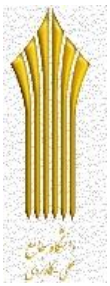


دانشگاه جامع علمی کاربردی
مرکز آموزش جهاد کشاورزی خراسان رضوی

جزوه
آزمونهای استاندارد میکروبی شیر و فراورده های لبنی

تالیف و گردآوری:
سید علی محمدی
کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی

آئین کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذائی

از آنجائیکه یکسان نبودن شرایط آزمایش در آزمایشگاههای مختلف می‌تواند باعث ناهماهنگی در پاسخ آزمایش‌های مشابه باشد لذا باید آئین کار ساختمان , وسایل , روش کار , تجهیزات , اصول ایمنی و بهداشت کارکنان آزمایشگاههای میکروبیولوژی مواد غذائی تعیین گردد تا آزمایشات در همه آزمایشگاهها دارای شرایط یکسانی باشد .

۱- آزمایشگاه باید دارای فضای کافی باشد :

مساحت آزمایشگاه متناسب با حجم نمونه‌های مورد آزمایش و تعداد کارکنان میتواند متغیر باشد ولی حداقل ۲۰ متر مربع برای هر یک از کارکنان باید در نظر گرفته شود . مکان استریلیزاسیون و شستشو باید از قسمتهای تهیه محیط کشت و همچنین اتاف کشت جدا باشد . در مورد کارخانه‌ها و کارگاههای تولید مواد غذائی آزمایشگاه باید توسط راهرو یا درهای مضاعف از سالن تولید جدا شده باشد . بهتر است که آزمایشگاه در محموله جداگانه‌ای قرار گیرد .همچنین آزمایشگاه نباید در طبقات پائین‌تر از همکف ساخته شود.

۲ ـ کف: پوشش کف آزمایشگاه باید بدون ترک خوردگی و شکاف باشد بطوریکه شستشو و ضد عفونی کردن آن آسان بوده و محل اتصال دیوار به کف بدون زاویه و دارای انحنا باشد .

۳ ـ دیوارها: دیوارهای آزمایشگاه باید بدون ترک خوردگی , دارای رنگ روشن , سطح صیقلی قابل شستشو و ضدعفونی کردن باشد .

٤ ـ سقف: سقف آزمایشگاه باید حداقل ۲۸۰ سانتیمتر باشد و طوری ساخته شود که از جمع شدن کثافات جلوگیری نموده و نظافت آن آسان باشد . محل اتصال دیواره به سقف باید بدون زاویه و دارای انحنا باشد . در صورت استفاده از سقف کاذب این سقف باید یکپارچه و نفوذناپذیر باشد .

۵- پنجره‌ها: پنجره‌های آزمایشگاه باید طوری ساخته شوند که از نفوذ گـرد و غبـار , آب و همچنـین جمع شدن کثافات جلوگیری نماید. در مواردی که پنجره‌ها باز می‌شوند باید دارای توری باشند .

توری باید به آسانی قابل نظافت بوده و اگر در قسمت داخل پنجره پایه‌ای در نظـر گرفتـه شـده بایـد شـیب دار باشد تا به عنوان طاقچه مورد استفاده قرار نگیرد .

کرکره و پرده نباید در داخل آزمایشگاه نصب شود در صورت نیاز هر نوع سایه بان و آفتابگیر باید در بیرون از پنجره‌ها نصب گردد .

٦ ـ درها: درها باید سالم، دارای سطوح صاف و غیرقابل نفوذ بوده و در صورت امکان از نوعی باشند که پـس از باز شدن خود به خود بسته میشوند .

۷- روشنائی: روشنائی کافی برای آزمایشگاه باید از طریق نور طبیعی و مصنوعی تامین شود .

در هنگام تاسیس آزمایشگاه باید معیارهایی اختیار گردد تا احتمـال ایجـاد آلـودگی توسـط گـرد و غبـار و در نتیجه میکروارگانیسم‌ها را کاهش دهد. بعنوان مثال : الف - کمدهای رخت کن تا زیر سقف امتداد داشته باشد

ب - میزها ، طاقچه‌های پنجره ، یخچال‌ها ، کوره‌ها ، کابینت‌های کشت به نحـوی قـرار داده شـوند کـه گـرد و غبارگیر نبوده و به آسانی قابل نظافت باشند .

پ - برای نگهداری نمونه‌ها ، محیطها ، مواد و همچنین مدارک باید از کمدهای دربسته استفاده نمود .

شرایط عمومی آزمایشگاه:

آزمایشگاهها باید دارای شرائط زیر باشند :

۱- لامپ ماوراء بنفش جهت کاهش آلودگی محیط : از لامپ ماوراء بنفش فقط باید خارج از ساعات اداری استفاده شود. مواد شیمیائی و بیولوژیکی حساس به اشعه و کلیه نمونه‌های مورد آزمایش باید قبل از روشن شدن چراغ در جایی قرار داده شوند که تحت تاثیر تابش مستقیم قرار نگیرند .

۲- لامینایرفلوکابینت یا کابینت‌های کاملا بسته وجود داشته باشد .

۳- لامپهای ماوراء بنفش و شرایط هوای داخل کابینت باید ماهیانه کنترل گردد .

۴- فضای کار باید از تماس مستقیم نور خورشید محافظت گردد .

۵ - میزهای کار و وسایل آن باید سالم باشد . هیچگونه شکاف یا ترک خوردگی که بتواند باعث نشست گرد و خاک و در نتیجه منشأ آلودگی گردد . نباید وجود داشته و ضمنا دارای روکش مناسب و قابل شستشو و ضدعفونی کردن بوده و بلندی آن حدود ۹۰ سانتیمتر باشد .

تاسیسات:

۱- لوله کشی گاز

در صورت لوله کشی گاز مقررات و اصول مربوط به ایمنی که از طرف مقامات مسئول توصیه میگردد باید اجرا شود . در صورت استفاده از کپسول گاز باید کپسول در محلی قرار داشته باشد که از خطر آتش سوزی و انفجار محفوظ بماند .

۲- لوله کشی آب :آزمایشگاه باید دارای آب گرم و سرد سالم و بهداشتی برای شستشوی ظروف وسایل شیشه‌ای باشد .

۳- از بین بردن زباله کلیه وسایل و لوله‌های آزمایش کشت داده شده پس از کار شدن باید در اتوکلاو استریل شوند .

هرگز نباید ظروف محتوی کشت‌های میکربی بدون اتوکلاو شدن شسته شود . محلی که زباله در آن ریخته میشود باید دور از آزمایشگاه بوده و زباله دان باید در شرایط بهداشتی بوده و در اسرع وقت تخلیه گردد .

۴- سیم کشی برق

باید بصورتی باشد که از نظر ایمنی خطری ایجاد ننماید .همچنین نقشه فنی سیمکشی باید در دسترس بوده تا در صورت نیاز از آن استفاده نمود.

۵ ـ رختکن‌ها و تاسیسات بهداشتی

در کلیه آزمایشگاهها باید امکانات کافی و مناسب جهت تعویض لباس و تاسیسات بهداشتی (توالت‌ها , حمام‌ها و دستشویی‌ها) وجود داشته باشد .

تجهیزات و وسایل آزمایشگاه:

وسایل و تجهیزات اختصاصی برای هر آزمایشگاه متناسب با نوع نمونه‌های مورد آزمایش , حجم نمونه‌ها و تعداد پرسنل میتواند متغیر باشد .

۱- تجهیزات مورد نیاز بخش استریلیزاسیون

دستگاه آب مقطر گیری – آون یا فور (برای استریل کردن به روش خشک) استوانه‌های فلزی (جای پلیت و پیپت) – استوانه‌های بلند از جنس مناسب برای شستشوی پیپت – پنبه – کاغذ برش برای برش فویل آلومینیوم – دستکش ایمنی – دستکش (برای شستشو) – مواد پاک کننده – سبد فلزی از نوع ضد زنگ – سطل زباله از جنس استیل یا فولاد ضد زنگ – لوله شوی – میز چرخدار برای حمل وسایل، الکل و یا مواد ضدعفونی کننده دیگر .

۲ ـ وسایل محیط سازی:

بن ماری – پیپت ایمنی (برای کشیدن محلولهای سمی) – ترازوی حساس (با دقت حداقل ۰/۱ گرم) – جا لوله‌ای از جنس استیل یا فولاد ضد زنگ – دماسنج – ساعت آزمایشگاهی – سه پایه و توری سیمی – ماسک – وسایل شیشه‌ای شامل : ارلن مایر – لوله آزمایش – بشر – پیپت – مزور – بالن ژوژه – لوله دورهام و غیره – وسایل کوچک شامل : پنس و کاردک در اندازه‌های مختلف – یخچال برای نگهداری محیطهای کشت .

۳ - وسایل عمومی

۳-۱ - دستگاهها : اتوکلاو- بن ماری - فریزر (برای نگهداری نمونه‌های غذائی منجمد و سوش‌های میکربی) - میکروسکوپ - دستگاه شمارش کلنی - یخچال - pH متر - پمپ خلاء - ترازوی حساس - مخلوط کن برقی - ترازوی معمولی

۳-۲- وسایل شیشه‌ای : ارلن مایر، در ارلن تخلیه ، لوله آزمایش ، بشر و بالن ژوژه در اندازه‌های مختلف ،پی پت در اندازه‌های ۵،۲،۱ و ۱۰میلی لیتر، لام و لامل، استوانه مدرج ، میله شیشه‌ای .

۳-۳- وسایل متفرقه :

پنس - اسکالپل - فیلترهای غشائی - سوزن کشت - یخدان (برای حمل نمونه به آزمایشگاه) - جار بی‌هوازی - چراغ گاز رومیزی - ساعت آزمایشگاهی - سطل زباله - دستکش‌های یکبار مصرف - روپوش سفید - کلاه (برای اطاق‌های کشت) - عینک ایمنی .

ایمنی در آزمایشگاه:

کنترل کامل میکروارگانیسم‌ها در آزمایشگاه توسط سترون کردن و استفاده از ضد عفونی کننده‌ها از بیشترین اهمیت برخوردار است. کلیه وسایل و ظروفی که با میکروارگانیسم‌ها تماس داشته‌اند پس از کار باید ضدعفونی و استریل شوند .

بقایای میکروبی نه تنها ممکن است باعث آلودگی کشت‌های میکروبی دیگر شود، بلکه میتواند باعث عفونت و بیماری در انسان نیز باشد .

بسیاری از افراد که در آزمایشگاه میکروبشناسی کار می‌کنند ممکن است تصور کنند که باکتریهایی که با آنها سر و کار دارند غیر بیماری زا بوده و عدم رعایت مقررات شدید ایمنی مسئله‌ای را به وجود نمی‌آورد. باید توجه داشت که در واقع مرز جدا کننده‌ای بین باکتری‌های بیماریزا و غیر بیماریزا وجود ندارد .

تعدادی از باکتریهای ظاهرا بی‌زیان می‌توانند در افراد خاص و در شرایط معین ایجاد بیماری نمایند . کارکنانی که با میکروارگانیسم‌های خطرناک سر و کار دارند باید بر علیه آن میکروارگانیسم‌ها واکسینه شوند .

استفاده از پیپت‌های ایمنی در هنگام کار با کلیه محلولهایی که دارای باکتریهای بیماریزا شناخته شده یا مشکوک به آن می‌باشند الزامی است و در سایر موارد نیز استفاده از آن پیپت‌ها توصیه میشود .

نگهداری حلال‌های آلی: کلیه حلال‌های آلی باید در قفسه‌های قفل دار قرار داده شده و از حرارت و آتش دور نگهداشته شوند . توصیه میشود که مقادیر زیاد و اضافی مواد شیمیائی و حلال‌های آلی در محل مناسبی که خشک بوده و دارای تهویه و نور مناسب باشد نگهداری گردند .

بهداشت کارکنان:

کلیه افرادی که در آزمایشگاه میکروبیولوژی کار می‌کنند باید با اصول ایمنی و کار در آزمایشگاه آشنایی داشته باشند . در اغلب موارد کار آموزی و باز آموزی فارغ التحصیلان دانشگاهها و موسسات آموزشی در آزمایشگاههای مرجع معتبر و لازم است .

رعایت موارد زیر به جلوگیری از آلوده شدن کارکنان کمک می‌کند .

۱- کوتاه نگاهداشتن ناخن‌ها .

۲- پوشانیدن موی سر و ریش (چنانچه بلند باشد) در هنگام کار .

۳- شستشوی دست‌ها با آب گرم و صابون قبل و بعد از انجام آزمایش .

۴- شستشوی دست‌ها با آب گرم و صابون قبل و بعد از رفتن به توالت .

۵-برای خشک کردن دست‌ها از حوله‌های کاغذی و یا خشک کن‌های برقی استفاده شود . حوله‌های پارچه‌ای میتوانند بعنوان یک عامل نگاهدارنده و انتقال دهنده آلودگی میکربی به شمار آیند .

۶- عدم استفاده از زیور آلات بر دستها در هنگام کار .

۷- کلیه کارکنان در هنگام حضور در آزمایشگاه باید از روپوش سفید بدون پارگی و یا سوراخ شدگی استفاده نمایند . جنس روپوش باید کتانی بوده و از پارچه‌هائی نباشد که صد در صد از الیاف مصنوعی ساخته شده و به آسانی آتش می گیرند .

روپوش‌ها در هنگام شستشو نباید با البسه دیگر مخلوط شوند . با این روپوش نباید به مکانهای دیگر رفت .

۸- در هنگام کشت دادن از صحبت کردن خودداری شود .

۹- در هنگام تقسیم محیطهای کشت باید از ماسک پارچه‌ای یا کاغذی استفاده شود زیرا خطر آلوده شدن کشت‌ها را در اثر سرفه یا عطسه ناگهانی کاهش میدهد .

۱۰- کشیدن سیگار , آشامیدن و خوردن در محلی جدا از آزمایشگاه صورت گیرد .

۱۱- افرادی که دارای آلودگی های شدید در نواحی دست و صورت هستند نباید در انجام آزمایشهای میکروبشناسی شرکت نمایند زیرا امکان آلودگی متقابل وجود دارد . در آزمایشگاه باید جعبه کمک‌های اولیه وجود داشته باشد .

۱۲- در صورتیکه هنگام کار در آزمایشگاه فرد دچار بریدگی و یا خراشیدگی دست شود باید محل بریدگی را ضدعفونی کرده و آنرا با نوار چسب‌های زخم بندی از نوع نفوذناپذیر بپوشانند .

۱۳- در صورتی که کشت‌های میکربی بطور تصادفی به زمین ریخته شود نباید خم شد و آنها را جمع کرد . زیرا باکتری‌ها بصورت ذرات کوچک معلق در هوا پراکنده میشوند که در اثر تنفس باعث آلودگی می گردند . در این گونه موارد باید ابتدا مقداری محلول ضدعفونی کننده قوی روی کشت‌ها ریخت تا میزان آلودگی کاهش یابد . پس از مدتی میتوان محل آلوده شده را تمیز نمود .

باید توجه داشت که افتادن پلیت‌های حاوی میکرب حتی اگر شکسته نشوند میتوانند باعث آلودگی شده در این مورد نیز میکربها بصورت ذرات معلق در هوا پراکنده میشوند . بنابراین در این حالت نیز توصیه‌هائی که در مورد ظروف شکسته شده ذکر گردیده قابل اجرا است .

شرایط کار کردن با میکروارگانیسم‌های بیماریزا

در مواردی که بیماریزایی باکتری مورد آزمایش به اثبات رسیده است باید مقررات ویژه‌ای را در این مورد بکار برد .

هنگامیکه احتمال تماس پوستی با یک میکروارگانیسم بیماریزا وجود دارد باید از دستکش یکبار مصرف و یا نوع پلاستیکی مناسب دیگر که سترون شده باشد استفاده کرد . روپوش‌های آزمایشگاهی را پیش از شستشو باید اتوکلاو نمود .

سوزن کشت را باید پیش از استفاده و پس از کار کردن در روی شعله کاملا سترون نمود . بطوریکه سیم در طول خود کاملا سرخ و برافروخته شود . از تکان دادن سوزن کشت برای جدا کردن مواد از آن خودداری گردد . (برای کسب اطلاعات بیشتر به استاندارد آئین کاربرد روشهای عمومی آزمایشهای میکربی مواد غذائی بشماره ۲۳۲۵ مراجعه شود .)

گزارش نتایج آزمایش

۱- کلیه آزمایشهای انجام شده را باید در یک دفتر گزارش آزمایشگاهی بطور کامل با ذکر مشخصات نمونه مورد آزمایش و نتایج بدست آمده ثبت نمود .

در صورتیکه ثبت نتایج آزمایش در همان هنگام در دفتر گزارش آزمایشگاهی امکان‌پذیر نباشد باید یادداشت بسیار کاملی از نتیجه آزمایش در دست داشت که بعدا نسبت به وارد کردن اطلاعات مربوطه در دفتر گزارش آزمایشگاهی اقدام شود .

تاکید بر یادداشت کردن جزئیات نتایج در دفاتر آزمایشگاهی بسیار ضروری است . در بسیاری از موارد مشاهداتی که در مرحله نخست جزئی و یا بی‌اهمیت بنظر می‌رسد بعدا می‌توانند بسیار مورد استفاده قرار گرفته و گاهی به نتیجه‌گیری‌های مهم منجر گردند . بویژه در هنگامی که یک برنامه کنترل مستمر و یا یک کار پژوهشی در دست اجرا باشد .

۲- گزارش آزمایشهای کنترل کیفیت

گزارش‌های آزمایشگاهی در مورد کارهای انجام شده که بمنظور کنترل کیفیت فرآورده انجام می‌گیرد و به مدیر کارخانه ارائه میشود باید بصورتی تنظیم گردد که اطلاعات لازم و توصیه‌های مربوطه را بصورت مشخص و بدون ابهام در اختیار خواننده قرار دهند .

توصیه میشود خلاصه کارهای انجام شده در آغاز گزارش کار ذکر شود .

روشهای کار: کلیه روشهای کار باید بصورت مدون با ذکر منابع مورد استفاده در آزمایشگاه وجود داشته باشد . به این منظور باید از روشهای رسمی استاندارد شده و در صورت وجود نداشتن استاندارد ویژه برای پاره‌ای از موارد باید از منابع معتبر استاندارد شده بین المللی استفاده گردد .

نمونه برداری از محصولات غذایی

مقدمه

تاکنون استانداردهای متعددی برای انواع فرآورده‌های کشاورزی و صنعتی تدوین گردیده و به تصویب رسیده که اجرای بعضی از آنها اجباری می‌باشد .

اجرای استاندارد هر کالا اعم از آن که اجباری یا اختیاری باشد مستلزم بررسی ویژگیهای آن کالا و مقایسه نتایج بررسی با ویژگیهای مندرج در استاندارد مربوطه جهت داوری می‌باشد .

بررسی ویژگیهای هر کالا نیز فقط با انجام آزمایشهای لازم میسر است و چون انجام آزمایش روی تمامی کالا عملی نیست به ناچار آزمایشهای لازم باید روی نمونه یا نمونه‌های کالا که طبق ضوابط معین برداشته می‌شود انجام پذیرد .

ضوابط یا روشهای نمونه برداری از کالاها در برخی از استانداردها در متن یا ضمیمه استاندارد قید گردیده و در بعضی دیگر به یکی از روشهای نمونه برداری موجود مراجعه داده شده و در پاره‌ای از موارد نیز اصولا موضوع نمونه برداری مطرح نگردیده است .

تعدد روشهای نمونه برداری مندرج در متون و ضمائم استانداردها و نشریات مستقل و تنوع طرق ارائه و استفاده از آنها ضرورت تدوین روش یا روشهایی را که بتواند در موارد مشابه برای نیل به هدفهای یکسان به طور یکنواخت مورد استفاده قرار گیرد ایجاب نموده است .

با توجه به این اصل کلی که نمونه باید هر چه بیشتر معرف خصوصیات کالائی باشد که از آن نمونه برداری می‌شود و از آن جا که نوع و اهداف آزمایشهایی که باید روی نمونه انجام شود در نحوه نمونه برداری و مقدار یا تعداد نمونه‌ای که باید برداشته شود مؤثر است، لذا عمل نمونه برداری باید طوری انجام گیرد که با اجرای آزمایشهای مورد نظر روی نمونه‌ها (به طور جداگانه یا مخلوط شده) بتوان درباره تمامی کالائی که از آن

نمونه برداری شده داوری کرد و نسبت به رد و یا قبول و یا درجه بندی آن براساس ویژگیهای مندرج در استاندارد مربوطه اقدام نمود .

از آنجا که اتخاذ تصمیم درباره رد یا قبول هر کالا با بررسی ویژگیهای آن مقدور است و معمولا همه این ویژگیها از یک درجه اهمیت برخوردار نیستند در این روش مبنای رد یا قبول بر پایه ویژگیهای آن کالا اعم از نقصهای بحرانی , عمده و جزئی استوار است . بدیهی است که تعیین حدود و اهمیت هر یک از ویژگیها در هر یک کالاها و ضرورت دخالت آن در رد یا قبول کالا و میزان تأثیر آن در تصمیمات متخذه به عهده کمیسیون فنی تدوین و تجدید نظر استاندارد آن کالا می‌باشد .

دستور العمل تعداد استاندارد نمونه مورد نیاز در نمونه برداری از مواد غذایی

۱- اصول نمونه برداری برای کلیه نمونه ها بسته به طبیعت و خواص فیزیکی آنها انجام و در شرایط مناسب و استریل در اسرع وقت به آزمایشگاه تحویل گردد. (رعایت زمان، درجه حرارت و سایر شرایط)

۲- جهت امکان آزمایش روی نمونه های رسیده به منظور کنترلهای کیفی، میکروبی و شیمیائی از اماکن عمومی حداقل نمونه طبق استاندارد باشد.

۳- جهت آزمایشهای لازم و بررسیهای دقیق از کلیه نظرات و تطبیق با فرمولهای ساخت نمونه ها و کنترلهای کیفی (میکروبی و شیمیائی) نمونه هائی که از کارگاهها، کارخانه ها و واردات و صادرات ارسال می گردد بایستی طبق جداول مربوطه نمونه برداری نموده، استاندارد شماره ۲۸۳۶(نمونه برداری از فرآودره های کشاورزی بسته بندی شده که مصرف غذائی دارند) و تعداد و مقادیر نمونه ها بایستی در حدی باشد که بتوان کلیه بررسیها و آزمونها را براحتی معمول داشت.

۴- برای نمونه برداری از کره، پنیر، چایی و سایر فرآورده های کشاورزی بایستی طبق جداول استاندارد شماره ۲۸۳۶ ایران استاندارد نمونه برداری از فرآورده های کشاورزی باشد. برای سایر فرآورده ها و مواد اولیه در سطح وسیعی بایستی طبق استانداردهای مربوطه نمونه برداری بعمل آید.

۵- درموارد ضروری که آزمایشهای خاصی مورد نظر است بایستی طبق درخواست آزمایشگاه نمونه برداری بعمل آید.

