بسم الله الرحمن الرحیم

کتاب معلّم

(راهنمای تدریس)

عملیات میکروبیولوژی

رشتهٔ صنایع غذایی

۱۳۹۴

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 : **کتاب معلّم عملیات میکروبیولوژی ـ ۵۵۲/۳**
مؤلفان : **رسول پایان، سحر هنرمندجهرمی** با همکاری **میرمحمد شاملوانباردان**
ناظر : **نبی‌الله مقیمی**
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 ، دورنگار : ۸۸۳۰۹۲۶۶، کدپستی : ۱۵۸۴۷۴۷۳۵۹،
وب سایت : www.chap.sch.ir
مدیر امور فنی و چاپ : **لیدا نیک‌روش**
صفحه‌آرا : **زهره بهشتی‌شیرازی**
حروفچین : **فاطمه محسنی**
مصحح : **زهرا رشیدی‌مقدم، شاداب ارشادی**
امور آماده‌سازی خبر : **زینت بهشتی‌شیرازی**
امور فنی رایانه‌ای : **حمید ثابت‌کلاچاهی، فاطمه رئیسیان‌فیروزآباد**
ناشر : **شرکت چاپ و نشر کتاب‌های درسی ایران : تهران ـ کیلومتر ۱۷ جادّهٔ مخصوص کرج ـ خیابان ۶۱ (داروپخش)**
تلفن : ۵ـ ۴۴۹۸۵۱۶۱، دورنگار : ۴۴۹۸۵۱۶۰، صندوق پستی : ۱۳۹ـ ۳۷۵۱۵
چاپخانه : **شرکت چاپ و نشر کتاب‌های درسی ایران «سهامی خاص»**
سال انتشار و نوبت چاپ : **چاپ اوّل ۱۳۹۴**
حقّ چاپ محفوظ است.

شابک ۵-۱۹۶۱-۰۵-۹۶۴-۹۷۸ ISBN 978-964-05-1961-5

فهرست

پیش‌گفتار
مقدمه
سخنی با هنرآموزان

فصل اول : مقررات کار در آزمایشگاه میکروب‌شناسی ۱
۱ـ۱ـ فضای مربوط به آماده‌سازی نمونه و آزمایش ۱
۱ـ۲ـ مکان آزمایش ۱
۱ـ۳ـ تمیز کردن و ضدعفونی کردن سطوح کار ۲
۱ـ۴ـ بهداشت کارکنان و دانش‌آموزان ۲
۱ـ۵ـ مقررات ایمنی ۳

فصل دوم : دستگاه‌ها و وسایل آزمایشگاه میکروبیولوژی ۴
۲ـ۱ـ دستگاه‌ها و وسایل آزمایشگاه میکروب‌شناسی ۴
۲ـ۲ـ وسایل آزمایشگاهی ۱۵
۲ـ۳ـ میکروسکوپ ۲۱
۲ـ۴ـ انواع میکروسکوپ ۲۳

فصل سوم : رنگ‌آمیزی باکتری‌ها ۲۶
۳ـ۱ـ رنگ‌ها ۲۶
۳ـ۲ـ انواع رنگ‌آمیزی ۲۶
۳ـ۳ـ تهیه گستره خشک از نمونه میکروبی ۲۷
۳ـ۴ـ تهیه گستره مرطوب از نمونه میکروبی ۲۷
۳ـ۵ـ رنگ‌آمیزی ساده با متیلن‌بلو ۲۷
۳ـ۶ـ رنگ‌آمیزی گرم ۲۹
۳ـ۷ـ رنگ‌آمیزی اسپور ۳۲
۳ـ۸ـ رنگ‌آمیزی کپسول ۳۴

فصل چهارم : آلودگی‌زدایی و سترون‌سازی ۳۷
۴ـ۱ـ روش‌های گرمایی ۳۷
۴ـ۲ـ مواد شیمیایی ضدمیکروب یا سترون‌کننده‌ها ۳۸
۴ـ۳ـ تابش اشعه یا پرتودهی ۳۹
۴ـ۴ـ نحوه کاربرد مواد و روش‌های سترون‌کننده ۴۰

فصل پنجم : آماده‌سازی محیط‌های کشت میکروبی ۴۱
۵ـ۱ـ انواع محیط‌های کشت آزمایشگاهی ۴۱
۵ـ۲ـ آماده‌سازی و سترون‌سازی محیط‌های کشت آزمایشگاهی ۴۶

فصل ششم : نمونه‌برداری و آماده‌سازی نمونه برای آزمون ۴۹
۶ـ۱ـ نمونه‌برداری ۴۹
۶ـ۲ـ روش نمونه‌برداری از چند ماده غذایی ۵۱
۶ـ۳ـ جابه‌جایی نمونه‌ها ۵۳
۶ـ۴ـ دریافت و نگهداری نمونه‌ها در آزمایشگاه ۵۴
۶ـ۵ـ آماده‌سازی نمونه برای آزمون‌های میکروبی ۵۴

فصل هفتم : روش‌های کشت میکروارگانیسم ۵۹
۷ـ۱ـ روش‌های کشت میکروارگانیسم‌های هوازی در محیط جامد ۵۹
۷ـ۲ـ کشت میکروارگانیسم‌های بی‌هوازی ۶۶
۷ـ۳ـ کشت خطی ۶۷
۷ـ۴ـ شمارش مستقیم میکروسکوپی یا گسترش برید ۷۱

فصل هشتم : آزمون‌های میکروبی مواد غذایی ۷۲
۸ـ۱ـ آزمون‌های میکروبی آب ۷۳
۸ـ۲ـ آزمون‌های میکروبی شیر ۹۴
۸ـ۳ـ آزمون‌های میکروبی پنیر ۱۰۱
۸ـ۴ـ آزمون‌های میکروبی شیرخشک ۱۰۲
۸ـ۵ـ آزمون‌های میکروبی فراورده‌های غلات ۱۰۵
۸ـ۶ـ آزمون اختصاصی جستجو و شمارش ویبریو پاراهمولیتیکوس در ماهی ۱۰۷
۸ـ۷ـ روش‌های شناسایی کپک‌ها و مخمرها در مواد غذایی ۱۱۱

فصل نهم : آزمون‌های میکروبی تعیین نوع و میزان آلودگی محیط کار ۱۱۹
۹ـ۱ـ آزمون‌های میکروبی تعیین نوع و میزان آلودگی محیط کار ۱۱۹
۹ـ۲ـ روش‌های تشخیص آلودگی میکروبی محیط کار ۱۲۲

کتابنامه ۱۲۴

پیش‌گفتار

در دنیای اندیشه‌ها و مشاهده‌های آدمی، قلمرو میکروارگانیسم‌ها بسیار گسترده است. میکروارگانیسم‌ها در همه‌جا حضور دارند، در محیط زیست، در اندام‌های انسان‌ها و سایر موجودات زنده و سطوح در تماس با موجودات زنده و چنانچه شرایط مساعد باشد، رشد و نمو و تکثیر نموده موجب بیماری‌های عفونی و مسمویت مصرف‌کننده از یک طرف و فساد مواد غذایی از طرف دیگر می‌شوند.

از طرفی از اوایل قرن بیستم و پیدایش و گسترش صنایع غذایی و تولید انبوه امکان به خطر افتادن سلامت مردم در ارتباط با میکروارگانیسم‌ها قوت گرفت و نیاز به ارزیابی وضعیت سلامت مواد غذایی چندین برابر گردید و با توجه به تأثیر متغیرهای گوناگون بر نتیجهٔ آزمون‌های میکروبی و در نتیجه ارزیابی و قضاوت، مسئولان وزارت بهداشت و وزارت آموزش و پرورش را بر آن داشت تا نسبت به ارائهٔ دوره‌های آموزشی و تألیف کتاب به نحو مؤثرتری اهتمام ورزند. از سویی آغاز هزارهٔ سوم با ظهور فناوری‌های نوین در عرصه‌های گوناگون و از جمله علوم زیستی و صنایع غذایی و روش‌های مدرن ارزیابی، دگرگونی‌های زیادی در سیستم نظارت و کنترل بوجود آورده است که برای انطباق با آنها لازم است هر آزمون کننده به مسئولیت‌ها و وظایف خود در این ارتباط آگاه باشد و مسئولیت‌ها و وظایف هنرجویان و سیستم‌های کنترل و نظارت را بشناسند.

در این کتاب سعی شده است که مطالب پیرامون موضوع هایی باشد که روش‌های آزمون میکروبی، علل استفاده از آنها، مراحل انجام آنها، تجزیه و تحلیل یافته‌های آنها با دقتی درخور توجه و به زبان ساده بیان شود.

به رغم تمام محدودیت‌ها و کاستی‌ها، امید است مجموعهٔ ارائه شده بتواند در جهت تعلیم روش‌های آزمون و فراگیر نمودن آن مؤثر واقع گردد.

موارد زیر از جمله اصولی هستند که در تدوین کتاب راهنمای معلم مورد توجه مؤلفان بوده است :

- تأکید بر سادگی و کاربردی بودن روش‌های آزمایش
- تکیه بر دقت، صحت، تکرارپذیری، سرعت، حساسیت و اختصاصی بودن
- قائل شدن مرز بین روش‌های خاص علمی و روش‌های کاربردی
- مبتنی ساختن روش‌ها بر پایهٔ سهولت انجام، اقتصادی بودن و مورد تأیید مجامع معتبر ملی و جهانی بودن

مقدمه

هدف اصلی کتاب میکروبیولوژی موادغذایی عملی، راهنمای معلم، ارائهٔ روش‌های پایه و در عین حال علمی‌و کاربردی و معرفی آن با جزئیات بیشتر به مربیان/هنرآموزان برای آموزش هنرجویان است. روش تعلیم و تعلم متن کتاب هم هنرآموزان و هم هنرجویان را قادر می‌سازد که بتوانند در مورد لزوم از منابع جامع تر و در سطح بالاتری استفاده نمایند.

هدف‌های جنبی کتاب عبارتند از :

- آگاهی و شناخت بیشتر هنرآموزان نسبت به مسائل مربوط به میکروبیولوژی مواد غذایی
- تفهیم آسان تر و بهتر موضوعات به هنرآموزان
- آگاه ساختن هنرآموزان نسبت به خطاهای معمول در انجام آزمون‌های میکروبی
- بالا بردن توان علمی و مهارتی هنرآموزان
- تأکید بر ارزش آزمون‌های میکروبی در ارزیابی وضعیت بهداشتی مواد غذایی و محیط کار
- تأکید بر جنبه‌های علمی و مفهومی و ادراکی
- و بالاخره تأکید بر ارزش مشاهده دقیق علمی به عنوان ابزار اساسی برای شناخت پدیده‌ها؛ که امروزه در تمام دنیا تقویت بنیهٔ مشاهده در کسانی که در برنامه‌های علمی‌اشتغال دارند از اولویت بسیار بالایی برخوردار است زیرا بر پایهٔ مشاهدهٔ دقیق افراد، انجام تفسیرهای منطقی و درست میسر می‌شود اما متأسفانه در بسیاری از موارد به دلیل کمبود و یا حتی نبود محتوای مناسب و دستور کار دقیق و علمی‌کار، انجام آزمون‌های عملی و مشاهدهٔ یافته‌های آنها به درستی انجام نمی‌گیرد و از طرفی موجب سردرگمی و خستگی کارکنان و ایجاد شدن یافته‌های نامنظم، پراکنده و غیر قابل اعتماد می‌شود. به عبارت ساده‌تر به‌ندرت کوشش‌های سازمان‌یافته و منظم برای آموزش فراگیران در مقاطع گوناگون صورت گرفته است.

برنامه‌های کیفی برای شناسایی روش‌های آزمون عملی به‌ویژه در ارتباط با کار با موجودات زنده و مشاهدهٔ علمی‌یافته‌ها نیاز به پاسخ‌گویی به سؤال‌های زیر است :

- کدام آزمون برای ارزیابی‌ها برگزیده شود
- هنگام انجام آزمون به چه نکاتی توجه شود
- مشاهدهٔ یافته‌ها چگونه انجام گیرد
- یافته‌ها چگونه تجزیه و تحلیل شوند

این کتاب بر اساس تجربیات عملی مؤلفان و روش‌های استاندارد ملی تدوین شده و امید است جوابگوی نیازهای هنرآموزان باشد. در این راستا مؤلفان بر آنند که بر اساس هدف اصلی کتاب به هنرآموزان و فراگیران کمک کنند تا از راه مشاهدهٔ دقیق و علمی‌و تجزیه و تحلیل درست به نتایج دقیق و علمی‌دست یابند.

در بخش اول کتاب مطالب عمومی و پایه مانند تهیهٔ محیط کشت برای رنگ‌سازی، سالم‌سازی محیط کار شامل سطوح، هوا، اندام‌های کارکنان، تنظیم دستگاه‌ها و تجهیزات آزمایشگاهی، شستشو و آماده‌سازی و سترون‌سازی وسایل مورد بررسی قرار خواهند گرفت.

در بخش دوم روش ارزیابی آب، شیر، موادغذایی و... مورد بررسی است.

و بخش سوم شامل ضمایم است.

سخنی با هنرآموزان

✓ پیش از تدریس هر یک از آزمون‌ها، هنرجویان را تشویق کنید که هدف از انجام آزمون‌ها، روش‌های انجامشان، مراحل اجرایی کار، محیط های کشت لازم، محلول‌ها، رنگ‌های بیولوژیک، دستگاه‌ها و لوازم مورد نیاز هر آزمون را به خوبی بشناسند.

✓ روش انجام کار را ابتدا به صورت شفاهی و سپس به شکل نمایشی برای هنرجویان توجیه کنید و تا زمانی که موضوع و روش آزمون به خوبی درک نشده و یا حین اجرای آن قطعی نشده کار را آغاز نکنند.

✓ حین انجام آزمون‌ها نحوهٔ کار هنرجویان را زیر نظر داشته باشید و بخشی از نمرهٔ هنرجویان را بر مبنای یافته‌های این مشاهده تعیین نمایید.

✓ به سؤال‌های هنرجویان به دقت گوش داده و به آنها پاسخ دهید و سعی کنید پاسخ‌های شما دقیق و مستدل و در عین حال مستند باشد و از اختصاص دادن وقت به‌این موضوع دریغ نورزید.

✓ سعی کنید با طرح سؤال‌های مناسب و به‌جا و مربوط به هر آزمون قوهٔ تخیل هنرجویان را تحریک و تقویت نمایید.

✓ در مواردی که چند روش آزمون وجود دارد مزایا و معایب هر یک را مورد بحث و تبادل نظر قرار دهید؛ به‌ویژه از نظر کاربردی بودن روش.

✓ به انتظارهای آموزشی هر بخش به دقت توجه کنید.

✓ هر یک از گزارش کارهای هنرجویان را به دقت مطالعه و در صورت نیاز اصلاح کرده و پیش از جلسهٔ بعدی آزمون به آنان برگردانید تا از خطای خود آگاه شوند و مطمئن باشند که حاصل زحمت آنها مورد بررسی و نقد قرار می‌گیرد.

✓ بدیهی است ارتباط حضوری و چهره به چهره با هنرجویان و ایجاد ارتباط عاطفی با آنان به مراتب اثربخش‌تر است و هنرجویان جوان، درس هنرآموزی را که با آنان عاطفی و مسئولانه برخورد کرده باشد بیشتر دوست دارند و عمیق‌تر می‌فهمند و بهتر عمل می‌کنند و در نتیجه بازدهی آن در محیط کار برایشان بیشتر است.

محتوای ارائه شده در کتاب را می‌توانید در صورت امکان به ۲۱ جلسه ۵ ساعته آزمایشگاهی در طول سال تحصیلی به شرح زیر تقسیم نمایید؛

جلسه اول ــ رعایت نکات ایمنی هنگام کار در آزمایشگاه میکروب‌شناسی مواد غذایی و معرفی لوازم شیشه‌ای

جلسه دوم ــ معرفی تجهیزات شامل گرمخانه، اتوکلاو، میکروسکوپ

جلسه سوم ــ سترون‌سازی سطوح، وسایل و اندام‌ها

جلسه چهارم ــ معرفی انواع آماده‌سازی محیط‌های کشت جامد و مایع و رقیق‌کننده‌ها و سترون‌سازی

جلسه پنجم ــ معرفی روش‌های رنگ‌آمیزی‌های مورد نیاز، طرز کار با میکروسکوپ

جلسه ششم ــ تهیه سوسپانسیون‌ها، روش‌های گوناگون کشت (خطی، جامد به مایع، مایع به جامد)

جلسه هفتم ــ آماده‌سازی نمونه‌های آزمایشگاهی، تهیه و قسمت‌های متوالی، کشت سطحی، کشت استاندارد، کشت حلقه‌ای، مشاهده نتیجه کار هفته پیش

جلسه هشتم ــ شمارش کلنی و محاسبه تعداد میکروب در نمونه هفته پیش

آزمون میکروبی آب، شمارش میکروبی به روش TC، MPN، برای کلیفرم‌ها با محیط مک کانکی یا ویولت ردبایل‌آگار

جلسه نهم ــ تهیه گزارش آزمون میکروبی آب، طرز استفاده از جداول MPN و شمارش مستقیم

جلسه دهم ــ آزمون میکروبی شیر، احیای رنگ، شمارش کلی، شمارش مستقیم

جلسه یازدهم ــ آزمون میکروبی شیر خشک و پنیر، آزمون شمارش اسپور باسیلوس‌ها

جلسه دوازدهم ــ گزارش یافته‌های هفته پیش، آزمون استافیلوکوک در خامه

دو گونه استاف از پیش آماده شده + رنگ‌آمیزی اسپور

جلسه سیزدهم ــ انجام تست کوآگولاز، کاتالاز، رنگ‌آمیزی استاف و یک باکتری گرم منفی

جلسه چهاردهم ــ آزمون میکروبی مرغ، شناسایی سالمونلا، مرحله اول انجام کشت خطی، شمارش مستقیم

جلسه پانزدهم ــ ادامه آزمون میکروبی مرغ مرحله دوم (غنی‌سازی اولیه)

جلسه شانزدهم ــ ادامه آزمون میکروبی مرغ مرحله سوم

جلسه هفدهم ــ ادامه آزمون میکروبی مرغ، مرحله چهارم، تست‌های بیوشیمیایی

جلسه هجدهم ــ بررسی یافته های آزمون میکروبی مرغ، آزمون میکروبی برنج پخته برای جستجو و شمارش با سیلوس‌سرئوس

جلسه نوزدهم ــ CFU[1] شمارش باکتری‌های غنی‌سازی اولیه، آزمون میکروبی برنج + کشت کپک‌ها از نمونه آرد و مخمرها از آبمیوه

جلسه بیستم ــ مشاهده کشت کپک‌ها و مخمرها + انجام آزمون اسلاید کالچر چند گونه کپک

جلسه بیست و یکم ــ رنگ‌آمیزی و مشاهده اسلاید کالچرها و شناسایی کپک مربوطه با استفاده از شکل‌های استاندارد

نحوهٔ ارزیابی هنرجویان

برای سهولت و دقت کار ارزیابی هنرجویان و امتیازدهی دقیق به کار آنان لازم است برای هر یک از آنان پوشهٔ جداگانه‌ای در نظر گرفته شده، نسخه‌ای از گزارش آزمون‌های انجام شده با درج تاریخ، خطاهای احتمالی، نقاط قوت و ضعف و امتیاز متعلقه در آن نگهداری شود تا هر زمان و به ویژه آخر دوره از چگونگی پیشرفت و مهارت و خلاقیت و همزمان سستی و ضعف از آن استفاده شود و به تناسب خطاهای احتمالی، تکلیف لازم برای رفع مشکل کارکردی هنرجویان داده شود.

تلاش مجدانه و صادقانهٔ شما در انجام این کار موجب فراهم شدن الگوی مناسب و دقیقی برای هنرجویان خواهد شد.

از هنرجویان هم بخواهید که از ابتدای کار فعالیت‌های عملی خود و نتیجهٔ آزمون و داوری و امتیاز شما را در آن ثبت نمایند.

در آخر دوره نوعی جمع‌بندی از مطالب دوره، میزان تلاش و علاقمندی هنرجویان، صحت، دقت و نظم و خلاقیت به‌عمل آورید.

به هنرجویان تذکر دهیدکه به مشاهدهٔ عینی و دقیق یافته‌ها توجه بیشتری مبذول دارند و از هرگونه قضاوت غیرمنطقی و غیر مستدل بپرهیزند.

ایمنی کار در آزمایشگاه میکروب شناسی واقدامات پیش‌گیری از آلودگی هنگام کار

طراحی این کتاب برابر با پیش نیازهای ایمنی مربوط به کار با میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. برای این منظور میکروارگانیسم‌ها را به ۴گروه خطر دسته بندی می‌کنند.

گروه خطر ۱(میکروارگانیسم‌های بدون خطر یا دارای خطر خیلی کم برای افراد یا جامعه)

این گروه میکروارگانیسم‌هایی هستند که بیماری‌زایی آنها برای انسان و حیوان به اثبات نرسیده است.

گروه خطر ۲(میکروارگانیسم‌های دارای خطر متوسط برای افراد و کم خطر برای جامعه)

میکروارگانیسم‌های این گروه برای انسان و حیوان بیماری‌زا بوده ولی احتمال ایجاد خطر آنها برای کارکنان آزمایشگاه، جامعه

۱ــ Colony Forming Unit

یا محیط کم است.

گروه خطر ۳ (میکروارگانیسم‌های پرخطر برای افراد و کم خطر برای جامعه)

میکروارگانیسم‌های این گروه بیماری‌زا بوده و برای انسان و حیوان خطر آفرین هستند ولی عامل عفونت از فردی به فرد دیگر منتقل نمی‌شود.

گروه خطر ۴ (میکروارگانیسم‌های پرخطر برای افراد وجامعه)

این گروه میکروارگانیسم‌هایی هستند که برای انسان و حیوان بیماری‌زا هستند و به آسانی از فردی به فرد دیگر به طور مستقیم یا غیرمستقیم منتقل می‌گردند و برای بیماری‌های ناشی از آنها درمان مؤثر در دسترس نیست و پیش‌گیری از انتقال آنها هم مشکل است.

در این کتاب آزمون‌های جستجو و شناسایی میکروارگانیسم‌های مربوط به گروه‌های خطر ۱، ۲ و ۳ ارائه شده است.

فصل اول

مقررات کار در آزمایشگاه میکروب‌شناسی

طراحی آزمایشگاه و فضای مورد نیاز

۱ــ۱ــ فضای مربوط به آماده سازی نمونه و آزمایش

برای داشتن یک فضای خوب و مناسب آزمایشگاهی باید برای قسمت‌های زیر فضای جداگانه‌ای در نظر گرفته شود.

ــ دریافت ونگهداری نمونه‌ها

ــ آماده‌سازی نمونه‌ها به ویژه مواد خام

ــ گرمخانه گذاری میکروارگانیسم‌ها

ــ نگهداری سویه‌های مرجع[۱] (سویه‌های میکروبی مرجع که از آزمایشگاه‌ها و مراکز پژوهشی معتبر تهیه می‌شوند)

ــ آماده سازی و سترون‌سازی محیط‌های کشت و وسایل مورد استفاده

ــ انبار محیط‌های کشت آزمایشگاهی، نشانگرها و رنگ‌ها

ــ شستشوی وسایل شیشه‌ای، فلزی و پلاستیکی

ــ انبار نگهداری مواد شیمیایی خطر ساز در اتاق‌ها و قفسه‌ها

ــ فضای عمومی

برای موارد زیر لازم است :

✓ ورودی، راه پله و آسانسور

✓ رخت‌کن و سرویس‌های بهداشتی

✓ انبار مواد و وسایل

✓ فضای عمومی‌مربوط به کارکنان وهنرجویان

به علاوه فضای کاری کافی به منظور حفظ شرایط پاکیزگی و نظم باید وجود داشته باشد. بهتر است این فضا با حجم آزمون‌های مورد نظر و تشکیلات داخلی آزمایشگاه تناسب داشته باشد.

۲ــ۱ــ مکان آزمایش

مکان انجام آزمون‌های میکروبی باید به گونه‌ای ساخته و مجهز شود که خطر آلودگی به وسیله گرد و غبار و میکروارگانیسم‌های

۱ــ Type culture

موجود را کاهش دهد. برای این منظور لازم است موارد زیر در نظر گرفته شود :

ــ دیوار و کف باید صاف باشد تا به سهولت قابل تمیز کردن شود.

ــ کف باید دارای شیب ۲٪ باشد تا از جمع شدن آب روی آن جلوگیری شود.

ــ کف نسبت به شوینده‌ها و سترون کننده‌ها مقاوم بوده و لغزنده نباشد.

ــ به منظور کم کردن جریان هوا هنگام آزمون، پنجره‌ها و درها باید به طور کامل بسته شوند تا از ورود هوای آلوده بیرون به داخل جلوگیری شود.

ــ برای آزمون‌هایی که باید در هوای با آلودگی کم انجام شوند باید از اتاقک ایمن[1] استفاده شود.

ــ استفاده از پرده برای شیشه‌ها و پنجره‌های آزمایشگاه مناسب نیست زیرا خود یک منبع ورود گرد و غبار و سایر عوامل آلوده‌کننده است.

نکته‌های لازم برای مجهز کردن آزمایشگاه

- ✓ دسترسی به آب سالم برای مصارف مورد نظرمانند شستشوی وسایل
- ✓ دسترسی به برق با ولتاژ مناسب
- ✓ وجود نور کافی و استاندارد در هر قسمت آزمایشگاه (راهروها ۱۱۰ لوکس، مکان آزمون ۳۰۰ لوکس، مکان‌های کار خیلی دقیق ۵۰۰ لوکس)
- ✓ میز کار و صندلی‌های آزمایشگاه باید دارای سطوح صاف و غیر قابل نفوذ باشد و به آسانی قابل تمیز کردن و سترون کردن باشد.
- ✓ در دسترس بودن وسایل آزمایشگاهی
- ✓ دسترسی به اتوکلاو برای از بین بردن مواد زاید و محیط‌های کشت آلوده
- ✓ فراهم کردن سیستم ایمنی برای خاموش کردن آتش، برق اضطراری، دوش اضطراری و وسایل شستشوی چشم
- ✓ فراهم کردن جعبه کمک‌های اولیه

۳ــ۱ــ تمیز کردن و ضد عفونی کردن سطوح کار

ــ کف، دیوارها، سقف، میز کار آزمایشگاه، وسایل و اتصالات آنها باید به طور منظم از نظر آلودگی کنترل شود زیرا ممکن است منبعی برای آلودگی باشند.

ــ سالم سازی سطوح با استفاده از مواد سترون کننده انجام شود.

ــ وضعیت آلودگی سطوح در تماس با هنرجویان و هنرآموزان و دانش آموزان باید به طور منظم بررسی شود (به فصل مربوط در همین مجموعه مراجعه شود).

۴ ــ۱ــ بهداشت کارکنان و دانش‌آموزان

به منظور پیشگیری از آلودگی نمونه‌ها، محیط‌های کشت آزمایشگاهی و خطر ابتلا به عفونت کارکنان و هنرجویان اقدامات زیر باید انجام شود :

- ✓ از روپوش، دستکش، کلاه و درصورت امکان کفش یکبار مصرف استفاده شود.

۱ــ Safety cabinet

✓ لباس آزمایشگاه باید خارج از محل کار و رخت کن پوشیده شود.
✓ ناخن‌ها باید تمیز و کوتاه نگه داشته شود.
✓ پیش و پس از انجام آزمون‌های میکروبی لازم است دست‌ها با آب ولرم و صابون مایع همراه با ماده سترون کننده مناسب مانند یدوفور[1] به خوبی شسته شوند. برای خشک کردن دست‌ها از یک خشک کن برقی یا دستمال و حوله یکبار مصرف استفاده شود.
✓ هنگام کار با نمونه‌ها، کشت‌ها و محیط‌های کشت از صحبت‌کردن، سرفه کردن و عطسه‌کردن خودداری شود.
✓ از خوردن، آشامیدن در آزمایشگاه و قراردادن مواد غذایی مورد مصرف در یخچال یا فریزر آزمایشگاه خودداری شود.
✓ از کشیدن سیگار در آزمایشگاه پرهیز گردد.
✓ از مکیدن مایعات آلوده و عفونت زا با پی‌پت، به وسیله دهان پرهیز شود.
✓ آزمون‌های آلوده‌کننده محیط باید به منظور جلوگیری از پراکندگی هاگ قارچ‌ها در اتاقک ایمنی انجام شود.
✓ ظرف های دارای محیط کشت میکروارگانیسم‌ها باید به طور واضح علامت گذاری شوند.
✓ هنگام جابه‌جایی تشتک‌هایی که داخل آنها بخار جمع شده و برای جلوگیری از انتشار آلودگی باید دقت عمل صورت گیرد.
✓ هنگام جابه‌جایی ظرف‌های شیشه‌ای باید دقت شود. اگر به هر دلیل ظرفی شکسته شود و محتوی آن روی لباس کار، میز کار آزمایشگاه یا سطوح دیگر ریخته شود، نسبت به زدودن آلودگی و سترون کردن محل هرچه زودتر اقدام نمود.

۵ــ۱ــ مقررات ایمنی

✓ هنگام وقوع هر حادثه‌ای نخستین هدف باید حفظ سلامتی فرد یا افراد مصدوم باشد. کمک‌های اولیه و اختصاصی پزشکی را باید در نظر گرفت واز حرکت دادن شخص مصدوم تا جای ممکن جلوگیری کرد.
✓ در صورت وجود و پراکندگی ذرات معلق در فضا لازم است منطقه آلوده ترک شود و تا زمان فرو نشستن ذرات روی زمین و سترون کردن محل از رفتن به آنجا خودداری شود.
✓ پس از وقوع هر حادثه باید گزارش کامل و جامعی با تمام جزییات واقعه تهیه و به مسئول مربوط ارائه شود.
✓ از قرار دادن مواد شیمیایی که احتمال واکنش بین مواد فرار آنها وجود دارد، خودداری شود.
✓ در نگهداری موادی که دارای بخارات سمی یا قابل اشتعال هستند دقت کامل به عمل آید.
✓ لوله‌های انتقال گاز از نظر امکان نشت مورد توجه قرار گیرد.
✓ از قرار دادن وسایل شکستنی و سنگین در قسمت‌های بالای قفسه‌ها جلوگیری شود.
✓ از علایم هشداردهنده در آزمایشگاه استفاده شود.
✓ هنگام استفاده از وسایل آزمایشگاهی به توصیه‌های سازنده توجه شود.
✓ هنگام کار با شعله گاز لازم است از ایجاد کوران جلوگیری به عمل آید و دقت شود که از خاموش شدن شعله نیز جلوگیری گردد.
✓ هنگام خروج از آزمایشگاه از بسته بودن شیر اصلی گاز، آب و خاموش بودن کلیه وسایل برقی بدون استفاده، اطمینان حاصل شود.

۱ــ Iodophore

فصل دوم

دستگاه‌ها و وسایل آزمایشگاه میکروبیولوژی

۱ــ۲ــ دستگاه‌ها و وسایل آزمایشگاه میکروب شناسی

وسایل آزمایشگاهی باید تمیز ودر محل مناسب نگهداری شوند و پیش از استفاده و طی زمان کاربری از سلامت و ایمنی آنها اطمینان حاصل شود. در ضمن هنگام انتخاب وسایل باید کاربری آسان،، سهولت تعمیر، تمیز کردن، سترون‌کردن و کالیبراسیون یا تنظیم آنها مورد توجه باشد.

۱ــ۱ــ۲ــ اتاقک‌های محافظ : منظور از اتاقک محافظ، یک محل کار با جریان هوای عمودی و افقی برای زدودن گرد و غبار و ذرات معلق مانند میکروب‌ها از هوا می‌باشد. برای اتاقک‌هایی که در میکروب‌شناسی به کار می‌روند تعداد ذرات معلق در هوا نباید بیش از ۴۰۰۰ در هر متر مکعب باشد. هنگام کار با پودرهای آلوده و میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا باید از اتاقک‌های ایمن استفاده کرد. (شکل ۱ــ۲)

شکل ۱ــ۲ــ اتاقک محافظ آزمایشگاه میکروب شناسی

نکته‌ها

✓ استفاده از شعله گاز در اتاقک‌های محافظ توصیه نمی‌شود و در صورت نیازمشعل گاز باید شعله کوچکی داشته باشد که سبب جریان شدید هوا نشود.

✓ از اتاقک‌های محافظ برابر با شرایط محیط آزمایشگاه و کاربرد مورد نظر استفاده شود. کارایی اتاقک‌های ایمن باید توسط افراد کارآمد و آزموده در فواصل زمانی معین مورد بررسی قرار گیرد.

✓ در اتاقک‌های محافظ نباید از وسایل اضافی استفاده شود. با وجود این لازم است پیش از انجام آزمون برای کم‌کردن حرکت دست به خارج و داخل اتاقک وسایل مورد نیاز را به نحوی درون آن قرار داد که اختلال در جریان هوا ایجاد نشود.

✓ پس از انجام آزمون، محیط کار بهتر است با استفاده از مواد سترون‌کننده غیر خورنده و مناسب سالم‌سازی شود (به فصل مربوطه در همین مجموعه مراجعه شود).

✓ شبکه‌های سیمی و فیلترها در اتاقک ایمن باید به طور منظم بازبینی شوند و با پارچه آغشته به مواد سترون‌کننده پاک شوند.

✓پس از تمیز کردن سطح می‌توان از لامپ‌های UV[1] (اشعه فرابنفش) برای سترون‌کردن هوا و سطوح استفاده نمود. برای آشنایی با مقررات انجام کار به فصل روش‌های سترون‌کردن مراجعه شود.

شکل۲ــ۲ــ ترازوی توزین با دقت ۰/۰۰۱

۲ــ۱ــ۲ــ ترازوها: ترازو ها بیشتر برای وزن‌کردن نمونه، مواد تشکیل‌دهنده محیط‌های کشت و واکنش‌گرها به کار می‌روند. علاوه بر آن ممکن است برای اندازه‌گیری حجم محلول‌های رقیق کننده برحسب جرم نیز به کار روند. نمونه مورد آزمون به مقدار مشخص وزن می‌شود و رقیق کننده به نسبت مورد نیاز به آن افزوده می‌شود. (به بخش تهیه رقت‌های متوالی مراجعه شود.)

دقت ترازوی آزمایشگاه میکروب شناسی باید مناسب با توزین‌های لازم باشد. دقت‌های حدود ۰/۰۱ یا ۰/۰۰۱ برای این منظور مناسب است. بیشینه خطای مجاز هنگام توزین نمونه باید کمتر از ۰/۰۰۱ باشد.

نکته‌ها

✓ ترازو را باید روی سطح افقی قرار داد و برای اطمینان از تراز بودن آنها را تنظیم کرد و از لرزش و کوران هوا حفاظت کرد.

✓ کارآیی ترازو باید به طور منظم در طی استفاده و پس از تمیز کردن با وزنه‌های کنترل و توسط افراد آزموده بررسی شود. کالیبراسیون باید در فواصل زمانی معین با توجه به کارکرد دستگاه انجام شود.

✓ ترازو را پس از استفاده یا ریختن مواد در حال توزین، لازم است با یک ماده پاک کننده مناسب و غیر خورنده، سالم سازی نمود.

✓ برای توزین نمونه‌ها ترازوی با حساسیت ۰/۱ تا ۰/۰۱ گرم و با مقدار ۲۰۰ گرم مورد نیاز است.

✓ ترازوها باید دارای گواهی کالیبراسیون از شرکت‌های معتبر باشند.

✓ کلیه وسایلی که برای توزین نمونه به کار می‌رود باید از پیش سترون شده باشد. بهتر است برای این منظور یک فویل آلومینیومی را روی سرپوش ظرف‌های شیشه‌ای که نمونه‌ها در آنها ریخته می‌شود قرار داد و ظرف و فویل را با هم استریل کرد. سپس فویل را برداشته روی ترازو قرار داد و از آن برای توزین نمونه روی ترازو استفاده نمود.

۳ــ۱ــ۲ــ همگن کننده، خرد کن[2] و مخلوط کن[3]: این دستگاه‌ها برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه از فرآورده‌های غیرمایع استفاده می‌شوند.

انواع همگن کننده‌ها عبارتند از :

الف) خردکن یا مخلوط کننده چرخشی[4]: با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه و ۴۵۰۰۰ دور در دقیقه با ظرف‌های در پوش شیشه‌ای یا فلزی قابل سترون کردن

ب) تکان دهنده‌های مکانیکی[5]: مناسب برای یکنواخت‌کردن محتوای ظرف‌ها

۱ــ Ultra Violet

۲ــ Blender

۳ــ Mixer

۴ــ Rotary homogenizer

۵ــ Mechanical homogenizer

پ) مخلوط کننده ضربه‌ای[1] : با کیسه‌های سترون و مجهز به وسیله تنظیم کننده سرعت و زمان

ت) مخلوط کننده ارتعاشی[2]

نکته‌های مهم در استفاده از مخلوط کن‌ها

✓ در مخلوط کن ضربه‌ای زمان مخلوط کردن برای مواد غذایی خاص به طور معمول ۱تا ۳ دقیقه می‌باشد.

یادآوری : از همگن‌کننده‌های ضربه‌ای برای آزمون فرآورده‌های غذایی زیر استفاده نشود :

۱ــ فرآورده‌هایی که احتمال سوراخ کردن کیسه را دارند.(دارای قطعات تیز، سخت و خشک)

۲ ــ فرآورده‌هایی که به دلیل داشتن بافت خاص یکنواخت کردن آنها مشکل است مانند سوسیس و کالباس خشک

✓ در مخلوط کن چرخشی تعداد چرخش‌ها باید بین ۱۵۰۰۰تا ۲۰۰۰۰ باشد. حتی با مخلوط کردن کند، این زمان نباید بیش از ۲/۵ دقیقه باشد.

✓ مخلوط کن ارتعاشی را می‌توان برای بیشتر مواد غذایی شامل فرآورده‌های سخت و خشک استفاده کرد. زمان مخلوط کردن به طور معمول۱ تا ۵ دقیقه باشد.

✓ مخلوط کن‌های ضربه‌ای و مخلوط کن‌های ارتعاشی را به طور منظم و پس از هر بار سرریز شدن مواد از کیسه یا نشت کردن مواد، باید تمیز و سترون کرد.

✓ ظرف شیشه‌ای یا فلزی مخلوط کن‌های چرخشی، پس از هر بار استفاده باید تمیز و سترون شود.

✓ این دستگاه‌ها را باید با دستورکار سازنده بررسی و نگهداری نمود.

✓ جهت یکنواخت کردن و هم‌زدن نمونه‌های رقیق شده بهتر است از لوله‌ها و ظرف‌های سرپوش‌دار استفاده کرد تا هنگام مخلوط کردن با همزن‌ها محتوی آنها به بیرون سرازیر نشود.

شکل۳ــ۲ــ خرد کن و مخلوط کن

شکل۴ــ۲ــ مخلوط کن ارتعاشی

ث) مخلوط کن گردابی (ورتکس)[3] : این دستگاه تهیه مخلوط یکنواختی از محیط کشت مایع (مانند رقت‌های متوالی که در فصل‌های بعدی شرح داده خواهند شد) و نمونه‌های مایع و یا سوسپانسیون سلول‌های باکتری در یک مایع را آسان می‌کند. در این دستگاه مخلوط کردن با واسطه حرکت چرخشی گریز از مرکز محتویات لوله یا ظرف، انجام می‌شود و چرخش گرداب مانند به وجود می‌آورد.

۱ــ Peristaltic blender

۲ــ Vibrator

۳ــ Vortex

شکل۵ــ۲ــ مخلوط کن گردابی

برای کار با ورتکس باید لوله یا ظرف های دارای مایع را برای مخلوط کردن به سر مخلوط کن فشار داد. سرعت مخلوط کردن به وسیله تغییر سرعت موتور یا زاویه تماس با سر مخلوط کن کنترل می‌شود.

نکته‌ها

✓ هنگام مخلوط کردن لازم است از سر ریز شدن محتوی لوله یا ظرف‌ها اطمینان حاصل شود. برای این منظور نباید بیش از دوسوم گنجایش آنها پر شود. برای کنترل بهتر لوله و جلوگیری ازبالا رفتن بیش از حد مایع درون لوله، باید آن را ازحدود یک سوم بالای لوله نگه داشت.

✓ پس از مخلوط کردن، برای کاهش انتشار گرد و غبار در هوا، در پوش ظرف یا لوله را باید با احتیاط باز کرد.

یادآوری : مشاهده گرداب در مایع درون لوله، از سر تا ته آن نشان دهنده کافی بودن مخلوط کردن است.

شکل۶ــ۲ــ اتوکلاو

۴ــ۱ــ۲ــ اتوکلاو[1] : اتوکلاوها برای سترون کردن وسایل و موادی به کار می‌روند که ممکن است توسط میکروارگانیسم‌های خطرناک گروه ۱و۲ و۳ آلوده شده باشند. استاندارد حاضر، اتوکلاوهای مورد استفاده برای سترون کردن مواد آلوده شده توسط میکروارگانیسم‌های خطرناک گروه ۴ را که در مورد آنها کنترل و سترون کردن کامل ضروری می‌باشد، در بر نمی‌گیرد. اتوکلاو دستگاهی است که باعث ایجاد بخار آب اشباع شده و فشرده درون یک محفظه می‌شود و برای از بین بردن میکروارگانیسم‌ها چه سلول‌های رویشی و چه آندوسپور باکتری‌ها به کار می‌رود.

کاربردهای مهم اتوکلاو شامل :

الف) سترون کردن مایعات و محیط‌های کشت

ب) سترون کردن وسایل و ظرف‌های شیشه‌ای و فلزی

پ) ایمن سازی مواد و وسایل آلوده

الف) سترون کردن مایعات : فرآیند سترون کردن مواد مایع مانند محیط‌های کشت و رقیق کننده‌ها در ظرف‌های مختلف مانند ارلن، لوله‌های آزمایش و ظرف‌های شیشه‌ای. هنگام آزمون‌های میکروبی باید کلیه محیط‌های کشت و رقیق‌کننده‌ها عاری از هر نوع میکروب باشند. از مهمترین مراحل آماده‌سازی محیط های کشت سترون سازی آنها است که توسط اتوکلاو این کار انجام می‌شود.

نکته : چون برخی از اجزای تشکیل‌دهنده محیط‌های کشت، نسبت به گرما حساس هستند، کنترل‌های زمان و دمای اتوکلاو کردن باید به نحوی باشد که استفاده کننده بتواند ویژگی‌های دوره کاری را هر بار انتخاب کند. دستورکار سازنده این‌گونه محیط‌ها نیز باید مورد توجه قرار گیرد.

ب) سترون کردن وسایل و ظرف‌های شیشه‌ای : فرآیندی که به سترون کردن وسایل جامد تمیز محدود می‌شود. مانند سترون‌سازی همه وسایل شیشه‌ای یا فلزی که پیش از انجام آزمون‌های میکروبی باید انجام شود. مانند سترون‌سازی لوله‌های آزمایش، بطری‌ها و ارلن‌ها.

پ) ایمن سازی مواد و تجهیزات آلوده : عبارت است از فرآیند کاهش میکروب‌ها، به نحوی که بتوان آنها را بدون ترس از

۱ــ Autoclave

احتمال خطر عفونت یا آلودگی محیطی مورد استفاده قرار داده یا جا به جا نمود. این موارد ممکن است شامل ظرف‌های یکبار مصرف باشد که باید دور ریخته شوند ، برای نمونه لوله‌های دارای نمونه (لوله آزمایش پلاستیکی) و تشتک‌های دارای محیط کشت میکروبی ممکن است شامل مواردی برای تمیز کردن، سترون‌کردن و استفاده دوباره باشند ، مانند ظرف‌های شیشه‌ای و فلزی.

● ***طراحی محل نصب***

ــ اتوکلاوها بیشتر سنگین و حجیم می‌باشند. بنابراین هنگام انتخاب محل برای نصب آنها باید قابلیت دسترسی به دستگاه وکاربری آسان آن مورد توجه قرار گیرد. همچنین ظرفیت اتوکلاو، فضای محل نصب، طراحی محل بارگذاری و نحوه بارگذاری (از قسمت جلو یا بالا) نیز باید در نظر گرفته شود.

ــ اتوکلاوها باید به نحوی نصب شوند که سرویس آنها آسان باشد. نصب اتوکلاو در نزدیکی یک دیواره خارجی موجب سهولت تخلیه و تهویه می‌گردد.

ــ اتوکلاوهای ویژه سترون کردن مواد آلوده باید به راحتی در دسترس بوده و در داخل یا نزدیکترین فاصله ممکن به منطقه‌ای قرار گیرند که مواد آلوده باید بررسی و سامان دهی شوند.

نکته : توصیه می‌شود از جابه جایی مواد آلوده و عبور دادن آنها از اتاق‌هایی که این‌گونه مواد در آنها نگهداری نشده یا روی آنها کاری صورت نمی‌گیرد ، خودداری شود.

ــ نصب اتوکلاو در محلی که در آن محیط‌های میکروبیولوژی تهیه می‌شوند، ضروری می‌باشد. دسترسی به محل بارگذاری و تخلیه مواد ، مایعات و لوازم سترون شده (مواد دورریختنی آلوده را شامل نمی‌شود) باید به طورمستقیم از محل تهیه محیط‌های کشت صورت گیرد.

● ***گرما و تهویه :*** اتوکلاوها پس از یک دوره کاری و به هنگام خالی‌کردن، مقداری بخار، گرما و بوی نامطلوب در فضا پخش می‌کنند. بنابراین برای حفظ جریان هوای مطلوب در نزدیکی اتوکلاو ، تهویه مکانیکی ضروری می‌باشد. در طراحی سیستم تهویه باید بازده انرژی اتوکلاو و تأثیر آن بر محیط کار ، مورد توجه قرار گیرد.

