

روش کار : (مرفولوژی سلول رونده)

۱ــ به کمک حلقه کشت از هریک از کشت‌های موجود یک حلقه برداشته، آن را با محلول آبی ید (۳قطره آب + یک قطره ید گرم) مخلوط کرده، بعد آن‌ها را با یک لامل بپوشانید.

۲ــ هریک از نمونه‌ها را با عدسی شیئی قوی میکروسکوپ مورد مشاهده قرار داده، شامل مخمرها، همین‌طور ساختمان‌های داخلی قابل رؤیت آن را یادداشت کنید. چند میدان میکروسکوپی را مورد توجه قرار دهید تا بتوانید سلول‌های جوانه زده را بیابید.

خودآزمایی

۱ــ تفاوت کپک‌ها و مخمرها در چیست؟

۲ــ میسلیوم و هیف را تعریف کنید.

۳ــ برای طبقه‌بندی و شناسایی کپک‌ها از چه فاکتورهایی استفاده می‌شود؟

۴ــ خصوصیات ظاهری کپک پنی‌سیلیوم پس از رشد روی شیر و پنیر چیست؟

۵ــ تولیدمثل جنسی و غیرجنسی در مخمرها چگونه صورت می‌گیرد؟

۱ــ Ascqs

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^{-5}ــ10^{-1}) 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

ــ 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.

۱ــ۲ــ۹ــ 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.

۲ــ۲ــ۹ــ 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.

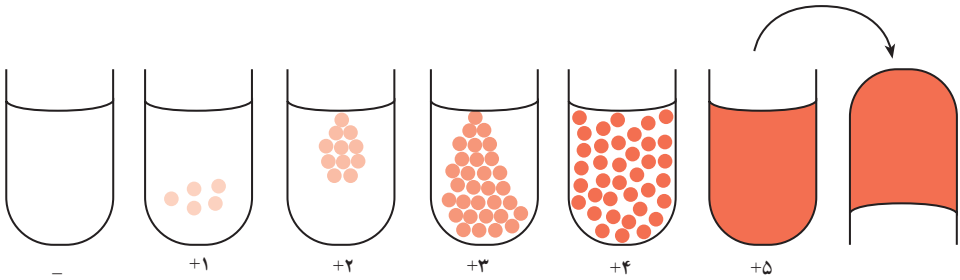
ــ به لوله‌های آزمایش حاوی ۰/۳ میلی‌لیتر پلاسمای خون خرگوش، ۰/۱ میلی‌لیتر از محیط کشت برین‌هارت اینفیوژن برات اضافه کرده، در دمای $37^{\circ}C$ ــ ۳۵ قرار می‌دهیم.

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 Triple 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 ۲۵°C ـ ۲۲ و ۳۷°C ـ ۳۵ و ۶۰°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 ۸۰°C و دیگری ۵دقیقه در دمای ۱۰۰°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.

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

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

8 ــ MICROBIOLOGY AND INFECTION DISEASE
BRIODY
1974

9ــ 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.