لیست حداقل مقدار نمونه جهت کنترل کیفی(شیمیائی و میکروبی) از اماکن عمومی

شماره	نوع نمونه	تعداد نمونه	مقدار برحسب گرم	مقدار برحسب میلی لیتر	کارخانه
۱	انواع طعم دهنده ها	۵ بسته یا ۵ شیشه	۲۰۰	معادل ۶۰۰	
۲	پکینگ پودر و مواد مشابه	۵ بسته یا ۵ شیشه	۳۰۰	معادل ۶۰۰	
۳	گوشت چرخ کرده و نکرده	۵ قطعه	۲۰۰	معادل ۶۰۰	
٤	تخم مرغ	۱۰ عدد	-	معادل ۵۰۰	۲۰ عدد
۵	انواع پودر تخم مرغ	۱۰ عدد	۲۰۰	معادل ۵۰۰	
٦	پودر پنیر و آب پنیر	۱۰ عدد	۵۰۰	معادل ۵۰۰	
۷	ژلاتین	۱۰ عدد	۳۰۰	معادل ۵۰۰	
۸	پودر خامه مصنوعی	۱۰ عدد	۳۰۰	معادل ۵۰۰	
۹	انواع شیرینی تر	۱۰ عدد	۱۰۰۰	معادل ۵۰۰	
۱۰	انواع شیرینی خشک	معادل ۱۰ بسته	۱۰۰۰	معادل ۵۰۰	

۱۱	سایر فرآورده های قنادی	–	٤۰۰	معادل ۵۰۰	
۱۲	خاویار	۳ قوطی	معادل ۱۵۰-۲۰۰	معادل ۵۰۰	
۱۳	انواع آرد و سویا	۳ بسته	معادل ۱۰۰۰	معادل ۵۰۰	
۱٤	انواع غلات و بلغور	۳ بسته	معادل ۱۰۰۰	معادل ۵۰۰	
	انواع سوپهای خشک	۵ بسته	معادل ۱۰۰۰	معادل ۵۰۰	۱۰ بسته
۱۶	انواع ادویه	٤ بسته	۱۵۰	معادل ۵۰۰	۵ بسته

	نوع نمونه	تعداد نمونه	مقدار برحسب گرم	مقدار برحسب میلی لیتر	کارخانه
۱۷	انواع عرقیات	۵ شیشه	معادل ٤۰۰	معادل ۱۰۰۰	
۱۸	انواع شربتها	۳ شیشه	معادل ٤۰۰	معادل ۷۵۰	
۱۹	نشاسته و گلوتن	۳شیشه	معادل ۳۰۰	معادل ۷۵۰	
۲۰	انواع آب لوله کشی و غیره	۳ شیشه	معادل ۳۰۰	معادل ۷۵۰	
۲۱	آب معدنی	۵ شیشه	معادل ۳۰۰	معادل ۲/۵	۵ شیشه
۲۲	مایه پنیر	۳ قوطی	معادل ۱۵۰	معادل ۲/۵	–
۲۳	انواع ترشیها	۳قوطی	معادل ۱۵۰	معادل ۲/۵	۵ شیشه
۲٤	انواع سس	۳ شیشه	معادل ۱۵۰	معادل ۲/۵	۵ شیشه
۲۵	انواع مربا	۳ شیشه	معادل ۱۵۰	معادل ۲/۵	۵ شیشه
۲٦	انواع آنزیم	۳ شیشه	معادل ۱۵۰	معادل ۲/۵	
۲۷	انواع عصاره ها	۳ شیشه	معادل ۱۰۰-۱۵۰	معادل ۵۰۰	
۲۸	انواع رشته و ماکارونی	۳ بسته	معادل ۳۰۰	معادل ۱۰۰۰	۵ بسته
۲۹	کازئینات	۳ بسته	معادل ۳۰۰	معادل ۱۰۰۰	

۳۰	انواع خشکبار	۳ بسته	معادل ۶۰۰	معادل ۱۰۰۰	٤ بسته
۳۱	سبزی خشک	۳ بسته	معادل ۳۰۰	معادل ۱۰۰۰	
۳۲	پودر ژله	۳ بسته	معادل ۳۰۰	معادل ۱۰۰۰	
۳۳	انواع قوام دهنده ها و صمغ	۳ بسته	معادل ۲۰۰	معادل ۱۰۰۰	۳۷
۳٤	انواع نگهدارنده	۳ بسته	معادل ۲۰۰	معادل ۱۰۰۰	
۳۵	انواع کاکائو	۳ بسته	معادل ۳۰۰	معادل ۱۰۰۰	۱۰ شیشه
۳٦	عسل	۲ شیشه	معادل ۳۰۰	معادل ۱۰۰۰	
۳۷	شکر	۲ شیشه	معادل ۲۰۰	معادل ۱۰۰۰	
۳۸	مکملهای غذائی	۳ بسته	معادل ۳۰۰	معادل ۳۰۰	
۳۹	رنگ خام (پودر)	۳ بسته	معادل ۵۰	معادل ۳۰۰	
٤۰	زولبیا	۵ بسته	معادل ۱۰۰۰	معادل ۳۰۰	
٤۱	انواع روغنها	۲ بسته	معادل ۱۰۰۰	یا ۳۰۰	

نمونه برداری از شیر و فراورده های لبنی:

به منظور اخذ نتایج صحیح از آزمایش ، نمونه برداری باید به طور صحیح و با رعایت کلیه نکات و اصول نمونه برداری صورت گیرد . نمونه باید کاملاً با خصوصیات مجموعه ایکه نمونه از آن برداشت شده ، مطابقت داشته باشد . در اصطلاح نمونه باید نمایانگر کل بحر باشد. بطور کلی از لحاظ علمی و مقرراتی ، نمونه برداری باید شرایط زیر را داشته باشد.

دستور العمل اداری :

- نمونه برداری باید بوسیله شخصی انجام شودکه مختار،مجاز و متعهد بوده و آموزش فنی لازم را دیده باشد.

- در صورت امکان نمونه برداری در حضور شهود و طرف ذینفع انجام گیرد .

- نمونه ها باید همراه صورتجلسه ای تحویل آزمایشگاه گردد و موارد زیر در آن قید شده باشد :

الف – تاریخ ، ساعت و محل نمونه برداری

ب- تعداد نمونه ها و هدف از نمونه برداری

پ – شرایط نمونه برداری (بعنوان مثال از مخزنی که از قبل دوشیده شده است ، برداشت شده و یا دوشش با نظارت شخص نمونه بردار صورت گرفته و سپس نمونه شیر برداشت گردد) .

ت – ثبت هر گونه اطلاعاتی که ممکن است حادث شده باشد .

ث – ظروف نمونه باید دارای بر چسب باشد و اطلاعات ضروری را منعکس نماید.

ج–در صورت امکان نمونه ها دوتایی برداشت شود تا در هنگام ضرورت امکان بررسی مجدد وجود داشته باشد.

چ– نمونه ها بلافاصله پس از برداشت به آزمایشگاه ارسال گردد .

دستورالعمل های فنی :

کلیات :

وسایل نمونه برداری به منظور آزمایشهای شیمیایی باید کاملاً تمیز و خشک باشند .

ظروف نمونه برداری به منظور آزمایشهای میکروبی به یکی از راههای زیر سترون شده باشند :

- با استفاده از حرارت خشک ۲ ساعت در ۱۷۰ درجه سانتیگراد(دستگاه آون)

- استفاده از حرارت مرطوب ۱۵ دقیقه در بخار ۱۲۱ درجه سانتیگراد (اتوکلاو)

در این دو حالت می توان وسایل را تا قبل از استفاده در شرایط مطلوب نگهداری نمود . چنانچه وسایل نمونه برداری سترون شده در اختیار نباشد و یا امکان سترون نمودن آنها با دو روش فوق میسر نباشد می توان از روش های زیر استفاده نمود . باید توجه داشت در این صورت وسایل بلافاصله مورد استفاده قرار گیرند .

- تحت تاثیر بخار ۱۰۰ درجه سانتیگراد بمدت یک دقیقه .

- فروبردن در آب جوش ۱۰۰ درجه بمدت یک دقیقه .

- فرو بردن در اتانول ۷۰ درصد و گرفتن روی شعله.

- قرار دادن در معرض یک شعله بطوریکه کلیه سطوح مورد استفاده در نمونه برداری درتماس با شعله قرارگیرد.

در نمونه برداری جهت انجام آزمایش نباید زمان نمونه برداری تا انجام آزمایش طولانی شود. لذا جهت اینکه مقررات و شرایط ذکر شده در بالا رعایت گردد از ظروف مخصوص نمونه برداری شیشه ای ،پلاستیکی و یا فلزی استفاده شود ، بطوریکه این ظروف هیچگونه نشتی نداشته باشند و شرایط استریل کاملاً رعایت گردد.

انتخاب وسایل:ظروف نمونه برداری از جنس پلاستیک مناسب و گنجایش ظروف نمونه باید متناسب با حجم نمونه مورد نظر انتخاب گردد. مقدار نمونه باید از حجم ظرف کمتر باشد تا امکان یکنواخت کردن نمونه در آزمایشگاه میسر باشد. کلیه ظروف مجهز به درپوش باشند تا هیچگونه تغییری در بو و طعم نمونه ایجاد نشود.

نکته: ظروف نمونه برداری باید به خوبی تمیز و ضدعفونی شده باشند بگونه ای که در آزمایش شمارش کلی تعداد میکروارگانیسمها از یک عدد در هر میلی لیتر تجاوز نکند.

دماسنج:

از نوع مدرج جیوه ای یا رنگی که دقت آن کنترل شده باشد.برای تعیین دقت دماسنج می توان از دماسنج مرجع یا کنترل شده استفاده کرد.درصورت عدم تطبیق ، عدد تصحیح را باید روی دماسنج ثبت نمود.حساسیت دماسنج نباید از۲درجه سانتی گراد تجاوز کند.

نکته: آزمایشگاهها باید مجهز به دماسنج مرجع باشند، اما به دلیل گرانی نباید در آزمایشات روزانه استفاده قرار گیرند.

نگهداری نمونه ها:

نگهداری و حمل نمونه ها باید در دمای مناسب و ترجیحا در دمای کمتر از ۵ درجه سانتی گراد صورت گیرد.برای حمل نمونه ها از جعبه های ایزوله که می تواند نمونه ها را تا مدتی حفظ کند استفاده شود. در این صورت از یخ یا آب یخ به عنوان ماده خنک کننده استفاده می شود.نمونه ها باید به گونه ای در جعبه گذاشته شوند که واژگون نشده و امکان نفوذ آب و یخ در آنها وجود نداشته باشد.

تحویل نمونه به آزمایشگاه نباید از ۲۴ ساعت تجاوز کند. بدیهی است در صورت عدم دسترسی به امکانات کاملا مطلوب ، نمونه ها بلافاصله پس از برداشت و در اسرع وقت باید تحویل آزمایشگاه گردند.

نمونه برداری از یک راس دام:

قبل از شیردوشی پستان دام باید کاملا تمیز و شسته شود و با محلولهای مناسب مانند یدوفور با غلظت ۳۵ میلی گرم در لیتر ضدعفونی گردد و در نهایت با پارچه خشک گردد.

نکته: حدود ۵۰ میلی لیتر ابتدای دوشش هر پستان جدا شده و با بقیه نمونه مخلوط نشود.

نکته: نمونه از دوشش کامل پستان برداشت گردد و بلافاصله تا ۵ درجه سانتی گراد خنک شده و حداکثر طی ۱۲ ساعت تحویل آزمایشگاه گردد.

نمونه برداری از تانکر حمل شیر:

شیر محتوی تانکر با استفاده از همزن باید یکنواخت گردد. مدت زمان هم زدن بر حسب نوع و اندازه تانکر متفاوت است که می توان با اندازه گیری چربی در نقاط مختلف تانکر این زمان را مشخص نمود. زیرا اختلاف چربی در نقاط مختلف نباید از ۰/۱ بیشتر باشد.

مقدار نمونه بر حسب نوع آزمایش متفاوت است. چنانچه در مسیر خروجی تانکر تجهیزات نمونه گیر اتومات و مجهز وجود داشته باشد می توان نمونه را از مسیر برداشت نمود.

نمونه برداری از مخازن شیر:

تانکهای نگهداری شیر معمولا مجهز به همزن می باشند. قبل از نمونه برداری باید همزن را روشن نمود که مدت زمان آن بستگی به گنجایش مخزن دارد. معمولا برای مخازن با حجم کمتر از ۵ تن زمان پنج دقیقه و در مورد مخازن بزگتر ۱۰ الی ۱۵ دقیقه کافی است. برداشت نمونه معمولا بر حسب طراحی تانکها از بالا و یا شیر مخصوص نمونه گیری است.

نمونه برداری شیر پاستوریزه و خامه

۱- نمونه برداری از مسیر مخازن

در کارخانجات باید در خط تولید شیر و خامه پاستوریزه محل هایی که قبلاً بوسیله آزمایشگاه یا کنترل کیفیت برای برداشت نمونه مناسب تشخیص داده شده مثل خروجی پاستوریزاتورها ، مخازن و انتهای مسیر شیر و خامه قبل از ورود به فیلر ، شیر مخصوص نمونه برداری تعبیه شود. برای برداشت نمونه از مسیر و مخازن ابتدا باید شیر نمونه برداری را بوسیله پنبه آغشته به الکل کاملاً تمیز و بوسیله شعله استریل نمود. سپس شیر را به آهستگی باز نموده و بگذارید مقادیری حدود ۵۰ میلی لیتر محصول از آن خارج شود. بر حسب هدف آزمایش نمونه مورد نظر را با استفاده از سوزن یا سرنگ استریل و لوله آزمایش استریل یا ارلن مایر استریل با رعایت اصول سترونی برداشت نمایید.

۲- نمونه برداری از محصول بسته بندی شده

ظروف بسته بندی خرده فروشی هر کدام بعنوان یک نمونه محسوب می گردد.(طبق دستورالعمل ذکر شده در استاندارد مربوطه)

۳- شرایط حمل و زمان آزمایش

نمونه ها باید قبل از آزمایش در دمای کمتر از ۵ درجه سانتیگراد حمل و نگهداری گردد. مدت زمان نگهداری نباید به هیچ وجه از حداکثر ۳۶ ساعت تجاوز نماید.

نمونه برداری ماست ، دوغ ، کشک مایع و نگهداری آنها :

به منظور کنترل فرآیند تولید در کارخانجات ،برداشت نمونه از نقاط زیر ضروری است .

الف- سواپ تست و یا برداشت آب آخر شستشو از مخازن شسته شده مخازن و مسیر ماست.

ب - نمونه برداری از شیر آماده شده پس از اعمال دما.

ج - نمونه برداری از مایه ماست مورد استفاده در تولید. برای این منظور باید بوسیله یک پی پت ۱۰ میلی لیتری سترون و لوله آزمایش سترون ، نمونه مورد نظر با رعایت اصول بهداشتی برداشت گردد.

د- نمونه برداری از ظروف بسته بندی شده (درمورد ماست قالبی) و یا مخازن ماست (در مورد ماست زده) بصورت تازه.

ه - نمونه برداری از ماست آماده توزین (ماست تهیه شده روز قبل)

کلیه نمونه ها به استثنای نمونه CIP مخازن و لوله ها تا قبل از انجام آزمایشهای میکروبی باید در یخچال ۴ ۰c نگهداری شوند.

نمونه CIP بهتر است پس از برداشت در دمای ۳۷ ۰c نگهداری شود تا در صورت وجود کمی آلودگی در مدت نگهداری در گرمخانه فرصت تکثیر به باکتریها داده شود. زمان نگهداری در گرمخانه بهتر است از ۶ ساعت کمتر نباشد.

آماده سازی نمونه ها

بمنظور آماده سازی نمونه های تخمیرشده برای انجام آزمایشهای میکروبی ؛ ابتدا نمونه را خوب یکنواخت نمایید. برای این منظور می توان از یک پی پت سترون و یا مخلوط کن استفاده نمود. سپس ۱ میلی لیتر ازنمونه

را به ۹ میلی لیتر محلول رینگر ویا ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی منتقل نمایید. نمونه رقیق کننده را خوب مخلوط نمایید تا کاملاً یکنواخت شود.

در مورد نمونه هایی که منعقد نیستند مثل شیر ماست و یا نمونه CIP تهیه رقت لازم نیست و نمونه ها باید مستقیم کشت گردند.

یادآوری :

MS water یا Microbiologicall Suitable Wate عبارت است از آبی است که فاقد مواد بازدارنده رشد میکروبی باشد و می توان از آن در آزمایشگاه میکروبیولوژی استفاده نمود . روش شناسی به صورت زیر انجام می گیرد.

با آب مقطر استریل موجود در هر آزمایشگاه از یک نمونه شیر پاستوریزه رقت های $\frac{1}{100}$ و $\frac{1}{1000}$ تهیه نموده و با روش پلیت کانت در زمان ۰ و۱۵ و۳۰ و۴۵ دقیقه کشت نمایید. چنانچه کاهش پرگنه ها پس از انکوباسیون لازم بیش از ۲۰٪ باشدآب مقطر موجود برای انجام آزمایشهای میکروبی مناسب نیست .

نمونه برداری کره

وسایل نمونه برداری :

الف – نمونه برداری از ظروف بزرگ

چندین بار سوند را در جهات مختلف کره فرو برده و کامل بچرخانید و سپس آن را خارج نموده با کمک کاردک از داخل سوند به ظرف دهان گشاد منتقل نمایید. مقدار نمونه نباید از ۲۰۰ گرم کمتر باشد. اگر کره بصورت منجمد باشد باید آن را مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰ درجه سانتیگراد نگهداری کرد تا نرم شود.

ب– نمونه برداری از قالب های خرده فروشی

قالب های ۲۵۰ گرمی یا بیشتر را به چهار قسمت تقسیم نمایید. دو ربع مقابل هم را بعنوان نمونه انتخاب کنید. اگر قالب از ۲۵۰ کمتر است هر قالب یک نمونه محسوب می شود.

نمونه کره را نباید در ظروف ویا کاغذی که آب و چربی را جذب می نماید نگهداری نمود.

نمونه برداری شیر خشک

کلیه وسایل نمونه برداری شامل قاشق، ظروف دهان گشاد در پیچ دار و یا کیسه های پلاستیکی نمونه برداری باید قبل از استفاده سترون شده باشند.

انجام نمونه برداری باید بلافاصله پس از بازکردن در کیسه صورت پذیرد. قبل از برداشت نمونه با استفاده از قاشق استریل حتی الامکان شیرخشک را یکنواخت نمایید. مقدار نمونه برای آزمون میکروبی باید حدود ۳۰ گرم باشد. مشخصات کامل شامل کد کالا، تاریخ نمونه برداری و غیره را روی ظرف نمونه برداری قید نمایید.

آماده سازی نمونه :

با استفاده از یک قاشق استریل ۱۱ گرم نمونه را در یک ظرف دهان گشاد درب دار و یا ارلن مایر استریل با گنجایش مناسب توزین نمایید. سپس ۹۹ میلی لیتر آب مقطر استریل که دمای آن قبلاً به ۴۰ تا ۴۵ درجه سانتی گراد رسیده اضافه نمایید. ۲ دقیقه تامل کنید تا نمونه آب جذب نماید. سپس با بالا پایین کردن و حرکات چرخشی نمونه را کاملاً مخلوط و یکنواخت نمایید. هم زدن نمونه باید بگونه ای باشد که هوا داخل نمونه نشود.

نمونه برداری از فرآورده های خشک شیر

شرایط نمونه برداری

هنگام برداشتن نمونه و ذخیره کردن و آماده کردن نمونه موارد زیر باید رعایت شود:

۱- نمونه برداری باید در محیط محفوظ ، عاری از رطوبت و گرد و غبار صورت گیرد.

۲- وسایل نمونه برداری باید تمیز و خشک باشد و برای آزمایشات میکربی ، وسایل نمونه برداری باید استریل بوده و در شرایط اسپتیک نمونه برداری انجام شود.

۳- دستها و لباس نمونه بردار باید خشک و تمیز باشد.

۴- ظروف نمونه برداری باید دارای گنجایش مناسب برای نمونه باشد. کیسه های پلاستیکی استریل برای نمونه برداری از شیر خشک مناسب است.

روشهای نمونه برداری

۱- نمونه برداری ساده :

توسط یک سوند نمونه برداری یا قاشق (از جنس فولاد ضد زنگ) حدود ۱۰۰ گرم نمونه از کیسه یا ظرف شیرخشک برداشته و در ظرف نمونه برداری بریزید و درب ظرف را محکم ببندید. کیسه یا ظرف اصلی هم باید بسرعت مجدداً بسته شود.

۲- نمونه برداری مرکب :

اگر آزمایش بر روی نمونه های مرکب از شیرخشک لازم باشد، نمونه مرکب را با توجه به موارد زیر تهیه کنید:

- نمونه های منفرد نباید کمتر از ۱۰۰ گرم وزن داشته باشند.

- بیش از ۶ نمونه منفرد را مخلوط نکنید.

- هر نمونه مرکب را در ظرفی با گنجایش کافی ریخته و توسط قاشق خشک آن را بمدت یک دقیقه کاملاً مخلوط نمائید و همزمان ظرف را بصورت چرخشی تکان دهید. هنگام مخلوط کردن نمونه از جذب رطوبت توسط نمونه جلوگیری کنید. ضمناً نمونه نباید در معرض گردو غبار قرار گیرد.

نمونه برداری بستنی و فراورده های منجمد لبنی

وسایل نمونه برداری :

- ظروف نمونه برداری دهان گشاد با گنجایش و دربندی مناسب

- قاشق ، کارد یا اسپاتول استریل

نمونه باید حاوی تمام ترکیبات بستنی باشد و بهتر است در همان دمای نگهداری بستنی صورت گیرد. به هرحال مقدار نمونه نباید از ۱۰۰ گرم کمتر باشد.

نمونه برداری برای آزمایشهای میکروبی

نمونه برداری باید با استفاده از ظروف سترون شده و با رعایت اصول سترونی انجام گیرد ، ترجیحاً نمونه از همان محلی برداشت گردد که نمونه های مربوط به آزمایشهای شیمیایی و حسی برداشت شده است.

برای برداشت نمونه از یک قاشق یا کارد استریل استفاده شود. حدود ۱۰ میلی لیتر از سطح بستنی کنار زده شود و نمونه را از عمق یک سانتی متری بستنی برداشت نمایید(در بستنی های با اندازه بیش از نیم کیلو) چنانچه برداشت نمونه از سطح بستنی منظور نظر است با استفاده از قاشق یا کارد استریل نمونه فقط از سطح بستنی در کمترین عمق برداشت شود. نمونه را سریعاً به ظرف نمونه برداری استریل شده منتقل نمایید. نمونه ها باید با استفاده از جعبه های ایزوله محتوی یخ به آزمایشگاه ارسال گردد. نمونه ها حداکثر پس از ۲۴ ساعت از نمونه برداری باید مورد آزمایش قرار گیرد.

در مورد بستنی های خرده فروشی با بسته بندی کوچک هر بسته یک نمونه محسوب می شود.چنانچه امکان آزمایش سریع وجود نداشته باشد نمونه ها باید در ۱۵- درجه سانتیگراد نگهداری شوند.

نمونه برداری پنیر

- **بسته بندی کوچک :** هر بسته خرده فروشی ۵۰۰ گرمی یا کمتر از آن معادل یک نمونه محسوب می شود.

- **نمونه برداری از حلب:** در پوش حلب را ابتدا با پنبه الکل خوب تمیز کرده با استفاده از دربازکن مناسب که قبلاً بوسیله الکل و شعله ضد عفونی شده باشد در حلب را در سه جهت کاملاً باز نمایید سپس با استفاده از

کاردک یا دستکش پلاستیکی ضد عفونی شده یک قالب کامل و یا بخشی از یک قالب که حداقل ۵۰٪ قالب را بر بگیرد برداشت نمایید و مقادیری از آب پنیر روی آن بریزید.

- **نمونه برداری از قالب های بزرگ** : برای برداشت نمونه از قالب های بزرگ (بیشتر از یک کیلو) با استفاده از کارد استریل بخشی از پنیر که شامل قسمت های مختلف پنیر باشد برداشت می گردد. با توجه به تنوعی که اشکال مختلف پنیر دارد نمونه برداری باید بگونه ای باشد که قسمت های مختلف پنیر (بخش سطحی و عمقی) در نمونه برداشت شده وجود داشته باشد.

حمل و نگهداری نمونه ها:

نمونه برداشت شده تا هنگام آزمایش باید در شرایط سرما و در دمای ۱±۴ درجه سانتیگراد نگهداری شود. چنانچه هدف از آزمایش تخمین شرایط تولید باشد، آزمایش کلی فرم حداکثر ۲۴ ساعت پس از برداشت نمونه باید انجام شود.

آماده سازی نمونه

با استفاده از روش اسپتیک نمونه مورد آزمایش باید کاملاً مخلوط و یکنواخت شود. با توجه به میزان سختی و نرمی پنیر روش یکنواخت کردن در مورد انواع پنیر متفاوت است.

الف – در مورد پنیر سخت باید از مخلوط کن های برقی استفاده شود. بدیهی است قسمت های مختلف مخلوط کن باید از نظر جنس مقاوم و ترجیحاً قابل سترون سازی باشد. برای ضد عفونی نمودن ظرف و یا تیغه های مخلوط کن می توان از آب کلر محتوی ۲۰۰ PPM کلر آزاد استفاده نمود. در این صورت ظرف و تیغه باید ۵ دقیقه در معرض آب کلر قرار گیرد و سپس پرکلرین آغشته به ظرف و تیغه بوسیله آب مقطر استریل آبکشی گردد.

ب – در مورد پنیرهای نرم می توان از کیسه های پلی اتیلن استریل (یکبار مصرف) استفاده نمود. در این صورت مقداری از نمونه را داخل کیسه ریخته و با مالش روی کیسه بوسیله یک وسیله استوانه ای مثل لوله آزمایش بزرگ و یا هر وسیله مناسب دیگر پنیر را داخل کیسه یکنواخت نمود.

نمونه برداری محصولات استریل

برقرار کردن یک طرح نمونه برداری برای کنترل میکروبی فرآورده ای با سطح بالای استریل بودن مساله پیچیده ای است. در فرآورده های UHT، سطح پذیرش ضایعات معمولاً بیش از یک در ۱۰۰۰ پاکت نبوده و عملاً سطح ضایعات موردنظر، یک در ۵۰۰۰ پاکت یا کمتر است ، حتی اگر ۱۰۰۰ پاکت از یک محموله تولید نمونه برداری و گرمخانه گذاری شود. باز هم احتمال دارد که یک پاکت فاسد را نتوانیم پیدا کنیم.مساله نمونه برداری یک مساله آماری است و در محدوده طرح نمونه برداری که تحت تاثیر شرایط تجارتی قرار دارد، می باشد. هرگز نمی توانیم سطح ضایعات را دقیقاً معین کنیم بلکه فقط می توانیم تخمینی از سطح معینی از ضایعات را بدست آوریم.

در اولین مراحل تولید تجارتی یک کارخانه UHT، نمونه برداری تصادفی به میزان ۵۰۰ تا ۶۰۰ پاکت در روز از یک خط پرکن باید انجام شود که ممکن است در حدود ۲٪ کل تولید باشد. سپس نسبت نمونه برداری را می توان به ۵۰ تا ۱۰۰ پاکت از تولید روزانه هر ماشین بسته بندی کاهش داد که تقریباً ۰/۲ درصد کل تولید است.

روش های نمونه برداری برای فرآورده های UHT

الف – نمونه برداری تصادفی

ب – نمونه برداری هدفدار

الف – نمونه برداری تصادفی

در نمونه برداری تصادفی همه بسته بندی ها دارای شانس مساوی برای انتخاب شدن می باشند. مثلاً برداشتن۵ نمونه با فواصل نیم ساعت در حین تولید یا برداشتن تعداد معینی نمونه از هر پالت.

هدف از نمونه برداری تصادفی تعیین درصد محصول معیوب در یک شیفت تولید با احتمال و سطح ریسک مشخص است. بدلایل اقتصادی تعداد نمونه ها محدود است و بهمین جهت دقت آزمایش برای یک شیفت تولید نسبتاً کم است و مستلزم قبول ریسک نسبتاً بالا برای ترخیص محصول با درصد نواقص قابل توجه می باشد. با وجود این ، از طریق جمع آوری نتایج انکوباسیون نمونه ها در یک دوره نسبتاً طولانی (مثلاً ۶ ماه) می توان متوسط درصد نواقص خط تولید را تعیین نمود. نتایج جمع آوری شده باید بخوبی ثبت و نگهداری گردد و توجه شود که نتایج ثبت شده فقط حاصل از نمونه برداری تصادفی باشد.