قسمت‌های مختلف دستگاه اتوکلاو

الف) دریچه اطمینان

ب) شیر تخلیه آب

پ) شیر خروجی بخار

ت) شیر ورودی هوای فشرده

ث) وسیله تنظیم دما و حفظ آن تا $\pm 3^{\circ}C$

ج) دماسنج یا ترموکوپل ثابت

چ) فشارسنج

به علاوه اتوکلاو بهتر است به ثبت کننده دما و زمان مجهز باشد.

هنگام کار با اتوکلاو باید به موارد زیر توجه کرد :

۱ــ هنگام سترون سازی با بخار آب لازم است تمام هوای موجود در دستگاه را پیش از بالا رفتن فشار از دستگاه خارج کرد، در غیر این صورت دمای لازم تأمین نمی‌شود.

۲ــ دمای بخار آب اشباع شده در محفظه باید حداقل $121^{\circ}C$ باشد.

۳ــ فشار بخار آب باید ۱۵ پوند بر اینچ مربع باشد.

۴ــ هنگامی‌که دمای اتوکلاو به $121^{\circ}C$ رسید زمان سترون کردن آغاز می‌شود. اگر هوای داخل اتوکلاو به خوبی خارج نشود، گرچه ممکن است فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع باشد اما ممکن است دما به $121^{\circ}C$ نرسد.

۵ ــ باید مراقب بود در محفظه اتوکلاو آب به‌اندازه کافی وجود داشته باشد در غیر این صورت مواد و اجزای داخل آن آسیب می‌بیند.

۶ــ برای سترون سازی مایعات به ویژه محیط های کشت مایع، بهتر است آنها را در ظرف‌های شیشه‌ای در پوش دار سالم‌سازی نمود.

۷ــ پس از مدت طولانی کار با اتوکلاو، مواد آلی و معدنی در محفظه ته‌نشین می‌شوند و بهتر است هر دو یا سه ماه یکبار مقداری آب در اتوکلاو ریخته و اتوکلاو را به دمای جوش رسانده، شیر تخلیه اتوکلاو را باز نگه داشت تا مواد ته نشین شده خارج شود.

نکته‌های ایمنی هنگام کار با اتوکلاو

✓ از اتوکلاو نباید برای سترون‌سازی وسایل تمیز و محیط های کشت آماده شده، همراه با وسایل آلوده به طور همزمان استفاده شود.

✓ وسایل و مواد داخل اتوکلاو تا رسیدن به دمای کمتر از $80^{\circ}C$ نباید از آن خارج شود.

✓ هنگام باز کردن درب اتوکلاو بهتر است کاربر در یک طرف بایستد و درب را طوری باز کند که بخار به صورت او بر خورد نکند.

✓ اگر داخل محفظه، ظرف‌ها دارای مواد مایع باشند، کاهش ناگهانی فشار باعث جوش آمدن آنها شده و در پوش آنها با شدت به خارج پرتاب می‌شود. بنابراین فشاررا به ویژه هنگام سترون سازی مایعات باید به تدریج کاهش داد و یا از هوای فشرده استفاده کرد.

✓ هنگام پایان کار اتوکلاو پیش از خروج لوازم و محیط‌ها بهتر است از جدا بودن سیم برق از دستگاه اطمینان حاصل شود.

رعایت نکته‌های لازم هنگام پایان عمل سترون سازی و باز کردن درب اتوکلاو

الف) اطمینان از بسته بودن دریچه ورودی بخار

ب) بسته نگاه داشتن شیر خروجی بخار تا زمانی که فشار به صفر برسد.

پ) پس از سترون سازی و پیش از جابه جایی مواد و وسایل بهتر است درون اتوکلاو خنک شوند.

نگهداری و کالیبراسیون اتوکلاو : محفظه داخلی دستگاه، فیلتر، شیر تخلیه آب و درزگیرهای دستگاه را باید به طور منظم تمیز کرد. اتوکلاو باید در وضعیت مطلوب نگهداری شود و به طور دائم عملکرد آن ارزیابی شود. بهتر است حس‌گرهای دما به منظور نشان دادن نفوذ کافی به مقدارلازم در جاهای گوناگون دستگاه قرار داده شوند.

۵ ــ۱ــ۲ــ گرمخانه یا انکوباتور[۱] : گرمخانه، همانطور که در شکل (۷ــ۲) نشان داده شده، عبارت است از اتاقک عایق‌بندی شده با قابلیت نگهداری دمای ثابت و توزیع یکنواخت دما با کمترین خطای مجاز در مقدار نوسانات دمایی تعیین شده است که برای کشت و نگهداری میکروارگانیسم‌ها در شرایط دمایی خاص به کار می‌رود. هر گرمخانه باید مجهز به یک ترموکوپل باشد تا دما یا سایر متغیرها را در کل حجم‌کاری ثابت نگه دارد. اگر دمای محیط نزدیک یا بالاتر از دمای گرمخانه باشد لازم است به یک سیستم خنک‌کننده نیز مجهز باشد.

۱ــ Incubator

نکته‌ها

✓ دیواره‌های گرمخانه باید از تابش نور خورشید محافظت شوند.

✓ در صورت امکان در هر دوره کار با گرمخانه، محفظه را باید به طور کامل پر کرد زیرا محیط‌های کشت برای رسیدن به دمای تعادل زمان طولانی و حدود ۲ ساعت را طی می‌کنند تا به دمای مورد نظر برسند.

✓ چیدمان تشتک‌ها[1] در گرمخانه باید به گونه‌ای باشد که فاصله بین آنها و دیواره گرمخانه از ۲/۵ سانتی‌متر کمتر نباشد.

✓ اتاقک های گرمخانه باید به خوبی عایق بندی شوند و مجهز به سیستم پخش دما وگردش هوا باشند.

✓ از باز گذاشتن درب گرمخانه به مدت طولانی باید خودداری شود.

✓ گرمخانه باید در مکانی قرار گیرد که در مواقع مختلف سال دمای آن بین ۲۷ـ۱۶ درجه سانتی‌گراد باشد.

✓ میزان رطوبت داخل گرمخانه باید کمتر از حدی باشدکه باعث کندانسه شدن یا تراکم قطره‌های آب روی ظرف‌ها و کشت‌های میکروبی شود. از طرفی رطوبت باید در حدی باشد که ظرف‌های دارای محیط کشت آگار بیش از ۱۵٪ رطوبت خود را در مدت ۴۸ ساعت از دست ندهند.

شکل۷ـ۲ـ نوعی گرمخانه ویژه آزمایشگاه میکروب شناسی مواد غذایی

✓ دیواره‌های درونی و بیرونی گرمخانه به طور منظم تمیز و بهسازی شود و گرد و غبار از سیستم تهویه آن پاک شود.

✓ برای کنترل دمای داخل گرمخانه دماسنجی باید در محل مناسب داخل گرمخانه قرار داده شود و محدوده عملکرد قابل قبول گرمخانه تعیین گردد.

✓ دمای گرمخانه را باید هر روز کنترل نمود. برای این منظور باید در هر گرمخانه یک یا چند دماسنج که حباب آن درون ظرف دارای گلیسرول باشد قرار داد.

✓ تشتک‌ها باید به صورت وارونه در داخل گرمخانه قرار گیرند یعنی درپوش آنها بر روی سطح قرار داشته باشد و پشت آنها به بالا. این کار از کندانسه شدن قطره‌های بخار آب در داخل آنها جلوگیری می‌کند.

۶ـ۱ـ۲ـ یخچال : یخچال وسیله‌ای برای نگهداری نمونه‌ها در دمای پایین است. دمای نگهداری مواد مورد آزمون به جز در موارد خاص، باید $2^{\circ}C$- تا $3^{\circ}C$ باشد. برای پیشگیری از آلودگی‌های ممکن و به منظور جداسازی فیزیکی، از اتاقک های مختلف یا ظرف های مختلف برای نگهداری موارد زیر استفاده می‌شود :

الف) محیط های کشت تلقیح نشده، رقیق کننده‌ها و معرف‌ها

ب) نمونه‌های مواد غذایی

پ) کشت‌های میکروبی

بهتر است نمونه‌های میکروبی و آلوده را در یک یخچال و نمونه‌های سالم و محیط های کشت سترون شده را در یخچال دیگری قرار داد.

نکته‌ها

✓ دمای داخل یخچال را باید با یک دماسنج که به طور ثابت نصب شده است کنترل کرد.

✓ پیش از قرار دادن تشتک ها ونمونه‌ها در یخچال سطح آن باید با پنبه و الکل اتیلیک ۷۰٪ تمیز و سالم سازی شود.

✓ وسایل را باید به گونه‌ای در یخچال قرار داد که گردش هوای مناسب ایجاد شده و خطر آلودگی کم شود.

۱ـ Petridishe

۷ــ۱ــ۲ــ فریزر : فریزر اتاقکی است که نگهداری مواد در شرایط منجمد را امکان‌پذیر می‌سازد و دمای آن جز در موارد مشخص شده باید کمتر از $18^{\circ}C-$ باشد.

فریزر جهت نگهداری موارد زیر به کار می‌رود :

الف) واکنش‌گرهای تلقیح نشده

ب) نمونه‌های مورد آزمون

پ) کشت میکروارگانیسم‌ها

وسایل را باید به گونه‌ای در فریزر قرار داد تا دمای مورد نظر حفظ شود، به ویژه وقتی فرآورده‌های غیر منجمد در آن قرار داده می‌شود.

۸ ــ۱ــ۲ــ حمام مایع[1] یا بن ماری : حمام با دمای ثابت که با یک مایع مانند آب یا اتیلن گلایکول یا روغن پر می‌شود و دارای درب جهت محدود ساختن تبخیر است و به منظور ثبت دمای مشخص به کار برده می‌شود. حمام‌های درپوش دار برای دماهای بالاتر استفاده می‌شوند. درپوش آن به گونه‌ای طراحی شده که مانع چکیدن قطره‌های ناشی از بخار آب بر روی وسایل درون آن شود.

حمام مایع در موارد زیر کاربرد دارد :

الف) گرمخانه‌گذاری محیط‌های کشت تلقیح شده که باید در دمای ثابت قرار داده شوند.

ب) نگهداری محیط‌های کشت جامد سترون و ذوب شده پیش از ریختن آنها در تشتک.

پ) تعدیل دمای محیط کشت جامد ذوب شده و سترون برای استفاده در تهیه برخی از محیط‌های کشت مانند محیط کشت آگار خوندار که ابتدا محیط کشت آگار آماده شده و سترون شده باید در حمام مایع به دمای معین برسد و سپس خون به محیط آگار افزوده شود.

شکل ۸ ــ۲ــ بن ماری

ت) آماده سازی سوسپانسیون‌های اولیه یا محلول‌ها در دمای کنترل شده

نکته‌ها

✓ در صورت ضرورت کنترل دقیق دما، حمام باید به پمپ گردش آب و سیستم تنظیم کننده دمای خودکار مجهز باشد.

✓ حرکت مایع درون حمام نباید به گونه‌ای باشد که سبب پاشیده شدن قطره‌های آب به اطراف شود.

✓ محیط‌های کشت تلقیح شده را باید به گونه‌ای در حمام قرار داد که حداقل ۲ سانتی‌متر پایین‌تر از سطح مایع درون حمام باشد.

✓ عمق مایع حمام اندازه‌ای باشدکه آب از در پوش ظرف‌ها وارد آنها نشود.

✓ برای نگهداری وسایل درون حمام می‌توان از نگهدارنده‌ها استفاده کرد.

✓ ظرف‌ها و وسایلی که از حمام خارج می‌شوند باید پیش از استفادهٔ بعدی خشک شوند. بهتر است پس از خروج از حمام و پیش از استفاده دوباره خشک شوند.

۱ــ Control bath

✓ دمای حمام باید با استفاده از یک دماسنج یا ترموکوپل تنظیم وتثبیت شود.

✓ برای نگهداری محیط‌های کشت بهتر است از آب مقطر استفاده شود.

✓ هنگام تماس با مایع درون حمام بهتر است از قطع برق سیستم اطمینان حاصل کرد.

✓ سطح مایع حمام برای اطمینان از کارکرد درست و شناوری صحیح وسایل قرار گرفته در آن بایدبه طور منظم کنترل شود. سطح مایع باید همیشه المنت‌های گرم کننده را بپوشاند.

یادآوری : حمام مایع بهتر است با مایعی که کارخانه سازنده آن توصیه کرده پر شود و به طور منظم سطح مایع درون آن کنترل شود.

۹ــ۱ــ۲ــ آون‌سترون‌سازی[1] : اتاقکی است که قابلیت تثبیت دمای C°۱۸۰ــ۱۶۰ و خشک را برای از بین بردن میکروارگانیسم‌ها دارد. آون باید مجهز به یک دماسنج یا ترموکوپل و نشانگر زمان باشد. آون تنها برای سترون‌سازی وسایل مقاوم به گرمای خشک، مانند وسایل فلزی (جای پیپت‌ها و جای لوله‌های آزمایش) وشیشه‌ای (ارلن، بشر، استوانه‌های مدرج و پیپت‌ها) استفاده می‌شود.

نکته‌ها

✓ پیش از سترون سازی وسایل، لازم است به خوبی تمیز شوند.

✓ وقتی شرایط دمایی بر قرار شد، روند سترون سازی باید برای مدت کمتراز ۱ ساعت در دمای C° ۱۷۰ ادامه یابد.

✓ پس از سترون‌سازی به منظور پیشگیری از شکستن ظرف‌های شیشه‌ای بهتر است پیش از خارج کردن آنها از آون، آنها را خنک کرد.

یادآوری : برای برداشتن ظرف های سترون شده و داغ باید از دستکش های ویژه استفاده کرد.

شکل ۹ــ۲ــ آون سترون‌سازی

۱۰ــ۱ــ۲ــ پرگنه شمار[2] : دستگاه های شمارشگر دستی هستند که دارای یک وسیله شمارشگر حساس به فشار و یک شمارنده دیجیتال می باشند که با هر فشار پشت تشتک یک صدای خفیف ایجاد می‌کند. همانطور که در شکل (۱۰ــ۲) نشان داده شده است این دستگاه‌ها ممکن است یک وسیله ساده مانند قلم یا یک صفحه مدرج نورانی برای تشتک همراه با بزرگ نمایی تصویر برای کمک به شمارش پرگنه‌ها یا کلنی ها باشند. شمارشگرهای کلنی الکترونیکی خودکار (دیجیتال)که تصویر ایجاد شده را ثبت می‌کنند به وسیله ترکیبی از سیستم‌های سخت افزاری و نرم افزاری با استفاده از دوربین و نمایشگر عمل می‌کنند. پرگنه شمار همانطور که از نامش مشخص است وسیله‌ای برای شمارش پرگنه‌های باکتری ها در محیط های کشت میکروبی است.

شکل ۱۰ــ۲ــ نوعی پرگنه شمار

۱ــ Sterilizing oven

۲ــ Colony counter

پرگنه شمار دستی از یک ذره‌بین، صفحه مدورتقسیم شده به اشکال مربع شکل، شمارشگر و یک لامپ برای روشن شدن محیط تشکیل شده است. تشتک مورد نظر بر روی صفحه مدور قرار گرفته، لامپ روشن می‌شود و فرد شمارش کننده با فشار انگشت روی دگمه شمارشگر موجب ثبت تعداد پرگنه‌ها روی نمایشگر می‌شود. وجود اشکال مربع شکل موجب دقت بیشتر و جلوگیری از خطا در شمردن پرگنه‌ها می‌گردد.

نکته‌ها

✓ پیش از انجام کار حساسیت شمارشگر کلنی خودکار را تنظیم کرده تا از شمارش تمام کلنی‌های مورد نظر اطمینان حاصل شود.

✓ شمارشگر کلنی خودکار باید هر روز با استفاده از یک تشتک کالیبره شده با تعداد مشخص ذرات یا کلنی‌های شمارش شده، کنترل شود.

✓ برای اطمینان از دقیق بودن شمارش‌های به دست آمده از پرگنه شمار، شمارش‌ها باید در فواصل منظم به صورت دستی کنترل گردد.

✓ دستگاه باید به طور دایم تمیز و از آلوده شدن به گرد و غبار حفظ شود.

۱۱ــ۱ــ۲ــ سانتریفوژ[1] : سانتریفوژها وسایل مکانیکی یا الکتریکی هستند که با استفاده از نیروی گریز از مرکز، ذرات معلق، مانند میکروارگانیسم‌ها را از مایعات جدا می‌کنند. در برخی موارد حذف آب محیط میکروارگانیسم‌ها به صورت ایجاد رسوب به وسیله سانتریفوژ کردن نمونه‌های مایع انجام می‌شود و این مایع دوباره رقیق شده و برای آزمون‌های بعدی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

شکل ۱۱ــ۲ــ سانتریفوژ

نکته‌ها

✓ برای پیشگیری از تولید آئروسل‌ها (ذرات موجود در گرد و غبار) و اثر آلودگی‌های مواد و وسایل روی هم از راه کاربرد درست سانتریفوژ باید اقدامات لازم انجام گیرد.

✓ باید از لوله‌ها و ظرف‌های ویژه سانتریفوژ که درب دار و سترون شده هستند، استفاده شود.

✓ در مواردی که سرعت سانتریفوژ دارای اهمیت است و یا برای موارد ویژه، میزان آن مشخص شده، بهتر است سرعت سانتریفوژ به طور منظم و پس از هر بار تغییر دوباره کالیبره شود.

✓ پس از هر بار استفاده از سانتریفوژ برای نمونه‌های میکروبی بهتر است سانتریفوژ تمیز و سترون شود.

۱۲ــ۱ــ۲ــ وسایل کشت در شرایط اتمسفر تغییر یافته[2] **:**

جار بی هوازی[3] : این وسیله ممکن است یک جار غیر قابل نفوذ یا هر وسیله مناسب دیگری باشد که بتواند به‌ایجاد شرایط اتمسفر تغییر یافته (مانند شرایط بی‌هوازی برای باکتری‌های بی‌هوازی) در طی مدت گرمخانه‌گذاری محیط کشت کمک کند. ترکیب اتمسفر می‌تواند به وسیله افزودن مخلوطی از گازها پس از تخلیه هوای جار و جایگزینی اتمسفربا استفاده از سیستم گاز ساز[4]

۱ــ Centrifuge

۲ــ Modified atmosphere

۳ــ Anaerobic Jar

۴ــ Gas pack

یا به طور بسیار ساده‌تر از راه روشن کردن یک شمع در جار و بستن درب آن انجام شود. (شمع تا زمانی روشن می‌ماند که داخل جار اکسیژن موجود باشد.)

یادآوری : این روش نمی‌تواند شرایط بی هوازی مطلق به‌وجود آورد و توان آن تا ایجاد شرایط بی هوازی اختیاری است.

طرز کار بسته گاز : این بسته ها دارای پوشش‌های پخش‌کننده گازی و پودر پالادیوم (کاتالیزور) است. برای استفاده از این بسته، تشتک‌های کشت شده درون جار قرار داده می‌شوند و با توجه به‌اندازه جار ممکن است ۱تا ۳پوشش پخش‌کننده گازی برای ایجاد شرایط بی‌هوازی استفاده شود. همانطور که در شکل (۱۲ــ۲) نشان داده شده است،این پوشش‌ها باز شده و به صورت عمودی در جار قرار داده می‌شوند. سپس ۱۰ میلی لیتر آب مقطر به آنها اضافه می‌شود و در نهایت درپوش جار بسته می‌شود. آب در پوشش با یک قرص سدیم بور هیدرید واکنش می‌دهد و هیدروژن تولید می‌کند و هیدروژن با اکسیژن ترکیب شده (در حضور کاتالیزور پالادیوم) و آب تولید می‌کند و اکسیژن از محیط حذف می‌شود. به علاوه پوشش پخش کننده دارای سدیم بی‌کربنات به اضافه اسیدسیتریک است که در حضور آب تولید CO_2 می‌کنند. دی‌اکسیدکربن برای رشد برخی از باکتری‌های بی هوازی تحریک کننده رشد است. در آخر سیستم جار آماده شده در گرمخانه قرار می‌گیرد.

شکل ۱۲ــ۲ــ جار بی هوازی همراه با بسته‌های گاز ساز

۱۳ــ۱ــ۲ــ توزیع کننده درون تشتک[1] : این دستگاه برای توزیع نمودن مایع، نمونه رقیق شده و نمونه یکنواخت شده بر روی یک محیط کشت جامد و سپس شمارش کلنی‌ها پس از گرمخانه گذاری به کار می‌رود. ابتدا حجم از پیش تعیین شده مایع را از بالای سطح یک تشتک آگار در حال چرخش در آن می‌ریزند.

بر طبق شکل (۱۳ــ۲) توزیع مایع به وسیله حرکت از مرکز تشتک به طرف لبه خارجی با افزایش شعاع چرخش می‌باشد. حجم توزیع شده در نتیجه توزیع با سوزن‌های متحرک از مرکز به لبه تشتک کاهش می‌یابد. بنابراین بین حجم تلقیح شده و شعاع چرخش رابطه معکوس وجود دارد. در این حالت کلنی باکتری‌ها در امتداد خطوطی که مایع تلقیح شده است، رشد می‌کنند. تعداد کلنی‌ها در یک محدوده شناخته شده با استفاده از یک صفحه شمارش خط‌کشی شده که همراه با دستگاه می‌باشد، شمارش می‌شود.

شکل ۱۳ــ۲ــ توزیع کننده درون تشتک

نکته‌ها

- ✓ سطح تشتک‌های جامد استفاده شده با تشتک پرکن اسپیرال باید تراز و عاری از حباب هوا باشد.
- ✓ برای اطمینان از حذف رطوبت اضافی تشتک‌ها، پیش از استفاده باید آنها را خشک کرد.
- ✓ پیش از نمونه‌برداری و پس از استفاده بهتر است با آب سترون شده تمیز شود.

۱۴ــ۱ــ۲ــ دستگاه آب مقطرگیری[2] : دستگاهی است که برای تهیه آب مقطر یا آب بدون مواد معدنی یا یون با کیفیت مورد

۱ــ Spiral platter

۲ــ Water distillator

نیاز برای تهیه محیط‌های کشت میکروبیولوژی یا واکنش‌گرها و سایر کاربردهای آزمایشگاهی به کار می‌رود. قابلیت هدایت آب باید هنگام استفاده یا پس از ذخیره‌سازی در حد مطلوب نگهداری شود و به طور منظم کنترل شود.

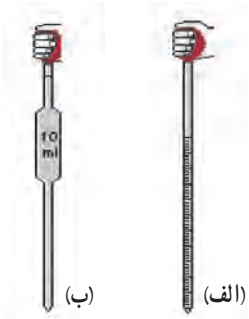
نکته : دستگاه آب مقطرگیری باید با توجه به سختی آب ورودی، در یک دوره زمانی خاص تمیز و رسوب زدایی شود.

۲ــ۲ــ وسایل آزمایشگاهی

۱ــ۲ــ۲ــ پی‌پت[1] : پی‌پت‌ها وسایل شیشه‌ای یا پلاستیکی یک بار مصرف هستند که برای جابه‌جایی حجم‌های معین مواد مایع یا غلیظ به کار می‌روند، پی‌پت‌های مدرج حجم‌های مشخص را با دقت مربوطه جابه جا می‌کنند.

در آزمایشگاه‌ها از دو نوع پی‌پت استفاده می‌شود :

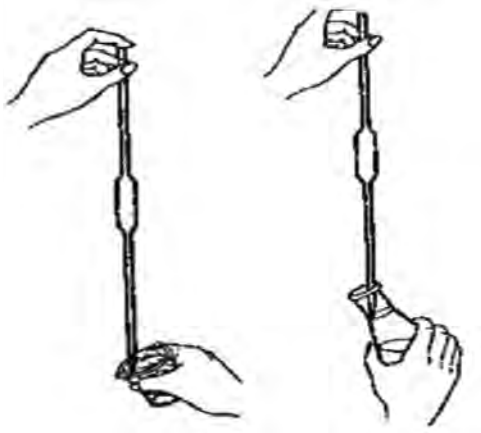
الف) پی‌پت حباب دار : یک پی‌پت حباب دار دارای مخزنی است که گنجایش پی‌پت روی آن نوشته شده است. همان‌طور که در شکل (۱۴ــ۲ــ ب) نشان داده شده است در بالای حباب در قسمت باریک خط نشانه (به صورت دایره سفیدرنگی) وجود دارد که باید پی‌پت را تا این خط نشانه پُر کرد. پی‌پت حباب‌دار برای برداشتن حجم‌های استاندارد مانند ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و... میلی‌لیتر به کار می‌رود.



شکل ۱۴ــ۲ــ الف) پی پت ساده، ب) پی‌پت حباب‌دار

ب) پی‌پت ساده : مانند بورت درجه‌بندی شده است و صفر آن در بالا قرار دارد و باید آن را مانند بورت روی درجه صفر تنظیم و تا آخر خالی کرد. پی‌پت مدرج برای برداشتن حجم‌های غیراستاندارد مانند ۳ میلی لیتر یا حجم‌های ممیزدار مانند ۲ و نیم و غیره به کار می‌رود.

طرز استفاده از پی‌پت : همانطور که در شکل (۱۵ــ۲) نشان داده شده است، برای پر کردن پی‌پت، نخست باید نوک آن را در قسمت زیر سطح و نزدیک ته محلول قرار داد تا هنگام مکیدن محلول هوا داخل پی‌پت نشود. زیرا در این صورت محلول به سرعت بالا می‌آید و وارد دهان می‌شود (در صورت کم بودن حجم محلول در ظرف). وقتی سطح محلول درون پی‌پت حدود ۲ میلی لیتر از خط نشانه گذشت، باید دهانه پی‌پت را با انگشت بست و آن را با ظرف محلول بالا آورد تا هم سطح چشم شود و به طور عمودی نگاه داشت. با کم کردن فشار انگشت، قطره قطره، زیادی محلول را خارج کرده تا سطح زیرین مایع به خط نشانه برسد و در این وضعیت دوباره با فشار انگشت بر دهانه پی‌پت، مانع خارج شدن مایع شد. سپس باید نوک پی‌پت را از محلول خارج کرد و در ظرفی که محلول در آن باید ریخته شود قرار داد. برای خالی کردن پی‌پت، فشار انگشت را باید کم کرد. هنگام خارج کردن پی‌پت از ظرف دوم، ظرف را باید کج کرد و نوک پی‌پت را در جایی که محلول نباشد، به جداره ظرف تماس داد. به‌این ترتیب قسمتی از مایع که در نوک پی‌پت مانده خارج می‌شود. برای خارج کردن این قسمت از مایع نباید به داخل پی‌پت فوت کرد.


شکل ۱۵ــ۲ــ طرز استفاده از پی پت

نکته : از پی‌پت‌ها باید برای جابه‌جایی مواد مایع یکنواخت شده و سوسپانسیون‌های میکروبی استفاده شود. چنانچه‌این کار از پیش انجام نشده باشد لازم است ده بار پی‌پت را در جا و با احتیاط پر وخالی کرد تا یکنواخت شود.

۱ــ Pipete

شکل ۱۶ــ۲ــ پیپتور

۲ــ۲ــ۲ــ پی‌پت پرکن : دستگاه بسیار ساده‌ای است که دارای یک مخزن مایع و یک پی‌پت دو راهه است. به طوری که با کشیدن پیستون مایع از یک راه وارد پی‌پت شده و با فشردن پیستون از راه دیگر خارج می‌شود. از پیپتور برای سرعت عمل و انتقال حجم معین از مواد مایع ویژه یا سمی‌استفاده می‌شود.

زمانی که نمونه مورد آزمون آلوده است، برای برداشتن مایعات سمی نباید با مکیدن پی‌پت از راه دهان حجم مورد نظر را برداشت، بلکه بهتر است از مکنده یا پوآر استفاده کرد.

روش استفاده از مکنده پلاستیکی: مکنده پلاستیکی دارای ۳ کلید A ،S و E است که پس از نصب پی‌پت در محل خود بر روی مکنده مانند شکل(۱۷ــ۲)، برای برداشتن مقداری ازمواد مایع به ترتیب زیر استفاده می‌شود :

شکل ۱۷ــ۲ــ مکنده

الف) کلید A و حباب لاستیکی را فشار داده تا هوا خارج شود.

ب) پی‌پت را وارد ظرف محتوی مایع کرده و وقتی سر پی‌پت به‌اندازه کافی داخل مایع شد کلید S را به آرامی فشار دهید تا بر اثر مکش حباب که در مرحله اول فشرده و خالی شده، مایع وارد پی‌پت شده و بالا بیاید (نباید مایع وارد مکنده شود).

پ) پس از این که به‌اندازه لازم مایع وارد حباب شد پی‌پت را وارد ظرفی که باید مایع داخل آن خالی شود نموده و کلید E را فشار دهید تا مایع داخل پی‌پت خالی شود.

نکته‌ها

✓ پی‌پت‌های آسیب دیده و شکسته باید دور انداخته شود.

✓ برای پیشگیری از آلودگی سر پی‌پت‌های مدرج و ساده لازم است سرهای پی‌پت‌ها و پیپتورها با پنبه غیر جاذب، پنبه گذاری شود.

✓ در آزمایشگاه میکروبیولوژی غیر از جابه جایی مواد مایع غیر آلوده، برای مکش نباید از دهان استفاده شود.

✓ پی‌پت‌ها باید در جای ویژه نگهداری پی‌پت که از جنس فولاد زنگ نزن یا آلومینیوم است نگهداری شوند و هنگام سترون‌سازی پی‌پت‌ها درون جا پی‌پتی قرار داده شده و در آون با دمای ۱۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت سترون شوند.

✓ پس از استفاده از پی‌پت‌ها به ویژه هنگام کار با مواد مایع آلوده باید از طرف نوک آنها را در یک استوانه مدرج بزرگ که دارای محلول سترون کننده است قرار داد تا تمیز و سالم سازی شده، سپس درون آون سترون گردند.

۳ــ۲ــ۲ــ دماسنج[۱] : دماسنج وسیله‌ای است که برای پایش دما در محدوده فعالیت‌های آزمایشگاهی به کار می‌رود. در بیشتر موارد از یک لوله شیشه‌ای که دو طرف آن بسته و در قسمت پایین آن حبابی پر از جیوه یا الکل قرار دارد تشکیل می‌گردد، برای مدرج ساختن آن، دماسنج جیوه‌ای را در کنار دریا در ظرف بخار آبی که در حال جوش است قرار می‌دهند، جیوه بر اساس خاصیت انبساط

۱ــ Thermometer

اجسام در اثر گرما در لوله بالا می‌رود و در نقطه‌ای می‌ایستد که آن نقطه را با عدد ۱۰۰ علامت می‌گذارند. سپس مخزن جیوه را در خرده یخ در حال گداز می‌گذارند. جیوه از لوله پایین می‌آید و در نقطه‌ای می‌ایستد که آن را، نقطه صفر دماسنج فرض می‌کنند که در حقیقت نقطه انجماد آب یا نقطه ذوب یخ است. آنگاه میان این دو رقم را به صد قسمت مساوی تقسیم می‌کنند و هر قسمت یک درجه سانتی‌گراد است. این‌گونه دماسنج که به صد درجه تقسیم شده‌اند دماسنج سانتی‌گرادی نامیده می‌شوند. به جز این درجه بندی انواع دیگری نیز وجود داردکه از آن جمله دماسنج رئومور و دماسنج فارنهایت است.دماسنج رئومور که در این گرماسنج نقطه انجماد یا ذوب یخ با صفر درجه سانتی‌گراد برابر است ولی نقطه جوش آب در این دماسنج ۸۰ درجه سانتی‌گراد است. این دماسنج توسط یک دانشمند فرانسوی طراحی و ساخته شده است.

انواع دماسنج آزمایشگاهی

الف) دماسنج دارای حباب مایع دار: این نوع دماسنج یکی از رایج‌ترین دماسنج ها می‌باشد. دماسنج دارای حباب مایع دار را به عنوان دماسنج‌های جیوه‌ای یا الکلی می‌شناسیم. ساختمان این نوع دماسنج از یک مخزن مایع و یک لوله مویین تشکیل شده که مایع درون مخزن در اثر انبساط از لوله مویین بالا رفته و دما را نشان می‌دهد. این نوع دماسنج را می‌توان برای اندازه‌گیری دما از ۳۷/۸°C تا ۳۱۵°C استفاده نمود.اما اگرفضای بالای سطح جیوه را از گاز ازت پر نمایند، می‌توان تا دمای ۵۳۸°C از آن استفاده نمود.

شکل ۱۸ــ۲ــ دماسنج دارای حباب مایع دار(دماسنج جیوه‌ای)

ب) دماسنج انبساط سیال: این نوع دماسنج یکی از باصرفه‌ترین و رایج‌ترین وسایل اندازه‌گیری دما در صنعت می‌باشد.اساس کار این دماسنج در شکل(۱۹ــ۲) نشان داده شده است. همان گونه که ملاحظه می‌شود با بالا رفتن دما فشار درون حباب که می‌تواند پر از مایع، گاز یا بخار باشد، بالا رفته و توسط فشارسنج اندازه گیری می‌شود. طول لوله مویین می‌تواند تا ۶۰ متر باشد؛ اما این مقدار بر دقت اندازه‌گیری دما تأثیرگذار خواهد بود.

شکل ۱۹ــ۲ــ دماسنج الکتریکی

پ) دماسنج الکتریکی: این نوع دماسنج کاربردهای فراوانی در صنعت داشته و می‌توانند از دماهای پایین تا دماهای بسیار بالا را اندازه‌گیری نمایند که به صورت مقاومتی و ترموکوپل هستند.

ت) دماسنج مقاومتی: دماسنج مقاومتی به صورت یک سیم بلند و ظریف است که آن را به دور یک قاب نازک می‌پیچند تا از فشار ناشی از تغییر طول سیم که در اثر انقباض آن در موقع سرد شدن پیش می‌آید، جلوگیری کند. در شرایط ویژه می‌توان سیم را به دور جسمی‌که به منظور اندازه‌گیری دمای آن است، پیچید یا در داخل آن قرار داد (در گستره دمای خیلی پایین). دماسنج‌های مقاومتی بیشتراز مقاومت‌های کوچک رادیویی با ترکیب کربن یا بلور ژرمانیوم که ناخالصی آن آرسنیک بوده و جسم حاصل در درون یک کپسول بسته پر از هلیوم قرار دارد، تشکیل می‌شوند. این دماسنج را می‌توان بر روی سطح جسمی‌که برای اندازه گیری دمای آن است سوار کرد یا در حفره‌ای که برای این منظور ایجاد شده، قرار داد. دماسنج مقاومتی پلاتین را می‌توان برای کارهای خیلی دقیق در گستره ۲۵۳°C تا ۱۲۰۰°C به‌کار برد.

ث)ترموکوپل: ترموکوپل وسیله دیگری است که برای اندازه‌گیری دما مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این نوع دماسنج از خاصیت انبساط و انقباض اجسام جامد استفاده می‌گردد. دامنه دمایی یک ترموکوپل بستگی به موادی دارد که ترموکوپل از آن

ساخته شده است برای نمونه، دامنه یک ترموکوپل پلاتینیوم ـ ایریدیوم که ۱۰ درصد پلاتینیوم دارد از صفر تا $1600^{\circ}C$ است. مزیت ترموکوپل در این است که به خاطر جرم کوچک، خیلی سریع با سیستمی که اندازه‌گیری دمای آن مورد نظر است، به حال تعادل گرمایی در می‌آید. بنابراین تغییرات دما به آسانی بر آن اثر می‌کند، ولی دقت دماسنج مقاومتی پلاتین را ندارد.

نکته‌ها

✓ دماسنج‌های مرجع و سایر وسایل پایش دما باید به روشی کالیبره شوند که با استانداردهای ملی و جهانی قابل بررسی باشد.

✓ دماسنج‌ها و ترموکوپل‌هایی که در گرمخانه قرار دارند به منظور پیشگیری از هدررفتن گرما هنگام باز بودن در گرمخانه و برای خواندن درست، بهتر است در ظرف‌های مناسب دارای گلیسرول، پارافین مایع یا پلی پروپیلن گلیکول قرار داده شوند.

✓ چنانچه ستون جیوه یا الکل دماسنج شکسته شود باید دور انداخته شود.

✓ دماسنج‌ها و ترموکوپل‌ها بهتر است در نقطه انجماد و یا با دماسنج‌های مرجع در محدود دمای آزمایشگاه کنترل شوند.

یادآوری : جیوه برای سلامتی انسان خطرناک است. در صورت شکسته شدن حباب و ریختن جیوه، لازم است از دست زدن به آن و تنفس در برابر آن خودداری کرده و مکان‌های آلوده به آن را تمیز و سالم سازی نمود.

۴ــ۲ــ۲ــ تشتک‌ها یا پتری دیش‌ها[1] : تشتک‌ها ظرف‌هایی هستند از جنس شیشه یا پلاستیک یک بار مصرف که دارای قطر ۸۵ میلی‌متر و عمق ۱۲ میلی‌متر هستند. تشتک‌ها برای تهیه محیط‌های کشت جامد و سپس کشت باکتری‌ها به کار برده می‌شوند.

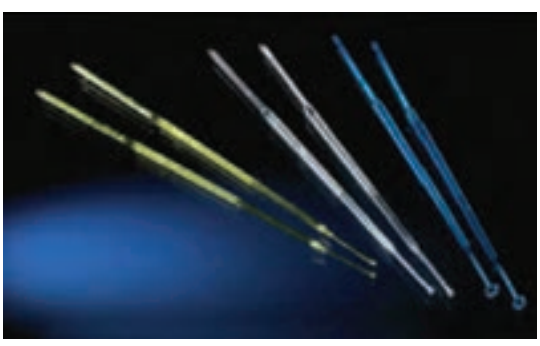
شکل ۲۰ــ۲ــ تشتک یا پتری دیش

نکته‌ها

✓ پس از کشت باکتری‌ها در تشتک‌های دارای محیط کشت، هنگام قرار دادن در گرمخانه درب آنها باید روی سطح گرمخانه و پشت آنها به سمت بالا قرار گیرد.

✓ تشتک‌های کشت شده میکروبی را پس از استفاده و پیش از دور ریختن باید در اتوکلاو درون یک کیسه بزرگ سترون کرده و سپس دور ریخت.

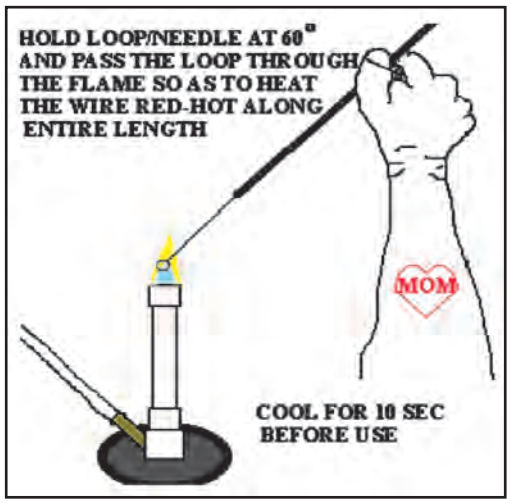
۵ ــ ۲ ــ۲ــ سیم کشت : این وسیله از یک قطعه سیم که یک طرف آن آزاد و طرف دیگر آن در داخل دستگیره‌ای از جنس شیشه یا فلز است، ساخته شده که از آن هم برای برداشت باکتری‌ها از محیط‌های کشت میکروبی و هم برای کشت باکتری ها به روش خطی استفاده می‌شود. همانطور که در شکل(۲۱ــ۲) نشان داده شده است، بر حسب نوع آزمایش انتهای آن می تواند به صورت حلقه[2] باشد که در این صورت فیلدوپلاتین یا حلقه کشت نام دارد و یا می‌تواند بدون حلقه باشد که در این صورت آنس یا سوزن کشت نامیده می‌شود.



شکل ۲۱ــ۲ــ سمت راست، حلقه کشت و سمت چپ سوزن کشت

۱ــ Petri dishes

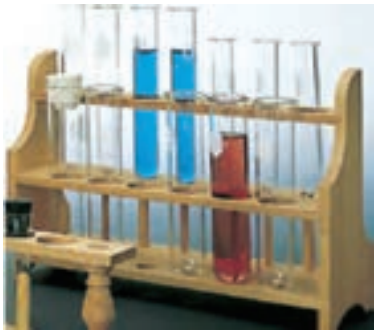
۲ــ Loop



شکل ۲۲ــ۲ــ روش سترون کردن حلقه و سوزن کشت

نکته : مهم‌ترین نکته در رابطه با استفاده از لوپ و آنس، سترون‌کردن آنها پیش و پس از کار و تماس با کشت میکروبی و محیط‌های آلوده است. برای این منظور، همانند شکل(۲۲ــ۲) باید چراغ گازی یا الکلی را روشن کرده و لوپ را با زاویه ۶۰ درجه سانتی‌گراد در قسمت آبی شعله نگه داشت تا قسمت فلزی آن گداخته شود، سپس از شعله خارج کرده و حدود ۱۰ ثانیه به حال خود قرار داد تا خنک شود و برای کاربرد مورد نظر آماده شود.

۶ــ۲ــ۲ــ لوله‌های آزمایش : لوله‌های آزمایش مقاوم در برابر گرمای زیاد و در اندازه‌های گوناگون هستند. همانطور که در شکل (۲۳ــ۲) نشان داده شده است، قسمت پایین لوله گرد و سر آنها صاف است. این لوله‌ها برای نگهداری محیط‌های کشت مایع، رشد میکروارگانیسم‌ها در محیط مایع وانجام و مشاهده واکنش‌های بیوشیمیایی باکتری‌ها درمحیط‌های متابولیکی به کار می‌روند.



شکل ۲۳ــ۲ــ لوله‌های آزمایش همراه با جالوله‌ای

نکته‌ها

✓ لوله‌های آزمایش را پیش و پس از آزمون‌های میکروبی باید در آون با دمای ۱۷۰°C سترون کرد.

✓ بهتر است از لوله‌هایی استفاده شود که درپوش یا چوب پنبه روی در آنها قرار دارد.

✓ برای نگهداری لوله‌های آزمایش از جا لوله‌ای که می‌تواند مانند شکل(۲۳ــ۲) چوبی و یا فلزی و پلاستیکی قابل شستشو باشد، استفاده شود.

✓ برای برداشتن لوله‌های آزمایش سترون شده و داغ باید از دستکش ویژه و یا گیره چوبی استفاده شود.

✓ برای شستشوی لوله‌های آزمایش و از بین رفتن کامل مواد ته نشین شده در لوله‌ها باید از برس لوله استفاده شود.

شکل ۲۴ــ۲ــ گیره چوبی

شکل ۲۵ــ۲ــ برس شستشوی لوله

شکل ۲۶ــ۲ــ چراغ گازی

۷ــ۲ــ۲ــ چراغ گازی[۱] : در این چراغ نوعی گاز مانند متان یا بوتان با هوا مخلوط شده و می‌سوزد که به یاد مخترع آن بونزن (شیمیدان آلمانی) نامگذاری شده است. در آزمایشگاه میکروبیولوژی کلیه آزمون‌های میکروبی را باید در فاصله حدود ۳۰ سانتی‌متری شعله انجام داد. چراغ گازی برای سترون سازی لوپ و آنس با شعله مستقیم، تهیه گسترش میکروبی بر روی لام که در فصل‌های بعد شرح داده خواهد شد و در انواع رنگ آمیزی ها به کار می‌رود و برای حرارت دادن محیط‌های کشت جامد هنگام آماده سازی آنها به‌کار برده می‌شود.

نکته‌ها

✓ هنگام کار با چراغ گازی ابتدا باید شیر اصلی گاز را باز کرد.

✓ در آزمایشگاه‌ها باید روی میزهای کار هنرجویان به تعداد لازم چراغ گازی قرار داده شود که هر کدام علاوه بر این که به شیر اصلی گاز وصل هستند دارای شیرهای جانبی نیز باشند وهنگام کار با آنها با باز و بسته کردن شیر جانبی می‌توان آنها را به طور جداگانه روشن و خاموش کرد.

✓ برای روشن کردن مشعل باید شیر جانبی را باز کرده وسپس برای جلوگیری از نشت گاز به اطراف، کبریت را روشن نموده و با آن مشعل را روشن کرده و برای تنظیم شعله از حلقه نزدیک پایه مشعل استفاده کرد. اگر حلقه گاز باز باشد و گاز از دهانه به اطراف پراکنده شود با روشن کردن شعله کبریت منجر به‌ایجاد شعله بسیار شدید خواهد شد.

✓ هنگام روش کردن شعله مشعل بهتر است سر را کنار و دور از دهانه مشعل قرار داد تا اگر بر اثر بی‌احتیاطی، شعله گاز به اطراف پراکنده شد به صورت برخورد نکند.

✓ پس از کار با چراغ گازی باید شیر جانبی بسته شود.

✓ در صورت بروز خطر و ایجاد شعله زیاد در اثر نشت گاز باید بلافاصله شیرهای جانبی و اصلی را بسته و مراتب را گزارش داده و برای بر طرف شدن نقص اقدام لازم را به عمل آورد.

✓ برای گرم کردن محلول‌ها و محیط‌های کشت جامد (فصل آماده‌سازی محیط‌های کشت) تا زمانی که شفاف شوند باید یک سه پایه فلزی همراه با توری نسوز که در شکل (۲۷ــ۲) نشان داده شده است، روی شعله قرار داد و سپس ظرف دارای محیط را روی آن گذاشت.

۸ ــ۲ــ۲ــ سه پایه فلزی و توری نسوز : وسیله‌ای است که برای نگه داشتن وسایل و گرم کردن آنها در بالای شعله چراغ کار آزمایشگاهی کاربرد دارد.

شکل۲۷ــ۲ــ سمت راست، توری نسوز و سمت چپ، سه پایه فلزی

۱ــ Bunzen burner

شکل۲۸ــ۲ــ میله شیشه‌ای همزن

۹ــ۲ــ۲ــ میله‌های شیشه‌ای همزن و سرکج : میله‌های شیشه‌ای همزن برای یکنواخت کردن نمونه‌های مورد آزمون به ویژه حل کردن مواد جامد در رقیق‌کننده به کار می‌روند. میله‌های شیشه‌ای سرکج برای انجام یک نوع کشت میکروبی که برای شمارش باکتری‌ها در محیط جامد به کار می‌رود، استفاده می‌شوند.(به فصل روش‌های کشت میکروارگانیسم ها نگاه کنید)

نکته : هنگام کار با میله‌های شیشه‌ای باید ابتدا آنها را از قسمت سر، درون ظرف دارای اتانول ۷۰ درصد قرار داد تا سترون شوند و موقع استفاده یک بار ازروی شعله عبور داده تا الکل روی میله‌ها سوخته یا بخار شود.

شکل۲۹ــ۲ــ قاشقک

۱۰ــ۲ــ۲ــ قاشقک[1] : وسیله‌ای است که برای برداشتن و وزن کردن مواد اولیه محیط‌های کشت و مواد مشابه که به صورت پودر هستند به کار می‌رود. در صورت نیاز لازم است پیش از کاربری تمیز و سترون شود.

۱۱ــ۲ــ۲ــ لام (اسلاید) : برای تهیه گسترش میکروبی، رنگ‌آمیزی و مشاهده زیر میکروسکوپ به کار می‌روند. لام‌ها یا به صورت یکبار مصرف هستند یا شیشه‌ای. برای استفاده دوباره از لام‌های شیشه‌ای باید آنها را درون محلول سترون‌کننده قرار داده و سالم‌سازی نمود.

سایر وسایل آزمایشگاهی شامل استوانه‌های مدرج برای برداشت حجم مشخص مواد مایع و رقیق کننده‌ها، بشر، ارلن، پنس برای برداشتن نمونه‌های آلوده و نمونه‌هایی که با دست نمی‌توان گرفت.

۳ــ۲ــ میکروسکوپ

میکروسکوپ مجموعه‌ای از لنزهای دارای بزرگ‌نمایی است. امروزه میکروسکوپ‌های معمولی می‌توانند شکل‌ها را تا ۱۰۰۰ برابر بزرگتر کنند که این رقم تنها مشاهده اندازه، شکل و حرکت سلول‌های باکتری را امکان پذیر می‌سازد. میکروسکوپ های اختصاصی‌تر با بزرگ‌نمایی بیشتر مانند میکروسکوپ الکترونی، شکل‌ها را تا ۱۰۰۰۰۰ برابر بزرگتر می‌کنند و مشاهده ویروس ها و حتی اتم‌ها را امکان‌پذیر می‌سازند. ساده‌ترین نوع میکروسکوپی که در بیشتر آزمایشگاه‌ها به کار برده می‌شود میکروسکوپ نوری معمولی است.

۱ــ۳ــ۲ــ ساختمان میکروسکوپ نوری : هر میکروسکوپ نوری دارای قسمت‌های زیر است :

الف) منبع نور یا لومیناتور[2] : که در زیر محل قرار گرفتن اسلاید نمونه است.

ب) کندانسور[3] : نوعی عدسی است که نور خارج شده از منبع نوری را روی اسلاید نمونه متمرکزمی‌کند و زیر صفحه قرار دارد.

پ) صفحه[4] : صفحه‌ای است که نمونه روی آن قرار داده می‌شود.

ت) عدسی چشمی[5] : یک جفت عدسی که بالای بدنه میکروسکوپ قرار دارد و دارای بزرگ نمایی ۱۰ است.

۱ــ Spatule

۲ــ Luminator

۳ــ Condensor

۴ــ Stage

۵ــ Ocular lense

ث) عدسی‌های شیئی[1] : عدسی‌هایی که مستقیم بالای صفحه و روی یک صفحه چرخان قرار دارند، عدسی‌های شیئی با بزرگ‌نمایی‌های۴، ۱۰، ۴۰، ۱۰۰ می‌باشند.

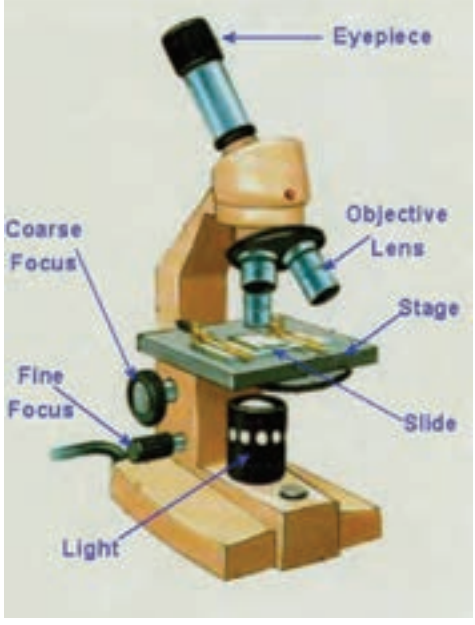
یادآوری : عدسی ۱۰۰ عدسی همراه با روغن سدر یا ایمرسیون[2] است. زیرا در بزرگ‌نمایی ۱۰۰ به دلیل اختلاف ضریب شکست نوری شیشه و هوا نور به خوبی منعکس نمی‌شود و شکل کدر خواهد شد. روغن ایمرسیون یا روغن سدر این عیب را بر طرف می‌کند زیرا ضریب شکست نوری مشابه شیشه دارد و نور را به خوبی منعکس می‌کند و تصویر واضح و شفاف خواهد شد.

ج) دریچه دیافراگم : زیر کندانسور و صفحه قرار دارد و میزان نوری را که به کندانسور می‌رسد با باز و بسته کردن دریچه می‌توان تنظیم کرد.

چ) پیچ‌های تنظیم[3] دو نوع هستند : ماکرومتر و میکرومتر؛ که بر روی بازوی میکروسکوپ قرار دارند.

پیچ تنظیم یا فوکوس بزرگتر یا ماکرومتر چسبیده به بازو است و برای تنظیم و وضوح تصویر در حد ماکرومتر به کار می‌رود. با چرخش آن صفحه در حد قابل رؤیت بالا و پایین می‌رود. پیچ تنظیم کوچکتر یا میکرومترکه چسبیده به ماکرومتر است و تنظیم تصویر را در حد میکرو انجام می‌دهد.

در شکل(۳۰ــ ۲) قسمت‌های میکروسکوپ نشان داده شده است.



شکل۳۰ــ۲ــ نما و اجزای میکروسکوپ نوری

۲ــ۳ــ۲ــ روش استفاده از میکروسکوپ نوری :

الف) کلید جریان برق را فشار داده و منبع نور را وصل کنید.

ب) صفحه عدسی‌های شیئی را بچرخانید تا عدسی به پایین‌ترین بزرگ‌نمایی برسد. در عدسی با بزرگ‌نمایی پایین قسمت بیشتری ازسطح اسلاید نمونه رادر میدان دید قرار می‌دهد. بنابراین ابتدا عدسی‌های پایین برای تنظیم اولیه شکل به کار می‌روند و در

۱ــ Objective lenses

۲ــ Immersion

۳ــ Adjustment Knobe

آخر در صورت نیاز عدسی ۱۰۰ با روغن ایمرسیون استفاده می‌شود.

پ) اسلاید نمونه را روی صفحه و بین خط کش‌ها قرار دهید. گیره کنترل را بالا بگیرید تا اسلاید درست روی صفحه و بالای مرکز نور قرار گیرد.

ت) در حالی که از کنار نگاه می‌کنید، صفحه را به آرامی تا جایی که امکان دارد بالا ببرید تا متوقف شود.

یادآوری : همیشه عدسی و صفحه را دور نگه دارید. زمانی که لازم است به هم نزدیک شوند، از کنار به دقت نگاه کنید و حرکت صفحه به بالا را به آرامی انجام دهید تا عدسی آسیب نبیند.

ث) با عدسی‌های چشمی نگاه کنید و صفحه را با پیچ تنظیم ماکرومتر به آرامی پایین بیاورید تا صفحه دید مورد نظرتان ظاهر شود.

ج) برای واضح شدن شکل از پیچ تنظیم یا میکرومتر استفاده کنید. با حرکت بسیار آرام پیچ، می‌توان وضوح تصویر را به دلخواه تنظیم کرد.

چ) همزمان برای وضوح تصویر می‌توان با باز و بسته کردن دریچه دیافراگم نیز به این کار کمک کرد.

ح) پس از تنظیم شکل با پایین‌ترین بزرگ‌نمایی، صفحه را بچرخانید تا به عدسی بالا برسید.

یادآوری : عدسی‌ها باید با دقت جابه جا شوند تا تنظیم شکل تغییرنکند. در هر صورت بهتر است پس از تغییر عدسی‌ها تنظیم دوباره انجام شود.

خ) هنگام کار با عدسی شیئی با بزرگ نمایی ۱۰۰ باید از روغن ایمرسیون استفاده شود. یک قطره روغن بر روی ناحیه روشن روی اسلاید قرار دهید و صفحه را بچرخانید تا به عدسی ۱۰۰ برسید و دوباره تنظیم را مانند پیش انجام دهید.

یادآوری : پس از پایان کار با روغن ایمرسیون، تنها عدسی شیئی ۱۰۰ را با پارچه ویژه و گزیلل پاک کنید.

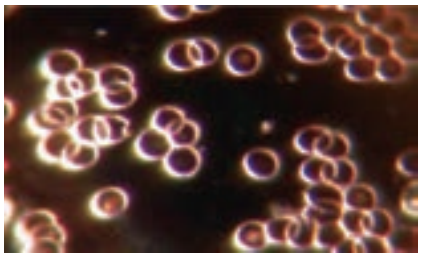
۴ــ۲ــ انواع میکروسکوپ

۱ــ۴ــ۲ــ میکروسکوپ زمینه روشن[۴] : میکروسکوپ نوری معمولی است که به طور کامل شرح داده شد. همانطور که در شکل (۳۱ــ۲) سمت راست نشان داده شده است، نور از منبع آن خارج شده و روی اسلاید نمونه متمرکز می‌شود. نمونه بیشتر امواج نوررا منعکس و برخی را جذب می‌کند. در این میکروسکوپ با رنگ آمیزی نمونه‌ها، شکل به صورت نمونه رنگ آمیزی شده در زمینه روشن مشاهده می‌شود. هدف از کاربرد میکروسکوپ نوری معمولی با زمینه روشن،مشاهده شکل و ترتیب قرار گرفتن باکتری‌ها، مشاهده اجزای بیرونی آنها مانند تاژه، کپسول و نیز مشاهده اسپور باکتری‌ها است.

شکل۳۱ــ۲ــ سمت راست، چگونگی تشکیل شکل توسط میکروسکوپ نوری زمینه روشن. سمت چپ، شکل گرفته شده توسط میکروسکوپ نوری زمینه روشن.

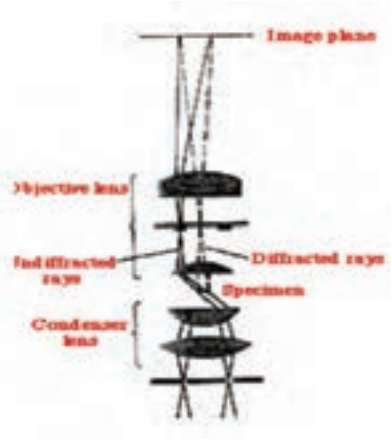
۴ــ Bright field Microscope

۲ــ۴ــ۲ــ میکروسکوپ زمینه تاریک[۱] : این میکروسکوپ نور را از منبع آن روی نمونه متمرکز می‌کند. نمونه بیشتر امواج نوری را جذب و برخی را به سمت عدسی شیء منعکس می‌کند. زمینه دید تاریک شده و نمونه روشن و شفاف دیده می‌شود.



شکل۳۲ــ۲ــ شکل گرفته شده توسط میکروسکوپ زمینه تاریک

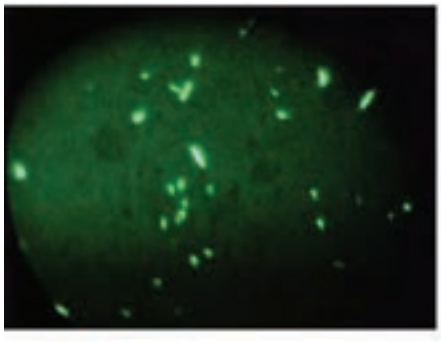
۳ــ۴ــ۲ــ میکروسکوپ فاز متضاد[۲] : این میکروسکوپ نور خارج شده از منبع آن را که به نمونه می‌رسد به جای انعکاس، منحرف می‌کند که حرکت نور خارج از فاز گفته می‌شود. این نوع میکروسکوپ نیازی به رنگ آمیزی نمونه ندارد بنابراین برای مشاهده باکتری‌های زنده در گسترش مرطوب و مشاهده حرکت باکتری‌ها به کار برده می‌شود.



شکل۳۳ــ۲ــ سمت چپ، میکروسکوپ فاز متضاد و سمت راست، چگونگی تشکیل شکل توسط میکروسکوپ متضاد

۴ــ۴ــ۲ــ میکروسکوپ فلورسنت[۳] :
میکروسکوپ فلورسنت برای مشاهده سلول یا موادی که به طور طبیعی ویژگی فلورسنت دارند یا با رنگ‌های فلورسنت رنگ آمیزی می‌شوند، به‌کار می رود. در میکروسکوپ فلورسنت از نور فرابنفش (UV)[۴] برای روشن کردن میدان دید استفاده می‌شود. نمونه بسیار درخشان در زمینه دید تاریک مشاهده می‌شود.

(الف)



(ب)

شکل۳۴ــ۲ــ (الف)، میکروسکوپ فلورسنت و (ب)، شکل گرفته شده توسط میکروسکوپ فلورسنت

۱ــ Dark Field Microscope
۲ــ Phase Contrast Microscope
۳ــ Flourescent Microscope
۴ــ Ultra Violet

۵ــ۴ــ۲ــ میکروسکوپ الکترونی : میکروسکوپ نوری برای مشاهده اجزای داخلی سلول باکتری‌ها بوده و برای مشاهده ویروس‌ها کارایی ندارد. برای این منظور از میکروسکوپ الکترونی با بزرگ نمایی تا ۱۰۰۰۰۰ برابر استفاده می‌شود. در این میکروسکوپ‌ها به جای منبع نور، از امواج الکترونی و به جای عدسی‌های شیشه‌ای از عدسی‌های الکترومغناطیس استفاده می‌شود. قدرت تفکیک میکروسکوپ الکترونی ۰/۳ بر حسب نانومتر است. البته کار با این میکروسکوپ فنی و دشوار است زیرا عدسی و نمونه باید در خلاء باشند و نیاز به آماده سازی پیچیده نمونه دارند. عکس گرفته شده از میکروسکوپ الکترونی میکروگراف نام دارد.

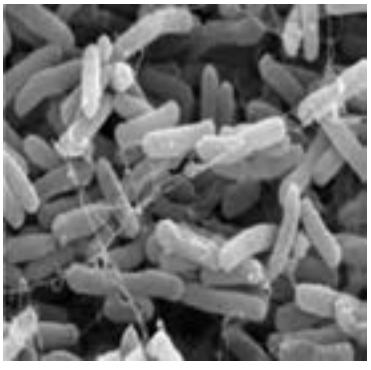
دو نوع میکروسکوپ الکترونی وجود دارد :

الف) میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)[1] : این نوع میکروسکوپ در شکل (۳۵ــ۲ــ ب) نشان داده شده، دارای بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰۰۰ برابر است و تصویر سه بعدی ارائه می‌دهد و تنها برای مشاهده شکل و سطوح بیرونی سلول‌ها به کار برده می‌شود نه اجزای داخلی آنها. نمونه‌ها به صورت لایه بسیار نازک بریده شده و با یک لایه طلا و پالادیوم پوشیده می‌شوند و سپس جهت مشاهده با میکروسکوپ الکترونی به کار می‌روند.

ب) میکروسکوپ الکترونی گذاره(TEM)[2] : در شکل (۳۵ــ۲ــ الف) نشان داده شده است، بزرگ‌نمایی بسیار بالا دارد در حد ۲۰۰۰۰۰ برابر و تصویر را به صورت دو بعدی نشان می‌دهد. برای مشاهده اجزای داخلی علاوه بر شکل سلول و بخش‌های خارجی آن به کار می‌رود.

(ب)

(الف)



(پ)

شکل۳۵ــ۲ــ(الف) میکروسکوپ الکترونی گذاره، (ب) میکروسکوپ الکترونی نگاره و(پ) تصویرسه بعدی گرفته شده با میکروسکوپ الکترونی نگاره

۱ــ Scanning Electron Microscope

۲ــ Transmission Electron Microscope

فصل سوم

رنگ‌آمیزی باکتری‌ها

گستره‌های میکروبی در زیر میکروسکوپ به شکل عادی با وضوح مشاهده نمی‌شوند. شفافیت و وضوح شکل را می‌توان با رنگ‌آمیزی افزایش داد. بنابراین رنگ آمیزی برای تمایز نمونه از زمینه دید به کار می‌رود.

۱ـ۳ـ رنگ‌ها

رنگ‌های مورد استفاده در میکروب شناسی نمک‌های مواد شیمیایی و دارای بار مثبت و یا منفی هستند. برای نمونه :

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

هنگام رنگ‌آمیزی، این رنگ ها با مواد شیمیایی موجود در ساختمان میکروب‌ها پیوند تشکیل داده و باعث رنگ‌آمیزی آنها می‌شوند. رنگ‌ها را به دو گروه تقسیم می‌کنند :

ـ **رنگ‌های بازی**[۱] : دارای بارالکتریکی مثبت (کاتیونی) هستند و می‌توانند به ترکیبات سلولی مانند اسیدنوکلئیک و پروتئین‌ها که دارای بار منفی هستند جذب شوند و آنها را رنگ کنند. مهم‌ترین رنگ‌های بازی متیلن بلو، کریستال ویوله، سافرانین و مالاشیت گرین می‌باشند.

ـ **رنگ‌های اسیدی**[۲] : دارای بار منفی (آنیونی)هستند بنابراین جذب ترکیبات سلولی با بار منفی نمی‌شوند و تنها برای رنگ‌آمیزی زمینه دید به کار می‌روند مانند رنگ نیکروزین.

ـ **رنگ‌های خنثی** : بدون بار الکتریکی هستند و برای رنگ کردن بخش‌های بدون بار سلول مانند چربی‌ها استفاده می‌شوند مانند رنگ سودان سیاه که در رنگ آمیزی دانه‌های چربی کاربرد دارند.

۲ـ۳ـ انواع رنگ آمیزی

۱ـ۲ـ۳ـ رنگ آمیزی ساده : در این نوع رنگ آمیزی تنها از یک نوع رنگ استفاده می‌شود. رنگ بازی برای رنگ‌آمیزی سلول باکتری و رنگ اسیدی برای رنگ آمیزی زمینه به کار می‌روند.

این نوع رنگ آمیزی برای تشخیص شکل، اندازه و ترتیب قرار گرفتن باکتری‌ها کنار هم به کار می‌رود مانند رنگ‌آمیزی ساده با متیلن بلو.

۲ـ۲ـ۳ـ رنگ آمیزی مرکب : در این نوع رنگ آمیزی از دو یا چند رنگ و در طی چندین مرحله استفاده می‌شود. مانند رنگ آمیزی گرم که جهت تمایز باکتری‌های گرم مثبت از گرم منفی به کار می‌رود.

۱ـ basic stains

۲ـ acidic stains

۳ــ۲ــ۳ــ رنگ آمیزی اختصاصی : در این رنگ‌آمیزی نیز از دو یا چند رنگ استفاده می‌شود و برای تشخیص اجزای خاص سلول باکتری‌ها مانند اسپور، تاژک وکپسول به کار می‌رود.

مهم‌ترین کار پیش از رنگ‌آمیزی نمونه‌ها تهیه گسترش میکروبی مناسب از نمونه مورد نظر است. بسته به نوع رنگ‌آمیزی دو نوع گستره میکروبی باید تهیه شود. برای رنگ آمیزی سلول باکتری‌ها از گستره خشک و برای رنگ آمیزی زمینه از گستره مرطوب استفاده می‌شود.

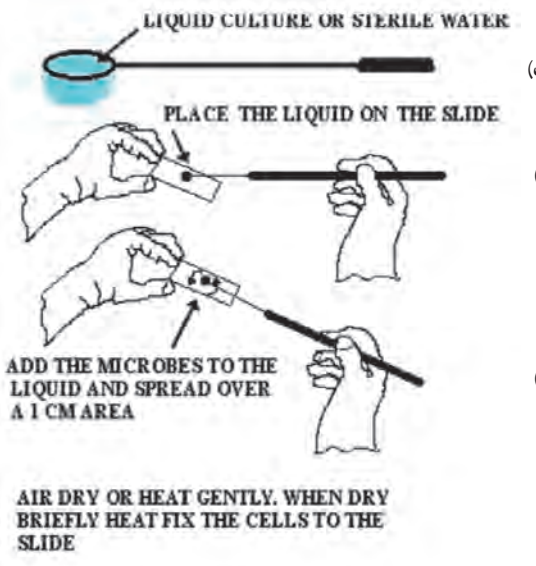
۳ــ۳ ــ تهیه گستره خشک از نمونه میکروبی

۱ــ۳ــ۳ــ یک قطره آب مقطر استریل در مرکز لام آزمایشگاهی قرار دهید.

۲ــ۳ــ۳ــ با استفاده از لوپ استریل (به فصل دوم مراجعه شود) از کلنی باکتری مورد نظر در محیط کشت میکروبی برداشت کرده و داخل آب مقطر به خوبی پخش کنید و به اندازه یک سکه گستره تهیه کنید (شکل ۱ــ۳).

۳ــ۳ــ۳ــ گستره تهیه شده را خشک کنید. برای خشک‌کردن گستره می‌توان آن را در دمای آزمایشگاه قرار داد و یا با استفاده از خشک‌کن‌ها، خشک کرد.

۴ــ۳ــ۳ــ در مرحله آخر گستره خشک شده را ثابت کنید. برای این کار بهتر است لام را به پشت ۳ مرتبه به سرعت از روی شعله عبور داد.



شکل ۱ــ۳ــ چگونگی تهیه گستره خشک میکروبی
(الف : یک قطره آب روی لام قرار داده می‌شود. ب : توسط حلقه کشت، میکروبها درون قطره روی لام به صورت حلقه‌ای به شکل یک سکه پخش می شوند. پ : گستره خشک شده و سپس روی لام ثابت می‌گردد.)

نکته‌ها

✓ لام‌ها باید به طور کامل تمیز باشند. برای تمیزکردن لام‌ها می‌توان از پنبه آغشته به گزیلل استفاده کرد.

✓ عمل تثبیت باعث می‌شود باکتری‌ها به لام چسبیده و در مراحل بعدی رنگ‌آمیزی شسته نشده و از روی لام پاک نشوند.

✓ گستره باید بسیار نازک باشد، زیرا در گستره ضخیم، باکتری‌ها بر روی هم قرار می‌گیرند و پس از رنگ آمیزی و مشاهده با میکروسکوپ نمی‌توان شکل باکتری‌ها را به خوبی تشخیص داد.

۴ــ۳ــ تهیه گستره مرطوب از نمونه میکروبی

گستره مرطوب میکروبی برای رنگ‌آمیزی کپک‌ها، مشاهده حرکت باکتری‌ها در محیط مایع و رنگ‌آمیزی زمینه در رنگ آمیزی منفی به کار می‌رود که برای هر کدام از این موارد در جای خود شرح داده خواهد شد.

۵ــ۳ــ رنگ آمیزی ساده با متیلن بلو

هدف : تشخیص شکل، اندازه و ترتیب قرار گرفتن باکتری‌ها در کنار هم

مواد و وسایل مورد نیاز

- لام میکروسکوپی
- لوپ یا فیلدوپلاتین
- چراغ گازی
- تشتک رنگ آمیزی
- رنگ متیلن بلو
- ظرف‌های دارای محیط‌های کشت میکروبی از سه گونه باکتری اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس ائورئوس و باسیلوس سرئوس
- میکروسکوپ نوری معمولی

روش کار

ــ ابتدا از هر کدام از نمونه باکتری‌ها به روشی که در پیش گفته شد بر روی لام میکروسکوپی گستره خشک تهیه کنید.

ــ گستره‌ها را با خشک کن خشک کنید.

ــ گستره‌های خشک شده را ۳ بار از روی شعله عبور دهید تا بر روی لام ثابت شود.

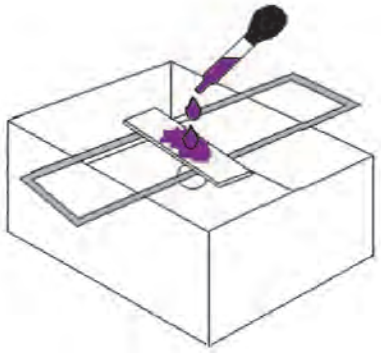
ــ لام گستره را روی تشتک رنگ‌آمیزی قرار داده و مانند شکل(۲ــ۳) روی گستره را با رنگ متیلن بلو بپوشانید.

ــ پس از ۱ دقیقه لام را شستشو دهید.

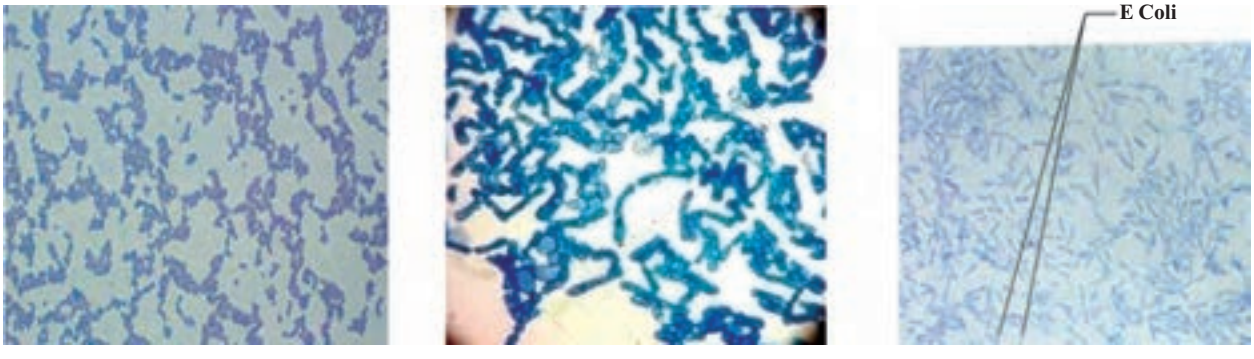
یادآوری : هنگام شستشوی لام با آب بهتر است از آب‌فشان (پیست) استفاده شود. با گیره چوبی لام را در یک دست به طرف پایین نگه داشته و با دست دیگر آب را با پیست به آرامی روی لام بریزید. با این کار از پاشیده‌شدن رنگ بر روی لباس و دست‌ها جلوگیری می‌شود.

ــ لام‌های شسته شده را با خشک کن خشک کنید.

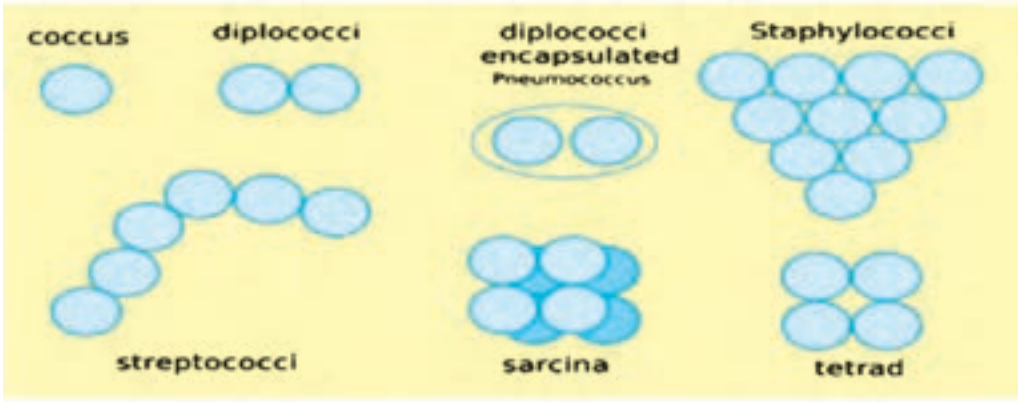
ــ نمونه زیر میکروسکوپ را اول با عدسی ۱۰x و ۴۰x و در آخر با عدسی ۱۰۰x و روغن ایمرسیون مشاهده کنید (برای آگاهی بیشتر به فصل دوم، طرز کار با میکروسکوپ نوری مراجعه کنید).



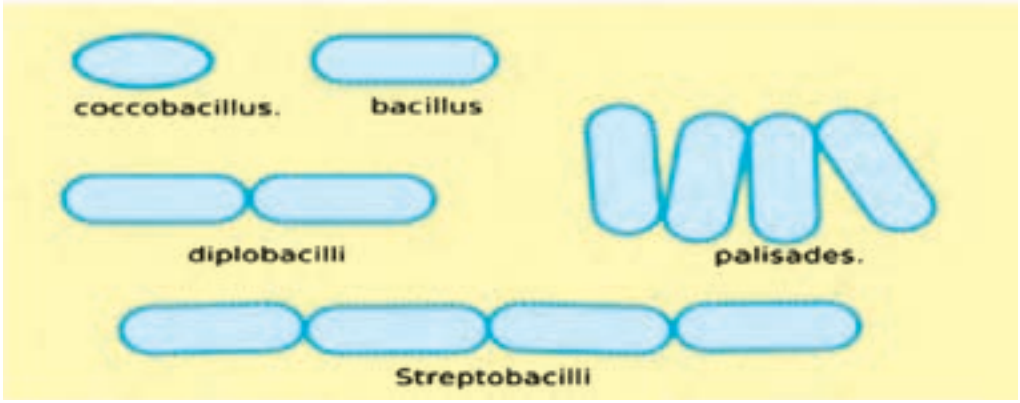
شکل۲ــ۳ــ چگونگی ریختن رنگ بر روی گستره تهیه شده



شکل۳ــ۳ــ از راست به چپ باکتری اشریشیاکلی به شکل کوکوباسیل، باکتری باسیلوس سرئوس به شکل باسیل زنجیره‌ای (استرپتوباسیل) و باکتری استافیلوکوکوس ائورئوس به شکل کوکسی خوشه‌ای



(الف)



(ب)

شکل ۴ــ۳ ــ (از چپ به راست)

(الف) :از چپ به راست Coccus (گرد تک)،diplococcus (گرد دو تایی)، diplococcus encapsulated (گرد دوتایی کپسول‌دار)، streptococci (گرد زنجیره‌ای)، sarcina (گرد هشت تایی)، tetrad(گرد چهار تایی)

(ب) :Coccobacillus(کوکوباسیل)، bacilus(میله‌ای)، diplobacilli(میله‌ای دوتایی)، streptobacilli(میله‌ای زنجیره‌ای)

بیشتر بدانیم

باکتری‌ها بر اساس شکل و ترتیب قرار گرفتن آنها در کنار هم به چندین گروه تقسیم می‌شوند که چندین نمونه آنها در شکل (۴ــ۳) نشان داده شده است.

۶ــ۳ــ رنگ آمیزی گرم

این نوع رنگ آمیزی مرکب برای تشخیص دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به کار می‌رود. اساس رنگ آمیزی گرم اختلاف ترکیبات دیواره سلولی باکتری‌ها است.

مواد و وسایل مورد نیاز

- لام آزمایشگاهی
- لوپ یا حلقه کشت

- تشتک رنگ آمیزی
- چراغ گازی
- رنگ های کریستال ویوله و سافرانین
- محلول لوگول
- محلول الکل استن
- تشتک‌های دارای محیط‌های کشت میکروبی از سه گونه باکتری استافیلوکوکوس ائورئوس،اشریشیاکلی و باسیلوس سرئوس
- میکروسکوپ نوری معمولی

روش کار

ــ ابتدا از کلنی باکتری‌های مورد نظر برداشت کرده و به روشی که در پیش گفته شد گستره خشک بر روی لام تهیه کنید.

ــ گستره را با خشک کن خشک کرده و با ۳ بار عبور دادن از روی شعله بر روی لام ثابت کنید.

ــ سطح گستره را با رنگ کریستال ویوله بپوشانید و ۱ دقیقه صبر کنید تا رنگ جذب سلول شود.

ــ پس از ۱ دقیقه لام را بشویید.

ــ سطح گستره را به مدت ۱ دقیقه با لوگول بپوشانید.

یادآوری : نقش لوگول، تثبیت رنگ کریستال ویوله در دیواره سلول باکتری‌ها است (نقش دندانه دارد).

ــ پس از ۱ دقیقه لام را با آب شستشو دهید.

ــ سپس با الکل استن به مدت ۳۰ ثانیه رنگ بری کنید.

یادآوری : الکل استن نقش رنگ بری برای رنگ کریستال ویوله دارد. اختلاف باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در همین مرحله است. (به قسمت بیشتر بدانیم توجه کنید.)

نکته‌ها

✓ هنگام استفاده از الکل استن بهتر است لام را به صورت کج نگه دارید و الکل استن را به آرامی‌به مدت ۳۰ ثانیه از بالای لام روی آن بریزید.

✓ سطح گستره را با رنگ سافرانین به مدت ۱ دقیقه بپوشانید.

✓ پس از ۱ دقیقه لام را با آب بشویید.

✓ در آخر لام را خشک کرده و با میکروسکوپ نوری و عدسی ۱۰۰x نمونه را مشاهده نمایید.

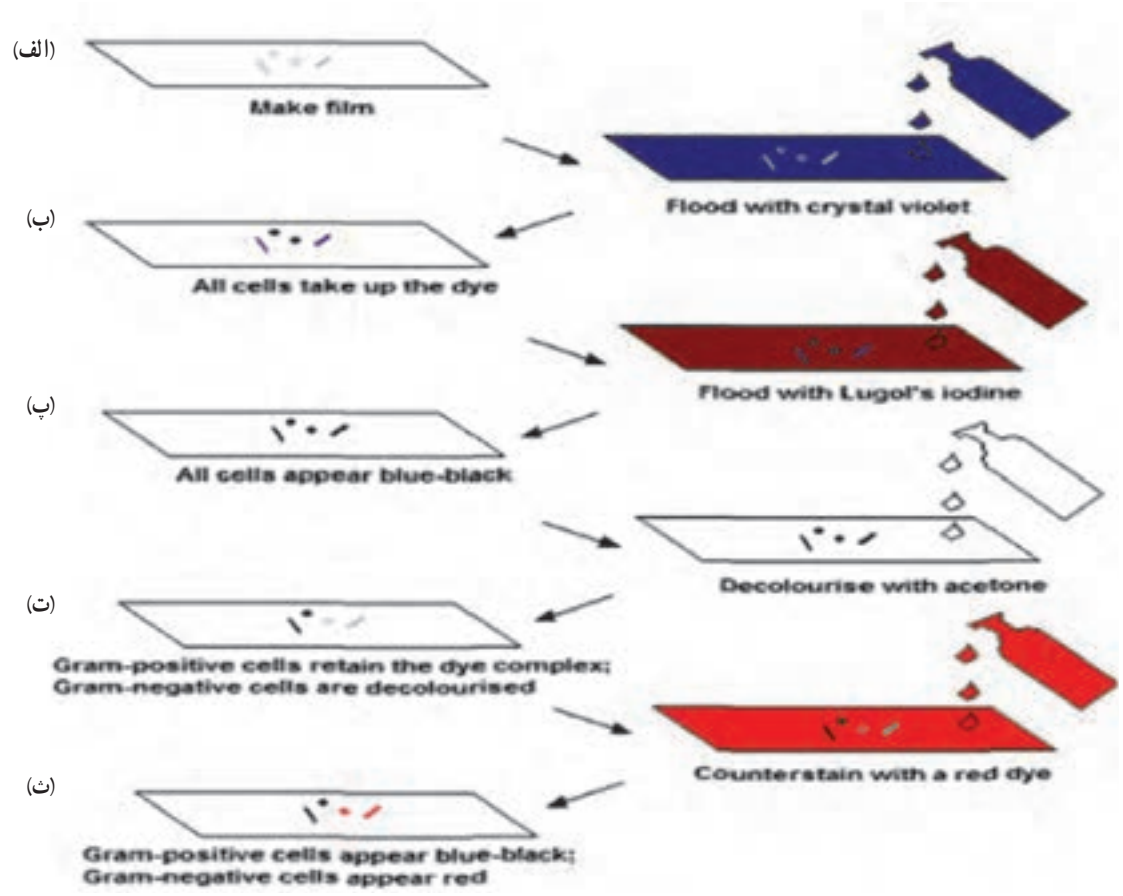
مراحل رنگ آمیزی گرم در شکل (۵ــ۳) نشان داده شده است.

نکته‌ها

✓ در تمام مراحل هنگام استفاده از رنگ‌ها و محلول‌ها، لام باید روی تشتک رنگ‌آمیزی قرار داده شود.

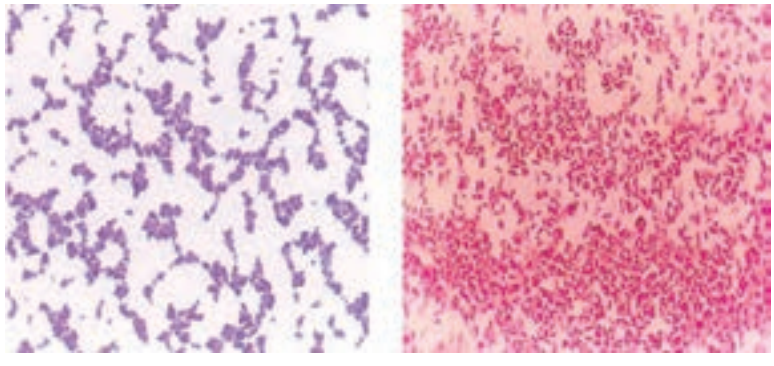
✓ هنگام شستشوی لام، آن را با گیره چوبی نگه دارید تا دست‌ها رنگی نشوند.

✓ لام را پایین نگه دارید و آب را با پیست به آرامی روی لام بریزید تا رنگ به لباس و دست و صورت نپاشد.



شکل۵ــ۳ــ (الف) تهیه گستره میکروبی (ب)گستره با رنگ کریستال ویوله به مدت ۱ دقیقه پوشانده می‌شود. در این مرحله همه باکتری‌ها رنگ کریستال ویوله را جذب می‌کنند. (پ)گستره با محلول لوگل پوشانده می‌شود. (ت)گستره با الکل استن رنگ بری می‌شود. در این مرحله باکتری‌های گرم مثبت رنگ را نگه می‌دارند ولی در باکتری‌های گرم منفی رنگ پاک می‌شود. (ث) گستره با رنگ سافرانین رنگ می‌شود. در این مرحله باکتری‌های گرم مثبت همان رنگ اول کریستال ویوله که بنفش است را حفظ می‌کنند ولی باکتری‌های گرم منفی که در مرحله اول رنگشان پاک شده رنگ قرمز سافرانین را جذب می‌کنند.

یافته‌ها : پس از رنگ آمیزی گرم، باکتری‌های گرم منفی به رنگ قرمز و گرم مثبت‌ها به رنگ بنفش مشاهده می‌شوند.



(الف) **(ب)**

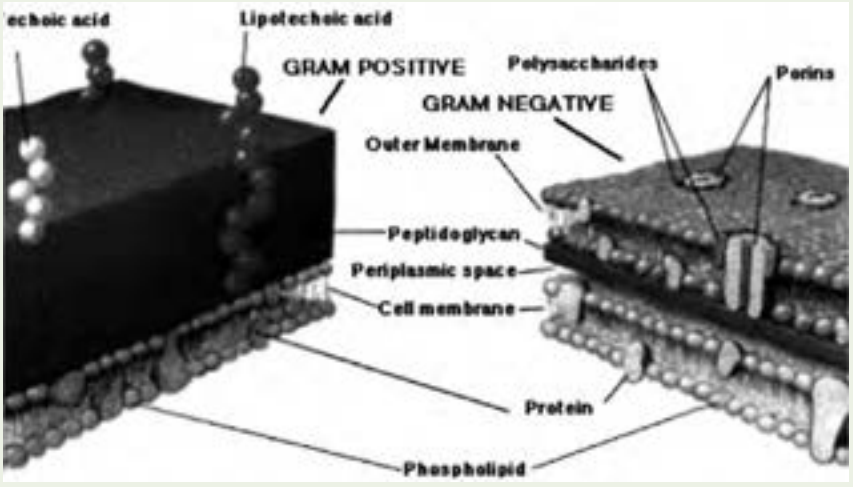
شکل۶ــ۳ــ (الف) باکتری اشریشیا کلی‌کوکوباسیل و گرم منفی (ب) باکتری استانیلوکوکوس اورئوس کوکسی خوشه‌ای و گرم مثبت

بیشتر بدانیم

باکتری‌ها را بر اساس اختلاف در دیواره سلولی به دو گروه بزرگ گرم مثبت و گرم منفی تقسیم می‌کنند. مهم‌ترین اختلاف دیواره سلولی باکتری‌ها مربوط به ساختار دیواره و ضخامت لایه پپتیدوگلیکان (ترکیب اصلی دیواره سلولی) در دیواره سلولی آنها است. ساختمان دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی پیچیده‌تر از باکتری‌های گرم مثبت است و ضخامت لایه پپتیدوگلیکان نیز بسیار کمتر از لایه پپتیدوگلیکان گرم مثبت‌ها است.

در شکل(۷ــ۳) تفاوت ساختمان دیواره باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داده شده است.

(ب)



(الف)

شکل۷ــ۳ــ (الف)ساختمان دیواره سلولی باکتری گرم منفی که شامل(cell membrane) غشای داخلی و غشای خارجی، (periplasmic space) فضای پری پلاسمیک، (peptidoglycan) پپتیدوگلیکان و لیپوپلی ساکارید است.(ب)ساختمان دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت که شامل پپتیدوگلیکان ضخیم و (lipotechoic acid) لیپوتایکوئیک اسید است.

۷ــ۳ــ رنگ آمیزی اسپور

رنگ آمیزی اسپور یک نوع رنگ آمیزی ویژه است که برای مشاهده اسپور باکتری‌ها به کار می‌رود. در بین باکتری‌ها دو جنس باسیلوس وکلستریدیوم، اسپوردار هستند.

مواد و وسایل مورد نیاز

- لام
- ارلن کوچک
- چراغ گازی
- رنگ مالاشیت گرین
- رنگ سافرانین
- محیط کشت باسیلوس سرئوس

روش کار

ــ یک ارلن آب مقطر روی توری نسوز و شعله چراغ گازی قرار دهید تا آب به جوش آید.

ــ از کلنی باکتری مورد نظر برداشت کرده و مانند آنچه در پیش گفته شد گستره تهیه و خشک و ثابت کنید.

ــ زمانی که آب داخل ارلن به جوش آمد لام را روی دهانه ارلن در حال جوش قرار دهید (مانند شکل۸ــ۳).

نکته‌ها

✓ اسپور شکل مقاوم باکتری‌ها است و نسبت به رنگ ها نفوذ ناپذیر است بنابراین باید از بخار آب جوش برای نفوذ پذیری اسپور و رنگ شدن آن استفاده کرد.

✓ هنگامی‌که زیر لام، بخار آب جوش جمع شد روی سطح گستره را با رنگ مالاشیت گرین به مدت ۱۰ دقیقه بپوشانید.

یادآوری :

الف) بخارات مالاشیت گرین سمی است، بنابراین هنگامی‌که رنگ روی لام در حال بخار کردن است باید دهان و بینی را دور نگه داشت و از استنشاق بخارات پرهیز نمود.

ب) رنگ روی لام نباید در مدت ۱۰ دقیقهٔ لازم برای رنگ شدن اسپور خشک شود. برای این کار زمانی که رنگ در حال خشک شدن بود باید دوباره رنگ مالاشیت گرین روی گستره ریخته شود.

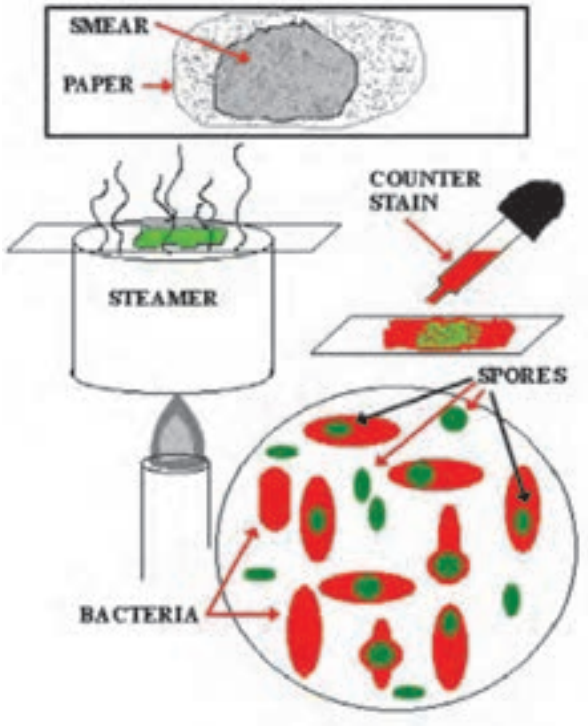
پ) هنگام ریختن رنگ روی گستره دقت شود که رنگ روی میز کار و لوازم ریخته نشود.