ب - نمونه برداری هدفدار

هدف از این نوع نمونه برداری تعیین و تشخیص ریسک موجود در قسمت خاصی از عملیات تولید است یعنی انتخاب نمونه ها در زمان ها یا قسمت های ویژه ای از خط تولید که دارای احتمال ریسک بخصوصی می باشد مانند زمانی که شرایط تولید تغییر می کند مثلاً شروع عملیات ، تعویض مواد بسته بندی، تغییر مسیر فرآورده از دستگاه پرکن به تانک اسپتیک و غیره. چون این نوع نمونه برداری در قسمت های با ریسک بالا متمرکز است. معمولاً درصد موارد معیوب بیشتر از نتایج حاصل از نمونه برداری تصادفی خواهد بود.

در اینجا نیز نتایج حاصل از نمونه برداری هدفدار باید جمع آوری شده و سوابق آن ثبت و نگهداری گردد. پس از تشخیص و تعیین مناطق ریسک ، می توان اقدامات هدفمندی را جهت بهبود نتایج تولید بکار گرفت.

ثبت مشخصات نمونه ها

تاریخ ، ساعت نمونه برداری ، دوره تولید و شماره ماشین بسته بندی بصورت دقیق بر روی نمونه ها ثبت شود. مساله مهم این است که هر نمونه باید به قسمتی از محصول تولیدی در انبار مطابقت داشته باشد تا در صورت لزوم محصول مربوطه نگهداری شده و مجدداً مورد بررسی و آزمایش قرار گیرد.

نمونه برداری از سطح جهت انجام آزمایشات میکروبی

هدف از نمونه برداری از سطوح با سوآب، شناسایی یا شمارش میکروارگانیسمهای زنده موجود در این سطوح می باشد.این روش برای نمونه برداری از کلیه سطوح موجود در محیطهای تولید مواد غذایی،تجهیزات مورد استفاده در فرایند مواد غذایی و در آزمایشگاههای کنترل این مواد کاربرد دارد.

روش کار:

در روش سوآب، ابتدا قسمت مشخصی از سطح مورد آزمون توسط تم پلیت نشانه گذاری می گردد. جهت این کار می توان فویل آلومینیومی ضخیمی به شکل مربع تهیه کرد و داخل آن را با ابعاد مشخصی (مثلا ۵ cm) برش زد.سپس سواب نم دار که قبلا همراه با سرم فیزیولوژی استریل گردیده است را روی سطح مورد نظر می کشیم.پس از آن سواب فوق را می بایست مجددا در لوله حاوی رقیق کننده قرار داد.

در این مورد باید توجه داشت قسمتهایی که با دست تماس مستقیم داشته است، شکسته شود تا خطایی در آزمایش بوجود نیاید.در پایان می توان لوله حاوی سواب را با دست و یا ترجیحا توسط شیکرلوله کاملا تکان داد و از این رقیق کننده به عنوان نمونه جهت آزمایش استفاده نمود.

نکته: در مواردی که سطح مورد استفاده و میزان آلودگی زیاد باشد(مثلا ۱۰۰cm) می توان از پارچه یا اسفنج در حجمهای مشخصی از رقیق کننده(۱۰۰ سی سی) استفاده کرد.

در این گونه موارد پارچه یا اسفنج استریل را با استفاده از پنس و یا دستکش از پوشش مخصوص خارج نموده و با مقدار کافی از از رقیق کننده استریل مرطوب می نماییم.چنانچه سطح مورد نظر دارای رطوبت کافی باشد دیگر نیازی به مرطوب کردن نمی باشد.

در پایان پس از کشیدن پارچه یا اسفنج بر روی سطح و نمونه برداری کامل از سطح آن را داخل رقیق کننده می اندازیم و در دمای زیر ۴ درجه سانتی گراد به آزمایشگاه منتقل کرده و مانند روش سواب تست مورد آزمون قرار می دهیم.

روشهای دیگر نمونه برداری و کنترل میکروبی سطوح

روش پلیت تماسی:

ظروف پلاستیکی با قطر ۶۵ میلی متر است که حاوی حجم مشخصی از محیط کشت آگاردار(مطابق با نوع میکروارگانیسم مورد جستجو) بوده و مخصوص نمونه برداری از سطح می باشد.برحسب سطح مورد آزمون می توان از پلیتهای تماسی با قطر متفاوت استفاده کرد.همچنین باید توجه داشت که سطح محیط کشت باید محدب باشد.در این روش بعد از خارج کردن پلیت از پوشش،محکم و بدون هیچگونه حرکت افقی روی سطح مورد آزمون،پلیت را فشار می دهیم.بهترین زمان تماس با سطح مورد نظر حدود ۱۰ ثانیه و فشاری معادل حاصل از یک وزنه ۵۰۰ گرمی باشد. بلافاصله بعد از نمونه برداری باید آن را درون پوشش استریل برگردانید.

روش دیپ اسلاید:

لامی با با سطح ۷ تا ۱۰ سانتی مربع است که یک یا هردو سطح آن با یک لایه از محیط کشت جامد(مطابق با نوع رآزمون) پوشیده شده باشد. این اسلایدها نیز درون پوششهای مخصوص استریل قرار دارد که برای سطوح با بار میکروبی کم استفاده می شود.پس از تماس لام با سطح موردنظر می توان آن را مستقیما گرمخانه گذاری نموده و در پایان کلنی های آن را مورد بررسی قرار داد.

انواع رقیق کننده هایی که می توان در آزمونهای مختلف میکروبی استفاده کرد.

۱- آب پپتونه بافری

مواد تشکیل دهنده

پپتون	۱۰ گرم

دی سدیم هیدروژن فسفات	۹ گرم
پتاسیم دی هیدروژن فسفات	۲ گرم
کلرور سدیم	۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰میلی لیتر

ترکیبات فوق را در آب حل نموده و در صورت لزوم حرارت دهید.pH آن را به گونه ای تنظیم کنید کـه پـس از سترون سازی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد حدود ۷ باشد.

نکته: این رقیق کننده برای آزمونهای جستجوی سالمونلا توصیه می شود.

۲- پپتون نمکی:

مواد تشکیل دهنده

پپتون یا کازئین هضم شده	۱۰ گرم
کلرور سدیم	۸/۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰میلی لیتر

ترکیبات فوق را در آب حل نموده و در صورت لزوم حرارت دهید.pH آن را به گونه ای تنظیم کنید کـه پـس از سترون سازی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد حدود ۷ باشد.

۳-محلول رینگر(رقیق شده به نسبت یک چهارم)

کلرور سدیم	۹ گرم
کلرو پتاسیم	۰/۴۲ گرم
کلرور کلسیم	۰/ ۴۸ گرم
بی کربنات پتاسیم	۰/۲۰ گرم
آب مقطر	۴۰۰۰ میلی لیتر

نمکها را در آب مقطر حل نموده به طوریکه pH نهایی آن حدود ۶/۹ باشد.

٤- بافر فسفات:

مواد تشکیل دهنده

پپتون	۱۰ گرم
دی سدیم هیدروژن فسفات	۹ گرم
سدیم دی هیدروژن فسفات	۲/۷۱ گرم
کلرور سدیم	۸/۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰میلی لیتر

ترکیبات فوق را در آب حل نموده و در صورت لزوم حرارت دهید.pH آن را به گونه ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد حدود ۷ باشد.

مایع خنثی کننده:

در مواردی که احتمال باقی ماندن ضدعفونی کننده ها وجود دارد،باید خنثی کننده مناسب به محلول رقیق کننده و محیطهای کشت مورد استفاده در پلیت های تماسی افزوده گردد تا از هرگونه اثر بازدارندگی ضدعفونی کننده ها بر رشد میکروارگانیسمها جلوگیری شود.

به طورکلی، پایه مایع خنثی کننده آب پپتونه بافری، پپتون نمکی و هر رقیق کننده مناسب دیگر می باشد.برای همه وضعیتها نمی توان خنثی کننده مناسب معرفی کرد.به طور کلی، سوربیتان منواولئات(۳۰ گرم در لیتر) و لیسیتین(۳گرم در لیتر) برای خنثی کردن باقی مانده ضدعفونی کننده های جذب شده(برای مثال ترکیبات چهارتایی آمونیوم،آمفوتریسایدها) مفید هستند.سدیم تیوسولفات(۵گرم در لیتر) خنثی کننده مناسبی برای فراورده های ضدعفونی کننده با پایه هالوژنی می باشد.

در مورد ضدعفونی کننده های با پایه پراکسیدی می توان از کاتالاز یا پراکسیداز به عنوان خنثی کننـده اسـتفاده کرد.

ترکیب یک خنثی کننده که در بیشتر مواقع می تواند مورد استفاده قرار گیرد در ادامه ارائه شده است.

مواد تشکیل دهنده

پپتون	۱ گرم
سوربیتال منو الوئات	۳۰ گرم
لسیتین	۳ گرم
کلرور سدیم	۸/۵ گرم
سدیم تیوسولفات	۵ گرم
ال- هیستیدین	۱ گرم
ساپونین	۳۰ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰میلی لیتر

پپتون و سدیم کلراید را در آب مقطر حل کرده وسایر مواد را به آن افزوده و سپس توسط اتوکلاو استریل نمایید.

کنترلهای میکروبی شیرخام

تعیین و شمارش مختلف میکروارگانیسم

مقدمه :

شمارش میکروبهای مختلف در شیر خام به منظور ارزیابی کلی جهت تطبیق با استاندارد یا اعمال جایزه و جریمه و یا ارزیابی قابلیت نگهداری شیرخام و محصولات حاصل یا نهایتاً تخمین کیفیت محصولات مورد بررسی قرار می گیرد. روشهای زیادی به این منظور تدوین گردیده ولی با هیچیک از آنها به تنهایی نمی توان انواع میکروارگانیسم های موجود در نمونه شیر خام را شمارش نمود. زیرا شرایط تغذیه ای یا دما و زمان گرمخانه گذاری میکروارگانیسمها با یکدیگر متفاوتند . مثلاً دمای ۷-۰ درجه سانتیگراد برای سرما دوستها و ۳۰-۳۵ درجه سانتیگراد برای باکتریهای مزوفیل و دمای ۵۵ درجه سانتیگراد برای باکتریهای گرمادوست مناسب می باشد. بنابراین درجه حرارت انکوباسیون به هدف آزمایش ارتباط دارد. بعنوان مثال برای بررسی تأثیر زمان در کیفیت میکروبی شیرخام در مخازن سردکننده باید باکتریهای سرما دوست با زمان انکوباسیون ده روز مد نظر قرار گیرد. باکتریهای مقاوم به حرارت غالباً بدلیل نفوذ آلودگی از سیستمهای گرمازا در یک مرکز تولیدی ایجاد می گردد که در این حالت سیستم گرمازایی باید کنترل شود و یا دمای سالم سازی افزایش یابد. لذا از آنجائیکه میکروارگانیسم ها دارای دامنه حرارتی متنوع برای رشد می باشند و دمای ویژه ای بطور مطلق برای اینکوباسیون وجود ندارد، به منظور یکنواختی و هم خوانی نتایج حاصل از آزمایش ، استانداردها و آیین کار مشخصی در کشورهای مختلف تدوین گردیده است. در این قسمت روش شمارش میکروارگانیسم های مختلف اعم از مزوفیل ، مقاوم به حرارت ، سرما دوست و غیره بیان می شود.

فلور میکروبی شیر خام دام سالم

گروه باکتریایی	مزوفیل	سرماگرا	مقاوم به حرارت
محیط کشت	پلیت کانت آگار	پلیت کانت آگار + شیر خشگ	پلیت کانت آگار
دمای انکوباسیون	۳۱±۱ ۰C	۱ ۰ C±۱ ۰C	۵۵±۱ ۰C
زمان انکوباسیون	۳ روز	۱۰ روز	۳ روز
میکرواگانیسمهای مشاهده شده	میکروکوکوس ها استریتوکوکوک ها باسیلهای گرم مثبت اسپورزا اسپورباکتریها کپک و مخمر	سودوموناس ها فلاوو باکتریوم آئروباکتر باسیلوس	مایکوباکتریوم ۹۹٪ میکروکوکوس اسپورباسیلوس اسپورکلستریدیوم

شمارش میکروارگانیسم های هوازی مزوفیل(توتال کانت)

۱- هدف

هدف از این آزمایش ارائه یک روش مرجع برای تخمین تعداد باکتریهای هوازی مزوفیل در شیر خام به منظور ارزیابی شرایط بهداشتی دوشش ، شرایط حمل و نقل و قابلیت نگهداری آن می باشد.

۲- دامنه کاربرد : این آزمایش در مورد کلیه فرآورده های شیر به استثنای محصولات تخمیری مثل ماست،دوغ و پنیر کاربرد دارد.

۳- اصول روش :

این روش بر پایه شمارش پرگنه هایی است که در محیط کشت پلیت کانت آگار (یا محیط جایگزین) در دمای $۳۰ \pm ۱ ^{\circ}C$ در مدت ۷۲ ساعت مشاهده می شود ، استوار است .

٤- شرایط نگهداری و زمان آزمایش نمونه :

نمونه ها باید قبل از آزمایش در دمای ۴-۰ درجه سانتیگراد نگهداری و حمل گردد و هر چه سریعتر پس از ارسال به آزمایشگاه مورد آزمایش قرار گیرند . زمان نگهداری حتی در دمای مذکور نباید حداکثراز ۳۶ ساعت تجاوز کند.

نمونه های یخ زده به دلیل تغییراتی که در شمارش باکتریهای آن ایجاد می شود فاقد اعتبار است .

٥- آماده سازی نمونه ها و تهیه رقت

۵-۱- آماده سازی نمونه ها :

نمونه ها باید قبل از آزمایش کاملاً یکنواخت گردند. دقت نمائید هنگام مخلوط کردن هوا وارد نمونه نشود برای این کار ظروف حاوی نمونه را چندین بار به آرامی برگردانید . فاصله یکنواخت کردن نمونه و انجام آزمایش نباید از ۳ دقیقه تجاوز کند.

۵-۲- تهیه رقت ها :جهت شمارش کلی میکروبهای شیر با توجه به بار آلودگی تهیه رقت های اعشاری ضروری است . چنانچه میزان آلودگی بین ۲۵۰۰ تا ۲۵۰۰۰۰ می باشد رقت $\frac{1}{100}$ و $\frac{1}{1000}$ تهیه نمایید . چنانچه میزان آلودگی تا ۳۰ میلیون تخمین زده می شود رقت را تا $\frac{1}{1000000}$ ادامه دهید . نمایش رقت ها بصورت توان منفی می باشد .لذا رقت $\frac{1}{10}$ بصورت 10^{-1} و $\frac{1}{100}$ بصورت 10^{-2} الی آخر می باشد.

برای تهیه رقت های مورد نظر از لوله آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر و یا شیشه در پیچ دار محتوی ۹۹ میلی لیتر محلول رقیق کننده (رینگر $\frac{1}{4}$ یا سرم فیزیولوژی) استفاده نمایید.

عملیات رقیق کردن به کمک یک پی پت ۱ میلی لیتری استریل صورت می گیرد . برای هر رقت از پی پت جداگانه استفاده شود. دقت نمائید نوک پی پت به جدار خارجی یا لبه ظرف تماس پیدا نکند. همچنین پی پت را زیاد در نمونه فرو نبرید.

برای یکنواخت کردن رقت ها از مخلوط کن مکانیکی استفاد نمایید و یا چندین بار ظرف محتوی نمونه و رقیق کننده را وارونه نمایید. دقت کنید هوا وارد نمونه نشود.

یادآوری :

در نظر داشته باشید که هر پی پت فقط در یک رقت داخل شود.

کلیه عملیات باید در کنار شعله و با رعایت شرایط استریل انجام گیرد.

٦- محلول های رقیق کننده :

- محلول های رقیق کننده نباید سبب مرگ میکروارگانیسمها شوند و یا در تقویت رشد آنها موثر باشند.

- محلول های رقیق کننده مورد استفاده در درجه اول محلول رینگر و یا سرم فیزیولوژی می باشد.

۶-۱- محلول رینگر یک چهارم

کلرور سدیم ۹ گرم

کلرو پتاسیم ۰/۴۲ گرم

کلرور کلسیم بدون آب ۰/۴۸ گرم

بی کربنات پتاسیم ۰/۲ گرم

آب مقطر ۴ لیتر

دستور تهیه : مواد فوق را در آب مقطر حل کرده و سپس در حجم ۹ میلی لیتر در لوله آزمایش و یا ۹۹ میلی لیتر در شیشه های در پیچ دار تقسیم و در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد برای مدت ۱۵ دقیقه استریل کنید.

ظروف محتوی مایع رقیق کننده را تا موقع مصرف در یخچال نگهداری کنید . مدت نگهداری نباید از یک هفته تجاوز کند.

۶-۲ – سرم فیزیولوژی

مواد لازم

کلرور سدیم ۸/۵ گرم

آب مقطر ۱ لیتر

دستور تهیه: کلرور سدیم را دریک لیتر آب مقطر حل کرده ، مطابق دستور قبل در لوله آزمایش تقسیم و در اتوکلاو سترون نمایید.

۷–روش کار (کشت مخلوط یا Pour Plate)

۷-۱- لوازم و مواد مورد نیاز

- پلیت استریل(۱۵×۱۰۰ میلی متری) یا پلاستیکی (۱۵×۹۰ میلی متری).

- پی پت ۱ و ۲ میلی لیتری استریل (پی پت ها قبل از سترون سازی پنبه گذاری شده باشند).

- حمام آب گرم برای نگه داشتن محیط کشت در حرارت ۴۶-۴۴ درجه سانتیگراد.

- گرمخانه با دمای ۳۱±۱ $^{\circ}C$ مجهز به ترموستات و دماسنج با گنجایش مناسب.

یادآوری :

ستون ظروف پتری در داخل گرمخانه باید بلافاصله مناسب از یکدیگر و از دیوارها و سقف گرمخانه قرار گیرند.هر ستون نباید بیش از ۶ ظرف پتری و ترجیحاً ۴ عدد تشکیل شده باشد.

- کلنی کانتر

- لوله های آزمایش و شیشه محتوی مایع رقیق کننده استریل مطابق دستورالعمل

- محیط کشت پلیت کانت آگار

یادآوری :

محیط کشت بصورت آماده از تولید کننده های معتبر مطابق دستورالعمل سازنده محیط کشت ساخته می شود.

۷-۲- ترکیب محیط کشت پلیت کانت آگار :

تریپتون	۵ گرم
گلوکز	۱ گرم
عصاره مخمر	۲/۵ گرم
آگار	۱۵ گرم

دستور تهیه : مواد فوق را به یک لیتر آب مقطر افزوده و به منظور یکنواخت شدن آن را بهم بزنید و تا نقطه جوش حرارت دهید . محیط کشت آماده شده را در حجمهای مورد نظر بر حسب تعداد نمونه آزمایش در ارلن تقسیم نموده در آن را با پنبه و فویل آلومینیوم بپوشانید و سپس در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید .pH نهایی بعد از اتوکلاو کردن باید ۰/۲ ±۷ باشد. ارلن محتوی محیط کشت را تا موقع مصرف در یخچال نگهداری از یک هفته تجاوز نکند.

۷-۳- روش آزمایش

توسط پی پت یک میلی لیتری ، یک سی سی از رقیق ترین محلول تهیه شده مثلاً رقت 10^{-4} را برداشته به یک ظرف پتری و سپس رقتهای دیگر را به همان صورت در پلیتهای مشخص شده منتقل کنید.

بعد از وارد کردن نمونه های رقیق شده به ظروف پتری در فاصله زمانی کمتر از ۲۰ دقیقه حدود ۱۵-۱۲ میلی لیتر محیط کشت پلیت کانت مذاب و استریل را که دمای آن بیش از ۴۵±۱ °C درجه سانتیگراد نباشد به

ظرفهای پتری دیش محتوی نمونه منتقل کنید و سپس برای مخلوط شدن نمونه با محیط کشت پلیت را چند بار بطور چرخشی و مانند عدد هشت لاتین حرکت دهید تا محیط با نمونه مورد آزمایش کاملاً مخلوط شود . در موقع حرکت دادن دقت کنید که محیط کشت به خارج نریزد زیرا سبب آلودگی درپوش و اطراف آن می شود.

یادآوری :

برای اطمینان از صحت کار و رعایت شرایط استریل دو ظرف پتری که یکی فقط دارای محیط کشت بدون نمونه و دیگری دارای یک میلی لیتر مایع رقیق کننده می باشد به عنوان شاهد انتخاب کنید.

بعد از بسته شدن محیط کشت ، ظرفهای پتری را به طور واژگون در دمای ۳۱±۱ °C برای مدت ۷۲ ساعت قرار دهید . سپس نتیجه آزمایش را بررسی کنید و تمام پرگنه هائی که در ظرف پتری ظاهر شده اند شمارش نمایید.

یادآوری : چنانچه امکان شمارش در زمان معین مقدور نباشد پلیت ها را در دمای یخچال نگهداری نمایید. این مدت نباید از ۲۴ تجاوز نماید.

۷-٤- شمارش پرگنه ها و تنظیم گزارش

بمنظور دقت در شمارش بهتر است از کلنی کانتر استفاده شود.

پلیتهایی را که حاوی ده تا ۳۰۰ پرگنه می‌باشند برای شمارش در نظر بگیرید. تعداد واحدهای تشکیل دهنده پرگنه (cfu) را بشمارید. تعداد پرگنه شمارش شده در هر گرم با هر میلی‌لیتر از فرآورده را با استفاده از زیر محاسبه کنید.

$$N=\frac{\sum c}{(n_1+0/1n_2)f}$$

که در آن :

N تعداد پرگنه‌های شمارش شده در گرم یا میلی‌لیتر آزمایه

$\sum c$ مجموع پرگنه‌های شمارش شده روی پشتابهای پتری مورد شمارش از دو رقت متوالی

n_1 تعداد پلیتهای شمارش شده در اولین رقت قابل شمارش با نتایج حداقل ده و حداکثر ۳۰۰

n_2 تعداد پلیتهای شمارش شده در دومین رقت قابل شمارش با نتایج حداقل ده و حداکثر ۳۰۰

f مقدار با حجم آزمایه موجود در اولین رقت انتخابی بر حسب گرم یا میلی‌لیتر

یادآوری - اگر بیشتر از ۲رقت قابل شمارش موجود باشد که نتایج آنها بین ده تا ۳۰۰پرگنه است، رابطه باید تغییر داده شود. بطوری که رقتهای بعدی نیز بحساب آورده شوند. در مورد رقت ۳، رابطه بصورت زیر تغییر پیدا می کند:

$$N=\frac{\sum c}{(n_1+0/1n_2+0/01n_3)f}$$

که در آن:

$\sum c$ مجموع پرگنه‌های شمارش شده روی بشقابهای پتری مورد شمارش از سه رقت متوالی

n_3 تعداد بشقابهای پتری نگهداری شده در سومین رقت قابل شمارش

می‌باشد.

نتایج بدست آمده را تا دو رقم معنی‌دار گرد کنید. اگر عددی که باید گرد شود برابر پنج باشد، رقم سمت چپ آن را طوری گرد کنید که عدد حاصل زوج باشد.

برای مثال: عدد۲۸۵۰۰در صورت گرد شدن می‌شود۲۸۰۰۰ و ۱۱۵۰۰ می‌شود۱۲۸۰۰۰.

نتایج بدست آمده را به عنوان تعداد واحدهای تشکیل دهنده پرگنه میکرو ارگانیسمها (cfu) در میلی‌لیتر یا در گرم فرآورده، در نظر بگیرید .مثال:

شمارش پرگنه میکروارگانیسمها، در دمای ۳۰درجه سلسیوس، نتایج زیر را بدست داده است:

یادآوری - برای هر رقت، دو پتری گرمخانه‌گذاری می‌شود.

در اولین رقت قابل شمارش 10^{-2}، تعداد۱۶۸ و۲۱۵پرگنه شمارش شده است.

در دومین رقت قابل شمارش 10^{-3}، تعداد۱۴ و۲۵پرگنه شمارش شده است.

$$N=\frac{\sum c}{(n_1+0/1n_2)f}=\frac{168+215+25+14}{[2+(0/1\times2)]10^{-3}}=19182$$

نتیجه حاصل را تا بدست آمدن عدد۱۹۰۰۰ یا $1/9\times10^4$گرد کنید که نمایانگر تعداد پرگنه میکروارگانیسم‌ها در هر گرم یا میلی‌لیتر از فرآورده می‌باشد.

نکته: اگر هر دو پلیت حاوی آزمایه (در مورد فرآورده‌های مایع یا رقت اولیه (در مورد سایر فرآورده‌ها) دارای تعداد کمتر از۱۰پرگنه باشد، نتیجه را بصورت زیر گزارش کنید.

- کمتر از۱۰ واحد تشکیل دهنده پرگنه میکروارگانیسم‌ها در هر میلی‌لیتر (برای فرآورده مایع)

- کمتر از $10\times1/f$واحد تشکیل پرگنه میکروارگانیسم در هر گرم (در مورد سایر فرآورده‌ها) که مقدار f مقدار با حجم آزمایه موجود در اولین رقت انتخابی برحسب گرم یا میلی‌لیتر می‌باشد.