ــ پس از مدت ۱۰ دقیقه لام را با آب شستشو دهید.

ــ لام را روی تشتک رنگ قرار داده وسطح گستره را با رنگ سافرانین به مدت ۱ دقیقه بپوشانید.

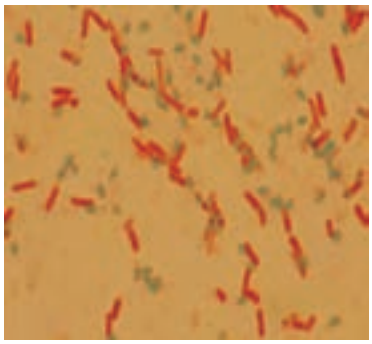
ــ لام را شسته و خشک کنید.

ــ لام را با میکروسکوپ نوری و عدسی ۱۰۰x مشاهده کنید.



شکل۸ ــ۳ــ مراحل رنگ آمیزی اسپور باکتری‌ها. ابتدا از نمونه باکتری مورد نظر گستره خشک تهیه شده و خشک می‌شود. سپس لام دارای گستره از پشت بر روی دهانه بشر دارای آب در حال جوش قرار داده شده و رنگ مالاشیت گرین روی آن افزوده می‌شود. در آخر پس از شستشو با سافرانین رنگ می‌شود. در زیر میکروسکوپ سلول های رویشی به رنگ قرمز و اسپورها سبز رنگ دیده می‌شوند.

نتیجه : با رنگ آمیزی اسپور، سلول‌های رویشی به رنگ قرمز و اسپور باکتری به رنگ سبز مشاهده می‌شود.

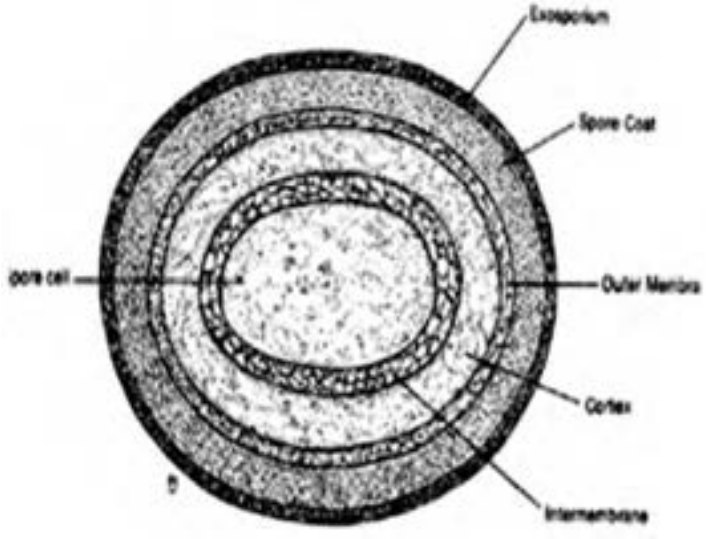


شکل ۹ــ۳ــ باکتری باسیلوس سرئوس(اسپور باکتری سبز و سلول رویشی قرمز)

بیشتر بدانیم

اسپور(اندوسپور) شکل مقاوم باکتری ها است که در دو جنس مهم باسیلوس و کلستریدیوم در شرایط نامساعد محیطی مانند کمبود مواد غذایی، خشکی و گرمای زیاد تشکیل می‌شود و باکتری را قادر می‌سازد مدت طولانی بتواند این شرایط را تحمل کند. تبدیل سلول رویشی به اسپور را اسپورزایی[1] می‌گویند. اگر شرایط برای باکتری دوباره مساعد شود اسپور تبدیل به سلول رویشی می‌گردد که به‌این عمل جوانه زدن گفته می‌شود.

در شکل (۱۰ــ۳) ساختمان اسپور باکتری‌ها و لایه‌های مختلف آن نشان داده شده است.



شکل ۱۰ــ۳ــ لایه‌های مختلف اسپور. به ترتیب از داخل به خارج شامل : سلول اسپور و هسته مرکزی، غشای داخلی اسپور، کورتکس، پوشش اسپور یا (coat)، غشای خارجی و پوسته بیرونی یا اگزوسپوریوم(Exosporium)

۸ــ۳ــ رنگ آمیزی کپسول

در رنگ آمیزی اختصاصی برای مشاهده کپسول باکتری ها به‌کار می‌رود. در عمل رنگ آمیزی شرط رنگ گیری یک سلول، یونی بودن آن است چون وقتی سلول حالت یونی داشته باشد هنگام رنگ آمیزی بین نواحی یونیزه سطح سلول و اجزای یونیزه

۱ــ Sporalation

مولکول‌های رنگ پیوند بوجود می‌آید. در نتیجه بین بارهای مخالف موجود در سطح سلول و مولکول‌های رنگ پیوند یونی تشکیل می‌شود و باکتری رنگ می‌گیرد. اما چون کپسول به علت غیر یونی بودن آن رنگ نمی‌گیرد و برای دیدن آن در زیر میکروسکوپ زمینه باکتری رنگ آمیزی می‌شود، امکان دیدن کپسول باکتری بصورت بیرنگ فراهم می‌شود. این روش را **رنگ‌آمیزی منفی** می‌نامند.

در این رنگ آمیزی تعدادی سلول از کلنی باکتری مورد نظر برداشت شده و در رنگ نکروزین یا مرکب چین روی لام مخلوط می‌شود و سپس با لام دیگری که مانند شکل(۱۱ـ۳) با زاویه ۴۵ درجه سانتی‌گراد روی لام اول قرار می‌گیرد از یک انتهای لام اول به سمت انتهای دیگر لام کشیده می‌شود. سپس لام اول را در مجاورت هوا خشک کرده و برای مرحله بعدی آماده می‌شود.

در این روش رنگ‌آمیزی برای تثبیت گستره از گرما استفاده نمی‌شود. چون در اثر گرما، باکتری در داخل کپسول از شکل طبیعی خود خارج می‌شود.

مواد و وسایل مورد نیاز

- لام ۲عدد
- لوپ (فیلدوپلاتین)
- مرکب چینی
- رنگ متیلن بلو
- میکروسکوپ نوری معمولی
- محیط کشت باکتری کپسول دار مانند استرپتوکوکوس پنومونیا

روش کار

ـ روی یک لام تمیز مقداری رنگ مرکب چین بریزید و با لوپ (نوک آنس) مقدار کمی‌از کشت باکتری به آن اضافه و مخلوط کنید تا سوسپانسیون به آرامی و به طور یکنواخت پخش شود.

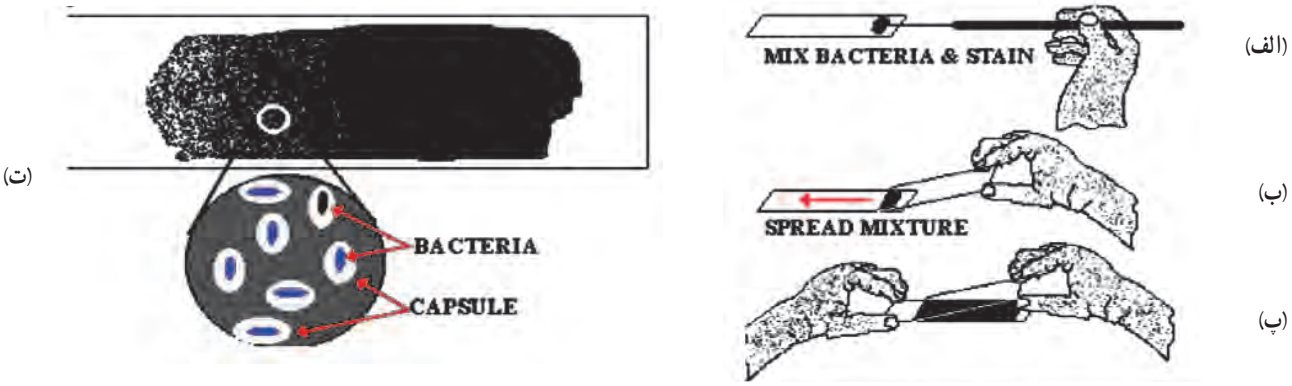
ـ مانند روش رنگ آمیزی منفی گسترش تهیه شده را در هوا خشک کنید.

یادآوری : هیچ‌گاه نباید کاغذ خشک کن را روی لام کشید.

ـ سطح گستره را با متیلن بلو به مدت ۳ دقیقه بپوشانید. رنگ اضافی را خالی کرده با آب مقطر شستشو دهید.

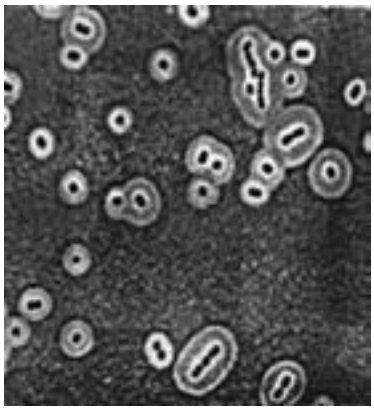
ـ لام را خشک کرده و با میکروسکوپ نوری و عدسی ۱۰۰x نمونه را مشاهده نمایید.

نکته : هنگام مخلوط کردن کشت با رنگ، آن را به آرامی‌هم بزنید تا آرایش باکتری‌ها بهم نخورد.



شکل۱۱ـ۳ـ مراحل رنگ آمیزی کپسول باکتری. (الف) باکتری درون یک قطره رنگ روی لام یکنواخت می‌شود. (ب) با لام دیگر که با زاویه ۴۵ درجه با لام اول در نقطه‌ای که رنگ و باکتری وجود دارند قرار داده می‌شود. (پ) با لام دوم از یک سر تا سر دیگر لام اول کشیده می‌شود. در آخر پس از خشک شدن لام نمونه دیده می‌شود. (ت)کپسول بی رنگ در یک زمینه دید تاریک.

نتیجه : در رنگ‌آمیزی باکتری‌های کپسول‌دار به روش رنگ‌آمیزی منفی، باکتری به رنگ آبی و کپسول به صورت روشن و بی رنگ در یک زمینه دید تیره مشاهده می‌شود.



شکل۱۲ــ۳ــ کپسول به صورت یک هاله روشن در اطراف باکتری در یک زمینه تیره مشاهده می‌شود.

بیشتر بدانیم

برخی از باکتری‌ها ماده لزجی از خود ترشح می‌کنند که خارج از سلول و پیرامون آن جمع می‌شود و دیواره سلولی را می‌پوشاند. این لایه کپسول نامیده می‌شود که ضخامت و چسبندگی آن در گونه‌ها یکسان نیست. اندازه کپسول به محیط کشت میکروبی بستگی دارد و همچنین باکتری‌های بیماری‌زا، در بین باکتری‌های تولیدکننده کپسول، کپسول‌های بزرگتری دارند. جنس این کپسول از پلی‌ساکارید است که در آب محلول و غیر یونی است.

کاربرد کپسول در باکتری‌ها : کپسول به عنوان یک سد اسمزی بین باکتری و محیط اطراف آن عمل می‌کند و در واقع نقش حفاظتی دارد. کپسول مانع از عمل بیگانه خواری گلبول‌های سفید می‌شود همچنین بعنوان مخزن ذخیره مواد غذایی یا دفع مواد زائد هم می‌تواند عمل کند.

در تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا، وجود کپسول شدت بیماری‌زایی و عفونت‌زایی را افزایش می‌دهد و ممکن است حتی این بیماری‌زایی به وجود کپسول بستگی داشته باشد. برای نمونه در استرپتوکوکوس پنومونیا اگر توانایی تولید کپسول در باکتری از بین برود این باکتری غیر بیماری‌زا می‌شود.

فصل چهارم

آلودگی‌زدایی و سترون‌سازی

واژه‌ها

استریلیزاسیون[1] : فرایند جداسازی و از بین بردن یا نابودی همه میکروارگانیسم‌ها و ویروس‌ها به شکل رویشی و اسپور، سترون سازی یا استریلیزاسیون نامیده می‌شود. نابودی میکروارگانیسم‌ها به این معنا است که نتوانند تکثیر کنند. واژه استریل، یعنی بدون میکروب.

ضدعفونی کردن [2] : فرایندی است که طی آن همه میکروارگانیسم‌ها یا دست کم میکروب‌های بیماری‌زا و ویروس‌ها از بین می‌روند اما برخلاف استریل کردن ممکن است برخی از میکروب‌ها زنده بمانند. واژه ضد عفونی کردن در عمل بیشتر در رابطه با مواد شیمیایی ضدمیکروب است که برای ضدعفونی کردن سطوح بی‌جان کاربرد دارند.

آنتی‌سپتیک[3] : به مواد سترون کننده پوست به ویژه هنگام اعمال جراحی گفته می‌شود.

گندزدایی[4] : منظور از گندزدایی یا بهسازی، کاهش بار آلودگی میکروبی متناسب با استانداردهای ایمنی و بهداشتی است.

آلودگی زدایی[5] : عبارت است از کاهش تعداد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در حدی که سلامتی افراد را به خطر نیاندازد. آلودگی‌زدایی می‌تواند همراه با یک شستشوی ساده باشد و یا با استفاده از گرما یا ضدعفونی کننده‌ها.

روش‌های سترون‌سازی

۱ــ۴ــ روش‌های گرمایی

۱ــ۱ــ۴ــ گرمای خشک :گرمای بدون رطوبت است که برای نابودی میکروارگانیسم‌ها به کار برده می‌شود مانند گداختن لوپ‌های آزمایشگاهی روی شعله چراغ گازی. این روش گرمایی برای استریل کردن وسایل شیشه‌ای، فلزی، پودرها و سایر مواد خشک بدون آب به کار برده می‌شود. زمانی که از گرمای خشک استفاده می‌شود مدت زمان گرمادهی برای کشتن میکروارگانیسم‌ها هم باید بیشتر باشد. مهم‌ترین وسیله برای استفاده از گرمای خشک در از بین بردن میکروب‌ها و سترون سازی، آون[6] است که با دمای

---

۱ ــ Sterilization

۲ ــ Disinfection

۳ ــ Antiseptic

۴ ــ Sanitization

۵ ــ Decontamination

۶ ــ Oven

۱۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ الی ۳ ساعت عمل می‌کند(برای جزییات بیشتر به فصل دوم مراجعه شود).

۲ــ۱ــ۴ــ گرمای مرطوب : مانند استفاده از گرمای آب جوش در فشار اتمسفری که بیشتر برای سالم سازی آب آشامیدنی به کار می‌رود ولی اسپور باکتری‌ها را از بین نمی‌برد. روش دیگر دمای بخار آب با فشار بالاتر از اتمسفریک است که برای از بین بردن اسپور باکتری‌ها هم مناسب است. این روش بیشتر برای استریل کردن وسایل کار و محیط‌های کشت میکروبی و سترون سازی تجارتی کنسروها کاربرد دارد. اتوکلاو بهترین وسیله برای استفاده از گرمای مرطوب با دمای بالاتر از ۱۰۰ °C و در بیشتر موارد ۱۲۰ °C با فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع است که مدت زمان لازم بسته به مورد ۱۵ دقیقه و بیشتر است (به فصل دوم مراجعه شود).

۳ــ۱ــ۴ــ پاستوریزاسیون[1] : این روش اولین بار توسط لویی پاستور دانشمند فرانسوی به کار برده شد. با این روش مواد به طور کامل استریل نمی‌شوند بلکه تنها میکروب‌های بیماریزا از بین می‌رود. این روش بیشتر برای شیر و آب میوه‌ها کاربرد دارد و ماندگاری مواد غذایی را بالا می‌برد و باعث کشتن میکروب‌های عامل سل، تب مالت و تب تیفوئید می‌گردد.

۴ــ۱ــ۴ــ تیندالیزاسیون[2] : در این روش از گرمادهی متناوب استفاده می‌کنند. مواد مورد نظر ابتدا تا دمای ۱۰۰ °C گرمادهی و بدون فاصله سرد می‌شوند. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری می‌شوند. این عمل سه روز متوالی تکرار می‌گردد. در دمای ۱۰۰ °C همه سلول‌های رویشی باکتری‌ها از بین می‌روند ولی اسپورها زنده می‌مانند. از طرفی اسپورها پس از شوک گرمایی وارد شده، با جوانه زدن تبدیل به سلول‌های رویشی می‌شوند که آنها هم در مراحل بعدی از بین می‌روند و به این ترتیب در دمای پایین سترون سازی انجام می‌شود و به مواد حساس به گرما آسیب کمتری وارد می‌شود.

۲ــ۴ــ مواد شیمیایی ضدمیکروب یا سترون‌کننده‌ها

۱ــ۲ــ۴ــ فنول : یکی از قدیمی‌ترین سترون کننده‌ها است ولی امروزه به دلیل ایجاد حساسیت بر روی پوست افراد استفاده از آن محدود شده است. ترکیبات فنولی غشای سیتوپلاسمی‌باکتری‌ها را تخریب می‌کند و اغلب باکتری‌های رویشی را از بین می‌برد. در غلظت‌های بالا می‌تواند اثر کشندگی بر روی باکتری عامل سل *داشته باشد*.

۲ــ۲ــ۴ــ الکل : از الکل اتیلیک و الکل ایزوپروپیلیک برای سترون کردن پوست و وسایل مختلف استفاده می‌کنند. قدرت میکروب‌کشی الکل‌ها با افزایش وزن مولکولی آنها افزایش می‌یابد. از آنجایی که با افزایش وزن مولکولی الکل‌ها حلالیت آنها کاهش می‌یابد، بدین جهت به عنوان میکروب کش بکار نمی‌روند. از میان الکل‌ها، الکل اتیلیک و الکل ایزوپروپیلیک به عنوان مواد سترون‌کننده کاربرد بیشتری دارند و مصرف خارجی آنها سمی‌نیست. الکل متیلیک خیلی سمی‌است و موجب آسیب به چشم می‌گردد و به عنوان میکروب‌کش به کار نمی‌رود. الکل‌ها منعقدکننده پروتئین‌ها و حلال چربی‌ها می‌باشند. الکل‌های خیلی غلیظ ٪۱۰۰ــ۹۵ باعث جذب آب بیشتر از سلول باکتری‌ها شده و موجب می‌شوند که الکل نتواند به درون سلول باکتری نفوذ کند و عمل دهیدراتاسیون[3] الکل باعث توقف رشد باکتری‌ها می‌گردد.

۳ــ۲ــ۴ــ الکل با غلظت ۹۰ ــ ۵۰ درصد باعث از بین بردن باکتریها و قارچ‌ها و بعضی از ویروس‌ها می‌گردد ولی برای اسپورباکتریها اثر ندارد. در عمل بیشتر از الکل ۷۰٪ و یا همراه با مواد دیگر مانند ید و فرمالدهید استفاده می‌شود. خاصیت ضدمیکروبی الکل ایزوپروپیلیک کمی بیشتر از الکل اتیلیک است، برای سترون کردن دماسنج‌ها بهتر است از الکل ایزوپروپیلیک استفاده شود. الکل‌ها به ویژه محلول‌های آبی الکل مانند اتانل ۷۰٪ به صورت آنتی سپتیک برای از بین بردن جرم‌های پوستی و

---

۱ ــ Pasturization

۲ ــ Tyndalization

۳ ــ Dehydration

به‌عنوان سترون‌کننده برای سالم سازی پوست، وسایل و سطوح به کار می‌روند. غیرسمی و ارزان بوده ولی به سرعت بخار می‌شود و زمان مؤثر تماس آنها و اثرشان را کاهش می‌دهد.

۴ــ۲ــ۴ــ آلدییدها : میکروارگانیسم‌ها و ویروس‌ها را با غیر فعال کردن پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلییک آنها از بین می‌برند. ترکیباتی مانند گلوتارآلدیید و فرمالدیید از این گروه هستند. باید توجه کرد که گلوتارآلدیید سمی بوده و مواد سالم سازی شده با آن باید پیش از استفاده با آب مقطر شسته شوند. فرمالدیید ترکیبی است که به شکل محلول (Formaldehyde (37٪)+10٪ Methanol) آبکی و یا جامد وجود دارد. فرمالدیید به صورت گاز یا محلول آبکی به نام فرمالین استفاده می‌شود.

یادآوری :

الف) موقع کارکردن با فرمالدیید باید از تجهیزات حفاظتی مانند عینک محافظ، لباس کار، ماسک ویژه، دستکش و کفش مناسب استفاده شود.

ب) در صورت کار با محلول فرمالدیید باید از هود بخار استفاده شود.

پ) در صورت تماس پوست با فرمالدیید باید آن را به مدت ۱۵ دقیقه با آب معمولی شستشو داده و لباس آلوده شده با آن از تن خارج شود و در صورت لزوم به پزشک مراجعه شود.

۵ــ۲ــ۴ــ اکسیدکننده‌ها : این مواد با اکسید کردن آنزیم‌های میکروب‌ها آنها را می‌کشند زیرا از سوخت وساز آنها جلوگیری می‌کنند. مهم‌ترین اکسید کننده‌ها عبارتند از :

۶ــ۲ــ۴ــ ازن (O_3) که فرم غیر مقاوم اکسیژن و یک اکسید کننده قوی می‌باشد. امروزه در بسیاری از کشورها برای ضدعفونی کردن آب آشامیدنی، سالم سازی هوا و پساب‌ها از اوزون استفاده می‌شود.

۷ــ۲ــ۴ــ آب اکسیژنه (H_2O_2) یا پراکسید هیدروژن که اکسید کننده‌ای قوی و استریل کننده‌ای مناسب می‌باشد که اثرات سمی ندارد و برای استریل کردن ظرف‌های فلزی و پلاستیکی به‌کار می‌رود.

۸ــ۲ــ۴ــ هالوژن‌ها : عناصر غیر فلزی هستند و در برابر سلول‌های رویشی، قارچ‌ها و ویروس‌ها مؤثرند در حالی که اسپور باکتری‌ها را در غلظت‌های عادی مصرف از بین نمی‌برند. مانند محلول ید و کلر که بیشتر برای سترون کردن آب به کار می‌روند. البته باید توجه کرد به کار بردن کلر برای دستگاه تنفسی و پوست بدن سمی است.

۹ــ۲ــ۴ــ سورفکتانت‌ها (فعال‌کننده‌های سطحی)[1] : این مواد با اثر بر روی غشای سلول باکتری‌ها موجب لغزندگی و جداشدن آنها از سطوح می‌شوند مانند صابون‌های خانگی و انواع شوینده‌ها.

۱۰ــ۲ــ۴ــ گازها : مانند اکسیداتیلن یا اکسید پروپیلن برای استریل کردن وسایلی که با گرما، مواد شیمیایی یا اشعه به راحتی استریل نمی‌شوند مانند بالشتک‌ها، تشتک‌ها، غذاهای خشک و ظرف‌های پلاستیکی و مصارف عمومی بیمارستان‌ها کاربرد دارد. همه این‌ها در یک فضای بسته قرار داده شده و با گاز اکسید اتیلن سالم سازی شوند.

۳ــ۴ــ تابش اشعه یا پرتودهی

تابش اشعه اثرات زیادی بر سلول‌ها می‌گذارد که به طول موج، شدت و زمان در معرض بودن آن بستگی دارد. پرتوهایی که برای از بین بردن میکروب‌ها به کار می‌روند دو نوع هستند :

ــ پرتوهایی که قدرت یونیزه کنندگی دارد مانند پرتو گاما و پرتوی ایکس.

ــ پرتوهایی که قدرت یونیزه کنندگی ندارند ولی طول موج بلندتر از پرتوهای یونیزه کننده دارند مانند اشعه فرا بنفش.

---

۱ ــ Surfactant (Surface active agents)

اشعه گاما که از برخی مواد رادیواکتیو مانند کبالت ساطع می‌شود قدرت نفوذ بالایی دارد ولی برای استریل کردن توده‌های زیاد زمان زیادی برای نفوذ اشعه فرابنفش به DNA سلولی که در معرض آن قرار دارد، لازم است. اشعه با ایجاد بازهای تیمین دوتایی در زنجیره DNA باعث اختلال در همانند سازی آن می‌شود. طول موج پرتوی فرابنفشی که بیشتر برای کشتن میکروارگانیسم‌ها مؤثر بوده، حدود ۲۶۰ نانومتر است. برای از بین بردن میکروب‌ها از پرتوهای با طول موج کوتاه و قدرت نفوذ زیاد استفاده می‌شود. از میان انواع اشعه، اشعه فرا بنفش(UV) با طول موج ۳۵۰ـ۲۰۰ نانومتر قدرت میکروب کشی مناسب دارد. بزرگترین عیب پرتوی فرابنفش قدرت نفوذ پایین آن است بنابراین برای اینکه این اشعه بتواند میکروارگانیسم‌ها را از بین ببرد، می‌بایست آنها را در معرض مستقیم این اشعه قرار دارد. مشکل دیگر این اشعه این است که می‌تواند به چشم انسان آسیب برساند.

یادآوری :

الف) در اتاق‌های انجام آزمون‌های میکروبی بهتر است لامپ‌های UV برای استریل کردن فضای اتاق در سقف نصب شود.

ب) هنگام کار با UV باید از دستکش محافظ و پیراهن آستین بلند استفاده شود.

پ) هنگام روشن بودن UV در زیر هود بیولوژیک باید دریچه جلویی آن بسته باشد.

ت) در صورتی که چشم یا پوست توسط UV آسیب دیده باشد فرد باید توسط پزشک معاینه شود.

ث) به دلیل خطر ناشی از روشن بودن لامپ UV برای انسان و کارکنان آزمایشگاه، لازم است سالم سازی با UV زمانی انجام شود که کارکنان و هنرآموزان در محل حضور ندارند.

۴ـ۴ـ نحوه کاربرد مواد و روش‌های سترون کننده

ـ برای سترون‌سازی تجهیزات و وسایل مقاوم به گرمای خشک مانند وسایل فلزی (جای پی‌پت‌ها و جای لوله‌های آزمایش) و شیشه‌ای (ارلن،بشر، استوانه‌های مدرج و پی‌پت‌ها) از آون با دمای ۱۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت استفاده می‌شود.

ـ پیش از دور انداختن وسایل یکبار مصرف مانند تشتک‌های یک بار مصرف لازم است آنها را سالم سازی نمود.

ـ مواد و وسایل شیشه‌ای را باید پیش از استفاده با گرمای مرطوب (اتوکلاو) و یا گرمای خشک (آون) سترون کرد.

ـ برای آلودگی‌زدایی و دفع مواد بهتر است آنها را درون کیسه‌های پلاستیکی مقاوم به گرما قرار داده و سپس اتوکلاو کرد.

ـ پیش از شستشوی وسایل شیشه‌ای آلوده با میکروب‌ها، باید آنها را اتوکلاو کرد.

ـ در طی آزمون، وسایل کوچکی مانند پی‌پت‌ها،میله‌های شیشه‌ای یا همزن، میله شیشه‌ای سرکج، پنس و... را باید در محلول سترون کننده (الکل اتانل ۷۰٪) یا محلول فنل قرار داد.

ـ برای سترون سازی پی‌پت‌های تمیز شده باید آنها را درون جا پی‌پتی قرار داده و در آون با دمای $170^{\circ}C$ به مدت دو ساعت سترون نمود.

ـ پس از استفاده از پی‌پت‌ها به ویژه هنگام کار با مایعات آلوده باید از طرف نوک، آنها را در یک ظرف استوانه‌ای بزرگ دارای محلول سترون کننده قرار داد تا سالم‌سازی شود، سپس آنها را شسته و درون آون سترون کرد.

ـ لوله‌های آزمایش را باید پیش و پس از آزمون‌های میکروبی در آون با دمای $170^{\circ}C$ سترون کرد.

ـ هنگام کار با میله‌های شیشه‌ای باید از قسمت سر، درون ظرف دارای الکل اتانل ۷۰ درصد قرار داده شوند و موقع استفاده یکبار از روی شعله عبور داده شوند. با این عمل و سوختن الکل میله‌ها سترون می‌شوند.

یادآوری : اتوکلاو بهترین وسیله برای سترون سازی و آلودگی‌زدایی است.

فصل پنجم

آماده‌سازی محیط‌های کشت میکروبی

محیط‌های کشت[1]

با شناخت فاکتورهای محیطی و مواد مغذی مورد نیاز رشد باکتری‌ها، ایجاد شرایط ویژه برای کشت آنها امکان پذیر می‌باشد. این شرایط شامل تعادل گازهای اتمسفر،مواد مغذی، دما و رطوبت نسبی هوا است.

۱ــ۵ــ انواع محیط‌های کشت آزمایشگاهی

۱ــ۱ــ۵ــ محیط کشت ساده : ساده‌ترین نوع محیط‌های کشت آزمایشگاهی هستند که دارای ترکیبات ساده مغذی مانند کربوهیدرات، مواد معدنی، ویتامین‌ها، پروتئین و آب می‌باشند.

۲ــ۱ــ۵ــ محیط‌های پیچیده یا کمپلکس : معمول‌ترین محیط های کشت آزمایشگاهی بوده که دارای انواع مختلفی از مواد مانند عصاره گوشت، پروتئین‌ها، مواد مغذی، ویتامین‌ها و سایر مواد غذایی می‌باشند. معروف‌ترین این محیط‌های کمپلکس نوترینت برات[2] یا آبگوشت مغذی نام دارد که دارای ۵ گرم پپتون، ۱۰گرم عصاره گوشت، ۵ گرم کلرور سدیم و ۱لیترآب مقطر است. چنانچه آگار به محیط کشت افزوده شود، محیط کشت جامد می‌گردد. مانند نوترینت آگار[3] یا آگار مغذی. بیشتر باکتری‌هایی که رشد آسان دارند مانند اشریشیاکلی در این محیط به راحتی رشد می‌کنند.

یادآوری : آگار یک پلی‌ساکارید است که از نوعی جلبک دریایی به دست می‌آید و در محیط‌های کشت تنها نقش سفت کننده دارد نه مغذی.

۳ــ۱ــ۵ــ محیط‌های کشت اختصای یا غنی کننده[4] : بسیاری از باکتری‌های بیماریزا به ویژه آنهایی که در پزشکی دارای اهمیت هستند به سادگی رشد نمی‌کنند و نیاز به محیط‌های کشت غنی‌تر از محیط‌های کمپلکس مانند آگار مغذی دارند. دو نمونه از محیط‌های کشت غنی که در آزمایشگاه‌ها کاربرد بیشتری دارد عبارتند از :

الف) آگار خون دار[5] *:* که علاوه بر ترکیبات محیط کمپلکس دارای خون به عنوان ماده غنی‌کننده و فاکتور رشد مناسب هستند

---

۱ ــ Culture media

۲ ــ Nutrient broth

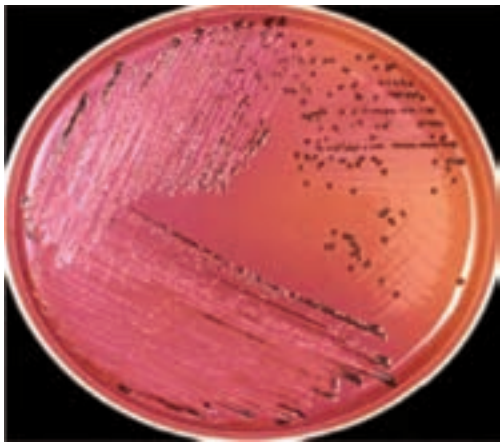
۳ ــ Nutrient Agar

۴ ــ Enrichment media

۵ ــ Blood agar

و برای کشت گونه‌های باکتری استرپتوکوکوس پایوژنز[1] که عامل عفونت گلو هستند به کار می‌رود.

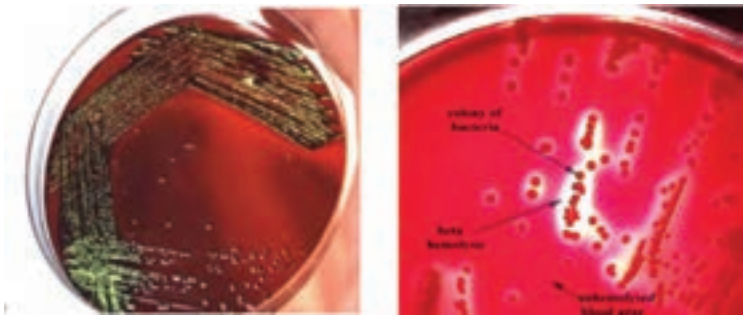
ب) شکلات آگار[2]: علاوه بر ترکیبات محیط کمپلکس دارای گویچه‌های قرمز خونی لیز شده و مواد مغذی اضافی است.



شکل ۱ــ ۵ ــ کلنی باکتری سالمونلا در محیط کشت مک کانکی آگار

۴ــ۱ــ۵ــ محیط‌های کشت انتخابی[3]: محیط‌های کشتی که از رشد یک گروه از میکروارگانیسم‌ها نسبت به گروه دیگر جلوگیری می‌کنند و تنها باعث رشد میکروب مورد نظر در محیط کشت می‌شوند، محیط کشت انتخابی نامیده می‌شوند. ترکیباتی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، برخی رنگ‌ها مثل کریستال ویوله و نمک‌های صفراوی جزء مواد انتخابی هستند که اگر به محیط کشت کمپلکس افزوده شوند آنها را تنها برای تکثیر پاره‌ای از باکتری‌ها مساعد می‌کنند. معروف‌ترین محیط‌های کشت انتخابی مک کانکی آگار[4] است. این محیط دارای رنگ کریستال ویوله (برای جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم مثبت) و املاح صفراوی (برای جلوگیری از رشد گرم منفی‌های غیر روده‌ای) می‌باشد. در نتیجه در محیط مک کانکی آگار تنها باکتری‌های گرم منفی روده‌ای مانند سالمونلا، شیگلا و اشریشیاکلی می‌توانند رشد کنند. در شکل(۱ــ۵) کلنی باکتری سالمونلا در محیط کشت انتخابی مک کانکی آگار نشان داده شده است.

۵ــ۱ــ۵ــ محیط‌های کشت افتراقی[5]: این نوع محیط کشت برای تشخیص کلنی میکروارگانیسم‌های مورد نظر از کلنی سایر باکتری‌ها به کار می‌رود که یا از روی رنگ کلنی مانند کلنی‌های سبز با جلای فلزی و براق باکتری اشریشیا کلی در محیط افتراقی EMB (ائوزین متیلن بلو) و یا از روی میزان همولیز در محیط‌های افتراقی خون‌دار استفاده می‌شود. باکتری‌های همولیزکننده خون از باکتری‌های بدون همولیز تشخیص داده می‌شوند (از روی هاله همولیز اطراف کلنی).



(الف) (ب)

شکل۲ــ۵ ــ (الف)کلنی‌های دارای هاله روشن همولیز بر روی محیط کشت Blood agar و (ب) کلنی سبز براق اشریشیا کلی در محیط EMB

۶ــ۱ــ۵ ــ محیط‌های کشت متابولیکی یا بیوشیمیایی: محیط‌های کشتی که بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی و فعالیت متابولیکی باکتری‌ها تهیه می‌شوند و بیشتر برای تعیین جنس و گونه باکتری‌ها به ویژه باکتری‌های گرم منفی به‌کار برده می‌شوند، محیط کشت متابولیکی یا بیوشیمیایی نام دارند. مکانیسم عمل این محیط‌ها و نحوه بررسی یافته‌های آنها یکی از مهم‌ترین تست‌های آزمایشگاهی برای شناسایی باکتری‌های کشت شده در محیط‌های کشت به ویژه باکتری‌های گرم منفی است و نیاز به آگاهی و دقت

---

۱ ــ Streptococcus payogenesis

۲ ــ Choclate agar

۳ ــ Selective media

۴ ــ Mac – Conky agar

۵ ــ Differential media

زیادی دارد. بنابراین در این بخش به طور کامل در مورد مهم ترین این تست‌ها و مکانیسم عملشان شرح داده خواهد شد. فرمول کامل محیط‌های کشت مورد استفاده، در فصل آخر ارائه می‌شود.

مهم‌ترین تست‌های متابولیکی به عنوان تست‌های ایمویک (IMVIC) معروفند و شامل ۴ محیط بیوشیمیایی مهم با نام‌های :

الف) TSI agar [۱] : این محیط دارای سه نوع قند گلوکز، لاکتوز و ساکارز به نسبت (۱ــ۱۰ــ۱۰) همراه با یک ترکیب آهن‌دار (سولفات فروس) و معرف فنل رد به عنوان شناساگر اسیدی و پپتن می‌باشد. همانطور که در شکل (۳ــ۵) نشان داده شده است این محیط قرمز رنگ به صورت کج درون لوله‌های آزمایش تهیه می‌شود (به آماده سازی محیط‌های جامد مراجعه شود). همانطور که در شکل نشان داده شده محیط TSI دارای یک بخش سطحی و یک بخش عمیق است.

شکل۳ــ۵ ــ محیط کشت قرمز رنگ و مورب TSI

روش کشت : هنگام تلقیح محیط ابتدا باید با استفاده از لوپ از کلنی‌های تک باکتری مورد نظر در محیط کشت جامد برداشت، و لوپ را در عمق محیط فرو کرده، سپس با همان لوپ روی سطح شیبدار محیط نیز به صورت زیگزاگ از بالا تا پایین کشت داده درپوش لوله را بسته و آن را در گرمخانه با دمای $35\ ^{\circ}C$ به مدت ۴۸ــ۲۴ ساعت قرار داد.

نکته‌ها

✓ تمام مراحل باید در کنار شعله با فاصله ۳۰ سانتی‌متری انجام شود.

✓ لوپ باید پیش و پس از انجام تست با شعله استریل شود.

✓ هنگام کشت دادن نباید هرگز در پوش لوله را بر روی سطح میز کار قرار داد زیرا باعث انتقال آلودگی به درون لوله تست شده و نتیجه آزمایش دچار اشکال می‌گردد. بهتر است در پوش لوله را با انگشت کوچک دست راست گرفته و لوله را با دست چپ نگه‌داشت و همزمان با لوپی که در دست راست است کشت داد.

✓ پس از انجام کشت باید سر لوله را یکبار به سرعت از روی شعله عبور داده تا از آلودگی در لوله‌های تست جلوگیری شود.

✓ هنگام کشت باکتری درون لوله دارای محیط بیوشیمیایی باید از صحبت کردن خودداری شود.

بررسی یافته‌های انجام تست TSI : یافته‌های به دست آمده از کشت باکتری در محیط TSIمربوط به ویژگی‌های تخمیرقندها توسط باکتری، تولید یا عدم تولید گاز و تولید یا عدم تولید رسوب سیاه رنگ نمک‌های H_2S است.

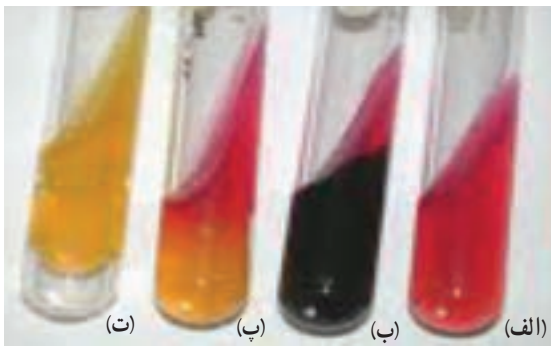
ــ ویژگی‌های تخمیری : برای تخمیر قندها در محیط TSI سه حالت وجود دارد که بسته به نوع باکتری می‌تواند یکی از این سه حالت را نشان دهد.

۱ــ سطح قرمز رنگ (قلیایی)، عمق محیط قرمز (قلیایی) **K/K (الف)**

۲ــ سطح قرمز(قلیایی)،عمق محیط زرد(اسیدی) **K/A (پ)**

۳ــ سطح زرد (اسیدی)،عمق محیط زرد(اسیدی) **A/A (ت)**

در شکل(۴ــ ۵) این سه حالت نشان داده شده است.



شکل۴ــ۵ ــ (الف) K/K، (ب)K/K و تولید رسوب سیاه رنگ H_2S، (پ) K/A و (ت) A/A

۱ ــ Triple Sugar Iron agar

ـ ***تولید گاز :*** به وجود آمدن شکاف، ترک خوردگی، حباب و خالی شدن ته لوله آزمایش در محیط TSI نشانه وجود گازهایی مانند دی اکسید کربن و هیدروژن است (شکل ۴ـ۵ قسمت ت).

ـ ***تولید H_2S :*** تولید رسوب سیاه رنگ دی سولفید هیدروژن به شرایط اسیدی نیاز دارد که به صورت لکه سیاه در محیط دیده می‌شود (شکل۴ـ۵ قسمت ب).

ب) محیط SIM[1] : این محیط کشت دارای اسید آمینه تریپتوفان است و سه ویژگی حرکت،تولید H_2S و تولید اندول توسط باکتری‌ها را نشان می‌دهد.

روش کشت : از کلنی تک همان باکتری که برای تست TSI به کار رفته، با سوزن کشت یا آنس برداشت کرده و به‌طور عمودی در محیط SIM فرو کرده و کشت دهید.

نکته‌هایی که برای کشت در TSI گفته شد در این‌جا هم باید مورد توجه قرار گیرد.

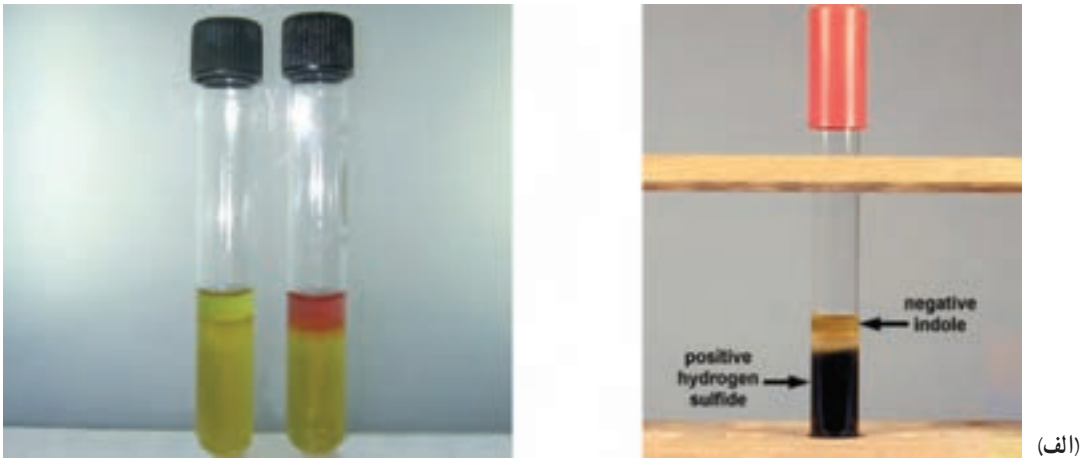
بررسی یافته‌های کشت باکتری در محیط SIM

ـ ***تولید رسوب نمک‌های H_2S :*** به صورت لکه سیاه رنگ در محیط دیده می‌شود، همانند شکل (۵ـ۵ قسمت الف).

ـ ***حرکت باکتری :*** اگر در مسیری که سوزن کشت فرورفته و اطراف آن در محیط کدورت ایجاد شود نشانه حرکت باکتری است در غیر این صورت باکتری فاقد حرکت است. (شکل ۵ـ۵ قسمت ب)

ـ ***تولید اندول :*** باکتری‌هایی که از اسید آمینه تریپتوفان استفاده می‌کنند قادر به تجزیه تریپتوفان و تولید اندول هستند که با افزودن ۵ قطره **معرف کواکس** و ایجاد حلقه قرمز رنگ در سطح محیط قابل تشخیص است. (شکل ۵ـ۵ قسمت ب).

پ) محیط سیمون سیترات[2] : در محیط سیمون سیترات که سبز رنگ و کج است، ترکیب سیترات و معرف بروموتیمول بلو وجود دارد و این محیط برای تعیین این که آیا باکتری قادر به استفاده از سیترات به عنوان منبع کربن است یا خیربه کار می‌رود.



(ب) (الف)

شکل۵ـ۵ـ (الف) نمونه اندول منفی ولی دارای رسوب سیاه H_2S، (ب) در سمت راست نمونه اندول مثبت و در سمت چپ نمونه دارای حرکت است.

روش کشت : از کلنی همان باکتری که در آزمون پیشین استفاده شد با لوپ برداشت کرده و در سطح کج محیط به صورت زیگزاگ از بالا تا پایین کشت دهید.

نکته‌هایی که برای دو محیط پیش گفته شد در اینجا نیز باید مورد توجه قرار گیرد.

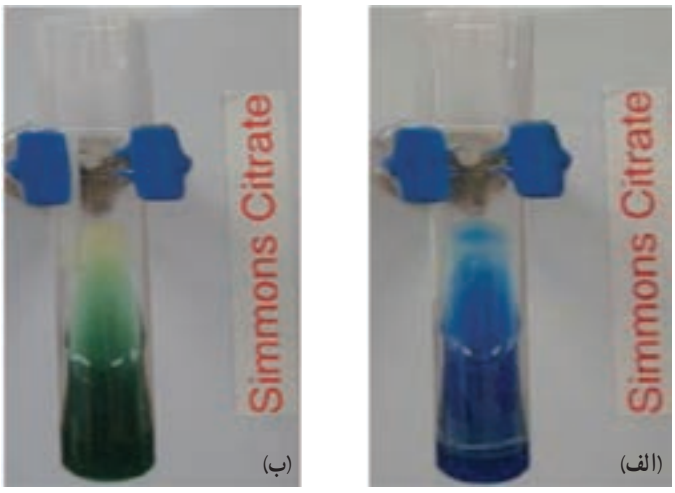
---

۱ ـ Sulfide Indole Motility medium

۲ ـ Simon Citrate agar

بررسی یافته‌های کشت باکتری‌ها در محیط

سیمون سیترات : باکتری‌هایی که قادر به استفاده از سیترات باشند رنگ معرف موجود در محیط را تغییر داده و از سبز به آبی تبدیل می‌کنند، (شکل۶ـ۵ قسمت الف) باکتری‌هایی که قادر به استفاده از سیترات نیستند رنگ محیط را تغییر نمی‌دهند (شکل۶ـ۵ قسمت ب).

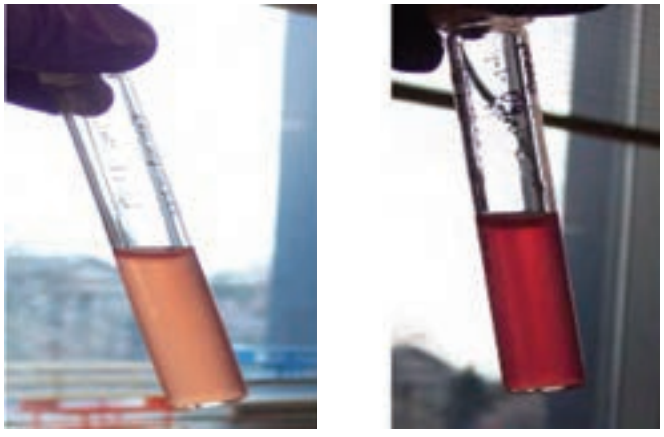


شکل۶ـ ۵ ـ (الف)نمونه سیترات مثبت و(ب)نمونه سیترات منفی

ث) محیط MRVP[1] : این محیط کشت ساده و از گلوکز، پپتن و برخی از املاح ساخته می‌شود و برای شناسایی تفاوت بین باکتری‌هایی که از مسیر متابولیسم اسیدی استفاده می‌کنند (متیل رد) از باکتری‌هایی که از مسیر بوتیلن گلیکول آزاد کننده استن یا وژپروسکوئر استفاده می‌کنند به کار می‌رود.

روش کشت : از کلنی تک همان باکتری با لوپ برداشت کرده و در داخل محیط مایع MRVP به شکل سوسپانسیون درآورده می‌شود.

بررسی یافته کشت باکتری در محیط MRVP : برای تعیین مسیر MR ویا مسیرVP، محیط موجود در لوله را بین دو لوله آزمایش تقسیم کرده، یک بخش محیط برای تست MR و بخش دیگر برای تست VPبه کاربرده می‌شود.



شکل۷ـ ۵ ـ (الف) نمونه MR مثبت و (ب) نمونه MR منفی

ـ MR : به یکی از دو لوله آماده شده بالا ۶ قطره معرف متیل رد اضافه می‌شود. اگر رنگ محیط قرمز رنگ شد یعنی باکتری از مسیر متیل رد استفاده می‌کند، (شکل۷ـ۵ قسمت الف) و اگر تغییر نکرد از مسیر دیگر مانند (شکل ۷ـ۵ قسمت ب).

ـ VP : به لوله دوم آماده شده ۵ قطره آلفانفتول۶٪ و KOH اضافه می‌شود پس از ۲۰ دقیقه نتیجه بررسی می‌گردد. اگر در لوله دو فاز تشکیل شود که فاز رویی قرمز رنگ باشد یعنی مسیر باکتری VP است.

نکته : در بیشتر موارد این دو مسیر از هم متفاوت هستند و باکتری‌ها تنها یکی از این دو مسیر را استفاده می‌کنند بنابراین اگر نتیجه یکی از این دو تست مشخص شود، دیگری عکس آن خواهد بود.

---

۱ ـ Methyl Red Vogese Preosquer

در زمانی که همه آزمون‌های بیوشیمیایی انجام شد یافته‌ها بررسی و با توجه به جدول تست‌های بیوشیمیایی باکتری‌های گرم منفی می‌توان گونه باکتری را مشخص کرد.

۲ــ ۵ ــ آماده سازی و سترون سازی محیط‌های کشت آزمایشگاهی

محیط‌های کشت آزمایشگاهی یا به صورت پودرهای آماده مصرف تجارتی بسته‌بندی شده در قوطی‌ها در اختیار آزمایشگاه‌ها قرار می‌گیرند یا باید در آزمایشگاه، با توجه به ترکیبات محیط کشت آنها را تهیه نمود. در این فصل روش آماده‌سازی محیط‌های کشت آماده شرح داده می‌شود و روش تهیه محیط‌های کشت غیر آماده با توجه به محیط‌های کشتی که در این کتاب مورد نیاز است در فصل آخر شرح داده خواهد شد.

۱ــ۲ــ ۵ ــ تهیه محیط‌های کشت آماده : همانطور که گفته شد، محیط‌های آماده به صورت پودر تهیه و به شکل بسته‌بندی شده در اختیار آزمایشگاه‌ها قرار می‌گیرد. برای آماده سازی آنها ابتدا باید برچسب روی بسته که دستور کار تهیه محیط کشت مورد نظر روی آن گنجانده شده است، خوانده و مراحل تهیه محیط را به ترتیب زیر انجام داد.

تهیه محیط کشت جامد نوترینت آگار : بر روی برچسب قوطی نوشته شده که ۲۳ گرم در ۱ لیتر، اگر تنها به نصف این مقدار ۵۰۰ سی سی محیط احتیاج باشد مقدار پودر هم نصف می‌شود. برای هر مقدار به سادگی می‌توان از تناسب استفاده کرد :

$$\frac{۵۰۰ \times ۲۳}{۱۰۰۰}$$

برای وزن کردن پودر، ابتدا باید یک تکه کاغذ تمیز و کوچک یا فویل آلومینیوم را روی ترازو قرار داده و عدد ترازو را با آن صفر کرد. سپس پودر را کم کم روی صفحه ریخته تا عدد ترازو اندازه مورد نظر را نشان دهد.

مقدار پودر وزن شده را باید در حجم مناسب آب مقطر که با استوانه مدرج اندازه‌گیری می‌شود، حل نمود و برای این که از گلوله شدن پودر محیط در آب مقطر جلوگیری شود، باید ابتدا مقدار کمی‌از پودر را در ظرف مناسب (ارلن با حجم مناسب) ریخت. سپس آب مقطر و بقیه پودر را کم کم به آن اضافه کرد و همزمان ظرف دارای پودر و آب مقطر را تکان داد. در این مرحله باید دقت کرد که محیط کشت با توجه به نامش جزء کدام محیط‌ها است مایع (broth)، جامد (آگار) یا نیمه جامد (Medium).

- ✓ اگر محیط مایع باشد برای یکنواخت کردن و شفاف شدن محیط نیازی به گرمادهی نیست.
- ✓ اگر محیط جامد و نیمه جامد باشد باید آن را گرم کرد تا شفاف گردد.

یادآوری : برای گرمادهی محلول دارای محیط و آب مقطر، ابتدا باید درپوش ظرف را برداشت. این عمل موجب می‌شود که اگر هنگام گرمادهی دما به حد جوش برسد در اثر فشار زیاد، محیط داخل ظرف با شدت به خارج پرتاب نشود و خطری برای کارکنان و یا هنرجویان ایجاد نکند. به علاوه ارلن نباید به مدت طولانی روی شعله مستقیم قرار گیرد؛ بلکه باید از سه پایه و توری نسوز استفاده کرد و پس از چند دقیقه ارلن را کنار گرفت و به آرامی تکان داد یا مشعل را از زیر آن خارج نمود.

یادآوری : عمل گرمادهی تا زمانی انجام می‌شود که محیط به خوبی و به طور کامل شفاف گردد.

سترون‌سازی محیط‌های کشت : مهم‌ترین مرحله در آماده سازی محیط‌های کشت سترون سازی آنها است. برای سترون‌سازی محیط‌های کشت آزمایشگاهی باید از اتوکلاو با دمای $۱۲۱^{\circ}C$ و با فشار ۱۵ پوند بر اینچ به مدت زمان لازم استفاده نمود. زمان ۱۵ دقیقه از هنگامی است که خارج شدن بخار از اتوکلاو به صورت پیوسته ویا به اصطلاح دم روباهی بوده و سوپاپ خروج هوا و بخار بسته می‌شود.

نکته‌ها

✓ ارلن دارای محیط کشت تهیه شده باید درپوش گذاری شود. (برای این منظور از چوب پنبه‌هایی که به طور محکم با چسب بر روی دهانه ارلن قرار داده می‌شوند استفاده می‌گردد). این عمل باعث می‌شود که طی گرمادهی محیط در اتوکلاو در اثر فشار ایجاد شده محتوی ارلن به بیرون از آن نریزد.

✓ پس از مدت زمان اتوکلاو کردن با رعایت تمام نکته‌های ایمنی، ارلن دارای محیط کشت باید از اتوکلاو خارج شود.

✓ دمای محیط کشت باید تا حدود $45^{\circ}C$ کم شود.

✓ سرد شدن محیط کشت باید در حدی باشد که محیط‌های آگار دار و جامد، سفت نشوند، بلکه به صورت مذاب باشند. برای این منظور بهتر است ارلن دارای محیط کشت را درون حمام بخار آب با دمای $42^{\circ}C$ قرار داد. (برای آگاهی بیشتر درباره استفاده از حمام آب به فصل اول مراجعه شود)

یادآوری : تا زمان استفاده از محیط کشت نباید درپوش آن‌را برداشت زیرا ممکن است محیط کشت آلوده شود.

۲ــ۲ــ۵ــ پخش محیط‌های کشت آماده شده درون لوله‌ها و تشتک‌ها : محیط‌های کشت آماده شده بسته به جامد، مایع و نیمه جامد بودن به صورت زیر در ظرف‌های مربوط پخش می‌گردند.

ــ محیط جامد (آگاردار) درون تشتک‌ها : این نوع محیط برای کشت باکتری‌ها، جداسازی و روش‌های شمارش میکروب‌ها به‌کار می‌رود. اگر محیط‌ها جامد باشند پس از سترون سازی ابتدا باید دمای آنها به $42^{\circ}C$ برسد (دمای مذاب) برابر آنچه گفته شد تا زمان پخش محیط درون تشتک‌ها باید به حالت مذاب بماند (برای این منظور بهتر است از حمام بخار آب استفاده شود). مراحل و پخش محیط در تشتک‌ها باید به صورت زیر انجام گیرد :

الف) تشتک‌های خالی شیشه‌ای یا یکبار مصرف پلاستیکی را باید به تعداد مناسب و با توجه به حجم محیط تهیه شده در روی سطح صاف درکنار هم قرار داد به طوری که پشت تشتک روی سطح و در آن به بالا قرار گیرد تا بتوان به راحتی درب آن را برداشت.

یادآوری :

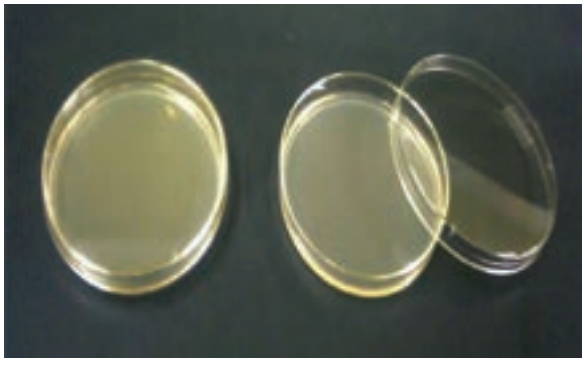
۱ــ پیش از قرار دادن تشتک‌های خالی بر روی سطح، باید ابتدا همه سطح را با پنبه آغشته به الکل سترون سازی کرد.

۲ــ ارلن دارای محیط کشت مذاب (دمای $42^{\circ}C$) را ازحمام بخار آب خارج کرده و پس از برداشتن درپوش حدود ۱۵ تا ۲۵ میلی لیتر از محتوی آن را در مجاورت شعله به درون هر یک از تشتک‌های خالی ریخت.

۳ــ برای ریختن محیط درون تشتک‌ها بهتر است با دست چپ درب تشتک را تنها به اندازه ۴۵ــ۶۰ درجه برداشته و با دست راست محیط مایع درون ارلن را به داخل تشتک منتقل کرد.

۴ــ با توجه به اینکه تعیین حجم ۲۵ــ ۱۵میلی لیتر محیط تنها با وسایل حجم سنجی امکان پذیر بود، و زمان گیر می‌باشد، بهتر است محیط را به اندازه‌ای درون تشتک افزود که به اندازه نصف سطح آن را در برگیرد و به آرامی همه سطح تشتک با محیط کشت مذاب پوشانده شود (شکل ۸ ــ ۵).

۵ــ گاهی اوقات با افزودن محیط کشت درون تشتک‌ها در سطح آنها حباب‌های هوا تشکیل می‌شود که در صورت باقی‌ماندن می‌تواند در رشد میکروب‌ها مشکل ایجاد کنند. برای از بین‌بردن این حباب‌ها بهتر است با برداشتن در تشتک، سطح محیط



شکل۸ــ ۵ ــ اندازه محیط ریخته شده درون تشتک

کشت را چند لحظه در برابر شعله قرار داد تا حباب‌ها ترکیده شوند.

ب) پس از تمام شدن کار و بستن درب تشتک‌ها، باید آنها را در دمای آزمایشگاه قرار داد تا محیط سفت شود و بدون این که محیط کشت داخل آنها تکان داده شود، جابه‌جا گردند.

ت) تشتک‌های دارای محیط کشت جامد سفت شده را باید در یخچال قرار داد تا در زمان آزمون از آن استفاده شود.

یادآوری :

۱ــ محیط‌های کشت را نباید مدت طولانی در یخچال نگهداری کرد زیرا کهنه شده و باکتری‌ها به‌خوبی در آنها رشد نمی‌کنند. بهتر است همیشه از محیط‌های کشت تازه تهیه شده استفاده شود.

۲ــ محیط‌های کشت آماده شده وکشت داده نشده را باید در یخچالی نگهداری نمود که نمونه‌های میکروبی و محیط‌های آلوده در آن نگهداری نمی‌شوند.

ــ محیط‌های جامد و نیمه جامد (آگار دار) درون لوله‌های آزمایش: این گونه محیط کشت بیشتر جزء محیط‌های متابولیکی یا بیوشیمیایی هستند (به فصل محیط‌های کشت آزمایشگاهی مراجعه گردد)، مانند محیط TSI وSIM که باید در لوله آزمایش تهیه شوند و با توجه به مکانیسم عمل محیط باید به صورت مورب در لوله تهیه شوند مانند TSI و سیمون سیترات. برای آماده کردن این محیط‌ها ارلن دارای محیط جامد مذاب را از حمام بخار آب خارج کرده و محیط داخل آن را درون لوله‌های آزمایش با اندازه‌های مناسب و یکسان پخش کرده و پس از بستن درپوش در یخچال نگهداری کرد.

یادآوری :

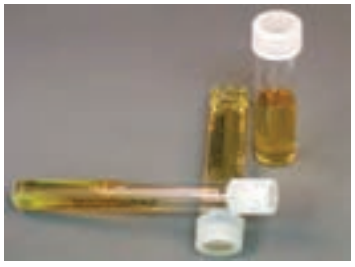
۱ــ بهتر است لوله‌ها در جالوله‌ای قرار داده شوند.

۲ــ تمام لوله‌های آزمایش باید سترون شده و درپوش دار باشند.

۳ــ ریختن محیط کشت درون لوله‌ها را باید در کنار شعله انجام داد و از قرار دادن در لوله روی میز خودداری کرد زیرا باعث انتقال آلودگی به داخل محیط می‌شود.

۴ــ اگر محیط باید در لوله به صورت شیبدار باشد باید لوله دارای محیط مذاب را به صورت کج روی سطح قرار داد تا به همان حالت سفت گردد.

ــ محیط‌های کشت مایع: این نوع محیط باید در لوله‌های آزمایش تهیه شود و در بیشتر موارد برای رشد باکتری‌ها و تست‌های بیوشیمیایی مانندMRVP به‌کار برده می‌شود. محیط‌های مایع را بهتر است پیش از سترون‌سازی ابتدا درون لوله‌های آزمایش به اندازه مناسب ریخته و پس از قرار دادن درپوش، آنها را در اتوکلاو سترون کرده و پس از سترون‌سازی از اتوکلاو خارج و خنک نموده و در یخچال نگهداری کرد.



شکل۹ــ۵ ــ نمونه‌ای از یک لوله آزمایش دارای محیط کشت مایع

فصل ششم

نمونه‌برداری و آماده‌سازی نمونه برای آزمون

نمونه برداری برای آزمون‌های میکروبی

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

ـ نمونه‌برداری

ـ جابه‌جایی نمونه مواد غذایی

ـ دریافت و نگهداری نمونه‌ها در آزمایشگاه میکروب شناسی

ـ آماده سازی نمونه‌های مواد غذایی برای انجام آزمون‌های میکروبی

۱ـ۶ـ نمونه‌برداری

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

۱ـ۱ـ۶ ـ واژه‌های مهم نمونه‌برداری :

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

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

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

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

---

۱ ـ Batch number

۲ ـ Lot

۳ ـ Sub Lot

۴ ـ Sample

گرمی هستند از جاهای مختلف ماده غذایی برداشت شود.

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

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

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

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

برای تهیه نمونه‌های اولیه باید موارد زیر رعایت شود :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

---

۱ ـ Increment

۲ ـ Sampling plan

۲ــ۱ــ۶ــ ویژگی‌های وسایل نمونه‌برداری :

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

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

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

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

۲ــ۶ــ روش نمونه‌برداری از چند ماده غذایی

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

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

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

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

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

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

۶ــ۲ــ۶ ــ شیر تازه :

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

یادآوری :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

۹ــ۲ــ۶ ــ کره :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

۳ـ۶ ـ جابه جایی نمونه‌ها

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

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

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

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

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

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

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

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

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

۴ــ۶ ــ دریافت و نگهداری نمونه‌ها در آزمایشگاه

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

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

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

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

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

۵ــ۶ ــ آماده‌سازی نمونه برای آزمون‌های میکروبی

۱ــ۵ــ۶ ــ رعایت نکته‌های بهداشتی پیش از انجام آزمون :

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

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

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

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

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

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

۱ــ وزن کردن نمونه

۲ــ رقیق کردن نمونه

---

۱ ــ Stable

۲ ــ Non stable

۳ ــ Further decimal dilutions

۳ــ یکنواخت کردن نمونه

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

مواد و وسایل مورد نیاز

- ترازو
- قاشقک
- پنس
- ظرف‌های شیشه‌ای

روش کار

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

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

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

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

نکته‌ها

✓ همه مراحل کار باید در شرایط سترون انجام شود.

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

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

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

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

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

ــ سرم فیزیولوژی (کلرید سدیم ۹ در ۱۰۰۰)

ــ آب پپتونه (۰/۱٪پپتون)

ــ محلول رینگر

ــ سیترات سدیم

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

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

رقیق کننده‌ها به سه منظور استفاده می‌شوند :

الف) رقیق کردن و مایع کردن نمونه‌های جامد

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

پ) جدا کردن میکروارگانیسم‌ها از یکدیگر در نمونه رقیق کننده

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

مواد و وسایل مورد نیاز

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

روش کار

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

نکته‌ها

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

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

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

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

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

مواد و وسایل مورد نیاز

- میله شیشه ای صاف
- همزن

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

نکته‌ها

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

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

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

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

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

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

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

مواد و وسایل مورد نیاز

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

روش کار

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

نکته‌ها

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

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

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

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

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

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

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

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

نکته‌ها

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

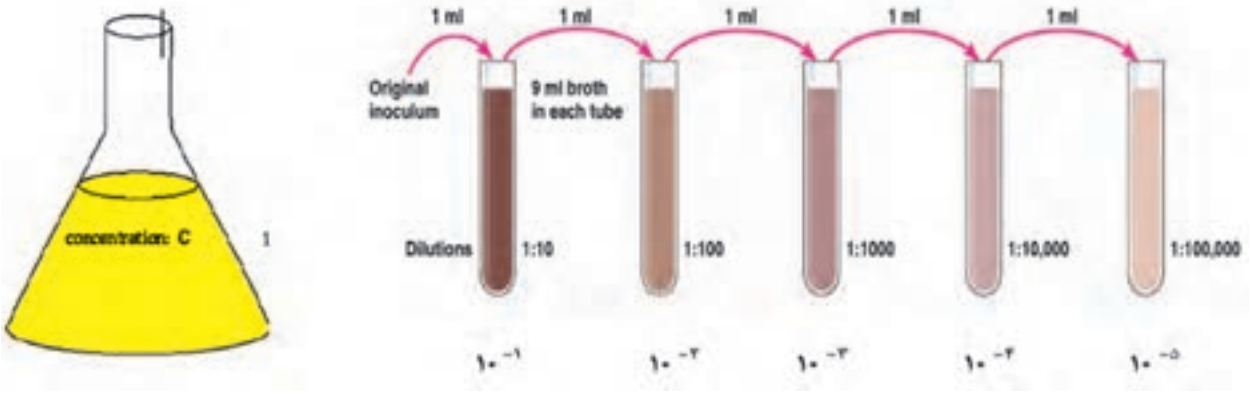
✓ برای تهیه هر رقت باید از یک پی‌پت جدید استفاده شود.

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

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

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

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



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

فصل هفتم

روش‌های کشت میکروارگانیسم

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

نکته‌ها

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

۱ــ۷ــ روش‌های کشت میکروارگانیسم‌های هوازی در محیط جامد

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

ــ کشت سطحی[2]

ــ کشت قطره‌ای

ــ کشت با کمک کاغذ صافی

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

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

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

---

۱ ــ Standard plate count

۲ ــ Surface plate count

مواد و وسایل مورد نیاز

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

روش کار

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

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

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

نکته‌ها

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

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

نکته‌ها

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

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

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

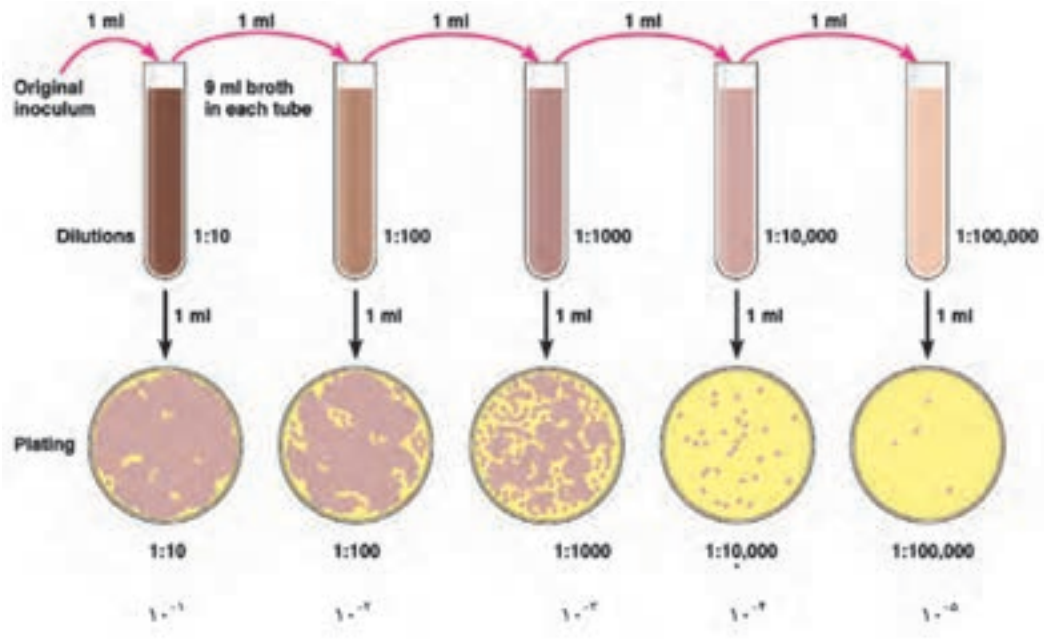
ج) پس از سفت شدن آگار، تشتک‌ها را وارونه کرده و به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه و دمای $35^{\circ}C$ـ$37^{\circ}C$ قرار می‌دهند.

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

---

۱ ـ Plate count agar

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



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

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

مواد و وسایل مورد نیاز

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

روش کار

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

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

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

نکته‌ها

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

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

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

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

نکته‌ها

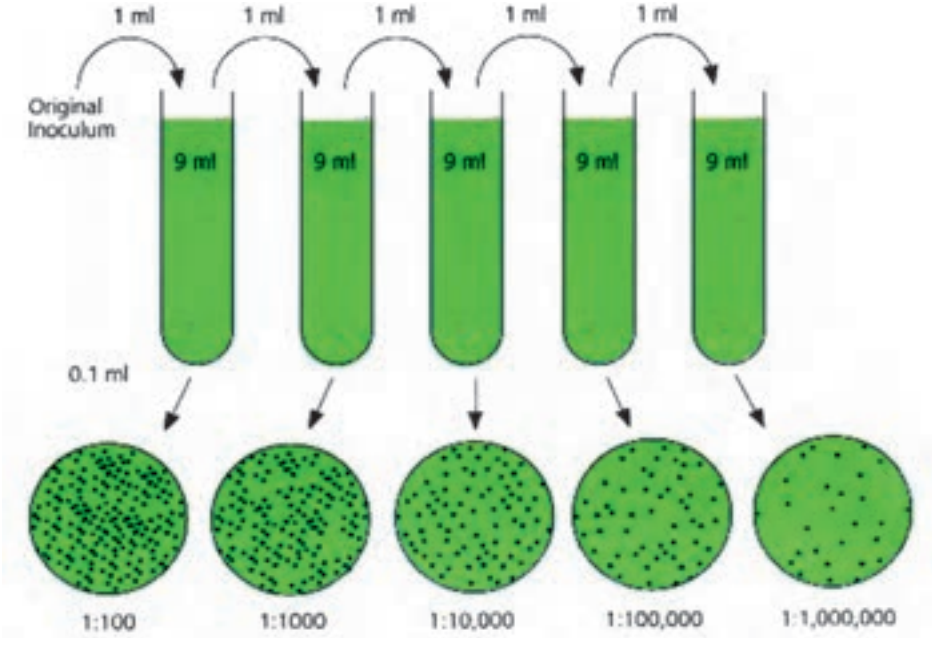
✓ برای سترون سازی میله شیشه‌ای یا قاشقک تا زمان کار آنها را در محلول الکل اتانول ۷۰٪ قرار می‌دهند. در زمان انجام آزمون میلهٔ شیشه‌ای را یکبار از روی شعله عبور داده و سپس خنک می‌کنند. هرگز نباید پخش کننده را در حالت داغ در ظرف دارای الکل قرار داد.

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

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

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

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



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

جدول ۱ــ۷ــ مقایسه روش‌های کشت استاندارد و سطحی

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

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

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

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

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

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

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

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

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

● **نکته‌های مهم در شمارش کلنی‌ها :**

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

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

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

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

---

۱ ــ Proteus

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

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

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

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

که در آن :

N : تعداد میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه غذایی آزمایش شده.

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

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

d : رقت معادل یا اولین رقت شمارش شده.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

راهنمای محاسبه تعداد باکتری‌ها :

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

---

۱ ـ Colony forming unite

محاسبه شود.

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

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

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

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

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

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

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

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

۲ـ۷ـ کشت میکروارگانیسم‌های بی هوازی[۱]

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

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

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

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

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

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

---

۱ ـ Anaerobic microorganism

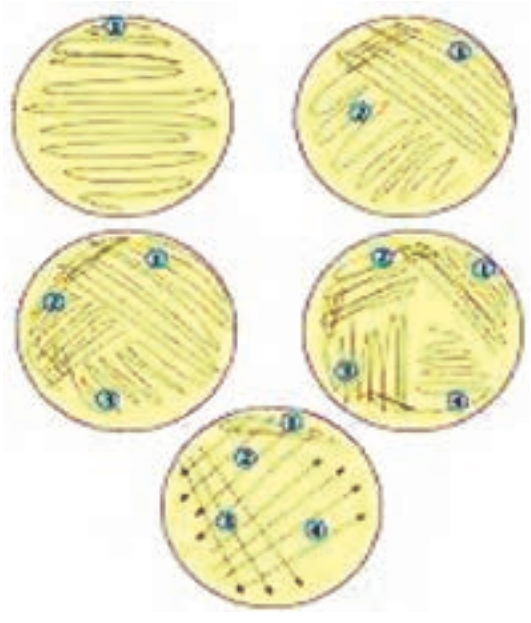
شکل۳ــ۷ــ جار بی هوازی

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

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

۳ــ۷ــ کشت خطی[۱]

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



شکل۴ــ۷ــ انواع مختلف کشت خطی

۱ ــ Streak plate

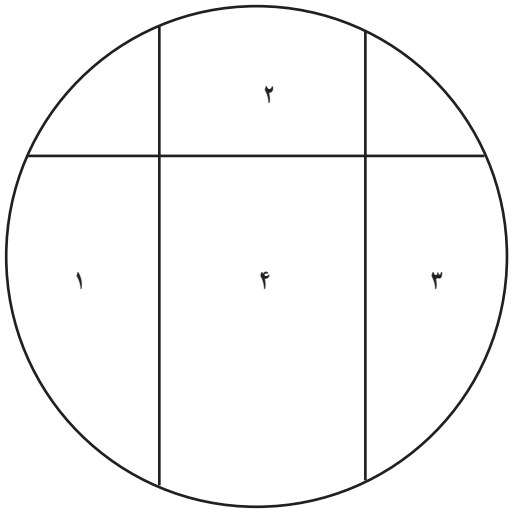
۱ــ۳ــ۷ــ کشت خطی کج راه[1] :

مواد و وسایل مورد نیاز

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

روش کار

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



شکل۵ــ۷ــ تقسیم تشتک به چهار قسمت

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

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

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

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

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

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

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

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

---

۱ ــ Undulating Line Quadraut

داد (شکل۶ــ۷).

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

چ) لوپ حرارت داده و خنک می‌شود.

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

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

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

نکته‌ها

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

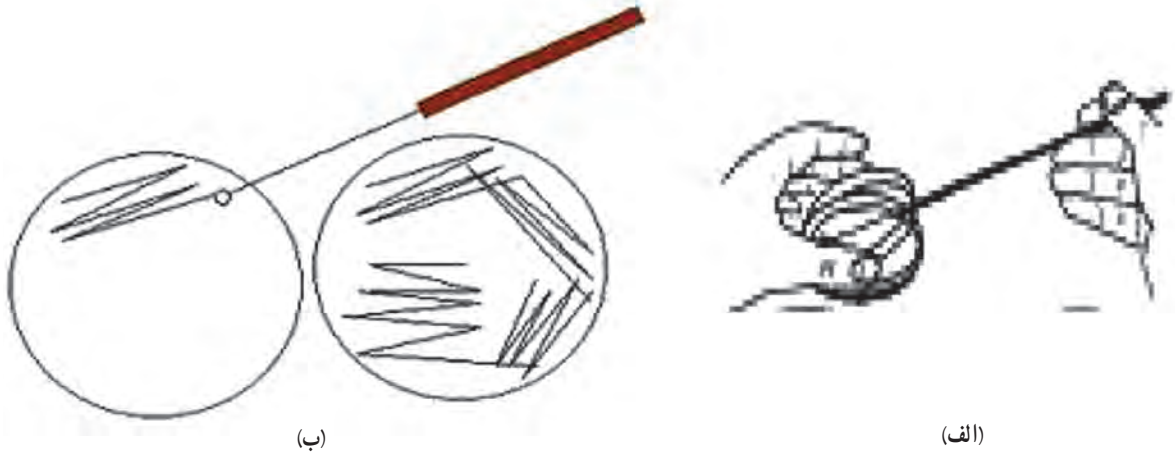
✓ لوپ را باید طوری روی محیط کشت کشید که خراش و بریدگی در محیط ایجاد نشود. برای این کار لوپ را باید با زاویه 45° با سطح محیط قرار داده و به آرامی کشت داد (شکل۶ــ۷ــ ب).

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

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

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

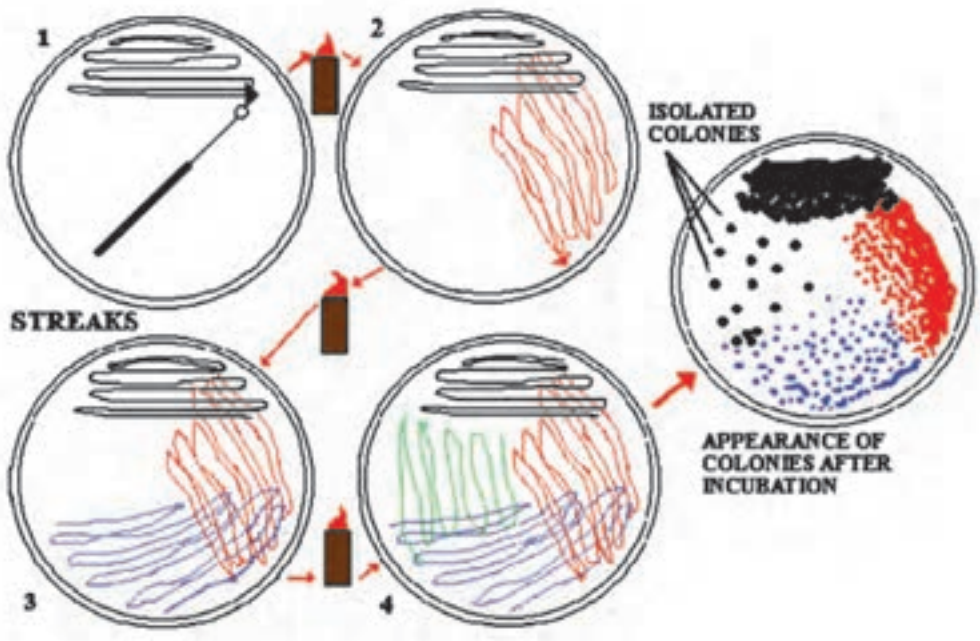
✓ درپوش تشتک را نباید در هر مرحله کشت روی سطح میز قرار داد. بهتر است با دست چپ درپوش و تشتک را نگه داشت و با دست راست توسط لوپ کشت را انجام داد (شکل ۶ــ۷ــ الف).



(ب) (الف)

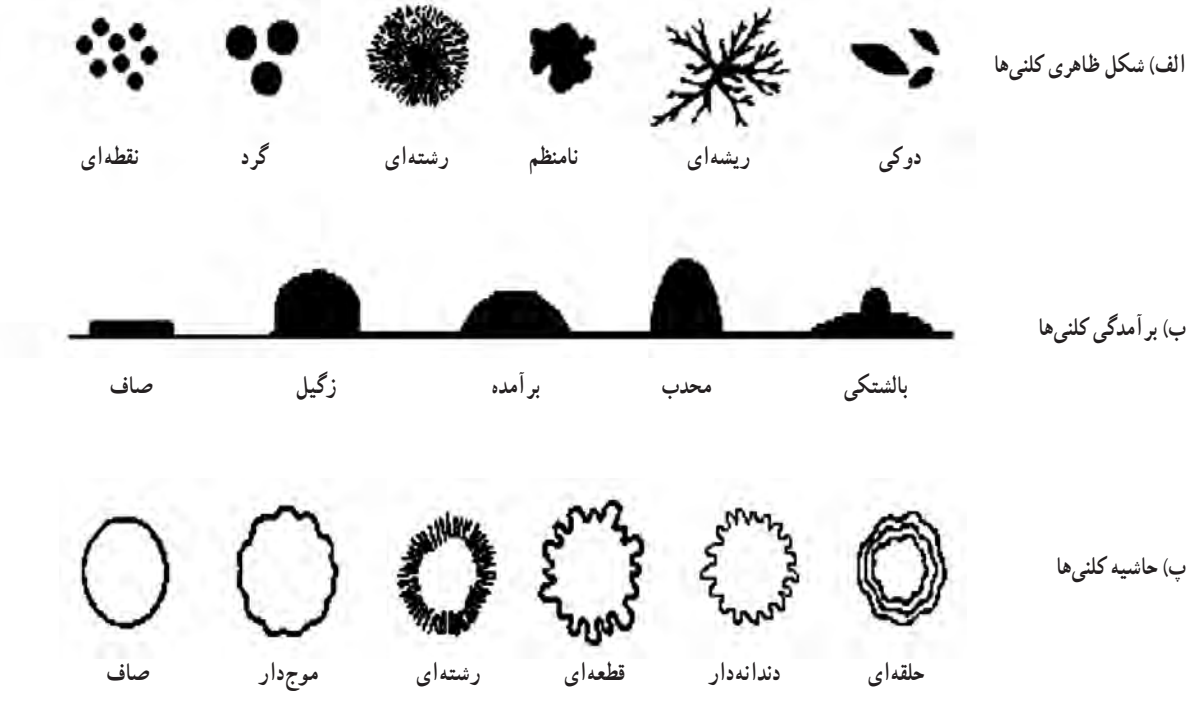
شکل۶ــ۷ــ (الف)طرز صحیح گرفتن لوپ و باز کردن درب تشتک برای انجام کشت خطی. (ب)زاویه لوپ با سطح محیط

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



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

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



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

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

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

مزیت‌ها :

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

ــ دارای سرعت عمل و سادگی است.

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

عیب‌ها :

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

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

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

ــ تشخیص اجزای غذایی از میکروارگانیسم‌ها دشوار است.

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

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

---

۱ ــ Direct Microscopic Count

۲ ــ Bread

۳ ــ Neobar

فصل هشتم

آزمون‌های میکروبی مواد غذایی

معیارهای گزینش روش‌های آزمایشگاهی

انتخاب روش آزمون چه میکروبی و چه شیمیایی و فیزیکی به عوامل گوناگونی بستگی دارد که مهم ترین آنها عبارتند از :

✓ **دقت**[۱] : عبارت است از یکسان بودن داده‌های به دست آمده از چند اندازه‌گیری پشت سر هم که توسط یک پژوهشگر یا کارشناس انجام شده یا اندازه‌گیری‌های انجام شده توسط پژوهشگران مختلف با استفاده از یک روش یکسان یا یک ابزار یکسان

✓ **تکرارپذیری یافته‌ها**[۲] : توانایی دستیابی به پاسخ‌های مشابه توسط پژوهشگران یا کارشناسان آزمایشگاه‌های مختلف با استفاده از روش آزمون ثابت

✓ **صحت**[۳] : بیانگر میزان توانایی و صحت روش برای اندازه‌گیری آنچه قصد تعیین آن می‌رود می‌باشد؛

✓ **سادگی**[۴] : روش به نحوی که نیازی به دستگاه‌های پیچیده و گران قیمت یا تخصص‌های بالا نداشته باشد.

✓ **اقتصادی**[۵] **بودن روش** : و به عبارت دیگر پایین بودن هزینهٔ آزمون شامل محیط‌های کشت و مواد شیمیایی مصرفی و نیروی انسانی

✓ **سرعت عمل**[۶] : منظور زمان لازم برای انجام آزمون از ابتدا تا بدست آمدن نتیجهٔ تجزیه و تحلیل یافته‌هاست.

✓ **حساسیت**[۷] : عبارت است از تابعیت روش مورد استفاده در تشخیص و تعیین مقدار مواد یا تعداد میکروارگانیسم‌ها به مقدار کم یا تعداد کم

✓ **اختصاصی بودن روش**[۸] : عبارت است از توانایی تشخیص و تعیین مواد یا باکتری‌های ویژه درمجاورت مواد یا باکتری‌های مشابه بدون مداخلهٔ منفی

✓ **ایمنی**[۹] : کار با پاره‌ای از مواد شیمیایی میکروارگانیسم‌های بیماری زا یا عامل مسمومیت‌های غذایی برای هنرآموزان

۱ــ Precision

۲ــ Reproducibility

۳ــ Accuracy

۴ــ Simplicity

۵ــ Economy

۶ــ Speed

۷ــ Sensitivity

۸ــ Specificity

۹ــ Safety

و هنرجویان ممکن است خطرناک باشد. به همین جهت ایمنی یکی از معیارهای گزینش در روش‌های آزمون میکروبی مواد غذایی است.

✓ **رسمیت داشتن**[1] : عبارت است از پذیرفته شدن یا مورد تأیید بودن روش توسط سازمان‌های معتبر جهانی و ملی

مهم‌ترین سازمان‌های معتبر جهانی برای این منظور عبارتند از :

الف) کمیسیون جهانی تعیین ویژگی‌های میکروبی مواد غذایی

International Commission for Microbiological Specification of Foods

ب) کمیته ملی ــ مشورتی معیارهای میکروبی موادغذایی

National Advisory Committee for Microbiological Criteria for Foods, NACMCF

پ) سازمان جهانی استاندارد

International Standard Organization, ISO

ت) کمیسیون کودکس موادغذایی (مشترک سازمان جهانی بهداشت و سازمان جهانی خواربار و کشاورزی)

و مهم‌ترین سازمان‌های ملی معتبر در این مورد :

الف) سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی وابسته به وزارت صنایع

ب) ادارهٔ کل نظارت بر صنایع غذایی وابسته به وزارت بهداشت

۱ــ ۸ ــ آزمون‌های میکروبی آب

بیشتر آزمایش‌هایی که روی آب انجام می‌گیرد به منظور تعیین قابلیت شرب آن است. باکتری‌های موجود در آب به سه گروه تقسیم می‌شوند :

ــ باکتری‌های آبزی طبیعی

ــ باکتری‌های خاکزی

ــ باکتری‌های دستگاه گوارش انسان یا جانوران

بیشتر باکتری‌های ساکن آب، گرم منفی هستند مانند سودوموناس[2]، کروموباکتریوم[3]، پروتئوس[4]، آکروموباکتر[5]، استرپتوکوکوس[6]، آئروباکتر[7]، سایتوفاگا[8] و اسنتوباکتر[9]. البته باکتری‌های گرم مثبت مانند میکروکوکوس[10] و باسیلوس[11] نیز به تعداد کم در آب یافت می‌شوند.

۱ــ Official approval

۲ــ Pseudomonas

۳ــ Chromobacterium

۴ــ Proteus

۵ــ Achromobacter

۶ــ Streptococcus

۷ــ Aerobacter

۸ــ Cytophaga

۹ــ Acenetobacter

۱۰ــ Micrococcus

۱۱ــ Bacillus

یادآوری : دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی با شرایط محیط آبی بیشتر سازگاری دارد.

بسیاری از ارگانیسم‌های آبزی در محیط‌های استاندارد معمولی مانند آگار مغذی و یا پلیت کانت آگار رشد نمی‌کنند. باکتری‌های خاکزی نیز از راه شستشوی زمین توسط آب باران وارد آب‌های سطحی می‌گردند. گرچه پس از بارندگی شدید، آبی که به رودخانه وارد می‌شود دارای تعداد زیادی باکتری خاکزی است ولی آب رودخانه‌های جاری دارای بیشینه تعداد باکتری حدود ۱۰۰عدد در هر میلی لیتر هستند. ورود پساب‌ها و پسماندهای جامد صنعتی به آب باعث آلودگی زیاد آب‌های سطحی می گردد. شمارش باکتری‌ها در آب رودخانه‌های آلوده بین ۱۰۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰ باکتری در هر میلی لیتر است و آب دریاچه‌های غیر آلوده دارای حدود ۱۰۰ باکتری یا کمتر در هر میلی لیتر هستند. در بررسی‌های مواد غذایی و آب آنالیز نمونه‌ها برای باکتری‌های بیماری‌زا بسیار سخت و وقت گیر است. بنابراین جهت ارزیابی وضعیت آلودگی میکروبی آب، ارگانیسم‌های شاخص[۱] شناسایی می‌گردند.

میکروارگانیسم‌های شاخص به تعداد زیادتری نسبت به بیماری‌زاها وجود دارند و تشخیص آنها راحت‌تر است. به علاوه این باکتری‌ها ویژگی‌های زیستی مشابهی با بیماری‌زا ها دارند. معروف‌ترین ارگانیسم‌های شاخص کلی‌فرم‌ها[۲] هستند که شاخص گروه ارگانیسم‌های گرم منفی روده‌ای یا خانواده آنتروباکتریاسه هستند که بیشتر در روده حیوانات خون گرم یافت می‌شوند. به دلیل اینکه باکتری‌های زیادی که آلوده‌کننده مواد غذایی نیز هستند در خانواده آنتروباکتریاسه قرار دارند و از دستگاه گوارش جدا شده‌اند، حضور تعدا بالای کلی فرم‌ها می‌تواند معرف حضور بیماری‌زاهای روده‌ای دیگر باشد. آلودگی آب با یک منشأ مدفوعی باعث ورود میکروارگانیسم‌های روده‌ای مانند اشریشیا کلی[۳]، استرپتوکوکوس فکالیس[۴]، کلستریدیوم پرفرانژانس[۵] و نیز باکتری‌های بیماری‌زای روده‌ای مانند سالمونلا[۶] و شیگلا[۷] است که گاهی این باکتری‌ها مدت طولانی می‌توانند در آب زنده بمانند. برای تعیین قابلیت آشامیدن آب لازم است که از عدم آلودگی آب به میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا که در بالا گفته شد اطمینان حاصل شود. از آنجایی که اگر باکتری‌های بیماری‌زای روده‌ای در آب زیاد باشند، تعداد باکتری‌های گفته شده نیز که به طور طبیعی ساکن روده هستند، زیاد خواهند شد بنابراین بهتر است آب را از نظر این باکتری‌ها مورد آزمایش قرار داد. از طرفی چون تعداد استرپتوکوکوس فکالیس در روده کمتر از اشریشیاکلی است، بنابراین تشخیص اشریشیاکلی ارزش بیشتری دارد و حضور آن در آب نشانه آلودگی آب به یک منشأ مدفوعی است که به تازگی رخ داده زیرا این باکتری مدت طولانی در آب زنده نمی‌ماند. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که اشریشیاکلی قادر است تا حدود ۲۸ روز در آب زنده بماند. کلستریدیوم ولشای یا پر فرانژانس مدت طولانی تری در آب زنده می‌ماند و چون باکتری بی‌هوازی است نشان‌دهنده آلودگی چاه‌های عمیق است.