نکته: اگر کلیه پلیتها دارای بیش از۳۰۰ پرگنه باشند، تعداد پرگنه‌ها را در بشقابهای پتری که نزدیک‌ترین تعداد پرگنه به۳۰۰ را دارند، تخمین زده و در عکس ضریب بالاترین رقت ضرب کنید. نتایج را بصورت تعداد تخمینی پرگنه‌های میکروارگانیسم‌ها در گرم یا میلی‌لیتر گزارش کنید.

۷-۵- قابلیت تکرار

تفاوت بین نتایج بدست آمده از دو آزمایش جداگانه که با استفاده از یک روش بر روی همان آزمایه در همان آزمایشگاه و بوسیله همان آزمایش کننده با فاصله زمانی کم و بوسیله همان تجهیزات انجام شده است، نباید بیش از ۳٪ حد پایینی نتیجه بدست آمده باشد.

یادآوری - اگر در ۵٪ از موارد آزمایش یا بیشتر، در شمارش پرگنه‌ها اختلاف وجود داشته باشد نشاندهنده خطا در انجام آزمایش است.

یادآوری :علاوه بر کشت صفحه ای Pour Plate (کشت مخلوط) روشهای دیگری برای شمارش میکروارگانیسم های شیر وجود دارد. مانند شمارش مستقیم میکروسکوپی یا استفاده از محیط کشت مایع چند لوله ای (M.P.N) بیشترین تعداد احتمالی ویا روشهای کدورت سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (براساس قدرت جذب یا شکست نور) و همچنین روشهای دستگاهی مانند باکتواسکن و یا روشهای تخمینی با استفاده از معرفهای شیمیایی مانند متیلن بلو و یا رزازورین .

باکتریهای سرماگرا و سرما دوست

مقدمه:

استفاده از دمای پایین بر این اصل استوار است که فعالیت میکروارگانیسمها در دمای بالای انجماد کند می شود زیرا فعالیت میکروارگانیسمها بوسیله آنزیمها کاتالیست می شود لذا با توجه به وابستگی فعالیت آنزیمها به دما این عمل رخ می دهد.

سایکروفیل: در مورد میکروارگانیسمهایی به کار می رود که دامنه ۲۰ – ۰ درجه سانتی گراد رشد می کنند و اپتیمم دمای آنها ۱۵-۱۰ درجه سانتی گراد است.

سایکروتروف: به میکروارگانیسمهایی اطلاق می گردد که قادرند در دمای ۷-۰ درجه سانتی گراد رشد کنند و در طی ۷ تا ۱۰ روز کلنی های قابل رویت(کدورت)تولید نمایند.

از آنجا که برخی سایکروتروفها قادرند در دمای حداکثر ۴۳ درجه سانتی گراد رشد نمایند در واقع جزء گروه مزوفیلها قرار می گیرند.

تمامی سایکروتروفها در دامنه دمایی ۷-۰ درجه سانتی گراد با سرعت یکسانی رشد نمی کنند. از این رو آنها را به دو گروه استنو سایکروتروف و اوری سایکروتروف طبقه بندی می کنند.

۱-استنو سایکروتروف: میکروارگانیسمهایی هستند که در عرض ۵ روز کلنی قابل رویت ایجاد می کنند.نظیر سودوموناس فراجی و آئروموناس هیدروفیلا که در ۷ درجه سانتی گراد و در عرض ۳ تا ۵ روز به خوبی رشد می کنند ولی در ۴۰ درجه سانتی گراد قادر به رشد نیستند.

۲- اوری سایکروتروف: به طور معمول گاهی اوقات در عرض ۶ تا ۱۰ روز هم کلنی قابل رویت ایجاد نمی کنند.نظیر نظیر انتروباکتر کلئوآکه، کافینا آلوئیل و یرسینیا انتروگلی تیکا که در عرض ۱۰ روز رشد کرده و در ۴۳ درجه سانتی گراد نیز رشد مناسبی دارد.البته باکتریهای دیگری نیز وجود دارند که در ۴۳ درجه سانتی گراد به خوبی رشد می کنند ولی رشد آنها در ۷ و در عرض ۱۰ روز ضعیف می باشد.

با توجه به موارد مذکور انتظار می رود سایکروفیلها منحصرا بر روی فراورده های به دست آمده از آب اقیانوسها یا آب و هوای خیلی سرد وجود داشته باشند. همچنین انتظار می رود میکروارگانیسمهای عامل فساد گوشتها، طیور و سبزیها که عموما در دمای ۰ تا ۵ نگهداری می شوند جزء سایکروتروفها باشند.

روش جداسازی سایکروتروفها از سایر میکروارگانیسمها:

سایکروتروفها قادر به رشد بر روی محیط غیر انتخابی در دمای ۴۳ و به مدت ۲۴ ساعت نمی باشد.لذا از این روش برای جداسازی آنها از سایر میکروارگانیسمها استفاده می شود.

جهت نگهداری موادغذایی در دمای پایین ۳ دامنه دمایی مشخصی وجود دارد.

۱- دمای سردکردن(Chilling): عبارت است از دمای یخچال معمولی(۷-۵ درجه سانتی گراد) و حرارتهای مربوط به ۱۵-۱۰ درجه سانتی گراد که معمولا برای انبار کردن برخی سبزیها و میوه ها نظیر خیار، سیب زمینی و لیموترش مناسب می باشد.

۲- دمای انجماد: به دماهای بین ۰ تا ۷- درجه سانتی گراد گفته می شود.

۳- دمای فریزر: به دمای ۱۸C°- و یا کمتر گفته می شود که رشد میکروارگانیسمها در این دما متوقف می شود. با این حال برخی قادرند در دمای فریزر با سرعت بسیار کند رشد نمایند.

حداقل دمای رشد:

گونه ها و سوشهایی از باکتریها که قادر به رشد در ۷ و یا کمتر می باشند. عمدتا در جنس باکتریهای گرم منفی قرار می گیرند و تعداد خیلی کمتر در جنسهای باکتریهای گرم مثبت مشاهده می شود.کمترین دمای رشد یک میکروارگانیسم در دمای ۳۴ C°- بوده است که مربوط به یک مخمر صورتی(Pink yeast) می باشد.رشد در دمای ۰ اغلب مربوط به مخمرها و کپکها است که با رشد قارچها در شرایط Aw پایین مطابقت دارد.رشد باکتریها در ۲۰ C°- و در محدوده ۱۲C°- نیز گزارش شده است.

گونه	pink yeast	گونه های Vibrio	یرسینیا انتروکولیتیکا	گونه های انتروکوکوس	لیستریا
حداقل دمای رشد(C°)	-۳۴	-۵	-۲	0	۱

برخی از خصوصیات سایکروتروف ها و سایکروفیل ها

۱- افزایش اسیدهای چرب غیر اشباع:

به طور کلی میکروارگانیسمهایی که می توانند دمای پایین را تحمل کنند با کاهش دما باعث افزایش اسیدهای چرب غیر اشباع می گردند و باعث بالا رفتن نسبت اسیدهای چرب غیراشباع به اسیدهای چرب اشباع می شوند که این امر باعث تحرک غشای سلولی شده و در نتیجه غشاء به راحتی می تواند اجازه ورود و خروج مواد را بدهد.این ایده به نام تئوری استحکام چربی(Lipid solification) معروف است.

مزوفیل ها چون قادر به تغییر نسبت فوق نمی باشند لذا قادر به رشد در دمای پایین نیستند پدیده ای به نام شوک سرد اتفاق می افتد که عبارت است از اینکه اگر میکروارگانیسمهای مزوفیل را به سرعت به دمای پایین ببریم(مثلا از ۳C° به ۵C°) غشای سلول آسیب می بیند.این آسیب در سلولهای گرم منفی به فضای پری پلاسمیک(بین دیواره و غشاءسیتوپلاسمی) وارد می شود و باعث می شود ترکیباتی که در این فضا قرار دارند به بیرون نشت کند. این پدیده حتی به غشای سیتوپلاسمی آسیب رسانده و باعث سوراخ شدن آن می گردد. در نتیجه باعث خارج شدن پروتئینها و یک سری آنزیمها از سلول می گردد. این پدیده در بسیاری از گرم منفی ها به خصوص E.coli نشان داده شده است و به اثبات رسیده است.همچنین در E.coli اگر قبل از کاهش سریع دما، آن را به تدریج به ۵C° برسانیم پدیده شوک سرد اتفاق نمی افتد. زیرا باعث می شود میکروارگانیسم خود را به آن دما تطبیق دهد.

۲- سایکروتروفها مقادیر زیادی از پلی ساکاریدها را سنتز می نمایند.طنابی شدن شیر و نان در دماهای پایین بهتر به وجود می آیند. همچنین تشکیل اسلایم که شاخص فساد سس، گوشت قرمز و مرغ است در دمای پایین ایجاد می گردد.همچنین تشکیل پلی ساکارید دکستران توسط لوکونوستوک مزنتریدیس و پدیوکوکوس در کارخانجات نیز در دماهای پایین بهتر بوجود می آید و در دماهای بالاتر از ۳۰C° این پلی ساکارید بوجود نمی آید. زیرا آنزیم دکستران سوکراز حساس به حرارت بوده و از بین می رود.

۳- تشکیل پیگمان تقویت می شود.

این اثر مخصوص میکروارگانیسمهایی است که پیگمانهای کاروتنوئیدی سنتز می کنند و بهترین مثال تولید توسط مارکسنس می باشد که آنزیم کاتالیست کننده این پیگمان به حرارت بسیار حساس می باشد.تعداد زیادی از سایکروتروفهای دریایی شاید تولیدکننده پیگمان باشند.این پدیده در مورد مخمرها نیز صدق می کند از طرف دیگر هیچکدام از گرمادوستهایی که عمدتا مطالعه شده اند قادر به تولید پیگمان نبوده اند.

۴- برخی سوشها سوبسترا را به روشهای مختلفی مصرف می کنند. نشان داده شده است که درتخمیرقند در زیر ۳۰C°، اسید و گاز ودر دمای بالای ۳۰C° فقط اسید تولید می شود. از طرفی گزارش مشابهی برای سایکروتروف ها وجود دارد که نشان می دهد در دمای پایین تر از ۲۰C° اسید و گاز و بالاتر از آن فقط اسید تولید می شود. این خاصیت به سیستم اسید فرمیک دهیدروژناز مربوط می باشد که این آنزیم به حرارت حساس است.

نشان داده شده است که میکروارگانیسمهای عامل فساد گوشت در ۵C° در مقایسه با ۲۰C° و ۳۰C° بهتر می توانند از پروتئینهای گوشت استفاده کنند و به راحتی می توانند در این دما از ژلاتین نیز استفاده نمایند.زیرا آنزیمهای عامل فساد حساس به حرارت می باشند.

روش شمارش میکروارگانیسم های سرماگرا

۱- هدف ارائه روش شمارش میکروارگانیسم های سرماگرا در شیر در ۵/۶ درجه سانتیگراد می باشد.

۲- تعریف

باکتریها , مخمرها و کپک هایی هستند که در دمای ۵/۶ درجه سانتیگراد در مدت ۱۰ روز روی محیط کشت بند ۴ پرگنه تشکیل می دهند.

۳- محیط کشت و محلولهای رقیق کننده

۳-۱ ترکیب محیط

نام مواد	مقدار
تریپتون	۵ گرم
گلوکز	۱ گرم
عصاره مخمر	۲/۵ گرم

شیر خشک بدون چربی ۱ گرم

آگار ۱۵ گرم

یادآوری :

محیط کشت فوق بصورت آماده و تجارتی در دسترس آزمایشگاههای صنایع شیر نمی باشد . با توجه به ترکیب محیط کشت فوق برای شمارش میکروارگانیسم های سرماگرا می توان با افزودن مقدار لازم پودر شیر بدون چربی به محیط کشت پلیت گانت آگار محیط مورد نظر را آماده نمود.

روش تهیه

مواد فوق را در یک لیتر آب مقطر حل کرده حرارت می دهیم تا شفاف شود. سپس به میزان لازم برای هر نوبت کاری در ارلن یا لوله آزمایش تقسیم کرده در اتوکلاو در حرارت ۱۲۱ ۰c به مدت ۱۵ دقیقه سترون نمایید.

pH محیط ۲۵ ۰c در باید ۷±۰/۱ باشد. دمای محیط کشت در موقع استفاده نباید از ۱±۴۴ درجه سانتیگراد بیشتر باشد. این محیط را می توان پس از آماده سازی در یخچال صفر تا ۵ درجه سانتیگراد به مدت یک هفته نگهداری نمود.

۳-۲- محلولهای رقیق کننده

از محلولهای رقیق کننده روش شمارش میکروارگانیسم های هوازی مزوفیل استفاده می شود.

٤- دستگاهها وسایل لازم

از دستگاهها و وسایل معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی استفاده نمایید.

٥- نمونه برداری

نمونه برداری طبق روش ارائه شده در مبحث نمونه برداری صورت می گیرد.

٦- روش آزمون

۶-۱- آماده سازی نمونه ها

نمونه های مورد آزمایش قبل از رقیق شدن باید کاملاً یکنواخت گردند . برای تهیه رقت 10^{-1} یک میلی لیتر از نمونه شیر را به ۹ میلی لیتر از محلول رقیق کننده اضافه نمایید. رقتهای بعدی نیز بهمین ترتیب تهیه می گردد. با توجه به اینکه تعداد میکروارگانیسم های سرماگرا در شیر غالبا خیلی زیاد نیستند نیازی نیست که نمونه بیشتر از 10^{-3} رقیق شود.

توجه :

برای تهیه رقت ها چنانچه بجای ۱ میلی لیتر نمونه در ۹ میلی لیتر رقیق کننده ۱۰ میلی لیتر نمونه در ۹۰ میلی لیتر رقیق کننده استفاده شود آزمایش از رقت بیشتری برخوردار خواهد بود.

٦-٢- روش کار

دو پلیت سترون (۱۰۰-۹ میلی متری) بردارید با پی پت سترون یک میلی لیتر از دو رقت تهیه شده (مثلاً ۲-۱۰ و ۱-۱۰) در آنها بریزید و سپس از محیط کشت مورد نظر به میزان ۱۵ تا ۲۰ میلی لیتر به آن اضافه نمایید. دقت کنید دمای محیط کشت ۴۴± ۱۰c باشد.

زمان بین آماده کردن اولین رقت تهیه شده و مخلوط کردن نمونه با محیط کشت نبایستی از ۱۵ دقیقه تجاوز کند.

پس از جامد شدن محیط کشت پلیت ها را بطور وارونه به مدت ۱۰ روز در ۶/۵ درجه سانتیگراد نگهداری نمایید.

توجه داشته باشید که بیش از ۶ پلیت روی هم قرار نگیرد و با سقف و دیواره انکوباتور یا یخچال با دمای مناسب فاصله کافی داشته باشد.

٦-٣- قرائت نتیجه و تهیه گزارش

- پلیت هائی که دارای ۳۰ تا ۳۰۰ پرگنه است برای شمارش انتخاب کنید.

- پرگنه های پخش شده در سطح محیط کشت که دارای یک مرکز هستند بعنوان یک پرگنه در نظر بگیرید.

شمارش کلی فرم ها

مقدمه :عموما کلی فرم ها شامل تمام باکتریهای گرم منفی، بدون اسپور، میله ای شکل ، هوازی یا بی هوازی اختیاری هستندکه قادرند در دمای ۳۰ الی ۳۷ درجه سانتیگراد در مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت لاکتوز را تخمیر کرده و گاز واسید تولید نمایند.

منبع اصلی این گروه از باکتریها روده حیوانات خون گرم است. گونه های غیر روده ای نیز در این گروه یافت می شود. مهمترین گونه های شناخته شده اشریشیاکلی ، انتروباکتر،سیتروباکتر و کلسیلا می باشند . این گروه از باکتریها در حرارت پاستوریزاسیون از بین می روند و در محصولات پاستوریزه بعنوان شاخص بهداشتی و وجود آلودگی ثانوی مورد بررسی قرار می گیرند.

کلی فرم ها در مورد فرآورده های خام اهمیت نداشته و فقط می توانند بعنوان درجه بندی میزان آلودگی مورد بررسی قرار گیرند. در شیر حتی در دمای یخچال قادر به تکثیر می باشند. در مورد فرآورده های تخمیری عمر محصول حائز اهمیت است، بدین معنی که کاهش pH به میزان کمتر از ۴/۶ در طول زمان نگهداری محصول موجب از بین رفتن این باکتریها می گردد. لذا بمنظور تعیین شرایط بهداشتی تولید محصولات تخمیری مثل ماست و پنیر آنها را باید طی ۲۴ ساعت پس از تولید مورد آزمایش قرار داد.

اساس آزمایش

باکتریهای کلی فرم به گروهی از باکتریها اطلاق می شود که می توانند در محیط کشت اختصاصی ویولت – رد – بایل – آگار V.R.B.A در مدت ۲±۲۴ ساعت در دمای ۱±۳۱ درجه سانتیگراد پرگنه های قرمز مایل به

ارغوانی با قطر حدو ۰/۵ میلی متر یا بیشتر با هاله مایل به قرمز (ناشی از رسوب نمکهای صفراوی) ایجاد نمایند. بمنظور تأیید کلی فرم ۵ پرگنه از نمونه کشت شده در VRBA را می توان بوسیله سوزن کشت به لوله آزمایش حاوی لوله دورهام و محیط کشت بریلیانت گرین برات با ۲٪ لاکتوز تلقیح نمود . پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۱±۳۰درجه سانتیگراد ایجاد گاز دورهام موید وجود کلی فرم می باشد.

یادآوری:

در طی فرآوری یا نگهداری محصولات ممکن است باکتریهای کلی فرم آسیب دیده بدون اینکه از بین بروند، دراین حالت کلی فرم ها نمی توانند در محیط کشت جامد کلنی های کاملاً مشخص و تیپیک ایجاد نمایند. در این صورت انجام تست تاییدی ضروری می باشد.

شمارش کلی فرم ها در محیط جامد V.R.B.A

این روش برای کلیه فرآورده های شیر قابل اجرا است.

آماده سازی نمونه

نمونه را با استفاده از مخلوط کن مکانیکی ویا چندین بار وارونه کردن ظرف کاملاً یکنواخت نمایید، دقت کنید هوا وارد شیر نشود.بطور معمول شیر پاستوریزه برای آزمایش کلی فرم نیاز به رقت ندارد. در صورتیکه آلودگی زیاد باشد، با استفاده از محلول رینگر رقت های لازم از آن تهیه نمایید.

روش آزمون

برای هر نمونه یک پلیت در نظر بگیرید. مشخصات نمونه را روی آن بنویسید ۱ میلی لیتر از نمونه را با رعایت شرایط استریل به پلیت منتقل نمایید. نوک پی پت را در فضای خشک پلیت قراردهید. در صورت تهیه رقت برای هر رقت پی پت جداگانه مصرف نمایید.

حدود ۱۵ میلی لیتر محیط کشت V.R.B.A که دمای آن ۱± ۴۵ درجه سانتیگراد است داخل هر پلت بریزید. با حرکت چرخشی محیط کشت و نمونه را خوب مخلوط کنید. پلیت ها را بگذارید تا خنک شود و بصورت

جامد در بیاید. پلیت های کشت شده را بصورت وارونه و در گرمخانه ۱±۳۰ درجه سانتیگراد بمدت ۲±۲۴ ساعت نگهداری نمایید.

پس از اتمام دوره گرمخانه گذاری پلیت هایی که تعداد پرگنه های آن بیش از ده و کمتر از ۱۵۰پرگنه و کمتر از ۲۵۰ عدد است شمارش نمایید. پرگنه های قرمز مایل به ارغوانی با قطر حدو ۰/۵ میلی متر یا بیشتر که با هاله مایل به قرمز (ناشی از رسوب نمکهای صفراوی) احاطه شده‌اند را شمارش کنید. و در گزارش بعنوان تعداد کلی فرم در یک میلی لیتر ثبت نمایید. چنانچه تعداد کلنی ها در یک پلیت بیش از ۱۵۰ عدد می باشد TNTC (Too Numerous to Count) بنویسید.

با استفاده از رابطه زیر تعداد پرگنه‌های کلی‌فرم‌ها را محاسبه کنید.

$$N=\frac{\sum C}{(n_1+0/1n_2)f}$$

که در آن:

N تعداد پرگنه کلی‌فرم در گرم یا میلی‌لیتر آزمایه

$\sum C$ مجموع پرگنه‌های شمارش شده در بشقابهای پتری از دو رقت متوالی

N1تعداد بشقابهای پتری شمارش شده در اولین رقت

N2تعداد بشقابهای پتری شمارش شده در دومین رقت

f مقدار یا حجم آزمایه موجود در اولین رقت انتخابی برحسب گرم یا میلی‌لیتر

نتایج بدست آمده را تا دو رقم معنی‌دار گرد کنید. اگر عددی که باید گرد شود برابر۵ باشد رقم سمت چپ آن را طوری گرد کنید که عدد حاصل زوج باشد. برای مثال: عدد ۲۸۵۰۰ در صورت گرد شدن ۲۸۰۰۰می‌شود و ۱۱۵۰۰در صورت گرد شدن ۱۲۰۰۰می‌شود.

مثال روش محاسبه

اگر از شمارش پرگنه‌های کلی‌فرم زیر بدست آمده باشد:

در رقت 10^{-2} ،۱۳۸و۱۲۵پرگنه و در رقت 10^{-3}،۲۰و۱۸ پرگنه.با استفاده از رابطه و با قرار دادن یک عدد در آن

$$N=\frac{\sum C}{(n_1+0/1n_2)f}=\frac{۱۳۸+۱۲۵+۲۰+۱۸}{[۲+(0/1\times۲)]۱۰^{-۲}}=\frac{۳۰۱}{0/022}=۱۳۶۸۰$$

که با گرد کردن نتیجه بصورتی که در بالا گفته شد، حاصل آن برابر با۱۴۰۰۰یا $1/4\times10^4$ کلی‌فرم در گرم یا میلی‌لیتر فرآورده می‌باشد.

در صورتیکه پرگنه ها شکل کاملاً مشخصی نداشته باشد و مشکوک به کلی فرم باشید آزمایش تاییدی ضروری است.

آزمایش تاییدی

۵ پرگنه مشکوک را انتخاب کرده بوسیله سوزن کشت (انس پلاتین) به لوله آزمایش حاوی لوله دورهام و محیط کشتBGBLB معمولی تلقیح نمایید. لوله ها را در گرمخانه ۱±۳۰ درجه سانتیگراد بمدت ۲۴ ساعت نگهداری نمایید. وجود گاز پس از خاتمه اینکوباسیون نشانگر تایید کلی فرم می باشد.

تشخیص اشریشیاکلی

مقدمه :

اشریشیاکلی باکتری گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه می باشد. این باکتری می تواند در ۴۵ درجه سانتیگراد لاکتوز را تخمیر نموده و گاز ایجاد نماید و در همین دما قادر است تریپتوفان را تجزیه نموده و اندول تولید نماید. بعضی از انواع اشریشیاکلی بیماری زا قادر نیستند در ۴۵ درجه تکثیر شوند.

بعضی از انواع اشریشیاکلی بیماری زا قادر به تولید سم می باشند. سم تولید شده توسط این گروه نسبت به حرارت مقاوم بوده و درپاستوریزاسیون از بین نمی روند، گروه دیگری از این باکتریها با تکثیر در دستگاه گوارش موجب ناراحتی هائی مثل اسهال و یااسهال خونی می گردند. این گروه نسبت به حرارت حساسند و در

دمای سالم سازی شیر از بین می روند. منشا آلودگی مواد غذایی به اشریشیاکلی، فضولات حیوانات و بیماری ورم پستان است.

وجود اشریشیاکلی بهترین نشانگر آلودگی روده ای مواد غذایی است و بدلیل مخاطراتی که ایجاد می نماید بررسی آنها در مواد غذایی اهمیت زیادی دارد.

یادآوری می نماید یک میلی لیتر یا یک گرم از شیر و یا سایر فرآورده های پاستوریزه باید عاری از اشریشیاکلی باشد.

اساس روش

در این روش تشخیص اشریشیاکلی بر اساس تولید گاز در اثر تخمیر لاکتوز و ایجاد اندول از تجزیه تریپتوفان در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد می باشد.

روش آزمون

جستجوی اشریشیاکلی : زمانیکه هدف تشخیص اشریشیاکلی در یک میلی لیتر ویا یک گرم نمونه است و شمارش مورد نظر نمی باشد به صورت زیر عمل نمایید:

الف) آزمون احتمالی:

یک میلی لیتر از نمونه را به محیط کشت لوریل سولفات و یا لاکتوز براث اضافه نمایید. لوله های آزمایش را در اینکوباتور و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بمدت ۲۴ ساعت قرار دهید. پس از این مدت اگر در لوله های مذکور گاز ایجاد نشد به مدت ۲۴ ساعت دیگر اینکوباتورگذاری را ادامه دهید. در پایان چنانچه هیچگونه تولید گازی به اثبات نرسید، نمونه از نظر وجود کلی فرم و اشریشیاکلی منفی خواهد بود.

اگر لوله محتوی محیط کشت لوریل سولفات ویا لاکتوز براث بر اثر مصرف لاکتوز، گازایجاد نمود،می گوییم

احتمال وجود کلی فرمها در نمونه می باشد. زیرا ممکن است باکتریهای دیگری مانند استافیلوکوکوس اورئوس و یا بعضی از مخمرها و باسیلوسها در محیط باشند که آنها نیز می توانند لاکتوز را مصرف کنند. لذا باید در مرحله بعد آزمایش تاییدی را انجام داد.