۱ــ۱ــ۸ ــ نمونه‌برداری : اولین مرحله، برای آزمون‌های میکروبی آب آشامیدنی نمونه برداری است. بنابراین هدف از این قسمت آشنایی با روش‌های معمول نمونه‌گیری آب است و هدف از نمونه گیری به دست آوردن قسمت کوچکی از آب است که باید نمایانگر ویژگی‌های واقعی منبع اصلی آن باشد و چند عامل به شرح زیر در آن دخالت دارد :

ــ مکان نمونه گیری

۱ــ Indicator

۲ــ Coliform

۳ــ Escherichia coli

۴ــ Streptococcus fecalis

۵ــ Clostridium perfringens

۶ــ Salmonella

۷ــ Shigella

ـ زمان و تناوب نمونه گیری

ـ حفظ و نگهداری نمونه به صورت ثابت تا زمان انجام آزمون

محل نمونه‌برداری باید به گونه‌ای انتخاب گردد که نمونه برداشته شده از آن محل، نشان دهنده ویژگی‌های کل آب مورد نظر باشد. برای نمونه کیفیت آب در انتهای قسمت خروجی مخازن نگهداری آب با آب قسمت ورودی متفاوت است.در هر روش نمونه‌گیری موارد زیر باید به کار رود :

- نمونه‌ها باید نمایانگر وضعیت موجود در نقطه نمونه گیری باشد.
- حجم نمونه‌ها باید در حدی باشد که تکرارهای مورد نظر آزمون میسر گردد.
- نمونه‌ها باید به گونه ای جمع آوری، بسته‌بندی و جا به جا شوند که پیش بینی و مراقبت‌های لازم جهت عدم تغییر در ترکیبات و ویژگی‌های آن تا مرحله اجرای آزمون‌ها صورت پذیرد.

● **ظرف‌های نمونه برداری** : برای نمونه برداری از آب باید از ظرف‌های تمیز و سترون شده استفاده شود. برای نمونه‌برداری به روش غوطه‌وری ظرف نمونه‌گیری در آب رود خانه‌ها و دریاچه‌ها باید از بطری‌هایی استفاده نمود که قسمت داخلی و بیرونی آن سترون باشد. برای خشک و سترون نگهداشتن ظرف‌ها پس از سترون‌سازی از کاغذ، کاغذ آلومینیومی و یا کیسه‌های پلاستیکی استفاده می‌شود. به طور کلی این ظرف‌ها باید دارای ویژگی‌های زیر باشند :

الف) بسته‌های پلاستیکی خشک (پلی اتیلنی) که به دلیل نشکن بودن نسبت به ظرف‌های شیشه‌ای برتری دارند.

نکته : کاربرد ظرف‌های با مواد غیراستاندارد به‌دلیل چسبندگی سطحی باعث اختلال در شناسایی میکروارگانیسم‌ها می‌شود.

ب) برای ظرف‌های شیشه‌ای درپوش‌دار باید از نوع سنباده‌ای یا پلاستیکی استفاده شود و برای ظرف‌های پلاستیکی درپوش‌های پلاستیکی فشاری مناسب است.

نکته‌ها

✓ از درپوش‌های فلزی یا پلاستیکی می‌توان برای هر دو نوع ظرف استفاده نمود.

✓ قسمت بیرونی در ظرف‌هایی که دارای درپوش سنباده‌ای یا پلاستیکی هستند باید با استفاده از کاغذ آلومینیومی از آلودگی حفظ شوند.

✓ درپوش‌های فلزی ممکن است هنگام سترون سازی ظرف‌ها در اتوکلاو وآون، مواد سمی‌ایجاد کنند.

✓ بهتر است از بطری‌هایی که دارای درپوش پلاستیکی فشاری متصل به بطری هستند استفاده شود، زیرا نسبت به نشتی شدن مقاوم هستند و هنگام باز کردن درپوش، در متصل به بطری باقی مانده و ضمن نگهداشتن در و بطری با هم نیز از آلودگی محافظت می‌شود.

پ) ظرف‌های جابه جایی نمونه که جهت انجام آزمون‌های میکروبیولوژی به کار می‌روند باید ابتدا سترون شوند.در صورتی که بطری‌ها برای بار دوم مورد استفاده قرار می‌گیرند پس از تمیز کردن بطری شیشه‌ای و درپوش آن با استفاده از مواد پاک کننده لازم است آن را با آب مقطر آب‌کشی و سپس سترون نمود.

نکته‌ها

✓ درپوش بطری‌ها را باید هنگام اتوکلاو کردن شل بست ولی پس از سترون سازی آنها را محکم نمود. بطری‌های خالی را باید در آون با دمای خشک $170^{\circ}C$ به مدت ۱ ساعت قرار داده و سترون نمود.

✓ در صورتی که سترون سازی با هیچ یک از روش‌های بالا امکان‌پذیر نباشد، باید ظرف‌ها و درپوش آنها را با غوطه وری در آب در حال جوش به مدت ۳۰ دقیقه سالم‌سازی نمود و در کاغذ تمیز پیچید. برای ظرف‌هایی که با استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده

سالم‌سازی و نگهداری می‌شود، انجام آزمون‌های سترونی توصیه می‌شود. سترونی بطری‌ها با کنترل فرایند سترون سازی تضمین می‌شود در غیر این صورت آزمون سترونی ظرف‌ها باید انجام شود.

✓ بطری‌های پلی اتیلنی را می‌توان با قرار دادن در معرض گاز اتیلن سترون کرد. البته به دلیل سمی‌بودن این گاز کلیه کارهای سترون سازی باید با رعایت مسایل بهداشتی و ایمنی ویژه انجام شود و زمانی برای حذف گاز اتیلن در نظر گرفته شود.

ت) برای انجام آزمون‌های میکروبی آب گندزدایی شده با اکسید کننده‌های کلر و برم یا ازن، فعالیت این گازها را باید بلافاصله پس از نمونه برداری خنثی نمود. برای این منظور از ماده احیاء کننده تیوسولفات سدیم استفاده می‌شود.

از نظر تئوری مقدار تیوسولفات سدیم لازم برای غیر فعال سازی یک میلی گرم کلر ۷/۱ میلی گرم است. بنابراین مقدار ۰/۱ میلی لیتر (دو قطره) از محلول تیوسولفات سدیم را به ظرف با گنجایش ۱۰۰ میلی لیتر اضافه می‌کنند. این مقدار باعث خنثی سازی حداقل ۵ــ۲ میلی گرم بر لیتر کلر باقی مانده می‌شود که برای بیشتر نمونه‌های آب کافی است.

نکته : تیوسولفات توسط گرمای خشک و مرطوب از بین نمی‌رود و اثر سویی نیز روی نمونه ندارد.

- **وسیله‌های مورد نیاز در نمونه برداری از آب**

➢ شعلهٔ گاز

➢ بشر

➢ فندک، کبریت

➢ مارکر، قلم، برچسب

➢ آچار، آچار پیچ گوشتی، انبر دست و چاقو

➢ ظرف یخ یا قالب یخ، کیسهٔ یخ و بسته‌های یخ مصنوعی

➢ یخچال قابل حمل ونقل و یا وسیلهٔ نقلیهٔ یخچال‌دار

➢ دماسنج یا ثبت کنندهٔ دما

➢ حامل بطری دارای کیسهٔ شن با طناب یا زنجیر که حداقل در قسمت انتهایی از جنس فولاد زنگ نزن باشد.

➢ انبرک یا گیرهٔ بلند یا وسیلهٔ نمونه برداری قابل تنظیم برای عمق‌های مختلف آب

➢ نقشهٔ محل نمونه برداری، فهرست نقاط نمونه برداری، برگهٔ نمونه برداری

➢ چکمهٔ ایمنی و ضد آب

➢ دستکش سترون

- **روش‌های نمونه گیری :**

الف) نمونه گیری از شیر آب یا پمپ آب : هدف از نمونه‌گیری از شیر آب تعیین کیفیت آب در شبکه اصلی توزیع آب، تعیین کیفیت آب در شبکه توزیع هنگام خارج شدن از شیر که ممکن است توسط شبکه داخلی ساختمان تغییر کرده باشد. نمونه برداری از مخزن‌های آب آشامیدنی به وسیله شیر در قسمت خروجی انجام می‌شود. نمونه‌هایی که برای ارزیابی کیفیت در شبکهٔ اصلی توزیع برداشته می‌شود بهتر است از شیرهای مخصوص که بدون اتصالات و نزدیک به شبکه اصلی توزیع آب است و قابلیت گندزدایی با شعله را نیز دارد باشد.

بسته به هدف نمونه برداری، برداشتن اتصالات شیر، گندزدایی شیر و خروج آب از شیر هم ممکن است لازم باشد و هم ممکن است، نادرست باشد. (به جدول ۱ــ ۸ مراجعه شود)

نکته‌ها

✓ نمونه برداری باید در شرایط استریل و با دست تمیز و ضد عفونی شده و یا دستکش سترون انجام شود.

✓ هنگام پرکردن بطری، قسمت داخلی درپوش نباید با انگشت، دهان و زمین تماس حاصل کند. پس از نمونه‌گیری باید به سرعت درپوش بطری را بست.

✓ به منظور به دست آوردن یک نمونه نمایانگر ویژگی‌های اصلی منبع آب، شیر جریان آب را باید به مدت ۱تا۲ دقیقه باز کرد.

● ***آب در تصفیه خانه و مخازن ذخیره :***

ــ در مخازن ذخیره و تصفیه خانه‌ها، نمونه‌های خاص باید از شیرهای تعبیه شده در قسمت خروجی اصلی و سایر نقاط نمونه‌برداری شود. برای نمونه‌برداری از شیرهایی که قابل سترون‌سازی با شعله باشد، استفاده می‌شود.

جدول۱ــ ۸ ــ نمونه برداری از شیر برای اهداف مختلف

هدف	نوع آب	برداشت اتصالات	گندزدایی	خروج آب از شیر
الف	در شبکه توزیع	بله	بله	بله
ب	در هنگام تحویل به شیر	بله	بله	خیر
پ	در هنگام مصرف	خیر	خیر	خیر

این شیرها همچنین باید تمیز، برچسب گذاری شده و مخصوص نمونه برداری باشد. برای آگاهی بیشتر به استاندارد ملی ایران در این زمینه مراجعه شود.

ب) آب در شبکه اصلی توزیع : برای تعیین کیفیت آب در شبکه اصلی توزیع، نمونه از قسمت اصلی و یا نزدیک به آن پس از کنتور آب برداشته شود. برای این منظور باید دقت شود که آلودگی سطح خارجی شیر به نمونه منتقل نشود. درصورت امکان باید از نمونه‌برداری از شیرهایی که چکه می‌کنند و شیرهای مخلوط خودداری شود. همچنین هرگونه افشانک متصل به شیر باید با استفاده از آچار و انبردست خارج شود. هرگونه کثیفی مانند پوسته، لزجی و چربی یا سایر مواد خارجی نیز باید از روی شیر پاک شده و شیر را چندین بار به طور کامل باز و بسته کرد تا هرگونه کثیفی از شیر به طور کامل برطرف شود. سپس نمونه برداری انجام گیرد.

نکته‌ها

✓ شیر را باید به‌وسیلهٔ شعله گندزدایی کرد. پس از شعله دادن و باز کردن شیر، صدای ناشی از حرارت شنیده می‌شود. تنها زمانی که گرمادهی شیر امکان‌پذیر نیست، می‌توان از روش‌های دیگری برای گندزدایی استفاده نمود.

✓ برای گندزدایی دهانهٔ شیرهای پلاستیکی، پس از تمیز کردن کامل، باید آن را به مدت ۲ تا ۳ دقیقه در بشر دارای محلول هیپوکلریت، الکل یا ایزوپروپانول فرو برد. سپس شیر را باز کرده تا آب خارج شود و درجهٔ حرارت آب به حد ثابتی برسد. پس از آن باید با برداشتن درپوش، بطری را زیرجریان آب قرار داده و در شرایط اسپتیک آن را پرکرد.

✓ به عنوان روش جایگزین برای گندزدایی قسمت‌های خارجی و تا حد امکان قسمت‌های داخلی شیر باید از یک سواب یا یک بطری دارای مواد شیمیایی سترون کننده یا وسیلهٔ مشابه استفاده نمود.

پ) آب در شیر مصرف کننده : برای تعیین کیفیت آبی که به شیر مصرف کننده تحویل داده می‌شود، باید دقت شود تا آلودگی از سطح خارجی ظرف به نمونه منتقل نشود. باید هرگونه کثیفی، لزجی، پوسته، چربی و سایر مواد خارجی را که ممکن است وارد نمونه شود، از شیر برطرف کرد.

نکته‌ها

✓ از شیرهایی که چکه می‌کنند، نمونه برداری نمی‌شود.

✓ هنگام نمونه‌برداری هرگونه افشانک یا سایر اتصالات شیر باید از آن جدا شود.

✓ شیر باید بوسیله شعله گندزدایی شود.

✓ پس از گندزدایی، آب باید به اندازه‌ای جریان یابد تا هیچ‌گونه اثری از مادهٔ گندزدا باقی نماند. سپس بطری‌ها را بدون بستن و باز کردن دوبارهٔ شیر آب، زیر شیر قرارداده شود.

ت) آب هنگام مصرف : برای تعیین کیفیت آبی که مصرف می‌شود و برای نمونه برداری در موارد شیوع بیماری، آلودگی آب توسط باکتری‌ها از راه قسمت‌های خارجی شیر و سایر اتصالات به شیر هم در نظر گرفته می‌شود. بنابراین در این موارد اتصالات شیر نباید پیش از نمونه‌برداری گندزدایی شود.

ث) آب چشمه و چاه : آزمون آب چاه با هدف‌های گوناگون انجام می‌شود :

الف) آگاهی از کیفیت سفرهٔ آب زیرزمینی

ب) آگاهی از کیفیت آب داخل چاه

پ) آگاهی از کیفیت آب به همان صورت که مصرف می‌شود.

بسته به هدف آزمون، به دلیل تفاوت‌های بین چاه‌های بدون پمپ و چاه‌های دارای پمپ دائمی، انتخاب روش‌های مختلف نمونه‌برداری لازم است. برای آگاهی بیشتر به استاندارد ملی ایران در این زمینه مراجعه شود.

نکته‌ها

✓ برای نمونه برداری از چاه‌هایی که در آن پمپ دائمی نصب شده و دارای شیر یا خروجی فلزی هستند. بسته به هدف نمونه‌برداری پمپ کردن زیاد و گندزدایی شیر به‌وسیله شعله لازم است.

✓ پمپ کردن زیاد دست کم ۳ بار برای آب‌های زیرزمینی بدین معناست که پمپ‌کردن تا زمان تثبیت درجهٔ حرارت آب و هدایت الکتریکی انجام شود.

✓ برای نمونه‌برداری از آب داخل چاه فقط خروج کوتاه آب برای غلبه بر اثر گندزدایی شیر کافی است.

✓ برای نمونه‌برداری از آب به همان صورت که مصرف می‌شود پمپ کردن و گندزدایی شیر لازم نیست. چاه‌هایی که بدون پمپ دائمی هستند توسط پمپی که قابل فرو بردن در زیرآب باشد نمونه‌برداری می‌شود. این پمپ‌ها فقط برای آب‌های تمیز استفاده می‌شود.

✓ برای نمونه برداری از آب داخل چاه بهتر است از وسیلهٔ نمونه‌برداری سترون شامل حامل و کیسه شنی استفاده شود. به‌طور جایگزین یک پمپ تمیز قابل فرو بردن در زیر آب را نیز می‌توان پس از پمپ کردن کم استفاده نمود. درمواردی که آب چاه بدون دستگاه پمپ به‌وسیلهٔ مصرف‌کننده استفاده می‌شود باید نمونه برداری به‌وسیلهٔ سطل انجام شده و آب از سطل به بطری نمونه‌برداری سترون منتقل شود.

برگه‌های نمونه‌برداری : هریک از بطری‌ها را باید برچسب شناسایی زد و پیش از نمونه‌برداری و یا پس از آن برگه‌های نمونه‌برداری را تکمیل کرد. برگه‌ها باید دارای نام و آدرس مشتری درخواست‌کننده، فهرست ویژگی‌هایی که قرار است مورد آزمون

و ارزیابی قرار گیرد، تاریخ، زمان، موقعیت محل نمونه برداری و نام نمونه بردار باشد. ماهیت منشأ نمونه‌ها، چگونگی ارسال نمونه به آزمایشگاه و هدف آزمون نیز به دلیل اینکه ممکن است به انتخاب روش آزمون کمک کند باید درج شود.

جابه‌جایی و نگهداری نمونه‌ها : فاصلهٔ زمانی بین نمونه برداری و آزمون باید تا حد امکان کوتاه باشد، برای آب‌های آشامیدنی بهتر است آزمون در همان روز نمونه برداری انجام شود.

نکته‌ها

✓ بهتر است هنگام حمل و نقل، نمونه‌ها در دمای $3\pm0/5^{\circ}C$ نگهداری شوند. برای این منظور می‌توان از کیسه‌های یخ استفاده نمود.

✓ برای آزمون‌های میکروبی به جز آزمون ویروس‌ها باید از یخ زدن نمونه‌ها پیشگیری نمود.

✓ نمونه‌ها را باید از تابش نور خورشید محافظت کرد. برای نمونه‌هایی که جابه‌جایی آن‌ها بیش از هشت ساعت به طول می‌انجامد، پایش و ثبت دما لازم است. شرایط جابه‌جایی نیز باید مستند شود.

✓ برای پیشگیری از یخ زدن نمونه باید دقت شود تا نمونه‌ها با کیسه‌های یخ تماس مستقیم نداشته باشند. همچنین تعداد و حجم کیسه‌های یخ با تعداد، حجم و دمای نمونه تنظیم شود.

✓ روش کار در مواردی که زمان جابه‌جایی نمونه بیش از هشت ساعت است باید مستند شود.

✓ نمونهٔ آب‌های سرد وگرم باید به طور جداگانه جابه جا شوند.

✓ سرد کردن نمونه‌ها در طی جابه‌جایی مهم است ولی نباید نمونه‌ها منجمد شود زیرا تشکیل یخ سبب مرگ بیشتر سلول‌ها می‌شود.

● **تعداد نمونه** : تعداد نمونهٔ لازم برای آزمون‌های میکروبی آب بسته به تعداد افراد مصرف کننده، نوع و منبع آب، نوع تصفیه و نو ع آزمون، متفاوت است و با یکی از روش‌های زیر تعیین می‌شود :

الف) تعداد نمونه بر حسب جمعیت مصرف کننده : در این مورد تعداد نمونه برای آزمون باکتری‌های نشانگر آلودگی مدفوعی در شبکهٔ توزیع، با توجه به جمعیت مصرف کنندهٔ تحت پوشش مطابق با جدول ۲ــ ۸ تعیین می‌شود.

جدول ۲ــ ۸ ــ حداقل تعداد نمونه برای آزمون باکتری‌های نشانگر آلودگی مدفوعی در شبکهٔ توزیع

ردیف	جمعیت	تعداد نمونه در سال
۱	کمتر از ۵۰۰۰	۱۲
۲	۵۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰	به ازای هر ۵۰۰۰ نفر ۱۲
۲	۱۰۰۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰۰	به ازای هر ۱۰۰۰۰۰ نفر ۱۲ به علاوه ۱۲۰ نمونه اضافی
۴	بیشتر از ۵۰۰۰۰۰	به ازای هر ۱۰۰۰۰۰ نفر ۱۲ به علاوه ۱۸۰ نمونه اضافی

گزینش روش آزمون میکروبی آب به عوامل زیادی مانند ویژگی‌های فیزیکی ــ شیمیایی نمونه آب وگونه میکروبی مورد جستجو در آب بستگی دارد.

نکته‌های مهم در مورد گزینش روش مناسب برای آزمون میکروبی آب

✓ در مواردی که آب دارای ذرات معلق است، استفاده از روش صافی غشایی مناسب نیست. زیرا مسدود شدن روزنه صافی‌ها توسط ذرات معلق در آب باعث کاهش عبور آب از صافی شده و در نتیجه شمارش میکروبی مختل می‌شود.

✓ در مورد آب‌های خیلی کدر روش شمارش بیشترین تعداد احتمالی MPN مناسب است.

✓ در مواردی که احتمال بیش از ۱۰۰ کلنی در روی هر صافی وجود داشته باشد، استفاده از روش صافی غشایی از حساسیت کافی برخوردار نیست.

✓ در مواردی که تعداد میکروارگانیسم‌ها در نمونه کم است (کمتر از ۱۰۰عدد در هر میلی لیتر) استفاده از روش کشت سطحی مناسب نیست.

✓ در مورد آب‌های دارای ذرات معلق، روش کشت (پورتشتک) به دلیل شمارش ذرات به جای کلنی حساسیت لازم را نداشته و مناسب نیست.

۲ــ۱ــ ۸ ــ آزمون شمارش کلی [۱] : هدف از انجام این آزمون ارزیابی وضع بهداشتی آب بوده و اگر تعداد میکروب‌ها از حد معین تجاوز کند آب غیر قابل شرب و مصرف در صنایع غذایی خواهد بود.

وسایل و مواد مورد نیاز

- لوله‌های آزمایش
- پی‌پت
- تشتک‌های یکبار مصرف
- محلول آب بافر پپتونه
- تشتک کانت آگار مذاب با دمای $45^{\circ}C$
- گرمخانه

روش کار

الف) ابتدا لوله‌های آزمایش را با شماره رقت‌های اعشاری از 10^{-1} تا 10^{-5} علامت گذاری کنید. سپس درون هر لوله آزمایش ۹ میلی لیتر محلول آب پپتونه ریخته و از نمونه آب مورد نظر در لوله‌های آزمایش رقت تهیه کنید.

ب) برای هر یک از رقت‌ها دو تشتک خالی در نظر گرفته و با شماره همان رقت علامت گذاری کنید. سپس از رقت مورد نظر ۱میلی لیتر به تشتک‌ها اضافه کنید و پس از آن ۲۵ میلی لیتر محیط کشت تشتک کانت آگار ذوب شده به تشتک دارای نمونه رقیق شده اضافه نمایید و تشتک‌ها را به همان روش کشت استاندارد که در فصل پیش گفته شد دوران دهید تا مواد داخل تشتک مخلوط و یکنواخت گردد.

پ) تشتک‌های کشت شده را به حال خود در آزمایشگاه قرار دهید تا محیط درون آنها سفت شود.

ت) پس از سفت شدن محیط‌ها تشتک‌ها را در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ــ۲۴ ساعت قراردهید.

ث) پس از این زمان تشتک‌هایی که دارای بیش از ۳۰۰ عدد کلنی هستند را غیر قابل شمارش گزارش کنید و تشتک‌های دیگر را با استفاده از رقت کشت شده و شمارش کلنی‌ها در دو تشتک مانند آنچه در فصل پیش گفته شد شمارش تعداد باکتری‌ها را در هر میلی لیتر محاسبه کنید.

۱ــ Total count

۳ــ۱ــ۸ ــ آزمون جستجو و شمارش کلی فرم‌ها در آب به روش چند لوله‌ای (آزمایش بیشترین تعداد احتمالی باکتری‌ها)[1] : همانطور که گفته شد گونه‌هایی آنتروباکتریاسه باکتری‌های گرم منفی روده‌ای هستند که به عنوان شاخص آلودگی در نظر گرفته می‌شوند. کلی فرم‌ها یکی از مهم‌ترین جنس‌های این خانواده باکتریایی هستند که قادرند قند لاکتوز را تخمیر کرده، اسید و گاز تولید کنند. به طور کلی همه باکتری‌های گرم منفی میله‌ای شکل، هوازی و بی‌هوازی اختیاری که قادر به تخمیر قند لاکتوز در دمای $37^{\circ}C$ در مدت ۴۸ ساعت هستند کلی فرم نامیده می‌شوند. محل طبیعی زندگی این باکتری‌ها در روده انسان و دام، خاک و آب است. محیط کشت مورد استفاده کلی فرم باید دارای قند لاکتوز باشد.

آزمون جستجو و شمارش کلی فرم‌ها در سه مرحله انجام می‌شود :

● **روش شمارش بیشترین تعداد احتمالی باکتری‌ها** : این روش یکی از راه‌های شمارش میکروارگانیسم‌های زنده موجود در مواد غذایی است. با این روش می‌توان گفت تعداد و تراکم میکروارگانیسم‌ها در یک ماده غذایی چه میزان است. روش MPN برپایه نظریه احتمالات بوده و فرض بر این است که میکروارگانیسم‌ها با یک توزیع یکنواخت و به‌طور اتفاقی در نمونه ماده غذایی پخش شده‌اند. این روش به ویژه برای آن گروه از مواد غذایی به کار می‌رود که احتمال وجود تعداد کمی‌میکروارگانیسم (کمتر از ۱۰ عدد در هر گرم) در آنها تخمین زده می‌شود. روش MPN بیشتر برای شمارش کلی فرم‌های آب، شیر و فرآورده‌های آن به کار می‌رود. به دلیل این که در مواد غذایی جامد امکان توزیع یکنواخت ارگانیسم‌ها بعید است، این روش کاربرد چندانی ندارد. به طور کلی روش MPN نسبت به روش‌های کشت که در فصل پیش گفته شد دقت کمتری دارد. در روش شمارش بیشترین تعداد احتمالی باکتری‌ها، حجم‌هایی از ماده غذایی به ۳ تا ۱۰ لوله آزمایش دارای محیط مایع منتقل می‌گردد. لوله‌ها در دمای $35\text{ــ}37^{\circ}C$ گرمخانه گذاری شده و پس از ۴۸ــ۲۴ ساعت نتیجه بررسی می‌شود. پس از تشخیص لوله‌های مثبت از روی کدورت یا تولید اسید و گاز در لوله‌ها، تعداد اولیه باکتری‌ها از روی جدول استاندارد MPN تعیین می‌شود.

هرچه تعداد لوله‌های آزمایش بیشتر باشد دقت روش بیشتر خواهد شد. بنابراین روش MPN ۱۰ لوله‌ای بسیار دقیق‌تر از MPN ۵ لوله‌ای یا ۳ لوله‌ای است اما از نظر صرف هزینه و زمان مناسب نیست و بیشتر از روش ۳ یا ۵ لوله‌ای استفاده می‌شود.

محیط‌های کشت مورد استفاده در این آزمون :

الف) لوریل سولفات تریپتوز برات[2] : این محیط کشت دارای تریپتوز به عنوان منبع نیتروژن، لاکتوز منبع کربوهیدرات و انرژی، بافر فسفات و نمک NaCl و لوریل سولفات است. محیط LST یک محیط کشت انتخابی و افتراقی است (براساس تعریف محیط‌های کشت در فصل سوم). واژه انتخابی به دلیل وجود لوریل سولفات است که از رشد باکتری‌های گرم مثبت جلوگیری می‌کند و واژه افتراقی به این دلیل برای محیط LST به کار می‌رود که تولید گاز در آن قابل تشخیص است (با لوله‌های دورهام).

ب) بریلیانت گرین بایل برات[3] : یا آبگوشت سبز درخشان این محیط دارای پپتن منبع ازت، لاکتوز منبع انرژی و بریلیانت گرین است و نوعی محیط کشت انتخابی و افتراقی است. انتخابی به دلیل وجود بریلیانت گرین که از رشد باکتری‌های گرم مثبت جلوگیری می‌کند و افتراقی به دلیل تشخیص تولید گاز توسط لوله‌های دورهام و تشخیص تولید اسید با تغییر رنگ محیط آبگوشت سبز درخشان (pH این محیط ۴ و رنگ آن سبز مایل به زرد است).

برای آزمون شمارش کلی‌فرم‌ها از روش MPN سه لوله‌ای استفاده کنید.

۱ــ Most probable number (MPN)

۲ــ Lauryl sulfate tryptose broth (LST)

۳ــ Brilliant green bile broth(BGB)

مواد و وسایل مورد نیاز

- لوله‌های آزمایش در پیچ دار با گنجایش ۱۰ میلی لیتر
- لوله‌های دورهام برای جمع آوری حباب گاز ایجاد شده در لوله آزمایش
- جا لوله‌ای
- پی‌پت‌های سترون شده ۱یا ۱۰ میلی لیتری
- یکی از محیط کشت‌های LST یاBGB
- گرمخانه با دمایC ° ۳۷

روش کار

الف) برای نمونه برداری باید به میزان ۱۰۰ میلی لیتر از آب مورد نظر برداشته و در بطری سترون شده نگهداری کنید (به روش‌های نمونه برداری از آب در ابتدای همین فصل مراجعه شود).

ب) برای هر یک از رقت‌های 10^{0}، 10^{-1}، 10^{-2} و 10^{-3} تعداد ۳ لوله انتخاب کنید و درون همه لوله‌های آزمایش یک لوله دورهام به صورت وارونه قرار دهید (۳ لوله برای رقت 10^{0}، ۳ لوله برای رقت 10^{-1} و...) و روی هر لوله برچسب زده و شماره رقت مورد نظر را یادداشت کنید.

پ) رقت‌ها را با استفاده از محیط کشت مایع مناسب LST یا BGB در لوله‌های علامت‌گذاری شده با شماره هر رقت توسط حجم معینی از آب مورد آزمون (۱میلی لیتر) تهیه کنید.(مانند شکل ۱ــ ۸)

نکته‌ها

- ✓ برای رقت‌های بالاتر 10^{0}و 10^{-1} غلظت محیط کشت باید دو برابر تهیه شود. یعنی اگر روش تهیه محیط کشت ۲۴ گرم در ۱۰۰۰میلی لیتر آب مقطر است برای این دو رقت باید ۴۸ گرم در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شود.
- ✓ برای هر سری رقت از یک پی‌پت مجزا و سترون شده استفاده کنید.
- ✓ همه مراحل آزمون باید در کنار شعله و با فاصله ۳۰ سانتی‌متری از آن انجام شود.

ت) لوله‌های آماده شده با رقت‌های مورد نظر و حجم تلقیح شده نمونه آب را به صورت دربسته درون جا لوله‌ای قرار داده و در گرمخانه با دمای C ° ۳۷ــ۳۵ به مدت ۴۸ــ۲۴ ساعت نگهداری کنید.

ث) پس از ۴۸ ساعت لوله‌ها را بررسی کرده و لوله‌هایی را که دارای کدورت (تیرگی در محیط کشت مایع درون لوله آزمایش) هستند، لوله‌هایی که دارای کدورت و همراه با تولید گاز در لوله‌های دورهام هستند و لوله‌هایی را که همراه با تولید اسید (به ویژه در محیط‌هایی که دارای معرف pH می‌باشند) از روی تغییر رنگ تشخیص داده و به عنوان نتیجه مثبت برای وجود کلی فرم‌های احتمالی در نظر بگیرید.

نکته : واکنش مثبت در لوله‌های آزمایش دارای محیط‌های کشت انتخابی افتراقی ذکر شده، کلی فرم‌های فرضی به حساب می‌آید. بنابراین انجام **آزمون تأییدی** روی محیط کشت انتخابی ضروری است.

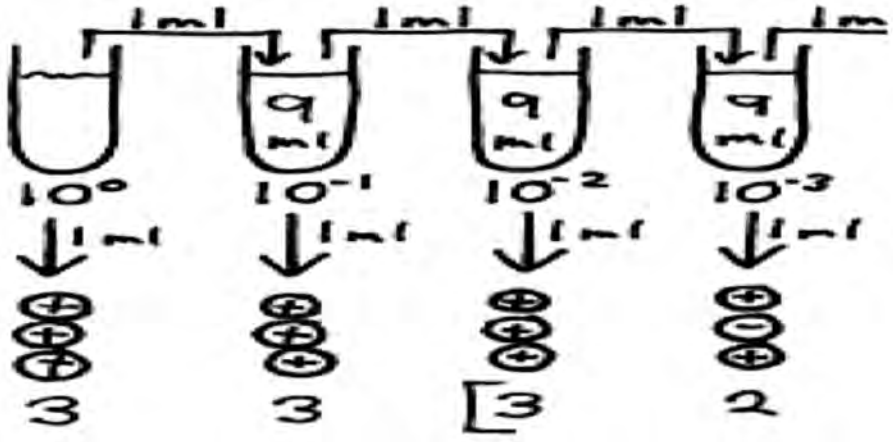
ج) تعداد لوله‌های مثبت در هر سری رقت یادداشت می‌شود. (بر طبق شکل ۱ــ۶)

یافته‌های آزمون MPN سه لوله‌ای باید با استفاده از جدول MPN سه لوله‌ای مربوطه انجام شود. (جدول ۴ــ۶)

نکته : جدول MPN براساس استاندارد سازمان FDA[1] یا سازمان غذا و داروی امریکا ارائه شده است و این جدول برای

۱ــ Food and Drug Administration

لوله‌هایی با مقادیر تلقیح شده ۰/۱ و ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ تنظیم شده است.



شکل ۱ــ ۸ــ روش MPN سه لوله‌ای (برای هر رقت سه لوله در نظر گرفته شده است). نتیجه آزمایش بر اساس کدورت و تولید گاز به صورت مثبت علامت گذاری شده و تعداد لوله‌های مثبت در هر سری از رقت‌ها نیز ثبت می‌شود.

استفاده از جدول MPN سه لوله‌ای برای تعیین تعداد کلی فرم‌های احتمالی : مهم‌ترین مرحله پیش از استفاده از جدول MPN انتخاب سه رقت مناسب برای فهرست جدول است. برای این منظور از راهنمای زیر استفاده کنید.

راهنمای انتخاب سه رقت مناسب : برای این منظور بالاترین رقت در تمام لوله‌های مثبت و دو رقت بالاتر بعدی انتخاب می‌شود. برای نمونه اگر تعداد لوله‌های مثبت از رقت 10^{0} (هر سه مثبت)،رقت 10^{-1} (هر سه مثبت)، رقت 10^{-2} (یکی از سه لوله مثبت) و رقت 10^{-3}(یکی از سه لوله مثبت) بود باید ترتیب ۱ــ۱ــ۳ در جدول MPN انتخاب شود.

➢ اگر دو رقت بالاتر در دسترس نباشد باید سه رقت پشت سرهم انتخاب شود. برای نمونه اگر در رقت‌های 10^{0}، 10^{-1} و 10^{-2} هر سه لوله مثبت باشد ودر رقت 10^{-3} یک لوله مثبت باشد باید ترتیب ۱ــ۳ــ۳ از جدول انتخاب شود.

➢ اگر هیچ رقتی مثبت نبود باید سه رقت پایین را به عنوان نتیجه مثبت در نظر گرفت. برای نمونه اگردررقت 10^{0}(همه منفی)،رقت 10^{-1} (یکی از سه لوله مثبت)ورقت 10^{-2}و 10^{-3}(همه لوله‌ها منفی) بود باید ترتیب ۰ــ۱ــ۰ از جدول انتخاب شود.

نکته : زمانی که تنها از رقت 10^{0}، 10^{-1} و 10^{-2} برای ترتیب جدول استفاده شود چون سری جدول بر اساس ۰/۱ و ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ است، تعداد MPN را در نهایت باید به عدد ۱۰ تقسیم نمود. ولی اگر از رقت‌های 10^{-1} و 10^{-2}و 10^{-3}برای ترتیب جدول استفاده شود خود عدد MPN به تنهایی به عنوان نتیجه استفاده می‌شود.

جدول ۳ــ ۸ ــ MPN سه لوله‌ای

NUMBER OF TUBES GIVING POSITIVE REACTION OUT OF			MIPN INDEX	95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS	
3 of 10 ml each	3 of 1 ml each	3 of 0.1 ml each	per 100 ml	LOWER	UPPER
0	0	1	3	<0.5	9
0	1	0	3	<0.5	13
1	0	0	4	<0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

۴ــ۱ــ۸ ــ آزمون تأیید وجود کلی فرم‌ها در آب : محیط کشت مورد استفاده در این آزمون محیط کشت لاکتوز برات[۱] است.

مواد و وسایل مورد نیاز

- حلقه کشت
- گرمخانه

۱ــ Lactose broth

➢ لوله آزمایش دارای محیط مایع لاکتوز برات

روش کار

الف) با استفاده از حلقه کشت سترون شده، از یکی از لوله‌های مثبت در آزمایش MPN یک حلقه پر مایع برداشت کرده و به لوله آزمایش دارای محیط لاکتوز برات منتقل کنید.

نکته : بهتر است از لوله‌هایی استفاده شود که در آن همزمان گاز و کدورت مشاهده می‌شود.

ب) لوله‌های تلقیح شده را با استفاده از تکان دهنده[1] مخلوط کرده و در گرمخانه با دمای $37^{\circ}C$ ـ۳۵ به مدت ۴۸ـ۲۴ ساعت قرار دهید.

پ) پس از ۴۸ ساعت، وجود گاز و حباب در محیط لاکتوز برات نشانه وجود کلی فرم‌ها در نمونه مورد آزمون است.

ت) یافته‌ها را به صورت تعدادکلی فرم‌ها در ۱۰۰ میلی لیتر نمونه آب و یا عدم آلودگی آب به کلی فرم در ۱۰۰ میلی لیتر نمونه آب ارائه دهید.

● **مشاهده و تشخیص کلنی کلی فرم‌های موجود در نمونه آب :** محیط‌های کشت مورد استفاده در این آزمون عبارتند از :

الف) محیط مک کانکی آگار[2] این محیط دارای رنگ کریستال ویوله برای جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم مثبت و املاح صفراوی برای جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم منفی غیر روده‌ای و یک محیط انتخابی و افتراقی است.

ب) محیط ویولت رد بایل آگار[3] این محیط دارای عصاره مخمر، پپتون، نمک‌های صفراوی، کلرید سدیم، لاکتوز و معرف قرمز خنثی و کریستال ویوله بوده و یک محیط انتخابی افتراقی محسوب می‌شود.

مواد و وسایل مورد نیاز

➢ تشتک‌های دارای یکی از محیط‌های کشت جامد بالا

➢ حلقه کشت

➢ گرمخانه با دمای $37^{\circ}C$

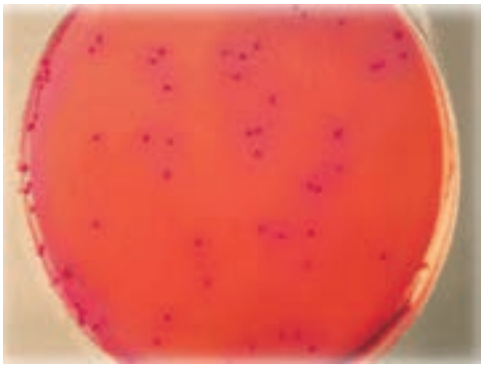
روش کار

الف) از یکی از لوله‌های دارای محیط لاکتوز برات که در آنها تولید گاز مشاهده شده،توسط حلقه کشت برداشت کرده و در محیط کشت جامد مک کانکی آگار یا ویولت ردبایل آگار کشت دهید.

ب) تشتک‌های کشت داده شده را درگرمخانه با دمای $37^{\circ}C$ به مدت ۴۸ ساعت نگهداری کنید.

پ) پس از ۴۸ ساعت کلنی کلی فرم‌ها را بررسی نمایید.

مشخصات کلنی کلی فرم‌ها در محیط کشت‌های مک کانکی آگار و ویولت ردبایل آگار : کلی فرم‌ها به دلیل تخمیر قند لاکتوز، اسید تولید کرده که در حضور معرف قرمز خنثی کلنی آنها به همان رنگ قرمز مشاهده می‌شود. به علاوه کلنی کلی فرم‌ها مسطح با قطر ۲ـ۱ میلی متر است که معمولاً توسط هاله روشن ناشی از تجزیه و رسوب نمک‌های صفراوی احاطه شده است. (شکل۲ـ ۸)



شکل۲ـ۸ـ کلنی‌های سطحی،قرمز همراه با هاله روشن کلی فرم‌ها در محیط ویولت رد بایل آگار

۱ـ Shaker ۲ـ Mac Conkey's Agar ۳ـ Violet red bile agar

۵ــ۱ــ۸ــ آزمون جستجو و شمارش کلی فرم‌های مدفوعی[1] در آب : کلی فرم‌هایی هستند که در مدت ۲۴ ساعت در دمای C ° ۰/۵ ± ۴۴رشد کرده و اسید و گاز تولید می‌کنند. بنابراین دمای بالا برای جدا کردن کلی فرم‌هایی که منشأ مدفوعی دارند از آنهایی که منشأ مدفوعی ندارند به کار برده می‌شود.

محیط کشت‌های مورد استفاده در این آزمون : لوریل تریپتوز مانیتول برات[2] دارای تریپتوفان

روش کار

برای این آزمون پس از انجام آزمایش MPN که در پیش گفته شد، توسط حلقه کشت از لوله‌های واکنش مثبت در آزمون MPN برداشت کرده و به لوله دارای محیط کشت لوریل تریپتوز برات همراه با مانیتول و تریپتوفان منتقل کنید. سپس لوله‌های تلقیح شده را در گرمخانه با دمای C ° ۴۴ قرار داده و پس از ۲۴ ساعت از نظر تولید گاز بررسی و گزارش نمایید.

۶ــ۱ــ۸ــ آزمون جستجو و شمارش اشریشیاکلی در آب : محل طبیعی این باکتری در قسمت انتهایی روده حیوانات خون گرم است. باکتری میله‌ای شکل دارای تاژه که وجودش در آب نشانه آلودگی مدفوعی است.

شکل۳ــ۸ــ اشریشیا کلی

محیط‌های کشت استفاده شده در این آزمون :

ــ لوریل تریپتوز مانیتول برات دارای تریپتوفان

ــ محیط مایع MRVP

ــ محیط سیمون سیترات

روش کار

برای این آزمون با استفاده از حلقه کشت از لوله‌های مثبت آزمایش MPN نمونه برداشت کرده و به لوله‌های دارای محیط‌های کشت ذکر شده در این آزمون منتقل کنید. لوله‌های تلقیح شده را در گرمخانه با دمای C°۴۴ به مدت ۲۴ ساعت قرار داده و تولید گاز، اندول و نتیجه واکنش سیترات و MRVP را نیز بررسی و شمارش نمایید.

نتیجه کشت در محیط دارای تریپتوفان : کلی فرم‌هایی که تاحدودی مقاوم به گرما هستند و در مدت ۲۴ ساعت در دمای C°۴۴ گاز تولید کرده و با استفاده از تریپتوفان محیط، اندول تولید می‌کند که با معرف کواکس قابل مشاهده باشند اشریشیاکلی هستند. (به فصل پنجم مراجعه شود.)

نتیجه کشت در محیط سیمون سیترات : اشریشیاکلی قادر به استفاده از سیترات محیط به عنوان منبع کربن نبوده و واکنش سیترات منفی است (به فصل پنجم مراجعه شود).

نتیجه کشت در محیط MRVP : پس از افزودن معرف متیل رد واکنش MR برای اشریشیاکلی مثبت ولی VP منفی است.

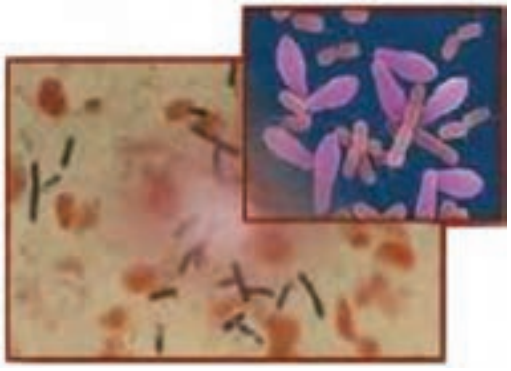
نکته : از روش‌های سریع نیز می‌توان برای تشخیص اشریشیا کلی در نمونه آب استفاده نمود.

۷ــ۱ــ ۸ ــ آزمون جستجو و شمارش کلستریدیوم پرفرانژانس(ولشای) در آب : کلستریدیوم ولشای باکتری میله‌ای، گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری، اسپوردار و بدون حرکت است که بومی لوله گوارش انسان و حیوانات بوده و در خاک و گرد و غبار نیز یافت می‌شود. در مشاهده میکروسکوپی اسپور این باکتری در مرکز یا نزدیک به انتهای سلول رویشی باکتری قرار دارد ولی باعث تورم در سلول باکتری نمی‌شود. اسپور باکتری دمای مرطوب C°۱۰۰ را حدود ۵ ساعت یا بیشتر تحمل

۱ــ Faecal coliform

۲ــ Lauryl Triptose Manitol Broth

می‌کند. تاکنون ۶ تیپ از این باکتری شناخته شده که با حروف A تا F نامگذاری شده‌اند. کلستریدیوم پرفرانژانس تیپ A و F برای انسان بیماری‌زا هستند. تیپ A نقش مهمی در ایجاد مسمومیت‌های غذایی دارد. از آنجایی که نسبت کلستریدیوم پرفرانژانس به اشریشیاکلی در مدفوع بسیار کم است، بنابراین جستجوی این باکتری در آب روشی دقیق برای پی بردن به آلودگی آن به یک منشأ مدفوعی که به تازگی رخ داده نمی‌باشد. زیرا اسپورکلستریدیوم ولشای زمان زیادی در آب زنده می‌ماند بنابراین وجود آن در آبی که از نظر آلودگی به اشریشیاکلی منفی باشد نشانه آلودگی جزیی آن با یک منشأ مدفوعی است.



شکل ۴ــ ۸ ــ کلستریدیوم پرفرانژانس و اسپورنزدیک به انتهایی آن

مواد و وسایل مورد نیاز

- ظرف‌های سترون با گنجایش ۱ لیتر
- استوانه مدرج سترون شده
- حمام آب $80^{\circ}C$
- دماسنج
- شیر لیتموس دار[1]
- وازپار ذوب و سترون شده
- گرمخانه با دمای $37^{\circ}C$

نکته : وازپار مخلوط مساوی وازلین و پارافین مایع است.

روش کار

الف) ۲۰۰ میلی لیتر نمونه آب مورد نظر را به درون ظرف سترون شده با گنجایش ۱۰۰۰ میلی لیتر منتقل کنید.

ب) به ظرف دارای ۲۰۰ میلی لیتر آب، ۴۰۰ میلی لیتر شیر لیتموس دار سترون اضافه کنید.

نکته : باید توجه کرد که شیر لیتموس دار باید در دمای $100^{\circ}C$ بخار داده شده و هوای آن خارج شود و به سرعت سرد و به ظرف افزوده شود.

پ) ظرف دارای نمونه آب و شیر لیتموس دار را به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب $80^{\circ}C$ قرار دهید.

نکته‌ها

✓ با این کار همه سلول‌های رویشی باکتری‌ها از بین می‌روند و اسپورها باقی می‌مانند سپس با تبدیل اسپور به سلول رویشی با شوک گرمایی می‌توان نسبت به شمارش و شناسایی آنها اقدام نمود.

✓ همزمان می‌توان ظرف مشابهی را که دارای ۶۰۰ میلی لیتر آب است همراه با یک دماسنج در حمام آب قرار داد تا دما کنترل شود.

ت) ظرف دارای نمونه و شیر لیتموس دار را سرد کرده و سطح مایع درون ظرف را با مخلوط وازپار ذوب و سترون شده بپوشانید و به مدت ۵ روز در دمای $37^{\circ}C$ گرمخانه گذاری کنید.

۱ــ Litmus milk

ث) هر ۲۴ ساعت پس از کشت، زیر مخلوط وازپار را از نظر تولید اسید، لخته و تولید گاز بررسی کنید. در واقع نمونه را از لحاظ وجود واکنش لخته طوفانی[۱] بررسی می‌شود.

بیشتر بدانیم

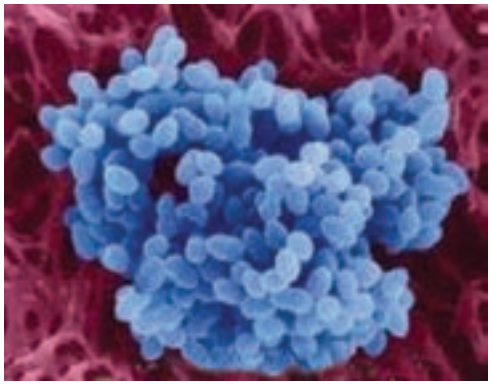
لخته طوفانی حالتی است که در محیط کشت و در اثر اسیدیته، لخته و گاز به‌وجود می‌آید (شکل ۵ــ ۸).

شکل ۵ــ ۸ ــ واکنش لخته طوفانی در شیر لیتموس دار

برای شمارش کلستریدیوم ولشای در آب می‌توان یک سری لوله‌های دارای حجم‌های مختلف نمونه آب را آماده کرده و با استفاده از آزمایش MPN یافته‌ها را به صورت نیمه کمی ارائه نمود.

نکته : کلستریدیوم پرفرانژانس در نمونه‌های کمتر از ۱۰۰ میلی لیتر آب ممکن است قابل تشخیص نباشد بنابراین باید مقادیر نمونه بیشتری را انتخاب کرد (۲۰۰ میلی لیتر) در نتیجه ممکن است جدول MPN ویژه‌ای مورد نیاز باشد.

۸ ــ ۱ــ ۸ ــ آزمون جستجو و شمارش استرپتوکوک‌های مدفوعی (فکالیس)[۲] در آب با روش MPN : استرپتوکوک‌های گروه لانسفیلد D یکی از بخش‌های فلور میکروبی طبیعی در روده انسان و حیوانات را تشکیل می‌دهند و ممکن است به عنوان یک شاخص آلودگی مدفوعی مورد استفاده قرار گیرند. این باکتری‌ها به شکل گرد و زنجیره‌ای و هوازی هستند. انجام آزمون جستجو و شمارش استرپتوکوک مدفوعی مشابه کلی‌فرم‌ها است با این تفاوت که در آن محیط‌های کشت متفاوتی استفاده می‌شود و چون این باکتری گاز تولید نمی‌کند نیازی به استفاده از لوله دورهام برای جمع آوری گاز نمی‌باشد (شکل ۶ــ ۸).



شکل۶ــ ۸ ــ استرپتوکوکوس فکالیس

محیط‌های کشت مورد استفاده در آزمون :

ــ محیط مایع گلوکز آزیدبراث[۳]

ــ محیط جامد اسکولین آزید اگار[۴]

۱ــ Stormy clot

۲ــ Streptococcus faecalis

۳ــ Glucose Azide broth

۴ــ Aesculin Azide agar

مواد و وسایل مورد نیاز

- لوله‌های آزمایش سترون شده و در پیچ دار
- پی‌پت‌های سترون شده ۱و ۱۰ میلی لیتری
- گرمخانه با دمای C ° ۳۷

روش کار

الف) مانند روش تهیه رقت‌های متوالی گفته شده، برای هر یک از رقت‌های 10^{-1}، 10^{-2} و 10^{-3} تعداد ۳ لوله انتخاب کنید. این رقت‌ها باید درون لوله‌های آزمایش دارای محیط کشت مایع گلوکز آزید تهیه شوند.

نکته : برای مقادیر بیشتر از ۱ میلی لیتر (۳ رقت بالاتر) غلظت محیط باید دو برابر باشد.

ب) لوله‌های تلقیح شده با نمونه آب را در دمای C ° ۳۷ به مدت ۷۲ ساعت در گرمخانه بگذارید.

پ) پس از این مدت هر ۲۴ ساعت یک بار لوله‌های مثبت را از نظر تغییر رنگ محیط مورد بررسی قرار دهید.

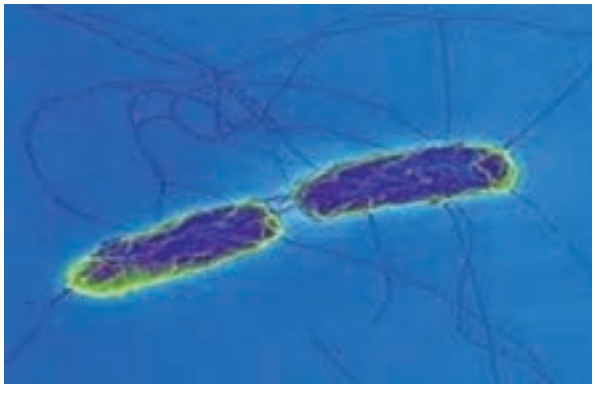
نکته‌ها

- ✓ استرپتوکوک‌های مدفوعی با تخمیر قند، گلوکز و اسید تولید می‌کنند که با تغییر رنگ محیط از ارغوانی به زرد مشخص می‌شود.
- ✓ تغییر رنگ می‌تواند در سراسر لوله یا فقط در قسمت انتهای لوله ایجاد شود.
- ✓ برای دقت بیشتر می‌توان لوله‌های واکنش منفی را برای مدت ۲۴ ساعت دیگر در دمای C ° ۳۷ قرار داده و پس از پایان این مدت حتی اگر تغییر رنگ ضعیفی مشاهده شود واکنش را باید مثبت در نظر گرفت.
- ✓ برای تفسیر یافته‌ها بهتر است از یک لوله شاهد استفاده شود.

ث) پس از مشخص کردن تعداد لوله‌های مثبت، با استفاده از جدول MPN مربوطه شمارش انجام می‌شود.

مرحله تأیید : برای تأیید وجود استرپتوکوکوس فکالیس از لوله‌های مثبت پس از تکان دادن و یکنواخت کردن محتوی آنها یک حلقه کشت کامل برداشت کرده و روی محیط کشت جامد اسکولین آزید آگار به صورت خطی کشت دهید. تشتک‌های کشت‌شده را به مدت ۴۸ ساعت در دمای C ° ۴۴ گرمخانه گذاری کنید.

۹ــ۱ــ ۸ ــ آزمون جستجو و شمارش سالمونلا در آب : گونه‌های سالمونلا باکتری‌هایی هستند که به طورگسترده در تمام دنیا پراکنده می‌باشند. این میکروارگانیسم‌ها در گروه باکتری‌های بیماری‌زا طبقه‌بندی می‌شوند و گونه‌های مختلف آن، توانایی بیماری‌زایی متفاوتی دارند. میزبان طبیعی گونه‌های سالمونلا انسان، دام، حیوانات وحشی بویژه پرندگان می‌باشند. افراد آلوده به سالمونلا ممکن است بدون این‌که علائم بیماری را داشته باشند، این باکتری را به دیگران منتقل کنند، بنابراین حذف آنها از طبیعت در عمل غیر ممکن است. برخی از گونه‌های سالمونلا مانند سالمونلا تایفی می‌توانند در انسان بیماری حصبه ایجاد کنند. با در نظر گرفتن این که آب یکی از راه‌های انتقال این باکتری به انسان است، بنابر این وجود یا عدم وجود آنها در آب به طور منظم باید بررسی شود. گونه‌های سالمونلا ممکن است در آب‌های شیرین، آب‌های زیرزمینی، آب دریا و همچنین پساب وجود داشته باشند.



شکل۷ــ ۸ ــ سالمونلا

باکتری‌های گرم منفی، از خانواده آنتروباکتریاسه هستند، که در محیط‌های غنی‌کننده و انتخابی رشد کرده ودر محیط‌های انتخابی جامد کلنی‌های مشخص به قطر ۳ تا ۴ میلی‌متر ایجاد می‌کنند.

روش شناسایی سالمونلا براساس مراحل پی در پی زیر می‌باشد :

ـ پیش غنی‌سازی نمونه در محیط‌های کشت غنی کنندهٔ غیرانتخابی مایع

ـ غنی‌سازی در محیط‌های کشت غنی‌کنندهٔ انتخابی مایع

ـ شناسایی سالمونلا با استفاده از محیط‌های کشت جامد انتخابی

ـ تأیید سالمونلا با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی مناسب

در مورد نمونه‌هایی مانند پساب که باید رقیق‌سازی انجام شود، براساس آزمون تهیه رقت‌های اعشاری که در پیش گفته شد نمونه رقیق‌سازی می‌شود.

محیط‌های کشت مورد استفاده در آزمون :

ـ ***آب پپتونه بافردار*** به عنوان محیط غنی کننده برای رشد اغلب سالمونلاها

ـ ***محیط کشت آبگوشت راپاپورت***[1]. این محیط دارای سویا، کلرید سدیم و پتاسیم هیدروژن فسفات و یک محیط مایع غنی‌کننده انتخابی برای گونه‌های سالمونلا است.

ـ ***محیط کشت انتخابی گزیلوز – لیزین ـ دزوکسی کولات آگار***[2] دارای گزیلوز، عصاره مخمر به عنوان منبع ازت، قندهای لاکتوز و ساکارز به عنوان منبع انرژی، کلرید سدیم و تیوسولفات سدیم و سیترات آمونیوم آهن سه ظرفیتی است.

ـ ***محیط کشت‌های بیوشیمیایی TSI ،MRVP ،SIM و سیمون سیترات***

مواد و وسایل مورد نیاز

- لوله‌های آزمایش دارای ۱۰ میلی لیتر محیط مایع راپاپورت سترون شده
- لوپ
- ظرف‌های سترون شده
- پی‌پت‌های سترون شده ۱میلی لیتری
- تشتک‌های دارای محیط کشت جامد انتخابی
- گرمخانه قابل تنظیم در دمای ۳۷°C و ۴۲ °C

نکته : به منظور رعایت نکات ایمنی و سلامت کارکنان آزمایشگاه، توصیه می‌شود آزمون‌های شناسایی سالمونلا در آزمایشگاه‌های مجهز به اتاقک میکروبیولوژی و با استفاده از کارکنان با تجربه و متخصص انجام پذیرد.

روش کار

الف) مرحله پیش غنی سازی : مقدار ۱۰ میلی لیتر نمونه آب مورد آزمون را به ۵۰ میلی لیتر محلول آب پپتونه بافردار با غلظت دو برابر تلقیح کنید. سپس نمونه را در گرمخانه با دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت قرار دهید.

نکته : برای انجام این مرحله می‌توان از محیط لاکتوز برات به عنوان محیط غنی‌کننده سالمونلا استفاده نمود.

ب) مرحله غنی سازی انتخابی : پس از پایان گرمخانه‌گذاری نمونه در مرحله پیش، ۰/۱ میلی لیتر از آن را در شرایط سترون به لوله دارای ۱۰ میلی لیتر محیط راپاپورت اضافه کنید. سپس لوله تلقیح شده را در گرمخانه با دمای ۴۲°C به مدت ۲۴ ساعت قرار دهید.

۱ـ Rapaport broth

۲ـ Xylose ـ Lysine – Deoxycholate Agar (XLD)

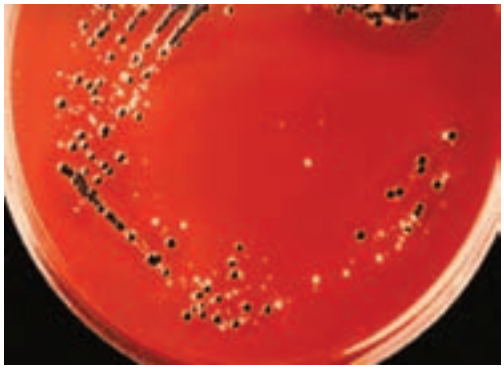
نکته : برای گونه‌های سالمونلا که رشدشان کند است، گرمخانه‌گذاری را می‌توان تا ۴۸ ساعت ادامه داد.

پ) مرحله کشت در محیط جامد انتخابی : با استفاده از حلقه کشت سترون، از نمونه گرمخانه‌گذاری شده درقسمت (ب) به‌طور همزمان بر روی محیط‌های کشت جامد انتخابی گزیلوز ــ لیزین ــ دزوکسی کولات آگار بصورت خطی کشت دهید. سپس تشتک‌ها را در گرمخانه با دمای $37^{\circ}C$ به مدت ۲۴ ساعت قرار دهید.

نکته : برای این مرحله می‌توان از محیط‌های کشت انتخابی دیگر مانند بیسموت سولفیت آگار و یا بریلیانت گرین آگار نیز استفاده نمود و همزمان بر روی این محیط‌ها نیز از نمونه مرحله پیش کشت خطی انجام داد.

پس از مدت زمان گرمخانه گذاری تشتک‌ها را از نظر ویژگی‌های کلنی سالمونلا بررسی کنید.

نتیجه : کلنی های سالمونلا در محیط کشت گزیلوز ــ لیزین ــ دزوکسی کولات آگار بی‌رنگ هستند ولی به دلیل قرمز بودن زمینه محیط کشت، متمایل به قرمز به نظر می‌رسند. این کلنی‌ها بیشتر دارای حاشیه زرد رنگ یا بی رنگ و مرکز سیاه می‌باشند.



شکل ۸ــ ۸ ــ کلنی‌های سالمونلا در محیط XLD agar

ت) مرحله تأیید بیوشیمیایی : برای انجام آزمون‌های تأییدی سالمونلا، از کلنی‌های مشخص محیط کشت XLD agar انتخاب کنید و در محیط‌های TSI،SIM،سیمون سیترات و MRVP کشت دهید (روش‌های کشت در فصل ۴ به طور کامل شرح داده شده است).

محیط‌های تلقیح شده را در گرمخانه با دمای $37^{\circ}C$ به مدت ۲۴ ساعت قرار دهید و پس از این مدت محیط‌ها را بررسی کرده و یافته‌ها را ثبت کنید و در آخر با جدول تست‌های بیوشیمیایی باکتری‌های گرم منفی مقایسه نموده و وجود یا عدم وجود سالمونلا را گزارش کنید.

۱۰ــ۱ــ ۸ ــ آزمون جستجو و شمارش قارچ‌ها در آب : قارچ‌ها که شامل مخمرها و گونه‌های رشته‌ای یا کپک‌ها هستند، ارگانیزم‌هایی هتروتروف و بدون کلروفیل می‌باشند که دارای دیواره سلولی سخت وهسته حقیقی بوده و بیشتر هوازی و یا میکروآئروفیل[1] هستند. قارچ‌ها در همه‌جا پراکنده‌اند و در هر جایی که ماده آلی غیر زنده وجود دارد یافت می‌شوند. با توجه به ارتباط بین میزان توده قارچ و مواد آلی می‌توان قارچ‌ها را شاخص خوبی برای آلودگی آب در نظر گرفت ولی متأسفانه تاکنون هیچ گونه یا گونه‌هایی از قارچ‌ها که از این نظر اهمیت داشته باشند، شناخته نشده‌اند. وجود تعداد زیادی قارچ، نشانه وجود مقدار زیاد مواد آلی می‌باشد. در بررسی‌های انجام شده قارچ‌ها از آب آشامیدنی و نیز از سطح داخلی لوله‌های توزیع آب جدا شده‌اند. آنها در آب تصفیه شده باقی مانده و یا پس از فرآیند تصفیه وارد سیستم شده، در هر صورت اسپور قارچ‌ها قادرند مدت زمان طولانی زنده باقی بمانند. قارچ‌های بیماری زا در آب مقطر استریل برای مدت زمان زیادی زنده می‌مانند. گرچه مزه و بوی آب‌های آشامیدنی مربوط به وجود ارگانیزم‌های پروکاریوت مثل باکتری‌ها، اکتینومیست‌ها و سیانوباکترها است، ولی قارچ‌ها نیز باعث تغییر بو و مزه آب می‌شوند.

۱ــ Microaerophile

محیط‌های مورد استفاده در این آزمون :

ـــ ***سابرو دکستروز اگار***[1] دارای پپتون و گلوکز است و برای جداسازی و شمارش کپک‌ها به کار می‌رود و فاقد آنتی بیوتیک است.

ـــ ***عصاره مخمر مالت گلوکز آگار***[2] این محیط دارای عصاره مخمر، مالت، گلوکز و پپتون است و برای جداسازی مخمرها به کار می‌رود.

الف) آزمون جداسازی و شمارش قارچ‌ها به روش پورپلیت

مواد و وسایل مورد نیاز

- ارلن با گنجایش ۲۵۰ میلی لیتر
- پی‌پت‌های سترون ۱ و ۱۰ میلی لیتری
- استوانه مدرج سترون شده
- تشتک‌های سترون
- یکی از محیط‌های کشت بالا به صورت ذوب شده
- گرمخانه

روش کار

الف) در یک ارلن‌مایر ۲۵۰ میلی لیتری سترون، ۱۳۵ میلی لیتر آب مقطر سترون و ۱۵ میلی لیتر از نمونه آب مورد آزمون را اضافه کنید تا رقت ۱۰ :۱ بدست آید.

نکته‌ها

✓ گرچه با تعداد ۲۰ نمونه می‌توان شمارش مطلوبی بدست آورد، اما بهتر است هربار با ۴۰ نمونه با روش زیر بررسی را انجام داد.

✓ از استوانه مدرج سترون برای هر یک از نمونه‌ها استفاده کنید و یا پس از هر بار استفاده آن را با آب مقطر سترون شستشو دهید.

✓ پیش از برداشتن ۱۵ میلی لیتر نمونه، بایستی آن‌را بخوبی هم بزنید.

ب) ارلن حاوی نمونه را روی هم زن با ۱۵۰ـ۱۲۰ دور در دقیقه به‌مدت نیم ساعت قرار دهید و یا محتویات آن‌را به یک مخلوط کن منتقل کرده و درپوش مخلوط کن را گذاشته و با سرعت کم به‌مدت یک دقیقه یا با سرعت زیاد به‌مدت ۳۰ ثانیه مخلوط کنید.

نکته : مخلوط کن باید برای هر نمونه سترون شده باشد ظرف‌های مورد استفاده پیش از کاربری برای هر یک از نمونه‌ها باید با آب مقطر سترون شسته شوند.

پ) رقت‌های اعشاری پی‌درپی را می‌توانید با افزودن حدود ۵ میلی لیتر از سوسپاسیون با رقت ۱۰ :۱ به ۴۵ میلی لیتر آب مقطر سترون، تهیه کنید.

ت) پنج تشتک سترون برای هر رقت مورد آزمایش تهیه کرده و ۱۰ میلی لیتر از یکی از محیط‌های بالا (بسته به نوع آزمون کپک یا مخمر) با دمای ۴۵ درجه سانتی گراد را در تشتک با قطر ۹ سانتی متر بریزید.

ث) یک میلی لیتر از نمونه رقیق شده را با پی‌پت سترون به تشتک دارای محیط کشت ذوب شده منتقل کنید و با حرکات دورانی

۱ـ Sabraudextrose agar

۲ـ Malt glucose agar

تشتک را در جهات مختلف بچرخانید تا به خوبی مخلوط شوند سپس بگذارید تا محیط جامد شود.

ج) تشتک‌ها را در دمای محیط (۲۴ــ۲۰ درجه سانتی گراد) قرار دهید و از تابش مستقیم نور خورشید به آنها جلوگیری نمایید. پس از مدت ۳ الی ۷ روز پرگنه‌ها را شمارش کنید.

نکته‌ها

✓ برای جلوگیری از خشک شدن محیط هنگام گرمخانه گذاری می‌توان مقدار بیشتری محیط کشت ذوب شده در تشتک‌ها ریخت.

✓ دمای مورد نیاز قارچ‌ها بر خلاف باکتری‌ها پایین‌تر و حدود C° ۳۰ــ۲۰ است.

✓ سرعت رشد قارچ‌ها بسیار آهسته تر از باکتری‌ها است در نتیجه مدت زمان بیشتری برای رشد نیاز دارند. (۵ تا ۷روز)

چ) پس از مدت زمان مورد نظر رقتی را که حدود ۱۵۰ــ۲۰ پرگنه ایجاد می‌کند، انتخاب کنید.

یادآوری : شمارش قارچ‌ها مانند شمارش باکتری‌های تک سلولی نمی‌باشد زیرا که یک کلنی قارچی ممکن است از یک سلول، اسپور، توده سلولی (خوشه‌ای از اسپورها یا از یک اسپور چند سلولی)، یک میسیلیوم و یا از قطعات میسیلیوم کاذب (شامل بیش از یک سلول زنده) تشکیل شود. با وجود این به نظر می‌رسد که هر کلنی قارچی در محیط کشت آزمایشگاهی از یک واحد تشکیل‌دهنده کلنی منشأ گیرد که آن واحد تشکیل‌دهنده کلنی ممکن است تنها یک سلول و یا بیش از آن باشد.

ح) تعداد پرگنه‌ها در هر میلی لیتر نمونه آب را از فرمول زیر به دست آورید.

ضریب رقت × میانگین تعداد پرگنه‌ها در ۵ تشتک = تعداد پرگنه

ب) آزمون جستجو و شمارش قارچ‌ها به روش کشت سطحی

مواد و وسایل مورد نیاز

- ارلن با گنجایش ۲۵۰ میلی لیتر
- استوانه مدرج
- پی‌پت‌های سترون ۱ میلی لیتری
- تشتک‌های دارای یکی از محیط‌های کشت ارائه شده در آزمون
- میله شیشه‌ای سر کج
- گرمخانه با دمای C° ۲۰

روش کار

الف) مانند آنچه برای روش پورپلیت انجام شد نمونه اولیه را آماده کرده و رقت‌های اعشاری بعدی را نیز به همان صورت که گفته شد تهیه کنید.

ب) تشتک‌های دارای محیط کشت آزمون را به مدت ۱/۵ــ۱ ساعت زیر هود، بصورت در باز قرار دهید تا رطوبت اضافی آنها گرفته شود. سپس یک میلی لیتر از نمونه یا از رقت تهیه شده را توسط پی‌پت سترون به محیط انتقال داده و با میله شیشه‌ای سر کج یا L شکل سترون بطور یکنواخت روی محیط کشت پخش کنید.

پ) پس ازتلقیح بگذارید محیط کشت خشک شود، سپس آنها را بطور وارونه در گرمخانه با دمای C° ۲۰ و رطوبت هوای بالا (۹۵٪ــ ۹۰٪) به مدت ۷ــ ۵ روز قرار دهید.

نکته : قارچ‌های کند رشد ممکن است در عرض ۶ــ۷ روز پرگنه ایجاد نکنند و به زمان بیشتری نیاز داشته باشند.

ت) بر اساس اندازه پرگنه در هر تشتک تا ۱۵۰ پرگنه را هم می‌توان شمرد، اما تعداد مناسب پرگنه ۱۰۰ عدد خواهد بود.

نکته‌ها

✓ اگر سه یا تعداد بیشتری تشتک برای هر نمونه داشته باشید، تعداد متوسط پرگنه‌ها را بدست آورید و در ضریب رقت ضرب کنید.

✓ اگر در هیچ کدام از تشتک‌ها پرگنه رشد نکند، تعداد آنها را در رقیق‌ترین نمونه، کمتر از یک گزارش کنید.

✓ اگر تعداد آنها بیش از ۱۵۰ بود، باید تعداد قارچ را به صورت بی‌شمار گزارش کرد.

✓ اگر پرگنه‌ها روی هم افتاده باشند، نتیجه را غیر قابل مشاهده ثبت کرده و آزمایش را تکرار کنید. این بار رقت را بیشتر کرده و یا مدت کمتری در گرمخانه قرار دهید.

۲ــ ۸ ــ آزمون‌های میکروبی شیر

شیر و فرآورده‌های آن از اجزای مهم تشکیل‌دهنده رژیم غذایی است که دارای پروتئین،چربی، لاکتوز، ویتامین‌ها و مواد معدنی همراه با آنزیم‌های طبیعی و دارای ارزش تغذیه‌ای بالایی است به همین دلیل محیط مناسبی برای رشد همه عوامل معمولی فساد می‌باشد. شیر خام به صورت طبیعی حتی با در نظر گرفتن میزان مراقبتی که در تهیه، نظافت دستگاه‌ها و وسایل حمل و نقل آن می‌شود دارای انواع میکروارگانیسم‌ها است. برای از بین بردن میکروب‌های عامل فساد و بیماری‌زا در شیر از روش‌های گرمایی مانند پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون استفاده می‌شود. تعیین بار میکروبی شیر مایع چه به صورت خام و چه به صورت پاستوریزه شده اهمیت زیادی دارد. مقدار زیادی از شیر به صورت فرایند شده مانند ماست و پنیر تهیه می‌شود و بار میکروبی اولیه شیر روی این محصولات نیز تأثیر می‌گذارد. به علاوه هر چه بار میکروبی شیر پس از مراحل پاستوریزاسیون کمتر باشد زمان نگهداری آن زیاد می‌شود وحتی به حدود ۶ ماه هم می‌رسد. روش‌های آزمون میکروبی شیر شامل آزمون‌هایی است که اطلاعات کلی را از نظر تعداد و فعالیت‌های میکروارگانیسم‌های موجود فراهم می‌کند. واضح است که شمارش میکروبی مورد انتظار یا مطلوب نمونه‌های شیر بستگی به میزان و نوع فرایند دارد. برای نمونه پس از پاستوریزاسیون شیر، شمارش کلی میکروبی نباید از 10^5 عدد در هر میلی لیتر بیشتر باشد و تعداد کلی‌فرم‌ها نیز باید کمتر از ۱۰ عدد در هر میلی لیتر باشد. برای کسب اطلاعات بیشتر به استانداردهای ملی مربوطه مراجعه شود.

واژه‌ها و تعریف عملی آنها :

● **شیر خام** : مایعی است حاصل از دوشیدن کامل پستان دام سالم حداقل ۴ روز پس از زایمان که در شرایط بهداشتی دوشیده شده و با اصول صحیح نگهداری شده باشد و آب یا ماده دیگری به آن اضافه یا از آن کسر نشده باشد. همچنین شیر خام باید فاقد آغوز[۱] باشد و هیچ گونه عملیات فرآوری روی آن انجام نشده باشد. آغوز اولین مایع مترشحه از پستان گاو شیرده حداقل ۴ روز پس از زایمان است.

نکته‌ها

✓ شیر خام بلافاصله پس از دوشیدن باید خنک شود و در شرایط مناسب و دمای $4^\circ C$ نگهداری شود.

✓ شیر خام باید با دمای کمتر از $8^\circ C$ تحویل گرفته شود و یخ نزده باشد.

✓ شیر دام‌هایی که با آنتی بیوتیک یا مواد هورمونی یا داروی دیگر درمان می‌شوند باید حداقل تا پایان مدت زمان تعیین شده در دستورالعمل دارو و بر طبق توصیه پزشک با سایر شیرها مخلوط و مصرف نشود.

۱ــ Colestrom

● **شیر پاستوریزه** : فرآورده‌ای است که با یکی از روش‌های سالم‌سازی از شیر خام تهیه شده به طوری که کلیه میکروب‌های بیماری زای غیر اسپوردار آن از بین رود و تعداد میکروب‌های غیر بیماری‌زا در آن به حداقل رسیده و کمترین تغییر در ترکیب آن حاصل شده باشد.

کیفیت شیر خامی که تحویل کارخانه‌های تهیه شیرپاستوریزه و فرآورده‌های شیر می‌شود باید از نظر میکروبی با ویژگی‌های استانداردهای زیر برابری داشته باشد.

حد مجاز در میلی لیتر..... نوع میکروارگانیسم

$۵/۷\times۱۰^{۵}$..... باکتری‌های هوازی مزوفیل

کمتر از ۱۰..... کلی‌فرم‌ها

منفی..... اشریشیاکلی

روش‌های ارزیابی آلودگی میکروبی شیر عبارتند از :

۱ــ۲ــ ۸ ــ آزمون احیای متیلن بلو : یکی از آزمایش‌های تعیین کیفیت شیر که با آن تعداد باکتری‌های موجود در شیر خام تخمین زده می‌شود، آزمایش احیای متیلن بلو است. اساس این آزمون بر این است که باکتری‌های موجود در شیر در دمای مناسب به سرعت رشد کرده و اکسیژن محیط را مصرف کنند. در اثر مصرف اکسیژن، حالت شیمیایی محیط تغییر کرده و پتانسیل اکسیداسیون و احیاء پایین می‌آید. برای تخمین زدن میزان فعالیت باکتری‌ها، می‌توان رنگ متیلن بلو (شناساگر حالت اکسیداسیون و احیاء) به شیر اضافه کرد. این شناساگر در ابتدا رنگ آبی دارد. اما پس از مصرف شدن اکسیژن محیط توسط باکتری‌های موجود در شیر رنگ خود را از دست داده و بی‌رنگ می‌شود. به طور کلی، طول مدت احیاء با تعداد باکتری‌های موجود در شیر نسبت عکس دارد. یعنی هر چه تعداد باکتری‌ها زیاد تر باشد زمان کمتری برای تغییر رنگ متیلن بلو لازم است. برای تسریع رشد باکتری‌های موجود در شیر و کاهش طول مدت آزمون، پس از افزودن شناساگر، باید نمونه شیر را در دمای کنترل شده قرار داد.

مواد و وسایل مورد نیاز

الف) رنگ متیلن بلوــ قرص‌های این ماده رنگی هر کدام دارای ۱۹ میلی گرم متیلن بلو استاندارد است و لازم است هر قرص را در ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر سترون و سرد شده حل کرده و به حجم ۸۰۰ میلی لیتر رساند. این محلول در یخچال تا ۲ ماه قابل نگهداری و مصرف است.

ب) گرمخانه با دمای ۲۵ــ۲۰ درجه سانتی‌گراد

پ) لوله آزمایش حدود ۲۵ــ۲۰ میلی لیتری با در لاستیکی

ت) نمونهٔ شیر و نمونهٔ شاهد برای مقایسهٔ رنگ

روش کار

حدود ۱ سانتی‌متر مکعب از محلول استاندارد رنگ آبی متیلن را با ۱۰ میلی لیتر از نمونه شیر مورد آزمون از پیش یکنواخت شده در لوله آزمایش دردار ریخته و به خوبی مخلوط نمایید. سپس آن را بدون فاصله در حمام آب گرم با دمای ۳۷/۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده تغییر رنگ را مشاهده کنید و زمانی که رنگ شیر به خوبی سفید شد زمان را یادداشت کنید. در شرایط عادی نمونه ظرف مدت ۳ تا ۵ ساعت بی‌رنگ می‌شود.

مزایای روش احیاء رنگ

ــ سرعت زیاد در رسیدن به پاسخ

ـ نیاز به کمترین فضا و امکانات
ـ امکان انجام آزمون برای تعداد زیادی نمونه به صورت همزمان

عیب‌های روش احیای رنگ

ـ در این روش نوع میکروب و بیماری‌زا بودن باکتری‌ها مشخص نمی‌باشد.
ـ یافته‌های آزمون تاحدی تابع دما، نور، نوع باکتری و مواد طبیعی احیاء کننده موجود در شیر می‌باشد.

نکته : به‌جای آزمون احیای متیلن‌بلو می‌توان از رنگ‌های دیگر مانند رزازورین و ۲،۳،۵تری فنیل تترازولیم کلراید هم استفاده نمود.

۲ـ۲ـ ۸ ـ آزمون شمارش باکتری‌های مقاوم به گرما در شیر (ترمودوریک[۱]) : در شیر خامی‌که چند روز در دمای یخچال نگهداری شود یک یا چند نوع از باکتری‌های زیر یافت می‌شود، استرپتوکوکوس[۲]، لوکونوستوک[۳]، لاکتوباسیلوس[۴]، میکروباکتریوم[۵]، پروپیونی‌باکتریوم[۶]، میکروکوکوس، کلی‌فرم، پروتئوس، سودموناس، باسیلوس. باکتری‌هایی که در دمای پایین قادر به رشد نیستند از نظر تعداد کم هستند. عمل پاستوریزاسیون تعداد همه باکتری‌های بالا غیر از ترمودوریک‌ها (از جمله استرپتوکوک‌ها و لاکتوباسیل‌ها) را کاهش می‌دهد.

باکتری‌های اسپوردار جنس باسیلوس و کلستریدیوم نیز درصورت حضور در شیر خام پس از فرایند پاستوریزاسیون باقی می‌مانند. فساد شیر پاستوریزه ناشی از رشد استرپتوکوک‌های مقاوم به حرارت (ترمودوریک) و عمل تجزیه لاکتوز و تولید اسیدلاکتیک توسط آنهاست. این امر باعث کاهش pH به نقطه ایجاد لخته (به pH حدود ۴/۵) می‌گردد. سپس استرپتوکوک لاکتیس با ادامه فعالیت‌های تخمیری و کاهش بیشتر pH تا حد ۴ یا پایین‌تر زمینه را برای رشد سایر لاکتوباسیل‌ها فراهم کند.

باکتری‌های مقاوم به گرما : باکتری‌هایی هستند که پس از پاستوریزاسیون در دمای C ° ۶۳/۵ به مدت ۳۰ دقیقه زنده می‌مانند و در شرایط مناسب رشد می‌کنند و پرگنه‌های قابل شمارش تشکیل می‌دهند.

مواد و وسایل مورد نیاز

- ظرف‌های شیشه‌ای درپوش‌دار سترون شده
- پی‌پت‌های سترون شده
- حمام بخار آب قابل تنظیم با دمای C °۶۳/۵
- گرمخانه با دمای C °۳۰
- تشتک‌های خالی
- رقیق کننده پپتون نمک‌دار
- محیط کشت ذوب شده آگار شیردار[۷]

۱ـ Thermoduric
۲ـ Streptococcus
۳ـ Leuconostoc
۴ـ Lactobacillus
۵ـ Microbacterium
۶ـ Propionibacterium
۷ـ Litmus Milk Agar

روش کار

الف) ۱۰میلی‌لیتر نمونه شیرمورد آزمون را وارد یک ظرف شیشه ای سترون شده کنید و درپیچ آن را محکم ببندید.

ب) ظرف شیشه‌ای را به‌طور کامل در حمام آب با دمای C ° ۶۳/۵ غوطه‌ور کنید. بعد از ۳۵ دقیقه آن را خارج کرده و بلافاصله در آب با دمای C ° ۲۰ خنک کنید. نمونه‌های لخته شده را جدا و از مراحل آزمون خارج کنید. این امر را در گزارش آزمون وارد نمایید.

نکته‌ها

✓ برای اطمینان از این که تمام شیشه‌ها حداکثر به مدت ۵ دقیقه به دمای C ° ۶۳/۵ رسیده اند. روش زیر را به‌کار گیرید.

✓ دماسنجی با درجه‌بندیC ° ۰/۱ را از یک درپیچ سوراخ دار عبور دهید به نحوی که مخزن آن در نمونه غوطه‌ور شود و نشتی نداشته باشد. ده میلی‌لیتر آزمونه را به شیشه منتقل کنید و درپیچ حامل دماسنج را ببندید. سپس در حین انجام آزمون این شیشه را نیز در حمام آب غوطه‌ور سازید. به مدت رسیدن دما تا C ° ۶۳ توجه نمایید.

✓ اگر در مدت ۵ دقیقه دمای داخل شیشه‌ها به C ° ۶۳ نرسیده ممکن است به دلیل جابجایی ضعیف گرما در آنها باشد که در این صورت باید تعداد آنها را کم کرد، یا سرعت گردش و یا هم زدن آب را بیشتر کرد.

پ) بلافاصله بعد از خنک کردن نمونه، کشت پورپلیت (روش استاندارد) را انجام دهید. برای این منظور با پی‌پت سترون شده، ۱میلی لیتر از نمونه خنک شده را به تشتک اضافه کنید و محیط کشت ذوب شده آگار شیردار را روی آن بریزید. سپس تشتک‌های دارای نمونه و محیط ذوب شده را دوران دهید تا به خوبی مخلوط شود، سپس به حال خود بگذارید تا سفت شوند.

ت) تشتک‌های آماده شده را به مدت دو روز در دمای C ° ۳۰ گرمخانه گذاری کنید به مدت دو روز نگهداری کنید.

ث) پس از این مدت تعداد باکتری‌ها را با استفاده از فرمولCFU محاسبه نمایید ونتیجه را به عنوان تعداد باکتری‌های ترمودوریک به ازای هر گرم یا هر میلی لیتر نمونه گزارش کنید.

۳ــ۲ــ ۸ ــ آزمون شمارش کلی میکروبی شیر : از این آزمون برای تعیین بار میکروبی شیر استفاده می‌شود.

محیط‌های کشت مورد استفاده در آزمون :

ــ تشتک پلیت کانت اگار

ــ آگار مغذی

مواد و وسایل مورد نیاز

- تشتک‌های یکبار مصرف
- پی‌پت‌های سترون ۱میلی لیتری
- لوله‌های آزمایش برای تهیه رقت‌های پی‌درپی
- رقیق کننده رینگر
- یکی از محیط کشت‌های مورد استفاده در آزمون به حالت ذوب شده
- گرمخانه قابل تنظیم با دمای C ° ۳۰

روش کار

الف) ابتدا رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-5} از نمونه شیر مورد آزمون را در لوله‌های دارای ۹میلی لیتر رقیق کننده رینگر تهیه کنید. (براساس روش تهیه رقت‌های بعدی یا متوالی در فصل چهارم)

ب) برای هر رقت آماده شده دو کشت پورپلیت یا استاندارد با یکی از محیط کشت‌های بالا انجام دهید. (مانند روش کشت

استاندارد در فصل چهارم)

پ) تشتک‌های کشت شده را به مدت ۴۸ــ۲۴ ساعت در دمای $30^{\circ}C$ قرار دهید.

نکته : برای شمارش باکتری‌های سرماگرا و مقاوم به گرما می‌توان کشت‌ها را به ترتیب به مدت ۷و۲روز در دمای $6^{\circ}C$ و $55^{\circ}C$ قرار داد.

ت) پس از این زمان شمارش کلنی‌ها را انجام دهید و با استفاده از راهنماهای ارائه شده در فصل چهارم CFU/gr را برای هر گروه از باکتری‌های بالا محاسبه کنید.

۴ــ۲ــ۸ ــ آزمون شمارش مستقیم میکروسکوپی در شیر : این روش در فصل ششم شرح داده شده است.

۵ــ۲ــ۸ ــ آزمون شمارش کلی فرم‌ها : برای انجام این آزمون از روش ارائه شده در آزمون میکروبی آب استفاده کنید.

۶ــ۲ــ۸ ــ شمارش اسپور مقاوم باکتری‌های هوازی (مزوفیل و مقاوم به گرما) :

الف)۱ میلی لیتر از محلول تورنسل را به ۱۰۰ میلی لیتر آزمایه(نمونه مورد آزمون) اضافه کنید.

ب) ۹ شیشه در پیچ دار دارای ۹میلی لیتر شیر تورنسل دار آماده کنید و به هر یک از سه شیشه درپیچ دار سترون ۱۰ میلی لیتر و به سه شیشه دیگر ۱ میلی‌لیتر و به سه شیشه آخر ۰/۱ میلی لیتر از نمونه آماده شده بند الف را بیافزایید.

نکته : برای هر گروه از میکروارگانیسم‌های بالا یک سری ۹ تایی آزمون باید انجام گیرد.

پ) درپیچ شیشه‌ها را محکم بسته و آنها را در اتوکلاو با دمای $100^{\circ}C$ یا آب در حال جوش به مدت ۳۰ دقیقه قرار دهید و سپس بگذارید خنک شوند.

ت) پس از خنک شدن، شیشه‌ها را به مدت ۱۴ روز در دمای $30^{\circ}C$ و به مدت ۷ روز در دمای $55^{\circ}C$ (برای مزوفیل‌ها) گرمخانه‌گذاری کنید.

ث) پس از این زمان‌ها شیشه‌ها را از نظر ایجاد کدورت و رشد باکتری‌ها بررسی کنید.

نکته : بهتر است برای بررسی دقیق‌تر رشد باکتری‌ها از رنگ‌آمیزی نمونه‌ها با رنگ نیومن استفاده کنید.

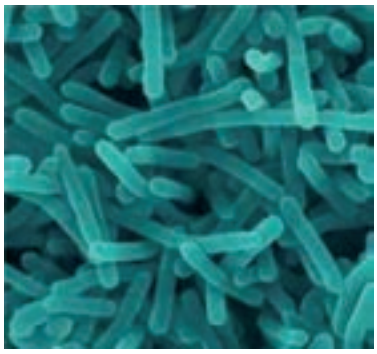
روش رنگ‌آمیزی نیومن[۱] *:* ابتدا یک قطره سرم فیزیولوژی بر روی لام قرار دهید و یک پرگنه را در آن پخش کرده و یک گستره میکروبی تهیه کنید و آن را در دمای ۵۰ درجه‌سانتی‌گراد در گرمخانه به مدت حدود ۵ دقیقه خشک کنید. سپس به مدت دو دقیقه گسترش‌ها را با رنگ نیومن رنگ‌آمیزی کنید. رنگ نیومن دارای متیلن بلو و تتراکلرواتان به عنوان حلال چربی است. پس از خنک شدن گستره‌ها در معرض هوا به ملایمت آنها را با آب شستشو دهید و آب اضافی را از روی لام خارج کنید، در هوا خشک کنید. سپس زیر میکروسکوپ مشاهده کنید.

ج) پس از بررسی شیشه‌ها از نظر کدورت و تعیین نمونه‌های مثبت با استفاده از جدول MPN اسپور باکتری‌ها (جدول۴ــ ۸، MPN) را برای شمارش تعداد اسپور هر گروه باکتری (مزوفیل و مقاوم به گرما) محاسبه کنید.