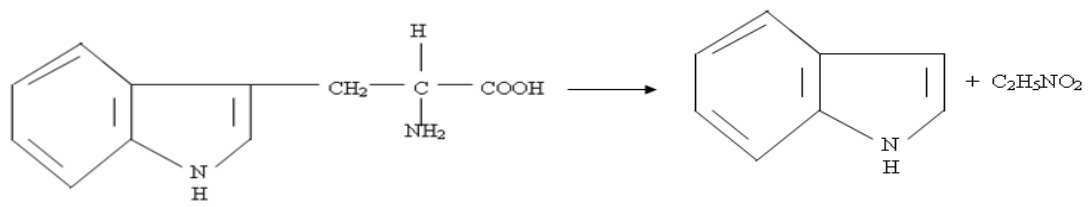
یادآوری)چنانچه نمونه موردنظر جامد باشد باید ۱۰ سی سی از رقت $\frac{1}{10}$ را در محیط کشت L.S یا L.b مضاعف تلقیح کنید.

ب) آزمون تاییدی:

در این مرحله جهت **تایید وجود کلی فرمها** در نمونه، یک سی سی از نمونه مرحله قبل را به محیط کشت بریلیانت گرین لاکتوز براث(BGBLb) و یا E.b انتقال دهید و در دمای°C ۴۴ به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری نمایید. در این مرحله به دلیل وجود مواد اختصاصی و دمای بالا فقط کلی فرمها می توانند لاکتوز را مصرف کرده وتولید گازنمایند و لذا دیدن حباب گاز در لوله درهام مؤید وجود کلی فرمها می باشد.

ج)آزمون تکمیلی:

پس از اطمینان از وجود کلی فرمها اکنون می توانیم به شناسایی E.coli بپردازیم. باید توجه داشت طبق آزمونهای IMVIC فقط اشرشیاکلی می تواند تریپتوفان را تجزیه کرده و تولید اندول نماید. لذا از نمونه مرحله قبل(بریلیانت گرین) یک میلی لیتر به محیط کشت Trypton water تلقیح کرده و در دمای°C ۴۴ درجه داخل اینکوباتور قرار دهید. پس از گذشت ۴۸ ساعت به لوله محتوی آب تریپتونه نیم میلی لیتر معرف کواکس اضافه کرده و خوب مخلوط نمایید. پس از یک دقیقه نتیجه را بررسی نمایید. اگر رنگ قرمز در سطح لوله ایجاد گردد، نشانه مثبت بودن واکنش اندول بوده و نمونه از نظر اشریشیاکلی مثبت تلقی می شود.



تبدیل اسیدآمینه تریپتوفان به اندول در اثرمتابولیسم میکروبی

بررسی متابولیسم سایر کلی فرمها طبق جدول IMVIC

متیل رد تست(Metyle Red Test)

کلی فرم های غیرهوازی مانند اشرشیاکلی قندها را تخمیر نموده و در نتیجه آن در مدت کوتاهی اسیدلاکتیک، اسید استیک، الکل اتیلیک، هیدروژن و گاز کربنیک به وجود می آورند.

تخمیر غیر هوازی کلی فرم ها به شرح زیر است:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CH_3\text{- }CH2OH\text{-}COOH+CH3\text{-}COOH+\ CO_2+\ C_2HCOH+H_2$$

همچنین تخمیر هوازی کلی فرم ها به صورت زیر است:

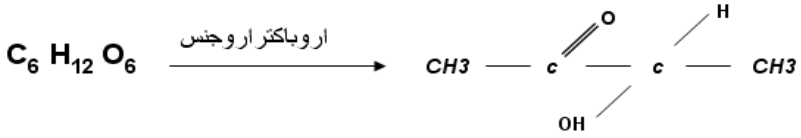
$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CO_2+H_2O$$

محیط کشتی که جهت انجام تست متیل رد مورد مصرف قرار می گیرد M.R.V.P می باشد. در این محیط کشت قند مورد مصرف دکستروز (گلوکز خالص) می باشد که مطابق آنچه در بالا شرح داده شده است در غیبت اکسیژن به ترکیبات مختلف ودر حضور اکسیژن تنها به آب و گاز کربنیک تبدیل می شود .جهت انجام آزمایش پرگنه مشکوک به اشرشیاکلی ویا از محیط کشت بریلیانت گرین لاکتوز براث به محیط کشت M.R.V.P انتقال داده و به مدت دو روز اینکوباتورگذاری می کنیم. پس از گذشت زمان مورد نظرچند قطره معرف متیل رد به آن اضافه می کنیم. چنانچه اشرشیاکلی در محیط باشد در اثر فعالیت اسید تولید می کند و در نتیجه در صورت

افزودن معرف به محیط رنگ قرمز پدیدار می گردد. زرد یا نارنجی شدن محیط پس از افزودن معرف دلیل بر عدم وجود اشرشیا و منفی بودن آزمایش می باشد.

وي.پي (ووگوس پروسکوئر) تست (Voges-proskaurs Test)

این آزمایش جهت بررسی وجود کلی فرم هوازی صورت می گیرد و اساس آزمایش بر مبنای تولید ترکیبی به نام استیل متیل کاربینول (استوئین) از قند گلوکز (شکل۲) توسط این باکتری می باشد.



تبدیل گلوکز به استوئین در اثر متابولیسم باکتری انتروباکتر

محیط کشت مورد استفاده جهت انجام تست وی.پی محیط M.R.V.P می باشد. جهت انجام آزمایش پرگنه مشکوک به انترو باکتر را در محیط فوق کشت داده و به مدت ۲ تا ۳ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد اینکوباتورگذاری می کنیم. پس از تکان دادن لوله های فوق مقدار ۱ میلی لیتر از آنرا به داخل یک لوله استریل خالی انتقال داده و روی آن ابتدا ۰.۶میلی لیتر (۱۲ قطره) محلول آلفا نفتل (۴درصد درالکل اتیلیک) و سپس ۰.۲ میلی لیتر (۴ قطره) پتاس ۴۰ درصد افزوده و بعد از تکان دادن و مخلوط کردن کامل آنها با یکدیگر لوله فوق را به مدت حداقل ۱۰ دقیقه در جای ثابت قرار می دهیم . ظاهر شدن رنگ صورتی تا قرمز نشان دهنده مثبت بودن آزمایش و تولید استیل متیل کاربینول می باشد.

واکنشهای IMVIC در کلی فرمها

Type	Indole	Metyle Red	VP Tese	citrate
E.coli	+	+	−	−
Entrobacter	−	−	+	+
kelebsiella	−	−	+	+

Citrobacter	−	−	−	+

نکته مهم:

از آنجائیکه شمارش کلی فرمها در محیط کشتVRBA در بسیاری از نمونه ها انجام می گیرد لذا در صورت وجود کلی فرم و ایجاد پرگنه در محیط می توان به شناسایی اشرشیاکلی پرداخت ودر صورت عدم وجود پرگنه دیگر نیازی به انجام آزمایش شناسایی E.coli نیست.

در مورد نمونه های کلی فرم مثبت در محیط کشت VRBA بمنظور شناسایی اشریشیاکلی بصورت زیر عمل گردد:

از پرگنه های ظاهر شده روی پلیت بوسیله آنس به لوله های محتوی محیط کشت بریلیانت گرین منتقل می نماییم تا وجود کلی فرمها تایید شود و دیگر به انجام مرحله احتمالی نیست. در ادامه می توان مانند روش گفته شده در قبل آزمایش را تا انتها ادامه داد.

نتیجه گیری :

تولید گاز در محیط BGBLB و تولید اندول درT.W نشانگر وجود اشریشیاکلی است و اگر هریک از واکنش های فوق ظاهر نشود اشریشیا منفی است.

تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس (کوآگولاز مثبت)

مقدمه :

یکی از متداولترین مسمومیت ها، مسمومیت استافیلوکوکی است که توسط باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس می تواند پس از تولید زهرابه یا سم انتروتوکسین در ماده غذایی مورد مصرف در انسان ایجاد مسمومیت کند.

باکتریهای استافیلوکوک به همراه باکتریهای میکروکوک و سارسینا تشکیل دهنده خانواده ای به نام میکروکوکاسه می باشند.

این باکتریها قادر به اثر گذاری در غذاهای عمدتا پروتئینی هستند. این غذاها شامل گوشتهای قرمز چرخ شده، همبرگر، فراورده های گوشتی مانند سوسیس، کالباس، فراورده های لبنی مانند شیر هموژنیزه، پنیرو خامه می باشد که در حدی گسترده تر نسبت به سایر غذاها موجب مسمومیت می شوند. چنانچه این باکتریها و عمدتا استافیلوکوکهای با گونه اورئوس بتوانند غذا را آلوده کنند تحت شرایط مناسب می توانند با افزایش جمعیت به شرایط مطلوب برای تولید سم انتروتوکسین دسترسی پیدا کنند. چنانچه تعداد میکروبها در هر گرم غذا به حدود 10^6 یا بیشتر برسد. زهرابه تولید شده در غذا می تواند پس از گذشت حداقل ۱ تا ۲ ساعت و حداکثر ۱۰ تا ۱۲ ساعت موجب بروز آثار مسمومیت در مصرف کننده غذا بشود. این آثار معمولا شامل سردرد، شکم درد، اسهال، استفراغ و دردهای شدید ماهیچه ای است چون سم این باکتریها از وزن مولکولی بالایی برخوردار است تا زمان دفع نشدن سم آثار مسمومیت نیز باقی می ماند.

عواملی که باعث انتخاب این مواد غذایی توسط باکتری استافیلوکوک جهت رشد می شود شامل: در دسترس بودن منبع پروتئینی در این غذاها (این باکتری پروتئولیتیک قوی است و می تواند باآنزیم های پروتئاز باندهای پروتئینی را بشکند)، **pH** مناسب برای فعالیت این باکتری و تولید سم در این غذها فراهم است.چون استافیلوکوکهای مولد مسمومیت ضمن اینکه پروتئولیتیک قوی هستند از نظر تجزیه چربیها لیپولیتیک ضعیف می باشند. چنانچه مواد غذایی را به شکل خورد شده و تجزیه شده قرار بدهیم باکتری می تواند هم از پروتئین و هم از لیپید آن استفاده کند. بنابراین عمل هموژنیزه کردن شیر و خرد کردن دلمه پنیر و زدن خامه باعث مساعد شدن محیط جهت فعالیت باکتری نسبت به حالت خرد نشده آن می شود.

استافیلوکوکوس اورئوس (**Staphylococcus aureus**) باکتری گرم مثبت , کاتالاز مثبت , کروی و بدون حرکتی است که گلوکز را در شرایط هوازی تخمیر کرده و بصورت توده‌ها و یا خوشه‌های نامنظم و یا زنجیره‌های کوتاه دیده می‌شود . و در روی محیطهای خوندار پرگنه های طلائی رنگ تولید می کند . گرچه این صفت یک ویژگی پایدار نیست و برخی از پرگنه‌ها ممکن است بیرنگ و یا سفید رنگ باشند . ایجاد همولیز بر روی محیط نیز یک ویژگی تغییرپذیر است ولی سویه‌های (سوش) بیماری زا همولتیک می‌باشند .

بیشتر سویه‌های استافیلوکک طلائی در تراکم‌های نسبتاً بالا از کلرور سدیم ۷/۵٪ الی ۱۰٪ رشد کرده و قادر به تخمیر مانیتول هستند (مانیتول مثبت) این صفت در بازشناسی استافیلوکوکوس اورئوس از استافیلوکوکوس اپیدرمیدی(**S.epidermidis**) و (**S.albus**)که مانیتول منفی است بکار میرود .استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از نظر شکلی مانند استافیلوکوکوس اورئوس است ولی کوآگولاز منفی می‌باشد .

روش شناسایی

۱- محیط های کشت مورد نیاز

الف - محیط کشت گوشت پخته نمک دار (Cooked Meat,Salted)

ترکیب محیط

قلب یا جگر گاو	۴۵۰ گرم
پپتون یا پروتئوزپپتون	۲۰ گرم
گلوکز	۲ گرم
کلرور سدیم	۱۰۰ گرم

این محیط بصورت تجارتی در دسترس می باشد . محیط را مطابق دستور سازنده تهیه نمایید و به ازاء ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت باید ۹ گرم نمک وجود داشته باشد . این محیط باید در لوله های مخصوص در پیچ دار آماده و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شود.

ب- محیط برد پارکر آگار (Baird Parker Agar)

ترکیب محیط کشت

پپتون	۱۵ گرم
عصاره گوشت	۵ گرم
کلرور لیتیوم	۵ گرم
عصاره مخمر	۱ گرم
آگار	۱۷ گرم
گلایسین	۱۲ گرم
پیروات سدیم	۱۰ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

-pH نهایی محیط باید ۶/۸ الی ۷ باشد.

- این محیط بصورت تجارتی در دسترس می باشد.

مراحل تهیه محیط بردپارکرآگار

طرز تهیه تلوریت پتاسیم:

یک گرم تلوریت پتاسیم را در شرایط کاملاً بهداشتی به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل افزوده و خوب هم بزنید.

سوسپانسیون زرده تخم مرغ

یک تخم مرغ تازه و سالم را در ظرفی محتوی الکل سفید به مدت یک ساعت به حالت غوطه ور قرار دهید . سپس در مقابل شعله با وسائل سترون (پنس وغیره) سفیده را کاملاً از زرده جدا کنید. زرده را به استوانه مدرج استریل منتقل و سپس بوسیله هم زن شیشه ای کاملاً یکنواخت و هم حجم آن تدریجاً سرم فیزیولوژی استریل بیفزایید و هم بزنید.

محیط کشت بردپارکر را مطابق دستورالعمل سازنده آماده نمایید. سپس آن را به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو ۱۲۱ درجه سانتی گراد استریل کنید . پس از سرد شدن محیط کشت در بن ماری ۱±۴۵ درجه سانتی گراد ، به ۱ لیتر محیط کشت ۱۰ میلی لیتر تلوریت پتاسیم یک درصد و ۵۰ میلی لیتر سوسپانسیون زرده تخم مرغ افزوده و خوب هم بزنید (دقت شود در موقع هم زدن کف ایجاد نگردد) . محیط آماده شده را به میزان ۱۵ تا ۲۰ میلی لیتر در پلیتهای استریل در مقابل شعله تقسیم نمایید . این محیط را می توان در یخچال حداکثر تا ۱۵ روز نگهداری نمود.

۲- روش آزمون

۲-۱- تکثیر مقدماتی

قبل از آزمایش نمونه را به منظور سیال شدن تا ۳۰ درجه سانتیگراد گرم نمایید . بلافاصله پس از گرم کردن ، بوسیله پی پت ۱میلی لیتری استریل، ۱ میلی لیتر از نمونه را به لوله در پیچ دار محتوی محیط کشت **Cooked Meat** منتقل نمایید . لوله ها را بمدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد قراردهید.

۲-۲- کشت روی نمونه محیط کشت بردپارکر

از نمونه کشت داده شده در محیط کشت کوکدمیت بوسیله یک پی پت ۱ میلی لیتری استریل نیم میلی لیتر روی سطح محیط بردپارکر منتقل نموده و بوسیله میله شیشه ای راد و یا لوپ به خوبی در سطح محیط پخش نمایید. آنگاه ظروف پتری را در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت قرار دهید. پس از این مدت پرگنه های استافیلوکوکوس اورئوس به رنگ سیاه براق با لبه نازک سفید و هاله شفاف در اطراف آن (در اثر تجزیه لیستین) آشکار می گردد.

تست های بیوشیمی

۱- تست کاتالاز

برای انجام آزمون کاتالاز یک لام شیشه ای تمیز را انتخاب نموده ، با کمک سوزن آنس از پرگنه های تفکیک شده در محیط کشت مانیتول سالت آگار بر روی لام انتقال می دهیم.

قبل از انتقال پرگنه بایستی روی لام یک قطره محلول پراکسید هیدروژن(۳٪ H_2O_2) قرار دهیم. پس از انتقال پرگنه، پرگنه را با کمک سوزن آنس کاملاً در محلول H_2O_2 پخش می نماییم.

سپس روی ترکیب فوق قطره پرمنگنات پتاسیم ۰/۰۱ نرمال می افزاییم. در صورت کاتالاز مثبت بودن ، محلول پرمنگنات ایجاد رسوب قرمز آجری می نماید و پرمنگنات پتاسیم کم رنگتر می گردد.

۲- تست ژلاتیناز

برای انجام این آزمایش درون محیط کشت ژلاتین (که در لوله آزمایش به صورت ایستاده قبلاً تهیه شده) با کمک سوزن آنس یک پرگنه از پرگنه های محیط کشت مانیتول سالت آگار را در داخل ژلاتین تلقیح می نماییم. پس از گذشت ۲۴ ساعت لوله آزمایش فوق را که به صورت مایع می باشد درون یخچال قرار می دهیم. اگر در دمای۴ درجه سانتی گراد محیط کشت مجدداً جامد گردد ، نشانه عدم فعالیت آنزیم ژلاتیناز می باشد. اما

اگر محیط کشت مذکور در دمای یخچال(۴ ۰C) همچنان مایع باقی بماند ، معرف فعالیت آنزیم ژلاتیناز توسط باکتری است. اگر آنزیم ژلاتیناز اثر کند محصول هیچ وقت دوباره ژله ای نمی شود.

همچنین می توان برای مشخص نمودن فعالیت آنزیم ژلاتیناز از محلول کلرورمرکوریک در اسیدکلریدریک استفاده کنیم. در صورت افزودن این محلول به ژلاتین مایع ایجاد رسوب سفید رنگ می نماید که نشان دهنده عدم فعالیت آنزیم ژلاتیناز و عدم هیدرولیز ژلاتین می باشد. اما اگر در صورت افزودن این محلول هاله ای روشن ایجاد گردد ، نشانه هیدرولیز ژلاتین و فعالیت آنزیم ژلاتیناز است.

۳- آزمایش کوآگولاز

پس از پیدایش پرگنه های سیاه رنگ روی محیط بردپارکر به تعداد جذر پرگنه ها بردارید و آزمایش کوآگولاز را در مورد آن ها انجام دهید .

آزمایش کوآگولاز به روش زیر انجام می شود.

الف)روش سریع: در هرانتهای یک لام یک قطره محلول رینگر $\frac{1}{4}$ ریخته و مقداری از پرگنه مورد آزمایش را با آن مخلوط کنید که به عنوان شاهد منظور می شود . به لام دیگر یک قطره پلاسمای رقیق نشده خرگوش یا انسان اضافه کنید.۵ ثانیه توسط سوزن کشت پلاسما و پرگنه را هم بزنید . در صورت وجود آنزیم کوآگولاز، قطره حاوی پلاسما بصورت گلوله ای در می آید که نشانه مثبت بودن آزمایش است .

ب)روش آهسته : در یک لوله آزمایش ۰/۵ میلی لیتر از پلاسمای سیتراته خرگوش را که چهار بار رقیق شده با حجم مساوی از محیط کشت نوترینت براث محتوی کشت ۲۴ تا ۳۰ ساعته استافیلوکوک مورد آزمایش مخلوط کرده و در لوله دیگر ۰/۵ میلی لیتر پلاسمای سیتراته را به ۰/۵میلی لیتر محیط کشت نوترینت براث استریل برای کنترل پلاسما بعنوان شاهد منفی بیفزائید و یک الی چهار ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید . (لوله‌های منفی را تا ۲۴ ساعت در گرمخانه نگهداشه و سپس بررسی کنید .) چنانچه استافیلوکوک

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 . عدم لخته و یا وجود لخته‌های کوچک جدا از هم (۱+) مثبت بحساب نمی آید و با مراجعه بشکل زیر حالات ۲+ ،۳+ و ۴+ مثبت محسوب می شوند .

یادآوری : چنانچه در آزمایشگاه سویه (سوش) استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز (+) وجود داشته باشد بهتر است بعنوان شاهد مثبت در یک لوله دیگر ۰/۵ میلی لیتر پلاسمای سیتراته و ۰/۵ میلی لیتر از کشت تازه استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز (+) را مخلوط کرده و در گرمخانه قرار دهید .

روش جستجو و شمارش قارچها (کپک‌ها و مخمرها) به روش شمارش پرگنه

١- هدف و دامنه کاربرد:

هدف از انجام این آزمایش ارائه روش کلی برای شمارش کپک‌ها و مخمرها در موادغذایی به روش شمارش پرگنه در ٢٥ درجه سانتی گراد می باشد .

٢- تعریف:

در این روش منظور از کپک و مخمر میکرو اورگانیسم‌هایی هستند که در دمای ٢٥ درجه سانتی گراد بر روی محیط کشت YGC پرگنه مشخص تولید می کنند .

٣- اساس آزمایش:

١- حجم مشخصی از نمونه مورد آزمون در صورت مایع بودن یا حجم مشخصی از رقت موردنظر در مورد مواد غذایی جامد و محیط کشت انتخابی به صورت کشت مخلوط به پلیت اضافه می گردد .

٢- پلیت‌ها مدت ٣, ٤ یا ٥ روز در شرایط هوازی و ٢٥ درجه سانتی گراد نگهداری می شوند .

٣- پرگنه‌های کپک و مخمر مورد بررسی و شمارش قرار می گیرند و تعداد آنها در یک گرم یا یک میلی لیتر از نمونه گزارش می شود .

٤- محیط کشت و محلولهای مورد نیاز

به منظور حصول نتایج بهتر استفاده از محیط تجارتی توصیه می گردد که بایستی طبق دستور سازنده عمل شود . کلیه مواد شیمیایی که در آزمایش بکار می روند باید از خلوص کامل برخوردار باشند . آب مورد استفاده نیز بایستی آب مقطر و عاری از هرگونه مواد بازدارنده برای رشد کپک‌ها و مخمرها باشد .

در مواردی که محیط کشت و محلول رقیق کننده بلافاصله مورد استفاده قرار نمی گیرند به شرطی که تغییری در ترکیبشان ایجاد نگردد تا یک ماه در تاریکی و صفر تا پنج درجه سلسیوس قابل نگهداری می باشد .

محیط کشت عصاره مخمر – دکستروز – کلرامفنیکل آگار

(Yeast extract- dextrose- chloramphenicol- agar)

نام مواد	مقدار	
عصاره مخمر	۵ گرم	Yeast extract
دکستروز	۲۰ گرم	Dextrose (C6H12O6)
کلرامفنیکل	۰/۱ گرم	Chloramphenicol (C11H12Cl2N2O5)
آگار	۱۵ گرم	Agar
آب مقطر	۱ لیتر	Distilled Water

روش تهیه

ترکیبات فوق را با جوشانیدن در آب حل نموده و سپس در ظروف مناسب تقسیم و در اتووکلاو۱۲۱درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل نمائید . pH نهایی محیط بایستی ۶/۶ باشد .

گاهی ممکن است اکسی‌تتراسایکلین به جای کلرامفنیکل استفاده شود که در این صورت محیط پایه را به روش فوق تهیه و کلرامفنیکل را حذف کنید . سپس محلول ۰/۱ درصد از اکسی‌تتراسیکلین هیدروکلراید در آب تهیه و توسط صافی سترون نموده و در هنگام آزمایش ۱۰ میلی لیتر از محلول را به ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت ذوب شده که دمای آن در حدود ۴۵درجه سانتی گراد است اضافه نمائید .

در صورتیکه محیط تجارتی در دسترس است طبق دستور سازنده عمل نمائید .

محلول رنگ‌آمیزی لاکتوفنل کاتن بلو (Lactio phenol cotton blue)

نام مواد	مقدار	
فنل	۲۰ گرم	Phenol
اسید لاکتیک	۲۰ گرم	Lactic acid
گلیسرین	۴۰ گرم	Glycerine
پودر کاتن بلو	۵۰ میلی گرم	Cotten blue powder
آب مقطر	۲۰ میلی لیتر	Distilled water

روش تهیه :

ابتدا فنل را به آب مقطر اضافه نموده , حرارت دهید تا کاملا حل شود. سپس اسیدلاکتیک و گلیسرین را به آن بیافزائید و پس از تهیه محلول لاکتوفنل , پودر کاتن بلو را به آن اضافه نموده و به آرامی به هم بزنید .

۵- روش کار

بطور جداگانه به هر یک از پلیت‌ها یک میلی لیتر از نمونه مورد آزمون , در صورت مایع بودن و یا یک میلی لیتر از رقت را در مورد فرآورده‌های غیرمایع اضافه نمائید . در صورت لزوم همین عمل را برای رقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ تکرار کنید .

سپس ۱۵ میلی لیتر از محیط کشت YGCذوب شده که دمای آن در حدود ۴۵ درجه سانتی گراد می باشد را به هر یک از پلیت‌ها اضافه و به آرامی آنها را مخلوط نمائید . توجه داشته باشید که فاصله زمانی بین تهیه رقت و اضافه نمودن محیط کشت به پلیت‌ها از ۱۵ دقیقه تجاوز ننماید .

پس از مخلوط شدن نمونه مورد آزمون و محیط کشت , تا جامد شدن محیط پلیت‌ها را بر روی سطح صاف و خنک قرار دهید , سپس آنها را مدت ۳ الی ۵ روز در ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری نمائید .

٦- تفسیر نتایج

پرگنه‌ها را بعد از۳،۴و۵ روز بررسی نموده و نتیجه را پس از ۵روز در پلیت‌هایی که کمتر از ۱۵۰ پرگنه دارند شمارش و گزارش کنید .

در صورتیکه بعضی از قسمتهای پلیت با رشد بیش از حد کپک‌ها پوشانده شده است و شمارش پرگنه‌های مجزا مشکل می باشد , پرگنه‌های شمارش شده در روزهای سوم یا چهارم را گزارش نمائید .

در صورت لزوم به منظور تشخیص مخمرها از باکتریها آنها را در زیر میکروسکوپ بررسی کنید .

۷- روش‌های مطالعه میکروسکوپی ساختمان قارچهای کپکی:

توسط سوزن سرکج پلاتینی قسمت کوچکی از پرگنه قارچ را برداشته و بر روی لام حاوی یک قطره محلول لاکتوفنل کاتن بلو قرار داده و با لامل سطح آن را بپوشانید .