۱ــ Newman's Stam

جدول ۴ــ ۸ ــ جدول استاندارد MPN اسپورها

حداکثر تعداد احتمالی در گرم / میلی‌لیتر	تعداد لوله‌های واکنش مثبت				حداکثر تعداد احتمالی در گرم / میلی‌لیتر	تعداد لوله‌های واکنش مثبت		
	۳ لوله هریک ۰/۱ میلی‌لیتر	۳ لوله هریک ۱ میلی‌لیتر	۳ لوله هریک ۱۰ میلی‌لیتر			۳ لوله هریک ۰/۱ میلی‌لیتر	۳ لوله هریک ۱ میلی‌لیتر	۳ لوله هریک ۱۰ میلی‌لیتر
	۰/۱	۱	۱۰			۰/۱	۱	۱۰
۹	۰	۰	۲		۰	۰	۰	۰
۱۴	۱	۰	۲		۳	۱	۰	۰
۲۰	۲	۰	۲		۶	۲	۰	۰
۲۶	۳	۰	۲		۹	۳	۰	۰
۱۵	۰	۱	۲		۳	۰	۱	۰
۲۰	۱	۱	۲		۶	۱	۱	۰
۲۷	۲	۱	۲		۹	۲	۱	۰
۳۴	۳	۱	۲		۱۲	۳	۱	۰
۲۱	۰	۲	۲		۶	۰	۲	۰
۲۸	۱	۲	۲		۹	۱	۲	۰
۳۵	۲	۲	۲		۱۲	۲	۲	۰
۴۲	۳	۲	۲		۱۶	۳	۲	۰
۲۹	۰	۳	۲		۹	۰	۳	۰
۳۶	۱	۳	۲		۱۳	۱	۳	۰
۴۴	۲	۳	۲		۱۶	۲	۳	۰
۵۳	۳	۳	۲		۱۹	۳	۳	۰
۲۳	۰	۰	۳		۱۵	۳	۰	۱
۳۹	۱	۰	۳		۷	۰	۱	۱
۶۴	۲	۰	۳		۱۱	۱	۱	۱
۹۵	۳	۰	۳		۱۵	۲	۱	۱
۴۳	۰	۱	۳		۱۹	۳	۱	۱
۷۵	۱	۱	۳		۱۱	۰	۲	۱
۱۲۰	۲	۱	۳		۱۵	۱	۲	۱
۱۶۰	۳	۱	۳		۲۰	۲	۲	۱
۹۳	۰	۲	۳		۲۲	۳	۲	۱
۱۵۰	۱	۲	۳		۱۶	۰	۳	۱
۲۱۰	۲	۲	۲		۲۶	۱	۳	۱
۲۶۰	۳	۲	۲		۲۴	۲	۳	۱
۲۴۰	۰	۳	۲		۲۹	۳	۳	۱
۲۶۰	۱	۲	۲					
۱۱۰۰	۲	۲	۲					
۱۱۰۰	۳	۲	۳					



شکل۹ــ ۸ ــ لیستریا مونوسایتوجنز

۷ــ۲ ــ ۸ ــ آزمون جستجوی لیستریا مونوسایتوجنز[1] در شیر : باکتری‌های جنس لیستریا شکل میله‌ای کوتاه به طول ۰/۴تا ۰/۵ و قطر ۵ ــ۲ میکرون با دو انتهای گرد و در بعضی موارد به صورت سلول‌های خمیده تکی یا زنجیره کوتاه و یا به شکل v دیده می‌شوند. طول رشته‌های آنها گاه ۲۰ــ۶ میکرون یا بیشتر می‌رسد. این باکتری‌ها قادربه رشد در دمای C ° ۴۳ــ C ° ۳۰ می‌باشند و pH مناسب رشد آنها نزدیک به خنثی است. باکتری میکروآئروفیل بوده و در شرایط هوازی نیز به خوبی رشد می‌کنند. گرم مثبت هستند اما در کشت‌های کهنه ممکن است تغییر رنگ دهند. پرگنه‌های این جنس درشرایط تابش نور به طور مایل به رنگ خاکستری مایل به آبی با درخشندگی عادی و جلای سبزآبی دیده می‌شوند.

باکتری‌های این جنس به‌طورفراوان درطبیعت، آب، گل، لجن، رستنی‌ها و مدفوع انسان وحیوان پراکنده است و در کشورهای پیشرفته مهم‌ترین باکتری بیماری‌زا برای انسان وحیوان است. عامل بیماری می‌تواند از حیوان و افرادی که با حیوانات سروکار دارند به انسان منتقل گردد.

درسال‌های اخیر این باکتری به عنوان عامل بیماری‌های ناشی ازموادغذایی بخصوص در فرآورده‌های شیری شناخته شده است. بیماری ممکن است با علائم آنفلونزا ظاهر شده و گاه ناشناخته بماند.

با وجود گزارش‌های بحث انگیز در مورد مقاومت این باکتری به حرارت پاستوریزاسیون به‌نظرمی‌رسد که این باکتری به طور عادی نمی‌تواند در فرایند پاستوریزاسیون (۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه) زنده بماند. جداسازی لیستریا از نمونه‌های غذایی نیاز به مراحل غنی سازی دارد.

محیط کشت‌های مورد استفاده در آزمون :

– آبگوشت غنی کننده لیستریا[2]

– آگار لیستریا مک براید[3]

– آگار تریپتیکاز سوی

مواد و وسایل مورد نیاز

- ظروف شیشه ای سترون شده با گنجایش ۳۰۰ میلی لیتر
- همزن یا مخلوط کن
- لوپ یا حلقه کشت
- لوله آزمایش برای تهیه رقت
- محیط‌های کشت گفته شده در بالا
- محلول ۰/۵ درصد هیدروکسید پتاسیم (رقیق کننده)
- گرمخانه قابل تنظیم با دمای C ° ۳۰ و C ° ۳۵

۱ــ Listeria monocytogenesis

۲ــ Listeria enrichment broth

۳ــ Listeria Mc Bride agar

روش کار

الف) ابتدا ۲۵ گرم نمونه مورد آزمون را به ۲۲۵ میلی لیتر آبگوشت غنی کننده لیستریا افزوده و با دقت مخلوط و یکنواخت کنید.

ب) مخلوط آماده شده را به مدت ۷ روز در گرمخانه با دمای $30^{\circ}C$ قرار دهید.

پ) یکبار پس از ۲۴ ساعت و بار دیگر پس از ۷ روز با استفاده از رقیق کننده ۰/۵ در صد هیدروکسید پتاسیم و نمونه غنی‌شده در مرحله پیش رقت 10^{-1} را تهیه کنید.

ت) از رقت تهیه شده با لوپ یک حلقه کامل برداشته و روی سطح مک براید آگار کشت دهید.

نکته : نمونه رقیق شده باید به سرعت کشت داده شود.

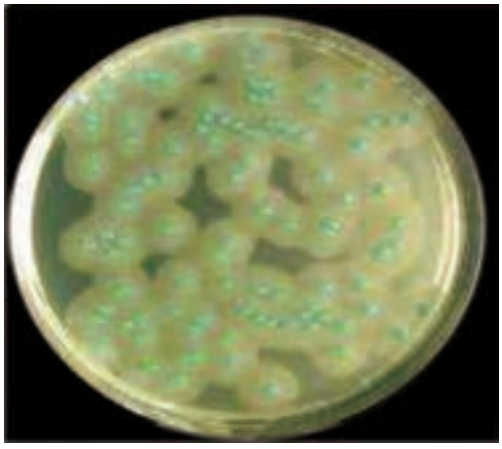
ث) تشتک‌های دارای محیط، کشت شده را در شرایط هوازی به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه با دمای $35^{\circ}C$ قرار دهید.

ج) پرگنه‌های تشکیل شده را از نظر وجود لیستریا بررسی کنید.

نکته : پرگنه‌های لیستریا به رنگ آبی مایل به خاکستری ظاهر می‌شوند و باید در زیر نور مناسب مشاهده شوند.

چ) از پرگنه‌های مورد نظر برداشت کرده و در محیط تریپتیکازسوی آگار کشت خطی دهید و تشتک‌های کشت شده را در گرمخانه با دمای $30^{\circ}C$ به مدت ۲۴ ساعت قرار دهید.

ح) پس از ۲۴ ساعت از پرگنه‌های مجزا برداشته و برای رنگ‌آمیزی گرم استفاده نمایید.



شکل ۱۰ــ ۸ ــ پرگنه‌های لیستریا مونوسایتوجنز در محیط آگارغنی کننده لیستریا

۸ ــ۲ــ ۸ ــ آزمون جستجو و شمارش کپک‌ها و مخمرها در شیر : این آزمون را مانند آنچه در مورد آب گفته شد، انجام دهید.

۳ــ۸ ــ آزمون‌های میکروبی پنیر

پنیر نوعی فرآوردهٔ لخته شده و تخمیر شده است که در اثر فعالیت پروتئولیتیک (تجزیه پروتئین) برخی از باکتری‌ها مانند گونه‌های لاکتوباسیلوس در شیر تولید می‌شود و دارای تعداد زیادی از باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک است. نمونه‌برداری از پنیر باید در شرایط سترون و با دستگاه‌های سترون شده انجام گیرد.

نکته : وزن نمونه برداشت شده نباید از ۵۰ گرم کمتر باشد.

رقیق کردن نمونه پنیر : مهم‌ترین قسمت در انجام آزمون میکروبی پنیر آماده‌سازی آزمایه و تهیه رقت‌های متوالی است که باید به صورت خاص و با رقیق‌کننده‌های خاصی انجام شود.

- **رقیق کننده‌ها :**

ــ محلول شیر لیتموس دار

ــ محلول سیترات سدیم ۲٪ : رقیق کننده مناسب‌تری است.

نکته : دمای این دو رقیق‌کننده هنگام رقیق‌کردن نمونه پنیر باید $45^{\circ}C$ باشد.

● **یکنواخت کردن :**

ــ همگن کردن یا یکنواخت کردن نمونه پنیر رقیق‌شده در دو رقیق‌کننده بالا با روش امولسیون‌کردن با دست یا استفاده از مخلوط‌کن الکتریکی انجام می‌شود.

نکته :ابتدا نمونه باید در شرایط سترون و با وسیله مخصوص، به خوبی خرد شود.

● **رقت‌های پی‌درپی** : برای تهیه رقت‌های مورد نظر می‌توان از رقیق‌کننده آب پپتونه استفاده کرد.

آزمایش‌های میکروبی پنیر اغلب همانند آزمون‌های میکروبی در شیر است که به همان روش‌ها نیز انجام می‌شود مانند آزمون‌های :

ــ جستجو و شمارش کلی‌فرم‌ها

ــ جستجو و شمارش اشریشیا کلی

ــ جستجو و شمارش کپک‌ها و مخمرها

ــ جستجو و شمارش باکتری‌های مقاوم به گرما (باسیلوس‌ها)

ــ جستجو و شمارش کلستریدیوم ولشای‌های مقاوم به گرما

۴ــ ۸ ــ آزمون‌های میکروبی شیر خشک

عوامل مهمی بر روی میکروفلور شیر خشک تأثیر می‌گذارد که مهم‌ترین آنها عبارتند از :

۱ــ فرآیند حرارتی که پیش از خشک کردن به شیر داده می‌شود.

۲ــ روش خشک کردن شیر

۳ــ آلودگی‌هایی که شیر از کارخانه کسب می‌کند.

در میان این میکروارگانیسم‌ها استافیلوکوکوس اورئوس مهم‌ترین باکتری از نظر بهداشت عمومی‌است که می‌تواند رشد کند و سمومی به نام‌های آنتروتوکسین و اگزوتوکسین تولید کند که دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد را برای مدت بیش از یک ساعت تحمل می‌کند. بنابراین در روش‌های پاستوریزاسیون و گرم کردن از بین نرفته و حدود ۱۲ ساعت بعد از مصرف موجب مسمومیت مصرف‌کننده با نشانه‌های اسهال، تهوع و بدون تب می‌شود، گرچه به صفر رساندن آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در غذاها مطلوب است اما در عمل این کار مقدور نیست و در بیشتر موارد تعدادی از آن در غذا وجود دارد.

نکته‌ها

✓ در طول نگهداری شیر خشک بار میکروبی آن کاهش می‌یابد به طوری که پس از یک سال بیشترین میزان رشد مربوط به باکتری‌های اسپوردار بی هوازی مانند کلستریدیوم‌ها است.

✓ بازسازی شیر خشک یعنی خارج کردن آن از حالت خشک و تبدیل آن به شیر مایع رقیق در انجام آزمون‌های میکروبی مهم است زیرا زمانی که شیر باز سازی می‌شود همه میکروب‌های زنده آن قادر به رشد می‌شوند.

نمونه برداری : روش نمونه برداری از شیر خشک در فصل چهارم به طور کامل شرح داده شده است.

● **رقیق کننده‌ها :**

ــ محلول رینگر $\frac{۱}{۴}$ غلظت

ــ محلول آب پپتونه ۰/۱۸٪

روش رقیق کردن شیر خشک برای آزمون‌های میکروبی

الف) در شرایط سترون مقدار ۱۰ گرم شیرخشک را وزن کرده و به یک ظرف دهان گشاد که دارای ۹۰ میلی لیتر آب مقطر سترون با دمای C ° ۵۰ است اضافه کنید تا همگن شود.

ب) ظرف دارای شیر خشک و آب مقطر را به مدت ۱۲ ثانیه ۲۵ مرتبه تکان دهید.

● **روش آزمون‌های میکروبی شیر خشک** : بیشتر آزمون‌های میکروبی شیر خشک مانند آزمون‌های میکروبی شیر است و مهم‌ترین آنها عبارتند از :

ـ آزمون مستقیم میکروسکوپی

ـ شمارش کلی میکروب‌ها

ـ شناسایی و شمارش کلی فرم‌ها و اشریشیاکلی

ـ شناسایی آلودگی‌های قارچی (کپک‌ها و مخمرها)

ـ جستجو، شناسایی و شمارش سالمونلاها

شناسایی و شمارش استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت در شیرخشک

محیط کشت‌های مورد استفاده در آزمون :

ـ برد پارکر آگار[1] همراه با زرده تخم مرغ: محیط کشت افتراقی ـ انتخابی برای تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس است که دارای تریپتون و عصاره گوشت به عنوان مواد مغذی، لیتیم کلرید و نمک تلوریت پتاسیم برای جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم منفی و زرده تخم مرغ برای شناسایی آنزیم لسیتیناز تولید شده توسط این باکتری است.

ـ مانیتول سالت آگار[2] : محیط کشت انتخابی است که دارای پپتون و عصاره گوشت به عنوان مواد مغذی، نمک طعام برای جلوگیری از رشد سایرمیکروارگانیسم‌ها و قند مانیتول است.

نکته : تنها کربوهیدرات قابل تخمیر توسط این باکتری مانیتول است.

ـ پلاسما کواگولاز با اتیلن دی آمین ترا استیک اسید[3] : افزودن اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (EDTA) به عنوان آنتی کوآگولانت (ضد انعقاد) است.

نکته : پلاسمای خون خرگوش برای ساخت این محیط و برای تعیین قدرت تولید آنزیم کواگولاز وایجاد لخته در پلاسمای خون استفاده می‌شود.

مواد و وسایل مورد نیاز

- لوله‌های آزمایش برای تهیه رقت‌های اعشاری
- پی‌پت‌های سترون ۱ میلی‌لیتری
- تشتک‌های دارای یکی از دو محیط کشت برد پارکر آگار یا مانیتول سالت آگار
- گرمخانه قابل تنظیم با دمای C ° ۳۷

روش کار

الف) از نمونه بازسازی شده شیر خشک که از پیش شرح داده شد، رقت‌های مورد نظر را در لوله‌های سترون شده دارای

۱ـ Baird Parker Agar

۲ـ Mannitol Salt Agar

۳ـ Coagulase Plasma With EDTA

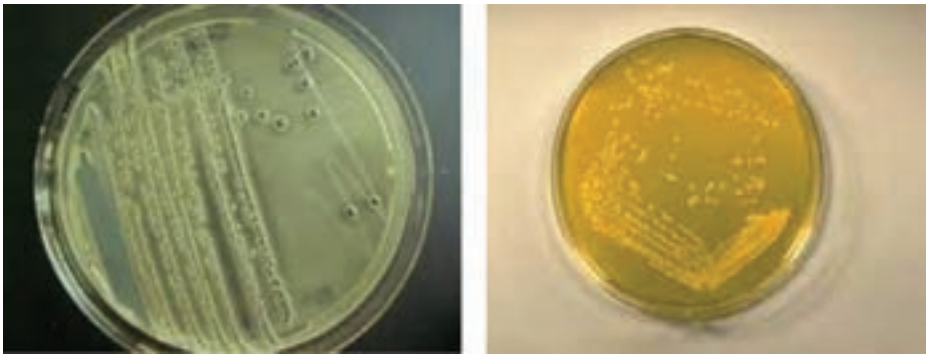
۹ میلی لیترآب مقطر تهیه کنید. (10^{-1} تا 10^{-5})

ب) برای هر رقت کشت سطحی بر روی دو پلیت انجام دهید (یکی از محیط کشت‌های گفته شده)

پ) تشتک‌های کشت شده را به مدت ۴۸ــ۲۴ ساعت در گرمخانه با دمای $37^{\circ}C$ قرار دهید.

ت) پس از این مدت کلنی‌های تشکیل شده را از نظر وجود استافیلوکوکوس اورئوس بررسی نمایید.

نتیجه : کلنی‌های استافیلوکوکوس اورئوس در محیط برد پارکر آگار به دلیل تجزیه نمک تلوریت پتاسیم و تولید ماده سیاه رنگ تلوریم و همراه با هاله رسوبی دور هر کلنی به دلیل تجزیه زرده تخم مرغ با آنزیم لیستیناز می‌باشند.



شکل ۱۱ــ ۸ ــ کلنی‌های استافیلوکوکوس. (الف) در محیط مانیتول سالت آگار، (ب) در محیط برد پارکر

● **تأیید استافیلوکوکوس اورئوس (تست کوآگولاز)** :برای تأیید استافیلوکوکوس اورئوس از آزمایش کوآگولاز استفاده می‌شود که به یکی از دو روش زیر انجام می‌گردد :

الف) روش سریع : در هر انتهای یک لام، یک قطره محلول $\frac{1}{4}$ رینگر ریخته و مقداری از پرگنه مورد آزمایش به آن اضافه کنید. سپس یک قطره را به عنوان شاهد منظور کنید و به دیگری یک قطره پلاسمای رقیق نشده خرگوش یا انسان اضافه کنید. مدت ۵ ثانیه توسط سوزن کشت، پلاسما و پرگنه را هم بزنید. در صورت وجود آنزیم کوآگولاز، قطره حاوی پلاسما بصورت گلوله‌ای در می‌آید که نشانه مثبت بودن آزمایش است.

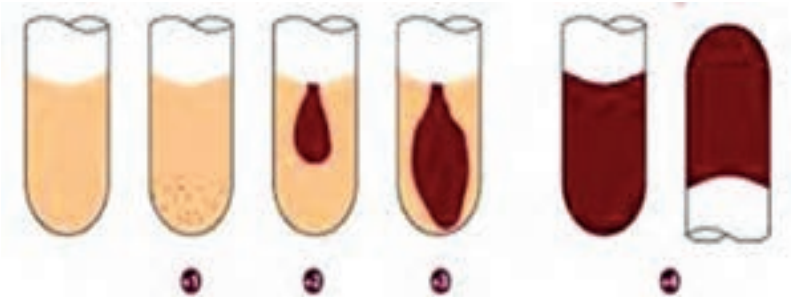
ب) روش آهسته :

ــ در یک لوله آزمایش ۰/۵ میلی لیتر از پلاسمای سیتراته خرگوش را که چهار بار رقیق شده اضافه کنید. سپس با حجم مساوی از محیط آبگوشت غذایی دارای کشت ۲۴ تا ۳۰ ساعته استافیلوکوکوس مورد آزمایش مخلوط کنید.

ــ در لوله دیگر ۰/۵ میلی لیتر پلاسمای سیتراته را به ۰/۵ میلی لیتر آبگوشت غذایی سترون بیفزایید (کنترل پلاسما به‌عنوان شاهد منفی) و ۱تا ۴ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ قرار دهید.

نکته : لوله‌های منفی را تا ۲۴ساعت در گرمخانه نگه داشته و سپس دوباره بررسی کنید.

ــ چنانچه استافیلوکوکوس کواگولاز مثبت بوده و آزمایش درست انجام شده باشد پلاسما در لوله محتوی میکروارگانیسم منعقد می‌شود ولی در لوله شاهد منفی پلاسما نباید منعقد گردد. وجود لخته‌های کوچک جدا از



شکل۱۲ــ ۸ ــ نمونه‌های تست مثبت و منفی کواگولاز در سرم سیتراته خون خرگوش

هم (+۱) مثبت به‌حساب نیامده و با مراجعه به‌شکل ۱۲ــ ۸ حالات ۲ + ۳+ و ۴+ مثبت بشمار می‌آیند.

۵ــ ۸ ــ آزمون‌های میکروبی فراورده‌های غلات

آرد غلات : عبارت است از غلات آسیاب شده (گندم ــ جوــ ذرت ــ برنج) که بسته به مورد تمام یا بخشی از پوسته و جوانه آن جدا شده و به ذراتی با اندازه موردنظر تبدیل شده باشد.

ویژگی‌های میکروبیولوژی آرد غلات

ویژگی / نوع فرآورده	گندم آرد، پوست‌کنده، بلغور	جو آرد،پوست کنده، بلغور	ذرت آرد، بلغور	آرد برنج
شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در گرم	حداکثر 10^5	حداکثر 5×10^5	حداکثر 10^4	حداکثر10^5
کلی فرم‌ها در گرم	–	–	–	–
اشریشیاکلی در گرم	–	–	–	–
کلستریدیوم پرفرانژانس در گرم	حداکثر 10^2	حداکثر 10^3	حداکثر 10^2	حداکثر10^2
باسیلوس سرئوس در گرم	–	–	–	حداکثر10^2
کپک‌ها در گرم	حداکثر 5×10^3	حداکثر 5×10^3	حداکثر 5×10^3	حداکثر 5×10^3

*** برای مواردی که به صورت ــ مشخص شده عدد نداریم.**

۱ــ۵ــ ۸ ــ آزمون جستجو و شمارش باسیلوس سرئوس در برنج : باسیلوس سرئوس[1] باکتری میله‌ای شکل گرم مثبت، اسپورزا، هوازی، بی‌هوازی اختیاری و مقاوم به آنتی بیوتیک پنی‌سیلین می‌باشد. این باکتری در طبیعت بطور گسترده‌ای پراکنده است. و از مواد غذایی گوناگون جدا می‌شود. باسیلوس سرئوس تا دمای $48^\circ C$ قادر به رشد بوده و دمای مناسب رشد آن ۳۰ تا $35^\circ C$ است.این باکتری آنتروتوکسین و آنزیم لسیتیناز تولید می‌کند و یکی از عوامل مسمومیت غذایی می‌باشد. مسمومیت غذایی ناشی از باسیلوس سرئوس هنگامی روی می‌دهد که موادغذایی پخته شده پیش از مصرف چند ساعت خارج ازیخچال نگهداری شوند. موادغذایی که تا به حال سبب مسمومیت با این باکتری شده‌اند، شامل گوشت پخته، سبزی‌ها، برنج پخته و سرخ شده، سس وانیل، سوپ‌ها و جوانه گیاهان خام می‌باشند. دو نوع بیماری در رابطه با مصر ف موادغذایی آلوده به باسیلوس سرئوس نسبت داده می‌شود. نوع اول و شناخته شده تر آن که با دردهای شکمی، اسهال و دوره

شکل۱۳ــ ۸ ــ باسیلوس سرئوس

۱ــ Bacillus cereus

نهفتگی ۴ تا ۶ ساعته مشخص می‌گردد و علائم آن ۱۲ تا ۲۴ ساعت به‌طول می‌انجامد و ناشی از مصرف شیر و لبنیات آلوده است نوع دوم با حملات حاد تهوع واستفراغ مشخص می‌گردد در زمان بین ۱ تا ۵ ساعت پس از مصرف غلات و برنج پخته آلوده رخ می‌دهد.

محیط‌های کشت مورد استفاده در آزمون محیط کشت کامل MYP آگار[1] : دارای محیط پایه مانیتول همراه با زرده تخم مرغ و آنتی بیوتیک پلی میکسین

مواد و وسایل مورد نیاز

- پی‌پت‌های ۱ میلی لیتری سترون شده
- لوله‌های شیشه‌ای سترون شده برای تهیه رقت‌های اعشاری
- تشتک‌های دارای محیط کشت MYP Agar
- رقیق کننده آب بافر پپتونه
- گرمخانه قابل تنظیم با دمای C ° ۳۰
- میله شیشه‌ای سرکج

روش کار

الف) ابتدا سوسپانسیون اولیه و آزمایه را تهیه کنید.

ب) در لوله‌های آزمایش دارای ۹ میلی لیتر رقیق کننده آب پپتونه با استفاده از نمونه آزمایه رقت‌های اعشاری آماده کنید. (10^{-1} تا 10^{-5})

پ) با استفاده از پی‌پت سترون ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت به دو پلیت محیط کشت MYP agar منتقل کنید و با میله شیشه‌ای سرکج آن‌را روی سطح محیط به خوبی پخش نمایید.(کشت سطحی)

ت) پلیت‌های کشت شده را چند دقیقه در شرایط آزمایشگاه قرار دهید تا نمونه تلقیح شده جذب محیط کشت شود.

ث) سپس پلیت‌های کشت شده را در گرمخانه با دمای C ° ۳۰ به مدت ۴۸ـ۲۴ ساعت قرار دهید.

ج) پس از این مدت پرگنه‌های تشکیل شده را از نظر وجود باسیلوس سرئوس بررسی کنید و با شمارش کلنی‌ها، CFU/g باکتری را محاسبه نمایید.

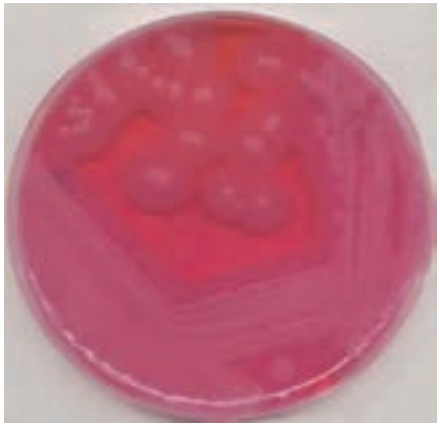
ویژگی‌های پرگنه باسیلوس سرئوس در محیط MYP Agar :

ـ باسیلوس سرئوس تنها باسیل مقاوم به آنتی بیوتیک پلی میکسین B می‌باشد و قادر است در این محیط کشت رشد کند.

ـ به دلیل عدم تخمیر قند مانیتول پرگنه‌ها به رنگ صورتی دیده می‌شوند.

ـ به دلیل تجزیه لسیتین زرده تخم مرغ با آنزیم لسیتیناز اطراف هر کلنی هاله رسوبی مشاهده می‌شود.

نکته :برای شمارش کلنی‌ها پلیت‌های دو رقت متوالی را که تعداد پرگنه‌های آنها ۱۵۰ـ۱۵ باشد شمارش کنید.



شکل۱۴ـ ۸ ـ پرگنه‌های صورتی همراه با هاله رسوبی باسیلوس سرئوس در محیط MYP Agar

---

۱ـ Mannitol yolk polymixin Agar

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

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

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

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

مراحل جداسازی ویبریو پاراهمولیتیکوس :

۱ــ غنی‌سازی در محیط کشت انتخابی

۲ــ جداسازی و شناسایی

۳ــ مرحله تأیید

محیط کشت‌های مورد نیاز در آزمون :

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

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

ــ محیط کشت TSI

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

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

۱ــ Vibrio parahaemolyticus

۲ــ Alkalin pepton water

۳ــ Thiosulfate –citrate–bile salt sucrose agar

۴ــ L – Ornithine decarboxylase monohydrochloride

۵ــ L – Lysine decarboxylation medium

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

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

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

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

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

مواد و وسایل مورد نیاز

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

روش کار

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

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

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

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

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

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

۱ـ Arginine dehydroxylase

۲ـ **Ortho**ـNitrophenolـ βـDـ galactopyranoside

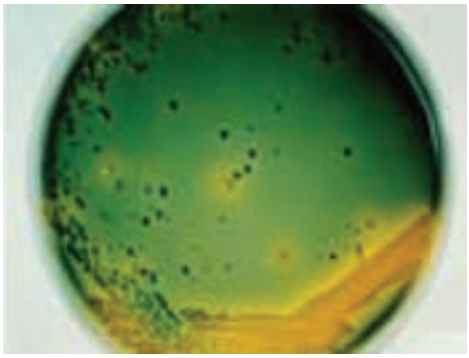
ث) پس از ۱۸ ساعت ابتدا لوله را به خوبی تکان داده و با لوپ یک حلقه کامل از محتویات داخل آن برداشته و بر روی سطح محیط کشت TCBS کشت دهید.

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

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

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

مشخصات کلنی ویبریو پاراهمولیتیکوس در محیط TCBS آگار : پرگنه‌های ویبریو پارهمولیتیکوس در این محیط کروی و ۳ـ۲ میکرون قطر دارد و به رنگ سبز یا آبی دیده می‌شود در صورتی که کلنی‌های ویبریوکلرا در این محیط به دلیل تخمیر ساکارز زرد رنگ دیده می‌شود.

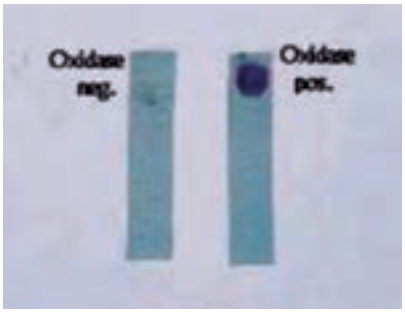


شکل۱۶ــ ۸ ــ پرگنه‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس(سبز) و ویبریو کلرا(زرد) در محیط TCBS

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

تست‌های بیوشیمیایی

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



شکل۱۷ــ ۸ ــ نتیجه آزمون اکسیداز

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

۷ــ۸ ــ روش‌های شناسایی کپک‌ها و مخمرها در مواد غذایی

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

شکل ۱۸ــ۸ ــ نمونه‌ای از آلودگی میوه‌ها با کپک‌ها

۱ــ moulds

۲ــ hyphe

۳ــ mycellium

۴ــ yeasts

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

۱ــ mycotoxine

۲ــ Chloramphenicol

۳ــ Jentamicin

۴ــ Potatodextrose agar

۵ــ Aspergillus

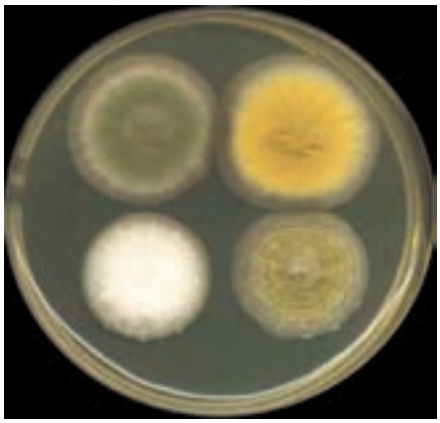
۶ــ Fusarium

۷ــ Mucor

۸ــ Penicillium

۹ــ Rhizopus

۱۰ــ Trichoderma

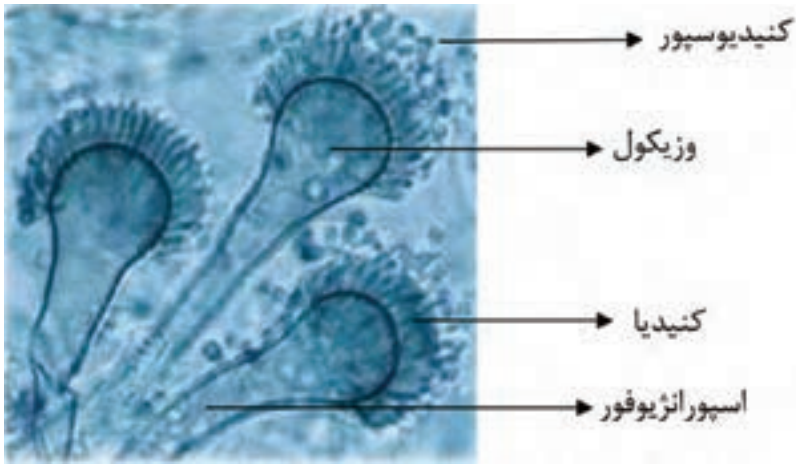


شکل ۱۹ــ ۸ ــ پرگنه‌های برخی از گونه‌های آسپرژیلوس

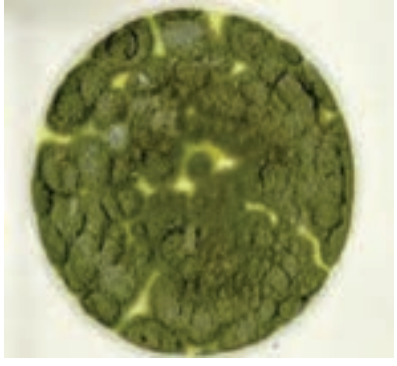
● **آسپرژیلوس** : گونه های آسپرژیلوس هوازی اجباری هستند و در محیط‌های غنی از اکسیژن یافت می‌شوند. بیشتر روی سطح مواد غذایی قادر به رشد هستند. گونه‌های آسپرژیلوس بیشتر در مواد غذایی نشاسته دار مانند نان و سیب زمینی رشد می‌کنند.

گونه آسپرژیلوس نیجر[1] مهم ترین گونه آن است که در محیط کشت سابرو دکستروز آگار پرگنه های پرزی و سیاه رنگ تولید می‌کند. گونه‌های دیگر دارای پرگنه‌هایی به رنگ‌های مختلف مانند سبز،زرد و سفید هستند (شکل۱۹ــ ۸).

ساختار میکروسکوپی آسپرژیلوس : کپک آسپرژیلوس جزء کپک‌هایی است که هیف آن دارای دیواره عرضی و شاخه دار است وروی ساختارهای هوایی خود اندامک‌هایی به نام کنیدیوفور (هیف حامل کنیدی[2]، کنیدیوسپورها[3]) را می‌سازد. در انتهای هیف حامل کنیدی که شاخه‌ها قرار دارند دارای یک ساختمان بر آمده به نام ستونک است و در ابتدای هیف سلول پایه دارد.



شکل ۲۰ــ ۸ ــ ساختمان میکروسکوپی کپک آسپرژیلوس



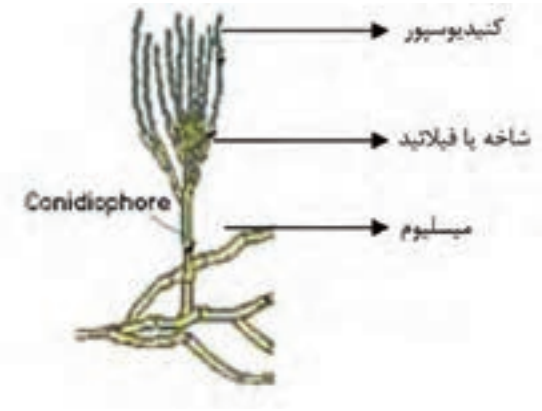
پنی سیلیوم : یکی از مهم‌ترین گونه‌های کپک‌ها در محیط‌های طبیعی است که رنگ پرگنه‌های آن به دلیل رنگ سبز کنیدیوسپورها بیشتر سبز رنگ است(شکل ۲۱ــ ۸). Penicillium notatum (تولید کننده پنی‌سیلین) و Penicillium camemberti در تولید نوعی پنیر به نام پنیر کاممبرت به کار می‌رود.

شکل ۲۱ــ ۸ ــ پرگنه‌های سبز رنگ کپک پنی‌سیلیوم

۱ــ Aspergillus niger

۲ــ Conidiophore

۳ــ Conidiospore

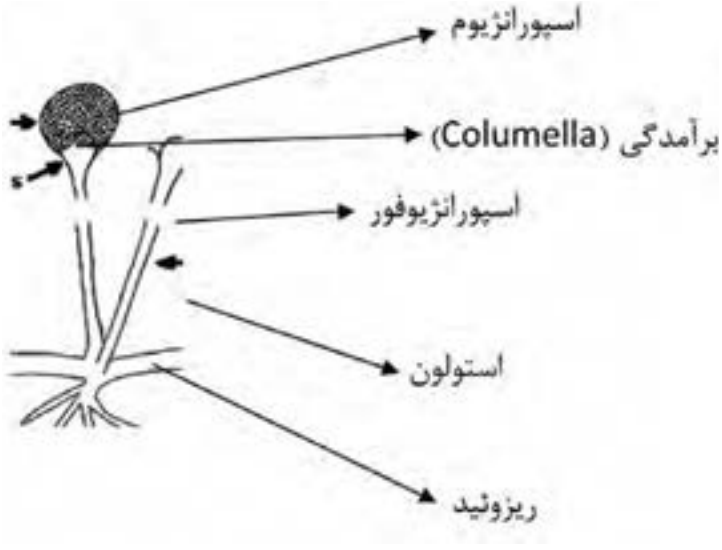


شکل ۲۲ــ ۸ ــ ساختار کپک پنی‌سیلیوم

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

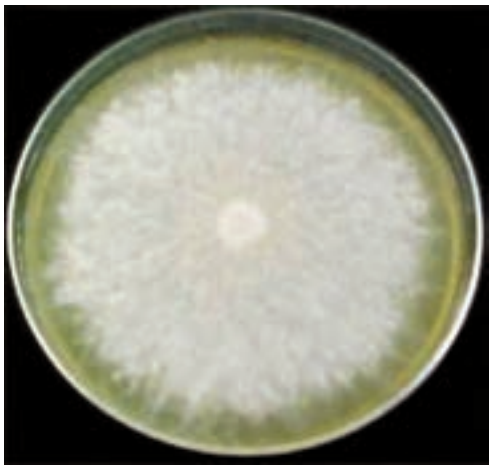
● **ریزوپوس** : ریزوپوس یکی از کپک‌های غیر بیماری‌زا برای انسان (ساپروفیت) است که از باقیمانده‌های گیاهان و جانوران تغذیه می‌کند و روی بسیاری از ترکیبات آلی به ویژه مواد غذایی مانند سبزی‌ها و میوه‌ها و نان قادر به رشد است. این کپک به روش تکثیر جنسی و غیرجنسی تولید مثل می‌کند. گونه‌های مختلفی از این کپک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

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



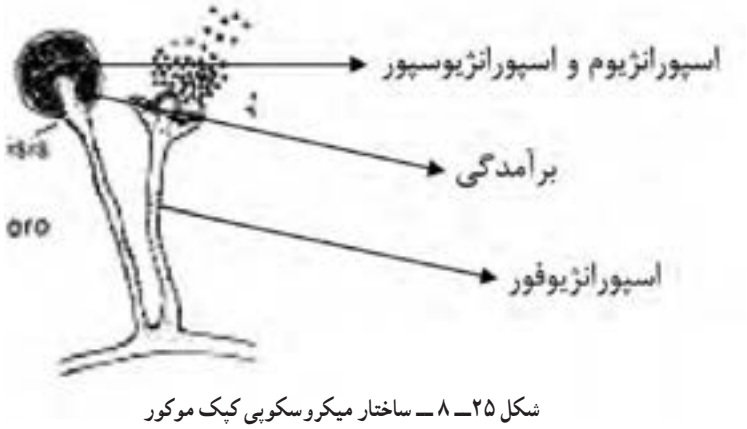
شکل ۲۳ــ ۸ ــ ساختار میکروسکوپی ریزوپوس

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



شکل ۲۴ــ ۸ ــ پرگنه کپک موکور

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



شکل ۲۵ــ ۸ ــ ساختار میکروسکوپی کپک موکور

روش‌های آزمون میکروسکوپی کپک‌ها

۱ــ۷ــ ۸ ــ روش خرد کردن پرگنه[۱] :

مواد و وسایل مورد نیاز

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

روش کار

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

۱ــ Teased mount

قرار داده و با لامل سطح آن را بپوشانید.

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

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

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

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

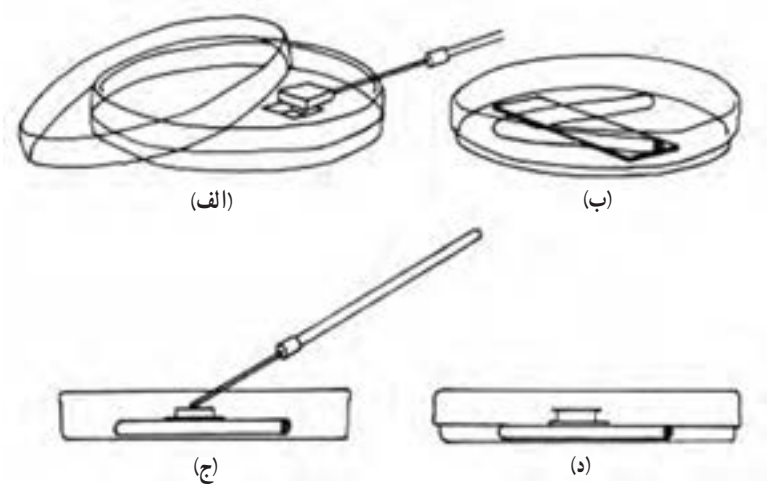
۲ــ۷ــ۸ ــ اسلاید کالچر[1] :

مواد و وسایل مورد نیاز

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

روش کار

الف) ۱۵ میلی لیتر از محیط کشت سابرودکستروز آگار را درون تشتک خالی سترون ریخته و پس از سفت شدن محیط توسط تیغ بیستوری سترون آن را به قطعات چهارگوش ۱×۱ سانتی‌متری تقسیم نمایید (شکل۲۶ــ۸ــ الف).



شکل ۲۶ــ۸ ــ مراحل آماده‌سازی آزمون اسلاید کالچر

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

پ) یک تکه از محیط کشت چهارگوش بریده شده را در شرایط سترون بر روی لام درون تشتک قرار دهید و در وسط آن با سوزن کشت سترون چند پرگنه قارچ مورد نظر را تلقیح نمایید (شکل ۲۶ــ۸).

۱ــ Slide culture

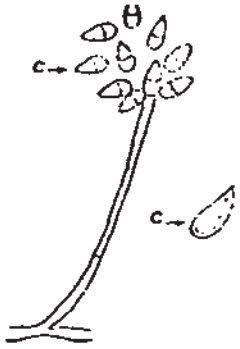
ت) یک لامل سترون را بر روی محیط کشت تلقیح شده قرار داده و کمی‌فشار دهید تا به خوبی به سطح آگار بچسبد. درب تشتک را گذاشته و آن را در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار دهید و به طور مرتب کشت را از نظر رشد و رطوبت موجود در تشتک مورد بررسی و کنترل قرار دهید و پس از اطمینان از رشد کافی کپک با روش زیر دو نمونه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

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

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

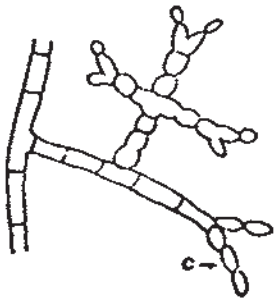
ب) نمونه تهیه شده از لام: محیط کشت را به آرامی‌از سطح لام بردارید و داخل تشتک بگذارید. سپس لام را از تشتک خارج کرده و یک قطره لاکتوفنل کاتن بلو را در محل رشد پرگنه کپک اضافه نموده و لاملی را بر روی آن قرار دهید. در صورت وجود رنگ اضافی در خارج لامل توسط کاغذ خشک کن آن را خشک و برای مسدود نمودن اطراف لامل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

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

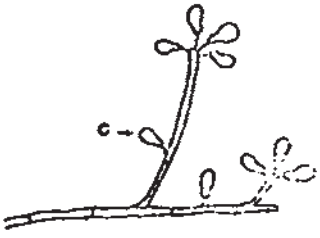


Trichothecium

Geotrichum

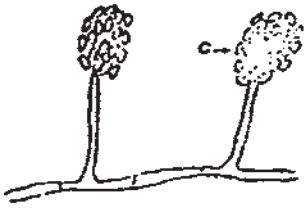


Monilia

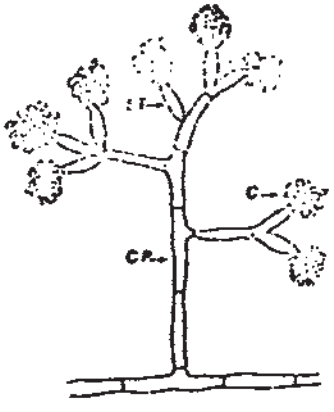


Sporotrichum

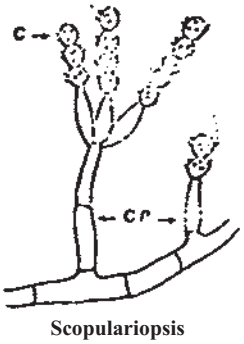
Butrytis



Cephalosporium

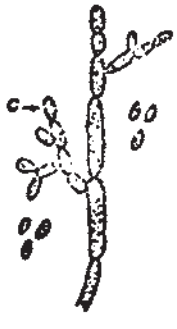


Triohoderma

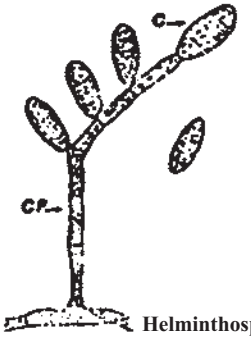


Scopulariopsis

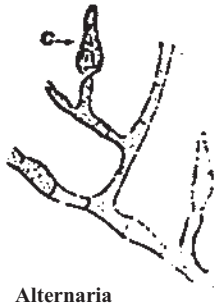
Pullularia



Cladosporium



Helminthosporium



Alternaria

شکل ۲۷ــ ۸ ــ اشکال بعضی از کپک‌ها و مخمرها

فصل نهم

آزمون‌های میکروبی تعیین نوع و میزان آلودگی محیط کار

۱ــ۹ــ آزمون‌های میکروبی تعیین نوع و میزان آلودگی محیط کار

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

۲ــ۹ــ روش‌های تشخیص آلودگی میکروبی محیط کار

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

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

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

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

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

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

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

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

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

۱ــ Pressure plate

برای شناسایی، باکتری‌های گوناگون متفاوت است اما در بیشتر موارد لازم است آلودگی دست به میکروارگانیسم‌های طبیعی مانند استافیلوکوک طلایی و استافیلوکوک اپیدرمیس و کلی‌فرم‌ها به عنوان شاخص آلودگی دست با دستگاه گوارش مورد ارزیابی قرارگیرد.

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

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

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

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

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

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

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

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

کتابنامه

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

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

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

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

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

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

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

8- Food´ Microbiology, 2005, Neelaw Khetrpaul.

9- Food Microbiology laboratory, 2005, linne Mac Landzbrough.

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

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

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

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

۱۴ــ سحر هنرمند جهرمی ۱۳۸۷، آزمایشات میکروب‌شناسی مواد غذایی

۱۵ــ دکتر گیتی کریم، آزمون‌های میکروبی مواد غذایی

۱۶ــ دکتر رضویلر ۱۳۷۵، میکروب‌های بیماری‌زا در مواد غذایی

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