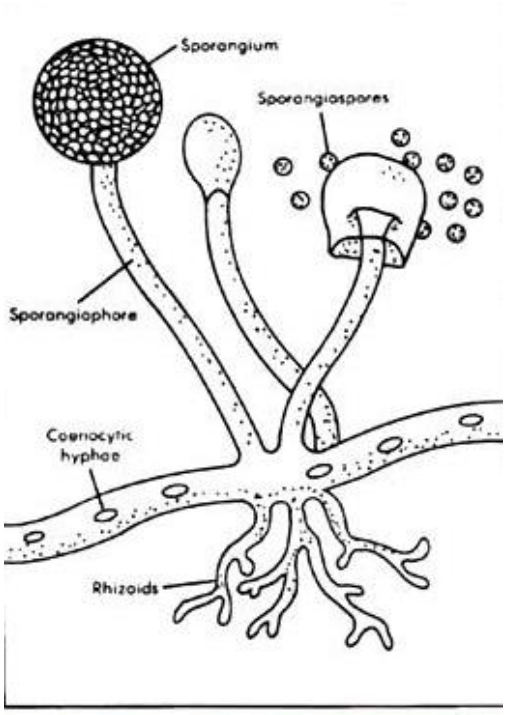
سپس رنگ اضافی را خارج نموده و در زیر میکروسکوپ با عدسی با بزرگنمایی ۱۰ و در صورت لزوم با عدسی با بزرگنمایی ۴۰ قارچ را مورد بررسی قرار دهید.

مشخصات تعدادی از کپکهای مهم در صنایع غذایی: کپکهایی که در مواد غذایی دیده می شوند معمولا جزء فیکومیستها می باشند(قارچهای کامل) و یا در رده قارچهای ناقص(Deutromycets) طبقه بندی می گردند.از رده فیکومیستها زیر رده زیگومیست،خانواده Mucuracea و جنسهای زیر اهمیت دارند که همگی فاقد دیواره اند.

۱-**Mucore:** فاقد دیواره عرضی است.دارای اسپورانژیوفورهایی است که روی آنها کلیه اعضاء کپک بوجود می آیند. فاقد Stolon و فاقد ریزوئید است.کلوملا حالتی گرد، استوانه ای یا گلابی شکل دارد.

گونه های مختلف موکور باعث فساد مواد غذایی می شوند و بعضی در فرایندهای صنعتی شرکت می کنند.

۲-Rhisopus: از لحاظ ظاهری مشابه موکور ولی از لحاظ میکروسکوپی متفاوت است.به دلیل تولید ریزوئید به آن رایزوپوس مس گویند. قارچ سریع الرشدی بوده و کلنی های آن در ابتدا سفید و بعدا خاکستری رنگ با نقاط سیاه دیده می شود.دارای استولون بوده و کلوملای کاملا نیمکروی دارد.در



محل نود(گره) معمولا دو اسپورانژیوفور می روید.

گونه مهم آن **R.Stolonifer** بوده که به کپک نان مشهور بوده و عامل فساد نرم در توت فرنگی و سیب زمینی است.

۳-Absidia: فاقد ریشک یا ریزوئید بوده اما دارای استولون می باشد. اسپورانژیوفورهای به صورت **Internode** بوده و اسپورانژیوفورهای آن گلابی شکل است. مانند آبسیدیا کوریمبیفرا که به سیستم عصبی حمله کرده و کشنده است.

۴-Thaminidium: این جنس دو نوع اسپور دارد۱- اسپورهایی که در اسپورانژیوم های بزرگ در انتهای اسپورانژیوفور تشکیل می شود.۲- اسپورهایی که در اسپورانژیولها یا اسپورانژیومهای کوچک تشکیل می

گردند.این کپکها در دمای ۱۳- نیز بر روی گوشت رشد می کنند. به طوریکه تامینیدیوم الگانس باعث رشد در گوشتهای منجمد شده و باعث ریش ریش شدن گوشت(**Whisher rot**) شود.

مهمترین قارچهای ناقص(Deutromycets):

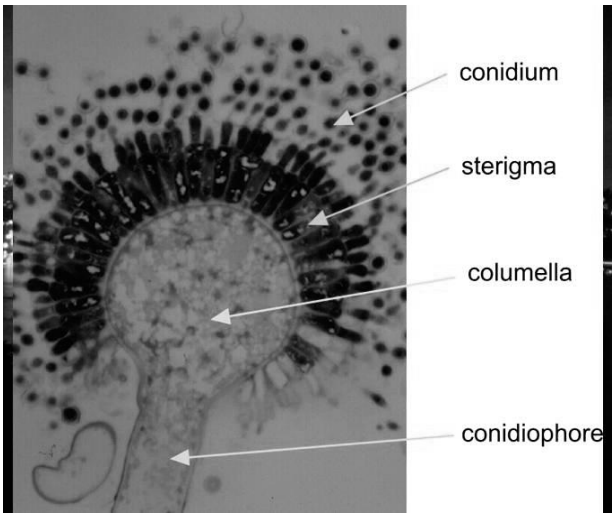
۱-جنس آسپرژیلوس: گونه های این جنس شدیدا در محیط پراکنده اند و از نظر پراکندگی در درجه اول قرار دارند. در این کپکها کونیدیوفورها در انتها به صورت یک برجستگی به نام Vesicle بوده که بر روی آنها استریگما قرار دارد.ریسه این قارچها معمولا بی رنگ است و اسپورها،سیاه،زرد،سبز و قهوه ای می باشد.کونیدیوفورها راست، مستقیم و غیر منشعب

می باشد. بوده و بر خلاف پنی سیلیوم فاقد دیواره عرضی است. کونیدیوفورها از روی محیط بلند می شوند .البته نه به اندازه گونه های خانواده موکوراسه.

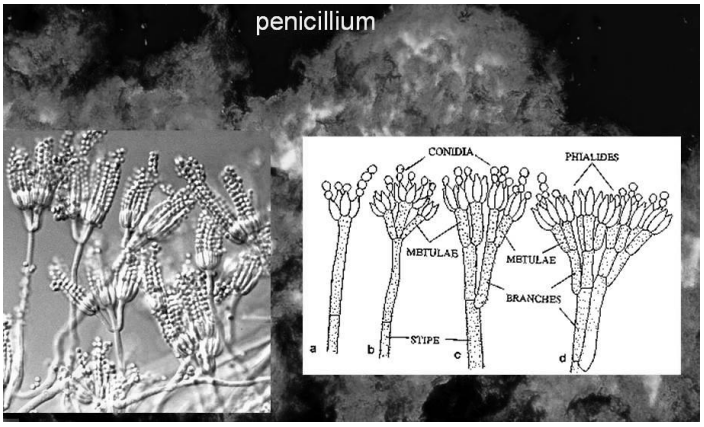
لازم به ذکر است بعضی جنسهای آسپرژیلوس نظیر فلاووس و پارازیتیکوس مولد سم آفلاتوکسین هستند.این سم مقاومترین سم تولید شده توسط میکروارگانیسمها است که تا کنون شناخته شده است.

۲-پنی سیلیوم:این جنس نسبت به آسپرژیلوس پراکندگی کمتری داشته اما در صنعت غذا و دارو اهمیت فراوانی دارد.کونیدیفور منشعب دارد و دارای دیواره عرضی است. مایکوتوکسینهای زیاد تولید می کند

مانند سیترینین، اوکراتوکسین، پاتولین، اسید پنی سیلیک، آفلاتوکسین و سموم زرد برنج می توان نامبرد.



گونه های پنی سیلیوم معمولا در محیط کشت تولید کلنی هایی با سطح مخملی با رنگهای سبز و سبز- آبی می نماید. معمولا فساد ناشی از پنی سیلیوم را فساد سبز و سبز- قهوه ای می گویند. برای مثال پنی سیلیوم اکسپانسوم عامل فساد قهوه ای در سیب و گلابی و فساد سبز در تخم مرغ و نان است.



جنسهای مهم دیگر در فساد مواد غذایی:

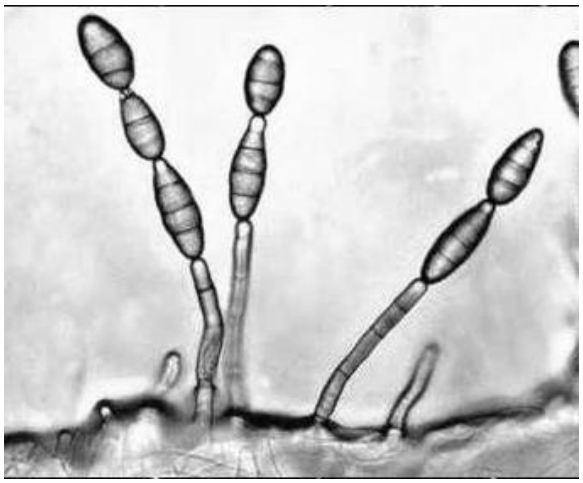
۱- اسپوروتریکوم

۲- ورتی سیلیوم

۳- فوزاریوم

۴- کلادسپوریوم

۵- آلترناریا



روش جستجوی سالمونلا

مقدمه :

سالمونلاها باکتریهایی میله ای شکل ، بی هوازی اختیاری ، گرم منفی و متعلق به خانواده انتروباکتریا سه می باشند. معمولا همه سالمونلاها ، به استثنای سالمونلا پولاروم و گالیناروم ، توسط تاژک قادر به حرکت هستند. این باکتری‌ها از مواد آلی و شیمیایی تغذیه کرده و دارای دو نوع متابولیسم تنفسی و تخمیری می‌باشند. دمای مطلوب رشد آنها ۳۷°C و pH مناسب رشد آنها ۷/۶ می باشد. محل زندگی طبیعی آنها لوله گوارش انسان و حیوانات می باشد. اکثراً بیماری زا و در مواد غذایی پروتئینی خصوصا گوشت ماکیان و تخم مرغ قابل تکثیر می باشند. تمام سالمونلاها متعلق به دو گونه بونگاری و کلراسوئیس می‌باشند . مهمترین و مضرترین سالمونلاها که در انسان عوارضی ایجاد می‌کنند عبارتند از : سالمونلاتیفوزا, سالمونلاپاراتایفی , سالمونلاتایفی موریوم, سالمونلا آنتریتیدیس, سالمونلااسکوت مولری. سالمونلاها در عمل پاستوریزاسیون دقیق و کامل شیر و در عمل بسته‌بندی به صورت اسپتیک کاملا از بین رفته و در صورت عدم دقت در مراحل مختلف پاستورایزسیون و یا استریلیزاسیون و فرایندهای دیگر حرارتی از قبیل پخت ، امکان باقی ماندن باکتری وجود خواهد داشت . ناراحتی حاصل از آنها همواره با تب و ناراحتی معده ای و روده ای همراه است. سالمونلاها در دمای پاستوریزاسیون از بین می روند و در صورت عدم رعایت موازین بهداشتی در فرآیند تولید موجب آلودگی محصول می گردند. در صورت آلودگی در فرایند تولید پنیر و یا سایر فراورده های لبنی ، سالمونلاها تکثیر پیدا می کنند. با کاهش pH رشد و تکثیر آنها متوقف می گردد به طوریکه pH کمتر از ۴/۵۵ موجب مرگ تدریجی سالمونلا می گردد. عامل عمده در مسمومیت سالمونلوسیس ، سالمونلا تایفی موریوم می باشد. ۱۲۴ گونه و دهها زیرگونه در سالمونلاها مشاهده

شده است. سالمونلا تایفی موریوم باسیلی شکل، گرم منفی، هوازی- بی هوازی اختیاری و قادر به تحمل و فعالیت در اندامهای گوارشی انسان و حیوان می باشد.

این باکتریها باسیلهای نسبتا کوتاه با طول حداقل ۱ تا حداکثر ۳ میکرون و عرض ۰.۸ تا ۱ میکرون می توانند تحت مشاهدات میکروسکوپی مورد شناسایی واقع شوند. سالمونلا تایفی موریوم نسبت به سایر سالمونلاها به علت اینکه از عرض یا قطر بیشتری در ساختمان سلولی خود برخوردار بوده و از طرفی مواد داخل سلول آنها به شکل نقاط تیره رنگ در بخش مرکزی یا دو انتهای سلول آنها دیده می شود در هنگام تهیه لام مناسب و انجام رنگ آمیزی گرم به خوبی قابل شناسایی می باشد. معمولا منشا عمده باکتریهای سالمونلا و هم خانواده آنها در بدن پرندگان از جمله خروس و مرغ و فراورده های آنها نظیر تخم مرغ، سالاد الویه و همچنین در شیر و لبنیات ، انواع ساندویچ، گوشتهای قرمز و انواع کتلت می باشد.

باکتریهای معروف انتروباکتریاسه ها شامل سالمونلا، شیگلا، پروتئوس، سراتیا، اشرشیا، اروباکتر و سیتروباکتر می باشند. بعضی ها هوازی- بی هوازی اختیاری بوده و قادرند در دستگاه گوارش انسان و حیوان فعال باشند و برخی نیز نیترات را به نیتریت جهت کسب انرژی تبدیل می کنند. تفاوت عمده باکتریهای خانواده انتروباکتریاسه به ویژه سالمونلا و باکتریهای مشابه از کلی فرم های وابسته نظیر اشرشیاکلی و انتروباکتر توانایی تخمیر قند گلوکز و عدم توانایی تخمیر قند لاکتوز و ساکارز می باشد.

توجه:چون تخم مرغ ها در تماس با اندام های گوارشی پرندگان هستند بنابراین می تواند آلوده به سالمونلا باشد وبه دلیل مزوفیل بودن این باکتریها بهترین منبع انتشار بدن پرندگان (دمای ۳۷ درجه) می تواند باشد. این باکتریها در سرما مقاومت زیادی دارند . این باکتریها در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه از بین می روند به شرط اینکه حرارت به تمام مواد غذایی برسد. احتمال وجود سالمونلا در غذاهای کمی اسیدی (**pH=6-7**) بیشتر می باشد. بهترین محل فعالیت سالمونلا در اندامهای گوارشی است و در طول مسیر گوارش

انسان از طریق تغذیه غذای همراه با محیط گوارشی شروع به تطبیق، رشد و تکثیر می کند. غذاهایی که سنگین هستند مانند سالاد الویه و ساندویج دیر هضم می شوند و فرصت کافی برای تکثیر و تطابق باکتری را فراهم می کند. سم سالمونلا از نوع اندوتوکسین می باشد زیرا داخل سلول باکتری تولید می شود و هم داخل بدن تولید می شود. اگر تعداد سالمونلا در هر گرم به ۱۲۵۰۰۰۰ عدد برسد و قدرت تولید سم هم داشته باشد باکتریها از فاز لگاریتمی به فاز سکون و سپس فاز مرگ وارد می شوند.

در فاز مرگ چون دیواره سلولی دچار تجزیه می شود سم تولیدی (اندوتوکسین) آزاد می شود. سم تولیدی در اولین نقطه نزدیک ترکه غالبا جداره داخلی اندام های گوارشی است ایجاد عفونت کرده و نوعی بیماری یا مسمومیت ایجاد می کند. در این لحظه سم در تمام بدن پراکنده شده و مسموم دچار شکم درد و دلدرد می شود. وزن مولکولی سم استافیلوکوک ۸۰ هزار به بالا و سم سالمونلا ۱۲۰ هزار به بالا است. سم هردو باکتری از جنس لیپوپلی ساکاریدی بوده و حداقل زمان برای بروز مسمومیت ۱۲ تا ۱۶ ساعت وحداکثر ۲۴ تا ۳۶ ساعت است. ممکن است سم از طریق مدفوع دفع شود. حال اگر مدفوع مرغ را آلوده به سالمونلا در نظر بگیریم امکان آلودگی پوسته تخم مرغ نیز وجود دارد. این مسمومیت را از نوع کند یا داخلی نیز می نامند .

برای آنکه بتوانیم وجود باکتریهای سالمونلا یا هم خانواده آنها را از طریق آزمایشات میکروبی مناسب شناسایی نماییم ضروری است از محیط کشت ها، ابزار و شرایط خاصی استفاده نماییم که بتوان در صورت وجود حتی تعداد بسیار محدودی از این باکتریها آنها را مورد شناسایی لازم قرار داد.

محیط های کشت لازم

الف – محیط کشت پپتون واتر

ترکیب محیط کشت و روش ساخت مطابق دستورالعمل ارائه شده در برچسب روی قوطی می باشد. محیط آماده شده را در ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری به میزان ۲۲۵ میلی لیتر توزیع نموده و با استفاده از اتوکلاو استریل نمایید.

ب- محیط کشت سلنیت براث

ترکیب : پپتون ۴ گرم ، لاکتوز ۴ گرم ، دی فسفات دی سدیک ۵ گرم ، فسفات دی هیدروژن پتاسیک ۵ گرم، سلنیت سدیم ۵ گرم ، ال سیستین ۱۰ میلی گرم.

طرز تهیه : مواد فوق را در یک لیتر آب حل کرده در لوله های آزمایش استریل به میزان ۱۰ میلی لیتر تقسیم نمایید و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری جوش سترون کنید. pH نهایی باید ۶/۹ باشد.

این محیط بصورت تجارتی موجود است و در صورت استفاده از آن طبق دستور سازنده عمل شود.

پ – محیط تتراتیونات – سبز درخشان

ترکیب : پپتون ۵ گرم ، املاح صفراوی ۱ گرم ، کربنات کلسیم ۱۰ گرم ، تیوسولفات سدیم ۳۰ گرم ، آب مقطر ۱ لیتر.

طرز تهیه : مواد فوق را به آب مقطر افزوده و بجوشانید تا کاملاً حل شود. سپس ۲ میلی لیتر محلول ۰/۵ درصد سبز درخشان به آن افزوده در لوله های آزمایش به حجم ۱۰ میلی لیتر تقسیم نمایید و آنها را در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد بمدت ۱۵ دقیقه استریل کنید.

در موقع استفاده با رعایت شرایط استریل به هر لوله ۰/۲ میلی لیتر محلول ید (لوگل) اضافه کنید.

طرز تهیه محلول سبز درخشان

نیم گرم از پودر سبز درخشان را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید.

طرز تهیه محلول ید

۵ گرم یدید پتاسیم را در ارلن مایر ۵۰ میلی لیتری استریل توزین کرده وسپس آنرا در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حل نمایید.

ت – محیط کشت سالمونلا شیگلاآگارا Salmonella Shigella Agar (S.S. Agar)

ترکیب : عصاره گوشت ۵ گرم ، پپتون ۵ گرم ، لاکتوز ۱۰ گرم ، املاح صفراوی ۸/۵ گرم ، سیترات سدیم ۸/۵ گرم ، تیوسولفات سدیم ۸/۵ گرم ، سیترات فریک ۱ گرم ، محلول سبز درخشان ۱ میل لیتر ، محلول قرمز خنثی ۱ میلی لیتر ، آگار ۱۳/۵ گرم ، آب مقطر یک لیتر.

طرز تهیه : مواد فوق را با رعایت شرایط استریل مخلوط و خوب بجوشانید. سپس تا ۴۵ الی ۵۰ درجه سانتی گراد سرد کرده در پلیتهای سترون تقسیم کنید. pH نهایی محیط باید حدود ۷ باشد.

ث – محیط سبز درخشان آگاردار Brilliant Green Agar (BGA)

ج – محیط لیزین آهن دار Lysine Iron Agar (LIA)

ترکیب محیط : پپتون ۵ گرم ، عصاره مخمر ۳ گرم ، گلوکز ۱ گرم ، بالیزین ۱۰ گرم ، سیترات آمونیوم فریک ۰/۵ گرم ، تیوسولفات سدیم ۰/۰۴ گرم ، محلول یک درصد بر موکرزول ارغوانی ۲ میلی لیتر ، آگار ۱۵ گرم ، آب مقطر ۱ لیتر.

طرز تهیه :

مواد فوق را تا حل شدن کامل بجوشانید ، سپس در داخل لوله آزمایش در حجم های مناسب تقسیم و در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه به مدت ۱۵ دقیقه سترون نمایید. پس از خارج کردن لوله ها از اتوکلاو آنها را طوری بخوابانید که هم قسمت ایستاده(عمق) و هم قسمت شیبدار داشته باشد. pH نهائی این محیط باید ۶/۷ باشد.

ج – محیط سه قندی آهن دار Triple sugar Iron Arar (T.S.I)

ترکیب محیط : عصاره گوشت ۳ گرم ، عصاره مخمر ۳ گرم ، پپتون ۱۵ گرم ، پرتئوزپپتون ۵ گرم ، گلوکز ۱ گرم ، لاکتوز ۱۰ گرم ، ساکاروز ۱۰ گرم ، سولفات فرو ۰/۲ گرم ، کلرور سدیم ۵ گرم ، تیوسولفات سدیم ۰/۳ گرم ، محلول فنل رد ۲/۴ درصد ۱ میلی لیتر ، آگار ۱۲ گرم ، آب مقطر ۱ لیتر

روش تهیه :مواد فوق را تا حل شدن کامل بجوشانید . و آنگاه به میزان مناسب در لوله آزمایش تقسیم نموده در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه بمدت ۱۵دقیقه سترون نمایند. سپس لوله ها را طوری بخوابانید که پس از بستن محیط هم قسمت ایستاده(عمق) و هم قسمت شیبدار وجود داشته باشد.

روش آزمایش

روز اول :

۲۵ گرم نمونه را که در شرایط استریل یکنواخت شده به ارلن محتوی ۲۲۵ میلی لیتر محیط کشت پپتون واتر منتقل نموده و آن را مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.

یادآوری : برای آزمایش انواع پودرها، آردها و شیرهای خشک باید ۲۵ گرم نمونه را در شرایط استریل به ارلن مایر محتوی ۲۲۵ میلی لیتر آب مقطر استریل و یک میلی لیتر محلول بریلیانت گربن (۰/۵ گرم بریلیانت گربن در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل) منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بمدت ۲۴ ساعت نگهداری کرد.

روز دوم :

به وسیله پی پت استریل یک میلی لیتر از کشت روز اول را به لوله محتوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت سلنیت تلقیح نموده و لوله را در ۴۳ درجه سانتیگراد بمدت ۲۴ ساعت نگهداری نمایید. همزمان، از کشت روز اول مجدداً یک میلی لیتر به محیط کشت تتراتیونات دارای سبز درخشان منتقل و برای ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید.

بررسی ترکیبات محیط سلنیت و واکنشهای بیوشیمی آن:

این محیط دارای ترکیباتی نظیر تریپتون، قند لاکتوز، فسفات دی سدیک (PO4HNa2) و نمکی بنام سلنایت سدیم (SeO3Na2) است . زمانیکه یک ماده غذایی آلوده با خانواده سالمونلا به داخل محیط کشت سلنایت براث منتقل می شود در طی مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت اینکوباتور گذاری شرایط محیط کشت به صورتی می شود که می تواند بهترین موقعیت را برای جداسازی باسیلهای گرم منفی از نمونه فراهم کند و به دنبال آن شرایطی را به وجود آورد که باکتریهای جدا شده بتواند پس از طی کردن مراحل تطابق با محیط کشت ، انجام تغذیه، رشد کرده و به مرحله تکثیر در حد نسبتا مناسبی برسد. از طرفی ترکیبات موجود در مدت زمان فوق می تواند به صورتی عمل کند که مانع بزرگی در برابر باکتریهای گرم مثبت شود و شرایط را برای رشد آنها نامناسب کند. در محیط سلنایت براث تریپتون به عنوان یک پروتئین خالص می تواند پس از تجریه به اسیدهای آمینه و در انتها به آمونیاک تبدیل شود. قند لاکتوز از قندهایی است که در صورت هیدرولیز و سپس تخمیر به طور عمده به اسید لاکتیک و انرژی برای باکتریهای تخمیر کننده آن تبدیل می شود. با تخمیر این قند در بسیاری از موارد گازهای دی اکسید کربن و هیدروژنH_2 تولید می شود. نمک فسفات دی سدیک مانند نمکهای فسفاته ۳ نقش عمده دارند که قبلا به آن اشاره شده است.

نمک سلنایت سدیم از نمکهایی است که در صورت وجود باکتریهای گرم مثبت می تواند دچار تجزیه شده و به بنیان SeO_3^{-2} و Na^+ تبدیل گردد. بنیان SeO_3^{-2} نقش آسیب رسانی به باکتریهای گرم مثبت را دارد. به این طریق با آزاد شدن بنیان نمک سلنایت رنگ محیط کشت از زرد مایل به نارنجی بسته به میزان سلنایت آزاد شده به رنگ قرمز تغییر خواهد کرد. لاشه های میکروبی و مواد غذایی در ته ظرف حاوی سلنایت براث ته نشین شده و گازهای بد بو از جانب باکتریهای گرم + و گرم – تولید می شود. بنابراین می توان پس از طی زمان اینکوباتورگذاری با بررسی رنگ ظاهری محیط کشت و خصوصیات محتویات غذایی کشت داده شده تا حد زیادی به وضعیت فلور یا تجمع میکروبی ماده غذایی پی برد. شدت رنگ قرمز در محیط سلنایت براث که در

ابتدا مایل به صورتی– نارنجی است نشاندهنده آزاد شدن یون سلنایت توسط باکتریهای گرم مثبت و در نتیجه میزان فلور میکروبی باکتریهای گرم مثبت می باشد اگر رنگ سلنایت براث ضعیف باشد نشانه کم بودن این فلور میکروبی می باشد. آشکار شدن خصوصیات ذکر شده معمولا به حداقل ۱۸ و حداکثر ۲۴ ساعت زمان نیاز دارد. در مدت زمان کمتر از آن نمی توان به شرایط ذکر شده دسترسی پیدا کرد و در مدت زمان بیشتر از ۲۴ ساعت نیز به دلیل آزاد شدن بنیان سلنایت و اثر گذاری بر روی باکتریهای گرم منفی به ویژه سالمونلا به شرایط نامناسبی می رسیم. سلنایت قادر به آسیب رسانی به تمام باکتریهای گرم مثبت نیست بنابراین تعدادی از این باکتریها باقی می مانند که باید از کتریهای گرم منفی در مراحل بعد جدا شوند.

محیط تتراتیونات براث (T.B):

محیط کشت تتراتیونات براث شامل ترکیبات زیر می باشد:

۱)پروتئوز پپتون ۲) نمکهای صفراوی ۳) کربنات کلسیم ۴) تیوسولفات سدیم

وجود پروتئوزپپتون به عنوان یک پپتون آنزیمی که به وسیله آنزیمهای پروتئاز مقداری نسبت به پپتون تجزیه شده است به عنوان یک منبع پروتئینی به سهولت می تواند به مصرف باکتری برسد. این پروتئین نیز پس از تجزیه به اسیدهای آمینه ، آمونیاک یا آمونیوم NH_4 تبدیل می شود. نمکهای صفراوی معمولا شامل تائوروکولات سدیم و گلایکولات سدیم می باشد. وجود نمکهای صفراوی در محیط کشت های مختلف به ویژه محیط های محلول مانند تتراتیونات براث به دلیل مشخص شدن تولید اسید در محیط کشت است زیرا زمانی که یک میکروارگانیسم بتواند در چنین محیط کشتی با انجام تجزیه و تخمیر بر روی مواد آلی اسیدهای مختلف تولید نماید با ایجاد اسید و کاهش PH محیط کشت از عدد ۷ نمکهای صفراوی بتدریج به شکل رسوبات زردرنگ در قسمت تحتانی محیط کشت نمایان می شود و به این طریق می توان تولید اسید را متوجه گردید. نمکهای صفراوی به صورت زیان آور بوده و نقشی در تغذیه باکتریها به ویژه انواع گرم – ندارند.

وجود کربونات کلسیم می تواند به دو دلیل باشد: ۱) تامین مواد معدنی ۲) ایجاد محیط شیری رنگ و سفید به منظور تشخیص بهتر رسوب نمکهای صفراوی.

تیوسولفات سدیم از نمکهایی است که می تواند توسط اکثریت میکروارگانیسم هایی که می توانند در فعالیتهای تخمیری تولید گازهای کربونیک و هیدروژن نمایند از قبیل سالمونلا به مصرف برسد. این نمک معمولا در مراحل بعد از تولید گازهای ذکر شده در اکثر موارد با همراه شدن گاز H2 به گاز SH2 و سولفورهای مختلف قابل تبدیل است در محیط کشت تتراتیونات براث برای آنکه از خصوصیات ذکر شده جلوگیری به عمل آید قبل از کشت نمونه غذا با استفاده از محلول غلیظ ید و در حرارت ۶۰ درجه سانتی گراد این نمک را به تتراتیونات سدیم Na2S4O6 تبدیل می نماییم. زمانی که تتراتیونات سدیم در محیط کشت T.B به وجود آید در مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در اینکوباتور در حضور باکتریهای گرم + به بنیان تتراتیونات دو بار منفی و سدیم تبدیل می شود. زمانیکه بنیان تتراتیونات در محیط کشت حاصل گردید این ترکیب مانند سلنایت براث روی مورن یا موکوپپتید دیواره سلولی باکتریهای گرم + که دارای اسید تیکوئیک می باشد اثر گذاشته و آنها را به تدریج غیر فعال کرده ودر انتهای زمان گرمخانه گذاری با تجزیه و مرگ سلول روبرو می کند. در محیط کشت T.B به دلیل آزاد شدن بنیان تتراتیونات می توان از رنگ سفید شیری اولیه به رنگهای خاکستری تا سیاه به ویژه در قسمتهای تحتانی محیط کشت به همراه رسوب نمک های صفراوی دست پیدا کرد. میکروارگانیسم ها از گوگرد تیوسولفات یا تتراتیونات استفاده کرده و در نهایت ازترکیب گوگرد با H2 تولید SFe سیاهرنگ می کند. در مواد گوشتی Fe+2 از هموگلوبین تامین می شود. در محیط کشت تتراتیونات براث وجود تیوسولفات مانع فعالیت باکتری های گرم + شده و شرایط برای فعالیت باکتریهای گرم – مساعد می شود. و بعد از ۱۸ تا ۲۴ ساعت در محیط گازهای H2, SH2, CO2 تولید می شود. و در نهایت رنگ خاکستری تا سیاه به همراه رسوب زرد رنگ حاصل از نمکهای صفراوری مشاهده خواهد شد.

می باشد.

روز سوم : از هر یک از لوله های کشت شده روز دوم بصورت جداگانه توسط آنس لوپ در سطح دو محیط کشت S.S.A و B.G.A بصورت خطی کشت دهید.

پلیتهای کشت داده شده را بمدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید.

محیط بریلیانت گرین آگار :

محیط بریلیانت گرین آگار شامل ترکیبات ۱) عصاره مخمر ۲) قند لاکتوز ۳) قند ساکارز ۴) کلرورسدیم ۵) معرف بریلیانت گرین ۶) معرف فنل رد ۷) آگار ۸) پروتئوز پپتون می باشد.

عصاره مخمر ماده مغذی عمده اغلب محیط کشتها می باشد. مخمرها در سلول خود پروتئین ، چربی، ویتامینهای گروه B، املاح مختلف و ... دارند. که به این غذاها STOCK CULTURE ترکیب عمده غذایی می گویند. سالمونلا قادر به مصرف ساکارز ولاکتوز نمی باشد. ولی گلوکز راتخمیر کرده و تبدیل به اسید لاکتیک می کند. کلرور سدیم به عنوان بخشی از مواد معدنی مورد نیاز باکتری مورد مصرف قرار می گیرد. معرف بریلیانت گرین در PH<4.5 به رنگ سبز و در PH>4.5 به رنگ سبز مایل به زرد می باشد. فنل رد در محیط های اسیدی به رنگ زرد و در محیط قلیایی به رنگ قرمز می باشد. PH بهینه برای فعالیت سالمونلا PH=6-7.5 است . باکتری که قادر به تخمیر ساکارز و لاکتوز نباشد از پروتئوز پپتون و عصاره مخمر استفاده می کند. میکروارگانیسم برای استفاده از پپتون توسط آنزیم پپتوناز خود باید از قبل به وسیله یک قند کسب انرزی نماید ولی برای پروتئوزپپتون که مقداری از قبل تجزیه شده است نیازی به مصرف قند و کسب انرژی نمی باشد. با مصرف پروتئوزپپتون توسط باکتری اسیدهای آمینه و در نهایت آمونیاک تولید شده و باعث قلیایی شدن محیط شده و در نتیجه تحت اثر معرف فنل رد پرگنه ها به رنگ صورتی تا قرمز تبدیل می شوند. کلی فرم ها شامل اشرشیاکلی و اروباکتر هر دو قند لاکتوز و ساکارز را تخمیر کرده و اسید لاکتیک و اسید استیک تولید می کنند. بنابراین با تولید اسید تحت

اثر معرف بریلیانت گرین پرگنه هایی به رنگ سبز تولید می شود. اگر در محیط نمک های صفراوی در حضور اسید حاصل از باکتریها موجود باشد در حاشیه پرگنه های سبز رنگ تولید شده حاشیه زرد رنگ نمکهای صفراوی را داریم.

روز چهارم : محیطهای کشت داده شده روز قبل را مورد بررسی قرار دهید. توسط سوزن کشت از هر ظرف پتری پرگنه های مشکوک (در مورد محیط سالمونلا شیگلا آگار پرگنه های بیرنگ و در مورد محیط بریلیانت گرین کلنی های صورتی رنگ) را انتخاب و در محیط کشت نوترینت آگار کشت خطی نمایید تا ایجاد پرگنه های تک نماید.

روز پنجم : برای هر یک از پرگنه های ایجاد شده در محیط کشت نوترینت آگار سه لوله یکی محتوی T.S.I و دیگری محتوی L.I.A و همچنین محیط اوره آز تهیه نمایید. از هر یک از پرگنه ها بطور جداگانه توسط سوزن کشت برداشت نموده ابتدا در محیط TSI بطور عمقی و سطحی کشت داده و سپس توسط همان سوزن در محیط LIA کشت دهید . در پایان نیز از کلنی ها در محیط اوره آز کشت دهید و آنها را مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید.

بررسی محیط کشت T.S.I

ترکیبات محیط تریپل شوگر آیرون آگار (**T.S.I.A**) شامل عصاره گوشت، عصاره مخمر، پپتون، پروتئوز پتون، لاکتوز ۱٪، ساکارز۱٪، دکستروز (گلوکز خالص) ۰.۱٪، تیوسولفات سدیم **Na2S2O3** ، سولفات آهن، آگار، نمک طعام و فنل رد می باشد. **T.S.I.A** به دلیل حضور معرف فنل رد به رنگ نارنجی است.

حضور ۵ باکتری سالمونلا تایفی موریوم ، اشرشیاکلی، پروتئوس ولگاریس، اروباکتراروجنس و شیگلا دیسانتری در این محیط کشت قابل بررسی می باشد. باکتریهای سالمونلا معمولا در محیط کشتهایی مانند **T.S.I.A** از بین ۳ قند موجودتنها قادر به تخمیر گلوکز می باشند و در اثر تخمیر آن ترکیباتی نظیر اسید لاکتیک، اسید فرمیک، دی

اکسید کربن، هیدروژن و **ATP** (انرژی) تولید می کنند و رنگ محیط از قرمز به زرد تبدیل می شود. درسطح لوله به دلیل حضور اکسیژن پس از تولید انرژی با اثرگذاری بر روی ۴ ترکیب مغذی محیط یعنی عصاره گوشت، عصاره مخمر و پپتونها موجب حاصل شدن اسیدهای آمینه و در نهایت یون **+NH4** می شوند. سپس باکتریها بر روی ترکیبات گوگردی محیط کشت نظیر نمکهای سولفات و تیوسولفات اثر گذاشته و حاصل فعالیت آنها تولید نمکی به نام تیوسولفات فروآمونیاکی **(NH4)2Fe(SO4)2** می باشد در مراحل تخمیر قند موجب تولید ۲ گاز H2 و CO2 می شوند. وجود گاز CO2 در محیط کشت باعث ایجاد شکستگیهای مشخصی می شود. ولی گاز **H2** با همراه شدن با ترکیبات گوگردار محیط ابتدا موجب حاصل شدن گاز با بوی نامناسب **SH2** یا سولفید هیدروژن شده و در مرحله بعد به همراه نمک تیوسولفات فروآمونیاکی موجب تولید سولفور آهن سیاه رنگ **(SFe)** و همچنین اسیدسولفوریک **, H2SO4 و H2 و NH3** می شوند.

$$(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 + SH_2 \longrightarrow SFe + 2\,H_2SO_4 + 2\,NH_3 + H_2$$

خصوصیات ذکر شده پس از ۴۸ ساعت اینکوباتورگذاری به وجود می آید به صورتی که در پایان مدت زمان فوق وجود باکتریهای سالمونلا را در لوله استب به شکل ایجاد نوار قرمز رنگ در سطح لوله به علت تولید آمونیاک و ایجاد رنگ زرد در قسمت زیر لایه قرمز رنگ به جهت تولید اسیدهای لاکتیک و فورمیک با تخمیر قند گلوکز مشاهده نمود. این باکتریها در لوله های استب به علت کاهش اکسیژن موجود فعالیتهای بعدی را نمی توانند به صورتیکه توضیح داده شد انجام دهند ولی در لوله اسلنت به دلیل گسترده تر بودن سطح محیط کشت و در دسترس بودن هوای بیشتر بقیه فعالیتها انجام می شود به این طریق که در لوله های اسلنت در سطح محیط ایجاد رنگ قرمز به دلیل تولید آمونیاک و در زیز آن به دلیل تولید رسوب سولفور آهن رنگ سیاه و در قسمت تحتانی به دلیل حضور اسیدهای اولیه (اسیدلاکتیک، اسید فوماریک) رنگ زرد را خواهیم داشت. در ۲۴ ساعت اول تمام خصوصیات ذکر شده مشاهده نمی شود و وقتی که باکتری مواد قندی را مصرف کرد سراغ

محیط های مغذی دیگر نظیر پروتئوزپپتون، عصاره گوشت و غیره می رود بنابراین در پایان ۴۸ ساعت مـی تـوان به بررسی باکتری پرداخت در ۲۴ ساعت اول لوله اسلنت مانند لوله استب زرد بـوده و نـوار قرمـز نـدارد ولـی بـا گذشت زمان و در دسترس بودن هوای بیشتر و تولید آمونیاک به تدریج از سطح لوله رنگ زرد خنثی می شـود. هر میکروارگانیسم که قـادر بـه تولیـد گازهـای دی اکسـیدکربن و هیـدروژن باشـد در صـورت حضـور نمـک گوگرددار قادر به تولید سولفید هیدروژن نیز می باشد. در صورت عـدم وجـود ترکیبـات گـوگرددار بـه سـراغ اسـیدهای آمینـه گـوگردار نظیـر سیسـتئین رفتـه و بـه دنبـال تولیـد سـولفید هیـدروژن رسـوبات سـولفید آهـن و اسیدسولفوریک و غیره نیز تولید می شود. بنابراین در ۲۴ ساعت ثانویه بتدریج در زیـر لایـه قرمـز رسـوب سـیاه داریم. اگر زمان اینکوباتورگذاری ادامه یابد بر شدت رنگ و رسوب سیاه افـزوده شـده و تمـام لولـه را پـر مـی کندتا به انتهای لوله برسد. ولی مواد دفعی و زیان آور سولفورآهن و گازهای آن باعث از بـین رفـتن باکتریهـای سالمونلا می شود بنابراین زمان گرمخانه گذاری نباید بیشتر از ۴۸ ساعت شود. گاز هیدروژن وارد واکنش شـده ولی گاز دی اکسید کربن باعث شکستگی محیط می شود. چون کلی فرم ها ۲۱ برابر سالمونلا (قادر بـه مصـرف هر ۳ قند موجود هستند) تولید اسید می کنند تمام محیط را زرد می کنند و بعد از مصرف مواد قندی سراغ مـواد دیگر نظیر عصاره گوشت و غیره می روند و در نهایت آمونیاک تولید می کنند. ولی چون اسـید تولیـدی بیشـتر است آمونیاک را خنثی کرده و رنگ قرمز مشاهده نخواهد شد. چون اشرشیاکلی هوازی-بـی هـوازی اختیـاری می باشد فعالیت خود را در شرایط کمبود اکسیژن نیز ادامه مـی دهـد پـس بـه دلیـل تولیـد سـولفید هیـدروژن و سولفید آهن رسوب سیاه را در هر دو لوله اسلنت و استب داریم . پروتئوس فقط سـاکارز و دکسـتروز را تخمیـر کرده و ۱۱ برابر سالمونلا ها نیز تولید اسید می کند. همچنین در اثر تولید گاز دی اکسید کـربن و هیـدروژن در نهایت تولید سولفید هیدروژن و سولفید آهن می کند. چون پروتئوس نسبت به سالمونلا اسید بیشتری تولیـد مـی کند نوار قرمز تشکیل شده باریک تر است. در صورت وجود اروباکتر هر دو لوله اسلنت و استب به دلیـل تولیـد

اسید بالا زرد شده و آمونیاک تولیدی را خنثی می کند و چون میزان دی اکسیدکربن زیاد است میزان شکستگی در محیط کشت بیشتر دیده می شود. فرق اروباکتر با اشرشیاکلی در این است که اروباکتر فقط گاز دی اکسید کربن تولید می کند و به دلیل عدم تولید گاز هیدروژن دیگر رنگ سیاه حاصل از سولفید آهن نداریم. عمل شکستگی توسط گاز دی اکسید کربن در محیط کشت و ایجاد رنگ زرد به دلیل هوازی بودن آن بیشتر در لوله های اسلنت دیده می شود. شیگلا ها فقط قادر به مصرف قند گلوکز بوده و بنابراین تولید اسید و گاز دی اکسید کربن می کنند و چون قادر به تولید گاز هیدروژن نمی باشند تولید سولفید هیدروژن و سولفید آهن نمی کنند. در ابتدا در لوله اسلنت رنگ زرد به دلیل تولید اسید تا انتهای لوله دیده می شود ولی در مراحل بعد به دلیل تولید آمونیاک از مواد پروتئینی رنگ قرمز در سطح نمایان می شود و به دلیل ایجاد دی اکسید کربن در محیط شکستگی داریم. به دلیل هوازی بودن شدید شیگلاها در لوله اسلنت به دلیل سطح تماس بیشتر با هوا تولید آمونیاک و رنگ قرمز و در لوله استب رنگ زرد به دلیل تولید اسید داریم.

محیط کشت اوره:

یکی از ترکیبات آلی این محیط اوره می باشد. از ترکیبات دیگر آن نمکهای فسفاته **KH2PO4,NaHPO4** و فنل رد می باشد. از خانواده انتروباکتریاسه تنها پروتئوس (تمام گونه های آن) قادر به هیدرولیز اوره بوده و به این آزمایش جواب مثبت می دهد و اوره **(NH2)2CO** را با عمل هیدرولیز به **+NH4 و CO**تبدیل کرده و آمونیاک تولیدی در حضور معرف فنل رد از رنگ نارنجی به قرمز تبدیل می شود. فنل رد در محیط قلیایی صورتی تا قرمز و در محیط اسیدی زرد رنگ است.

روز ششم : اکثر سالمونلاها در محیط TSI قسمت فوقانی را به رنگ صورتی مایل به قرمز (نشانه قلیائی شدن محیط) و قسمت عمقی را به رنگ زرد (نشان اسیدی شدن) در آورده که ممکن است همراه با تولید گاز سولفید هیدروژن باشد (که در این صورت محیط سیاه می شود) و یا نباشد.

در محیط LIA سالمونلا تمام محیط را به رنگ ارغوانی تغییر می دهد.

سالمونلاها اوره از منفی اند. در واکنش مثبت که دلیل بر عدم وجود سالمونلا است رنگ محیط قرمز مایل به صورتی می شود.

در صورت منفی بودن نتیجه آزمایش برای تأیید و تشخیص نمونه کشت شده را به آزمایشگاههای تخصص میکروب شناسی ارجاع دهید.

نکته:می توان برای اطمینان بیشتر از نتیجه کار یک لام میکروبی از کلنی های تشکیل شده در محیط کشت نوترینت آگار تهیه کرد.

یکی از خصوصیات شناسایی سالمونلا ها تیره بودن دو انتها یا مرکز سلول آنها می باشد. شکل برخی از باکتریهای خانواده انتروباکتریاسه به شرح زیر در مشاهدات میکروسکوپی می باشد.

۱)سالمونلا تایفی موریوم: تیره در مرکز یا دو انتها

۲) سالمونلا اینترتیدیس: باسیلهای کشیده و بلند

۳) پروتئوس: باسیل کاملا با دو انتهای گرد

۴) شیگلا: باسیلهایی که دارای شکل یکنواخت در دو طرف نمی باشند.

شدت جذب رنگ سافرانین یا فوشین در باکتریهای گرم – خانواده انتروباکتریاسه به ویژه در سالمونلا ها و کلی فرم ها بیشتر از باکتریهای گرم منفی دیگر است .

جدول - واکنش های بیوشیمیایی سالمونلا

آزمون	نوع واکنش	درصد گونه های سالمونلا که واکنش نشان می دهد
تشکیل اسید از تخمیر گلوکز در محیط کشت سه قندی تی اس ای	مثبت	۱۰۰
تشکیل گاز از تخمیر گلوکز در محیط کشت سه قندی تی اس ای	مثبت	۹۱/۹
تخمیرلاکتوز درمحیط کشت سه قندی تی اس ای	منفی	۹۹/۲
تخمیر ساکارز درمحیط کشت سه قندی تی اسی ای	منفی	۹۹/۵
تولید سولفید هیدروژن در محیط کشت سه قندی	مثبت	۹۱/٦
ال - لیزین - دکربوکسیلاز	مثبت	۹٤/٦
تجزیه اوره	منفی	۹۹

بیماری ورم پستان و بهداشت پستان دام

واژه ورم پستان به التهاب غده پستانی بدون توجه بعلت آن اطلاق میشود که بوسیله تغییرات فیزیکی شیمیائی ومعمولا میکربی شیر وهمچنین تغییرات حاصل از بیماری در بافت غده پستانی مشخص میشود مهمترین تغییراتیکه در شیر ایجاد میشود عبارت است از: تغییر رنگ وجود لخته و پیدایش تعداد زیادی لوکوسیت (گلبول سفید)با علا ئم تورم گرمی درد وسفت شدن غده پستانی که بوسیله آزمایش ظاهری شیر میتوان آ نها راتشخیص داد . موارد زیادی از ورم پستانها را بسهولت نمیتوان مشخص کرد بطوریکه دارای نشانیهای درمانگاهی نیستند (ورم پستان مخفی) دراین نوع ورم پستانها به آزمایش غیر مستقیم یعنی شمارش گلبولهای سفید متوسل می شوند. در اثر بیماری ورم پستان تلفات دامی نیز وجود دارد لکن زیان اقتصادی آ ن مربوط به تلفات به تنهائی نیست بلکه کاهش مقدار شیر پستا ن مبتلا و اختلال در فر آوری شیر عمده ترین خسارات را تشکیل میدهد. شیوع بیماری ورم پستان در اغلب کشورهاحدود ۴۰ درصد است که در بعضی از کشورها تا ۲۵ درصد آنرا کاهش داده اند. بطور متوسط ابتلا هر کارتیه (قسمت) از پستان به بیماری سبب کاهش ۸ درصد تولید شیر آن کارتیه میگردد ویطور کلی در یک گاو مبتلا سبب کاهش ۱۵ در صد از تولیدشیر میشود. ازطرفی زیان حاصل از تغییرات ترکیب شیر مثل کاهش چربی کاهش کازئین ولاکتوز، افزایش سرم شیر وپروتئین های سرمی ، افزایش ph وافزایش کلرور ها نیز بایستی در نظر گرفت .

عوامل ایجاد ورم پستان :میکربها یکی از عوامل ایجاد ورم پستان هستند اما به تنهایی به عنوان عامل اولیه نمی باشند .عوامل عفونی ایجاد کننده ورم پستان عبارتند از :استرپتوکوک ها: استرپتوکوک آگالاکتیه استرپتوکوک اوبریس و استرپتوکوک دیسگالاکتیه واسترپتوکوک فکالیس و استرپتوکوک پنومونیه- استافیلوکوک ها: استافیلوکوکوس اورئوس- کلی فرمها: اشرشیا کلی- کورینه باکتریها:کورینه باکتریوم پیو ژنس و کورینه باکتریوم بویس- سودو مو نا س ها.

عفونت در ابتدا بصورت التهاب مشخص میشود ولی تا بروز التهاب سه مرحله وجود دارد ۱-هجوم ۲- عفونت ۳- التهاب. هجوم مرحله ایست که میکرب از خارج سر پستانها به مجاری شیر نفوذ میکند عفونت مرحله ایست که میکرب رشد میکند و بافت پستانی را مورد تهاجم قرار میدهد التهاب نتیجه رشد میکرب و افزایش آ ن وتخریب بافت پستانی و نفوذ گلبولها ی سفید یا لکوسیتها جهت دفع عفونت میباشد.

۱) مرحله هجوم بستگی به حضور وتعداد باکتریهای مولد بیماری در محیط شیر دوشی، تعداد دفعاتی که سرپستانهای گاو بویژه نوک آنها با این باکتری ها آلوده میشوند که وابسته به میزان رعایت بهداشت در هنگام شیردوشی میباشد، میزان ضایعات اسفنکتر سرپستانها که ورود باکتریها را در مجاری آ نها آسان میکند و بستگی به ماشینها ی شیردوشی ودرست کار کردن ماشین شیردوشی ومراقبت از سرپستانها دارد، وضع اسفنکترسرپستانها بویژه در مرحله پس از شیر دوشی که عضلات اسفنکتر در استراحت میباشند وشل بودن اسفنکترها سبب میشود هجوم میکربها را به داخل آسان سازد اهمیت دارد.

۲- مرحله عفونت بستگی به نوع میکرب که قدرت آ نرا در تکثیر در شیر مشخص میکند، حساسیت میکرب عامل در برابرآ نتی بیوتیکها ی مورد استفاده ، وجود مواد حفاظت کننده در شیر (مواد ایمنی زا) که ممکن است طبیعی باشند یا در نتیجه عفونت قبلی تولید گردند، مرحله شیر واری زیرا عفونت در مرحله خشک شدن پستان با سهولت بیشتری صورت می گیرد .

۳-مرحله التهاب بستگی به بیماریزائی وقدرت هجوم میکرب، میزان حساسیت بافت پستان به میکرب دارد.

در مرحله هجوم بهتر از مراحل دیگر میتوان با توجه به پرستاری و بویژه بکار بردن روشهای بهداشتی خوب از میزا ن اشاعه تورم پستا ن کم کرد .

نشانیهای بیماری ورم پستان

برحسب حدت وشدت میکرب که به پستان هجوم کرده باشد نشانیها ی بیماری متفاوت است التهاب شدید (حاد) فوق حاد که با مسمومیت خونی (سپتی سمی) وبا واکنش عمومی همراه است یا بصورت التهاب نامشخص (تحت حاد) یا مخفی ویا مزمن که بتدریج بافت پستا ن فیبروزی وسفت میشود ظاهر میشود دراین حالات بستگی به نوع میکرب نشانی متفاوت است.

ورم پستان محفی (تحت حاد) :

در این نوع ورم پستا ن وضع ظاهری شیر سالم وعادی بنظر میرسد ودر دام هیچگونه علائم بیماری بصورت ظاهری دیده نمیشود لکن در ترکیبات شیر تغییرات زیر دیده میشود:

-افزایش گلبولها ی سفید و سلولها ی بافت پستان یا سلولهای سوماتیک (Somatic cell(sc- کاهش چربی شیر- کاهش کازئین- کاهش لاکتوز- افزایش سرم شیر- افزایش کلرورهادر شیر- افزایش گلیکوژن- کاهش تولید شیر.

ورم پستا ن مزمن:

این حالت ورم پستان نیز از نظر دامدارتا حدودی نا مشخص است اما اگر دقت شود و آزمایش ورم پستا ن استریپ کاپ انجام شود وجود لخته هائی در شیر مشخص کننده بیماریست و تغییرات ترکیبا ت شیر نیز مانند ورم پستا ن تحت حاد یا مخفی است اما پیشرفته تر در اینجا سرم شیر افزایش یافته و کلرورها افزایش بیشتری دارند.

ورم پستان حاد :

در این حالت پستان دارای التهاب و تورم است واطراف پستا ن گرم بوده ودام تب دارد. در هنگام دوشش دام پاها را بر زمین می کوبد واحساس ناراحتی میکند شکل ظاهری شیر نیز تغییر میکند دارای مایع سبز رنگ و رگه ها ی خون ولخته ها ی فراوان است در آزمایش استریپ کاپ براحتی میتوان پی به بیماری برد .گاو بی اشتها وناراحت است . این گا وها را بایستی بادستگاه شیر دوشی تک واحدی و در پایا ن شیر دوشی بطور جداگانه روزانه حداقل سه مرتبه

دوشید تا عفونت در پستا ن سبب ضایعه پستانی نشود دام را تحت مراقبت دامپزشک قرار میدهند .شیر دوشیده شـده را به فاضلأب میریزند وهر دفعه دستگاه را ضد عفونی میکنند .

ورم پستان فوق حاد : این نوع ورم پستا ن نیز مانند ورم پسـتا ن حـاد مشـخص بـوده ودام تـب دار و پسـتا ن بیمـار دارای التهاب است شیر سبز رنگ ودارای رگه ها ی خون و لخته میباشد.

تشخیص آزمایشگا هی ورم پستا ن :

به سبب تغییرات شیمیائی که در شیر ورم پستانی بوجود می آید و تاثیردرسیستم فرآوری و پاستوریزاسیون شـیرها ی ورم پستانی و بدنبا ل آ ن گا وها ی آلوده بایستی شنا سـائی شـوند. از آنجائیکـه بررسـی آزمایشـگا هـی تعـداد زیادی از نمونه ها ی شیر گران تمام میشود توجه زیادی به آزمایش های صحرائی بر پایه شناخت تغییرات فیزیکی وشیمیائی شیر می باشد البته این آزمایشها غیر مستقیم بوده وفقـط وجـود التهـاب وتغییـرات ظـاهری شـیر را نشـان میدهند و یک آ زمایش هدایت کننده تلقی میشوند. بدنبال آن بایستی آزمایش ها ی تشخیص میکربی و شـمارش میکربی ، آ زمایش های حساسیت در مقابل دارو، وجود آ نتی بیوتیک وآ زمایش های تشخیص قارچ انجام شود.

✓ آزما یش استریپکاپ :

چنانکه ملأحظه شد در ورم پستا نهای حاد یکی از علائم بیماری وجود رگه ها ی خون، لخته و دلمه همراه با سرم سبز رنگ در شیر است .قبل ار آنکه دستگاه شیر دوشی را بدام متصل کنیم باید چند مرتبه جریان شیر هـر کارتیـه را روی صفحه سیاه فنجان بریزیم تا عوامل غیر طبیعی شیر مشخص شود .

✓ آزمایش ورم پستان بروش کالیفرنیائی : California mastitis test - C M T

این آزمایش تشخیص گاوهای مبتلأ به ورم پستا ن مخفی است. در این نوع ورم پستا ن چنانکه ملا حظه شد شیر از نظر ظاهری سالم و طبیعی بنظر میرسد و هیچگونه علائم بیماری در گاوممکن است مشخص نباشد امـا بـا ریخـتن مقداری شیر درظرف چهار قسمتی مخصوص (هر کارتیه در یک قسمت) ورم پستان را تشخیص میدهیم. پـس از اضافه شدن شیر آنرا بمدت ۱۰ الی ۲۰ ثانیه بطور مورب تکان میدهند تا با معرف مخلوط شود پس از این مدت در

صورت وجود ورم پستان شیر لخته و بریده میشود . هرچه مقدار و غلظت لخته بیشتر باشد شدت ورم پستا ن و وجود مواد بافتی وگلبولها ی سفید بیشتر است .

- ✓ **: Brabant Mastitis Test (B M T)**

اساس این آزمایش همان آزمایش تشخیص کالیفرنیائی است لیکن بجای محلول معرف، ژل محتوی معرف در هر قسمت تعبیه شده ریخته و پس از آنکه ۲ سی سی از شیر اولیه هرکارتیه برروی آ ن ریخته میشود آنرا ۲۰ ثانیه تکان میدهند که تشکیل رسوب یا ایجاد لخته یا بریدگی شیر نشان دهنده ورم پستان است.

روشهای Mishigan Mastitis Test (MMT) ,Negretti Field Mastitis Test (NFMT), Viscansian Mastitis Test (VMT)

نیز بر اساس همان کالیفرنیا تست است تنها روش بکارگیری معرف ها متفاوت است.

- ✓ **آزمایش شمارش سلولهای سوماتیک Somatic Cell Count (SCC)**

آزمایش شمارش سلولهای سوماتیک روش مناسبی برای بررسی بیماری ورم پستان در شیر میباشد.

در حالت عادی در شیرهای سالم تعدادی سلول که شامل گلبولها ی سفید وسلولها ی جدا شده از بافت پستان است در شیر وجود دارد و در صورتیکه تعداد آ نها از حد متعارف(۳۰۰۰۰۰) بیشتر شود نشانه غیر عادی بودن شیر است. این افزایش سلولها در اثر ضربه و نفوذ باکتری وایجاد التهاب ودر نتیجه ورم پستا ن بوجود میآید و سبب کاهش کیفیت شیر میشود. سه روش برای اندازه گیری سلولهای سوماتیک وجود دارد : ۱-روش مستقیم : در این روش ۰/۰۱ میلی لیتر از شیر رادر یک سانتی متر مربع از سطح لام مخصوص شمارش سلولی پخش میکنند و آنرا خشک و رنگ آمیزی میکنند سلولها ی رنگ شده را با شمارشگر دستی شمارش می کنند.

۲-روش کولتر : این روش در اثر عبور سلولها ی سوماتیک از روزنه الکتریکی (الکترود) ایجاد نوسان ولتاژ میکند وبازاء هر نوسان یک شمارش از شمارش گری که متصل به الکترود است ثبت میشود در این روش ابتدا سلولها توسط فرمالین تثبیت میشوند .

۳- شمارش توسط دستگاه فوسوماتیک: مقدار معینی شیر از این دستگاه عبور میکند و با یک بافر ورنگ فلوئورسنت مخلوط میشود و DNA هسته سلولهای سوماتیک را هایلایت میکند و یک لام که بر روی صفحه دواری قرار دارد دراثر نور ایجاد شده انها را ثبت و یک کنترولر تعداد سلولها را در میلی لیتر مشخص میکند .

✓ کشت میکروبی :

روش کشت میکربی آ زمایش دقیق و وقت گیری است که بایستی قبل از اتصال دستگاه شیر دوشی به کارتیه ها به وسیله یک لوله آزمایش استریل درب دار از هر کارتیه مقدار ۳۰ تا ۱۰۰ سی سی شیر بر داشت. قبل از نمونه گیری باید پستا ن و نوک کارتیه ها را شستشو داد و با الکل ۷۰ درجه نوک پستا ن را ضد عفونی کرده و مستقیما از هر کارتیه بطور جداگانه شیر بر داشت. پس از نمونه گیری بایستی سریعا نمونه را در کنار یخ به آزمایشگاه ارسال نمود تا شیر در آنجا کشت گردد .

خسارات ناشی از ورم پستا ن:

۱-کم شدن تولید شیر۲- هزینه های درمان۳- دور ریختن شیر حاوی باقی مانده دارو در حین درمان

۴- احتما ل از بین رفتن یک یا چند قسمت پستا ن و یا حذف دام ۵- هزینه های کارگری و دامپزشکی.

مهمترین خسارت از طریق کم شدن شیر تا حدود ۱۵-۸ درصد در طول ۷ ماه دوره شیرواری است. هزینه ورم پستا ن حاد شامل ۱۴ در صد مرگ و میر ۸ درصد شیر دور ریخته شده ۸ در صد درمان است. هزینه ورم پستا ن مخفی ۷۰ درصد بعلت نا شناخته بودن و کا هش شیر در طول دوره شیر واری است .

در حال حاضر در کشور ما ۲ استاندارد برای اندازه گیری سوماتیک سل وجود دارد که یکی شمارش یاخته های پیکری بر اساس روش فلوروپتوالکترونیک (استاندرد ۷۰۷۰) و دیگری بر اساس شمارش یاخته های پیکری در شیر به روش میکروسکوپی (استاندارد ۵۰۲۸) می باشد. این دو استاندارد در بخش ضمیمه موجود می باشد.

آشنایی با استارتر کالچرها

استارتر کالچردر واقع به معنی کشت های آغاز گر می باشد که وظایف مختلفی در محصولات گوشتی، لبنی و ..... دارا می باشد. مهمترین وظایف آنها شامل:

افزایش خواص حسی در محصول: باکتریهای آغازگر با تولید اسیدهای آلی، اسید های آمینه و مواد فرار مختلف حاصل از هیدرولیز پروتین ها و چربی ها باعث ایجاد عطر و طعم در محصولات مختلف از جمله ماست، پنیر، کره و .... می شوند.

افزایش زمان ماندگاری محصول: به لحاظ تولید اسیدهای آلی نظیر اسید لاکتیک و آب اکسیژنه، اسیدهای چرب زنجیرکوتاه، باکتریوسینها، استالدئید و... توسط آغاز گرها به عنوان باز دارنده رشد باکتریهای بیماری زا زمان ماندگاری محصول افزایش می یابد.

تغییرخواص رئولوژیکی محصول نظیر ویسکوزیته ، سفتی و تغییر در شکل ظاهری و بافت محصول نظیر تولید گاز یا چشم در پنیر سوئیسی و ایجاد رنگ سفید، آبی یا قرمز توسط کپک ها بر روی پنیر های کپکی.

افزایش قابلیت هضم و افزایش ارزش غذایی محصولات تخمیری در ایمن سازی بدن

موثر در بهبود فرآیند تولید نظیر استفاده از استارتر در تسریع فرآیند پنیر سازی و یا استفاده از کالچر های خاص در جلو گیری از فرآیند آب انداختن ماست.

طبقه بندی استارترهای مورد استفاده در محصولات لبنی:

استارترهای مزوفیل: این استارترها بیشتردر تولید پنیر استفاده می شوند. این استارتر ها متعلق به خانواده استرپتوکوکوس و لوکونوستک می باشند.

استارترهای ترموفیل:

شامل باکتریهای اسید لاکتیک ترموفیل نظیر لاکتوباسیلوس بولگاریکوس استرپتوکوکوس ترموفیلوس ولاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس می باشند. دو استارتراول در تولید ماست استفاده می شوند.

استارترکفیروکومیس: دانه های کفیر حاوی مخمرها (ساکارومایسس کفیر، تورولوپسیس کفیر)، لاکتوباسیلوس ها(لاکتوباسیلوس کاکازیکوس)، استرپتوکوکوس و لوکونوستوک می باشد.

کشت های غنی سازی شده قارچی برای تولید پنیر: برای تولید پنیرهای رگه آبی نظیر روکیوفورتی و دنیش بلو کشت غنی ساز ی شده ای از پنی سیلیوم روکیوفورتی استفاده می شود همچنین در پنیرهای کپکی سفیدی نظیر کاممبرت از پنی سیلیوم کاممبرت استفاده می شود این قارچ ها با تولید آنزیم های پروتئولیتیک به ویژه در

مرکز پنیر باعث نرم شدن دلمه می شوند و با نرم شدن بخشهای سخت مرکز پنیر باعث رسیدن کامل پنیر شده و به دلیل فعالیت آنزیم های پروتئولیتیک و لیپولیتیک باعث ایجاد طعم ویژه پنیرهای قارچی می شوند.

سایر کشت های غنی سازی میکروبی برای تولید پنیر : از انواع مختلف استارتر هایی که برای این منظور استفاده می شوند می توان به نقش بروی باکتریوم لاینس که در رسیدگی سطحی در پنیرها نقش دارد وهمچنین به پروپیونی باکتریوم شرمانی که در تولید گاز دی اکسید کربن بر روی پنیرهای سویسی نقش دارند اشاره کرد.

استارتر کالچرها به صورت مایع، خشک شده (خشک شده به روش انجمادی یا پاششی) و منجمد (در دماهای ۲۰- ، ۴۰- ، ۸۰- ، ۱۹۶- درجه سانتی گراد) و به طریق های زیر تهیه می شوند:

از مراکز آموزشی و تحقیقاتی نظیر دانشگاه ها

بانک استارتر ها

کارخانجات صنعتی و بین المللی

کنترل کیفیت استارترها (استاندارد ۶۷۵۹):

جهت کنترل کیفی استارترها باید عدم آلودگی استارتر به فاژ و قدرت تولید اسید وطعم را توسط استارتر مد نظر دانست . قدرت آغاز گر عبارت از روند افزایش اسیدیته در محصول در فواصل زمانی مشخص در یک دوره زمانی معین.

ویژگی های مورد نظر در تهیه و نگه داری آغاز گر: با توجه به سویه های میکروبی مورد استفاده در تولید آغازگر و ایجاد ویژگی های مختلف در محصول نهایی تولید کننده باید از این ویژگی ها اطلاع داشته و با توجه به ویژگی مورد نظر محصول نهایی و ظرفیت تولید روزانه و همچنین تاریخ مصرف آغاز گر شرایط مناسب نگه داری در زمان آماده سازی مایه تازمان مصرف مطابق با دستور العمل سازنده در دما و شرایط مناسب و سری آغاز

گر مناسب را تهیه نمود.پاکتهای حاوی آغاز گر باید در شرایط غیر قابل نفوذ باقی بمانند و قدرت آغاز گر از نظر ایجاد اسید مهم می باشد.

تعیین کیفیت و قدرت باکتری های آغاز گر: تولید فرآورده تخمیری مطمئن و مطلوب با سنجش کیفیت وقدرت مایه به شرح زیر انجام می شود.

الف) کنترل آلودگی آغاز گرها: باکتریهای آغازگر همگی گرم مثبت هستند بنابراین به منظور کنترل آلودگی می توان گستره ای از آغازگر را روی لام تهیه و به روش گرم رنگ آمیزی نمود وجود هر باکتری گرم منفی نشانه آلودگی آغازگر است.

آغازگرهای لاکتیکی مطابق استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵ (سال ۱۳۷۴) و وجود کلی فرم در مایه آغازگرکه دلیل برآلودگی وسیع آن است مطابق استاندارد ملی ایران ۴۳۷ : سال ۱۳۷۳ بررسی می شوند.

آغازگرهای لاکتیکی نباید به کپک و مخمر آلوده شوند لذا کنترل مایه آغازگراز این نظر مطابق استاندارد ملی ایران ۹۹۷ : سال ۱۳۷۲ , «روش شناسایی آلودگیهای قارچی در مواد غذایی» ضروری است .

شایان ذکر است که در حال حاضر کمپانی های تولید آغازگر محیط های مخصوص کشت آغازگر را عرضه می کنند که با استفاده از این محیط های کشت به راحتی می توان خلوص آغازگر را ارزیابی نمود.

ب) تعیین قدرت مایه:

فعالیت کشتهای لاکتیک با توجه به مقدار اسید لاکتیک تولیدی در طی عمل تخمیر مشخص گردد.برای انجام این آزمایش به ۱۰ میلی لیتر شیر سترون پس چرخ شده و بدون آنتی بیوتیک , یک میلی‌لیتر از کشت اولیه باکتریهای لاکتیک تلقیح گردد و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۴ ساعت قرارمی دهیم سپس قدرت اسیدیته قابل تیترکردن تمامی محتویات با روش استاندارد با سود ۰.۱ نرمال تعیین می گردد.در صورتی که میزان

اسیدیته معادل ۷۰ درجه دورنیک یا بیشتر بدست آید و دلمه اسیدی جامد و همگنی تشکیل شود به معنی آن است که مایه دارای فعالیت زیاد و قابل قبولی است و برای تولید پنیر و محصولات تخمیری مناسب خواهد بود.

ج) شرایط اتاق تهیه مایه

تهیه مایه در مورد آغازگرهای مادر و فله مستلزم رعایت استانداردهای بهداشتی در حد مطلوب میباشد ، بنابراین لازم است در تهیه مایه و انتخاب تجهیزات دقت زیادی به عمل آید.بدین منظور باید اتاقی با حداقل فضا و مطابق با شرایط مندرج در استاندارد ملی ایران ۲۷۴۷ : سال۱۳۷۲ , " آیین کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی " احداث گردد و به منظور جلوگیری از آلودگی توصیه می‌شود در اتاق مذکور فشار هوای مثبت ایجاد شده و هوا پس ازعبور از صافی وارد آن شده و با نصب لامپ UV محیط ضد عفونی گردد.نظافت دستگاهها و تجهیزات موجود در اتاق تهیه مایه باید مناسب باشد بطوریکه مواد غذایی ،مواد پاک کننده و ضد عفونی کننده ازسطوح کاملا" پاک گردد.ضمنا" تولید کشت های واسط می تواند در محل نزدیک به اتاق مایه زنی پنیر ودر تانکهایی مناسب از نظر شرایط بهداشتی مطابق با استاندارد ملی ایران «آیین کار تولید پنیر سفید ایرانی به روش نیمه صنعتی » انجام گیرد و مایه آماده شده در شرایط بهداشتی به شیر مورد نظر جهت تهیه محصول اضافه شود.بدین منظور توصیه می شود مایه در تانکهای مناسب دو یا سه جداره به منظور تثبیت دمای مایه تهیه و توسط دوزینگ پمپ به خط تولید وارد شود سیستم شستشوی این تانکها نیز باید مطابق با استاندارد ملی ایران آئین کار تولید پنیر سفید ایرانی به روش نیمه صنعتی باشد.

د) کنترل باکتریوفاژها

باکتریوفاژها یک مشکل بزرگ در کشت آغازگرها میباشند چون برخی از آنها سلول های باکتریهای آغازگر را تحریک می کنند و مانع از تولید اسید می شوند . جهت کنترل و کاهش اثر فاژها بر روی مایه کشت موارد زیر باید رعایت گردد:

الف – کلر زدن کردن تانکهای تهیه مایه ،وتهای پنیر سازی و لوله های انتقال با محلـول ۲۰۰ پـی پـی ام کلرقابـل دسترس به مدت ده دقیقه .

ب - نصب لامپ UV در اتاق کشت و سالن انعقاد.

پ – تهویه هوای اتاق تهیه مایه کشت .

ت – استفاده از کشتهای مقاوم به فاژ ،محدود کردن تعداد سویه ها.

ث – تعویض نوع آغازگر در دوره های زمانی مشخص .

روشهای نوین آزمایشگاهی میکروبیولوژی

روش های شناسایی میکروارگانیسم ها

روش های کلی شناسایی میکروارگانیسم ها شامل:

الف) تکنیک های متداول و رسمی

ب) تکنیک های مدرن

ج) تکنیک های سریع

تکنیک های متداول خود شامل ۴ روش مرسوم است:

۱- روش شمارش صفحه ای استاندارد یا (SPC)

۲- روش تعیین آماری سلول های زنده(MPN)

۳- روش احیاء رنگ ها یا(DR)

٤- روش شمارش مستقیم میکروسکوپی یا(DMC)

به جز روش DMC که روش شمارش کل می باشد و در آن سلول های زنده به همراه سلول های غیر زنده تعیین می شوند، در سایر روش ها فقط سلول های زنده تعیین می گردند. در روشSPC که یک روش کشتی می باشد، بایستی از محیط کشت مناسبی استفاده نموده و همچنین نمونه برداری نیز بطور مطلوب انجام گردد. این روش نسبتاً وقت گیراست.

روشDR نسبتاً سریع بوده و بیشتر برای تشخیص بار میکروبی شیر بکار می رود.

روشMPN نیز بیشتر برای غذاهای مایع بکار رفته و رقت های مختلفی ازنمونه در این روش تهیه می شود و در نهایت با جداول مخصوص، تعداد میکروارگانیسم های زنده تعیین می شود. این روش غالباً برای شناسایی کلی فرمها بکار می رود ، اما نسبتا وقت گیر است.

روشDMC که یک روش شمارش کل بوده، روش سریعی در تشخیص سلول های میکروبی موجود در مواد غذایی است.

مزایای روشMPN : ۱- تا حدی ساده است. ۲- نتایج یکسانی در آزمایشگاه های مختلف بدست می آید. ۳- برای شناسایی گروه های انتخابی ارگانیسم ها، می توان از محیط کشت انتخابی و افتراقی استفاده نمود.

معایب روشMPN : ۱- استفاده زیاد از ابزار آلات شیشه ای ۲- عدم تشخیص کلنی ها از روی مورفولوژی آن ها ۳- عدم وجود رقت کافی

در روش احیاء رنگ ها (DR)، از تترازولیوم برای گوشت مرغ استفاده می شود. و رزازورین برای گوشت پخته خیلی بهتر از گوشت خام است. از مزایای این روش سادگی و سرعت مناسب و سریع آن است. همچنین احیاء رنگ ها صرفاً توسط سلول های زنده صورت می گیرد.

- روش فیلترغشایی یکی از روش هایی است که جهت شناسایی و شمارش مستقیم میکروب ها استفاده می شود. نوع غشاها و رنگ های بکار برده شده متفاوت است و استفاده از این تجهیزات باعث سریعتر شدن روشDMC می گردد.

- **بررسی میکروارگانیسم های آسیب دیده:**

برای تعیین میکروارگانیسم های آسیب دیده به این صورت عمل می شود که یک توده میکروبی استرس دیده را در دو محیط اختصاصی و غیر اختصاصی کشت می دهند. در محیط اختصاصی، فقط ارگانیسم های سالم و در محیط غیر اختصاصی هر دو نوع ارگانیسم سالم وآسیب دیده قادر به رشد هستند می توان نتیجه گرفت که اختلاف پرگنه های دو محیط ، مربوط به میکروارگانیسم های آسیب دیده است. به عنوان مثال برای شمارش استافیلوکوکوس آسیب دیده در مواد غذایی مختلف، از دو محیط اختصاصی TSAS (TSA + %7Nacl) و غیر اختصاصی TSA (Trypticase SoyAgar)استفاده می شود.

روش دیگر جهت شمارش سلول های آسیب دیده استافیلوکوکوس اورئوس بدین صورت است که اگر به محیط کشت اختصاصی، ترکیباتی چون Pyrovat یا کاتالاز افزوده شوند، باعث می گردند که محیط کشت اختصاصی، رشد سلول های آسیب دیده را تأمین کند.

لازم به ذکر است برای سلول های اسلافیلوکوکوس اورئوس یک محیط بسیار مناسب به نام Baird Parkr Agar وجود دارد که حاوی پیروات بوده و در دو سلول سالم و آسیب دیده می توانند رشد کنند.

روش های مدرن خود به سه گروه تقسیم می شوند که عبارتند از:

الف) روش های فیزیکی ب) روش های شیمیایی ج) روش های ایمونولوژیکی

الف) روش های فیزیکی

۱- روش امپدانس:

میکروارگانیسم ها در حین رشد در محیط کشت سوبستراهایی با هدایت الکتریکی پایین را به محصول با کنداکتیویته بالا متابولیزه می نمایند و با اندازه گیری این میزان تغییر می توان تعداد میکروارگانیزمها راتخمین زد.

۲- روش میکروکالریمتری:

این روش، روش سریعی است که با مطاله تغییرات جزئی حرارتی که دقیقاً وابسته به فعالیت های کاتابولیکی سول هاست. برای شناسایی وتعیین میکروارگانیزم های انتقال یافته به مواد غذایی مورد توجه قرار می گیرد.

۳- فلوسیتومتری (Flow Cytomtry)

علم اندازه گیری اجزاء تشکیل دهنده سلول ها و خواص ویژه سلول ها در سوسپانسیون مایع است. این روش؛ روشی بسیار سریع است و عموماً از یک یا دو ماده رنگی استفاده می شود که ترجیحاً با اتصال به سیتوزین و گوانین موجود در DNA به صورت رنگی نمایانشان می سازند.

ب) روش های شیمیایی

۱- نوکلئاز مقاوم به حرارت:

برای تعیین سویه های مختلف استافیلوکوکوس اورئوس خصوصاً انواع مولد آنتروتوکسین بکار می رود که اصطلاحاً Enterotoxiyenic نام دارند.

۲- آزمون LAL (Limulus Amoebocyte Lysat):

باکتری های گرم منفی به وسیله تولید اندوتوکسینی که لایه لیپوپلی ساکاریدی (Lps) غشاء خارجی سلولی آنها را تشکیل می دهد، مشخص می شوند. Lps ماده ای تب زا است و مسئول برخی علائم بیماریهای عفونی می باشد. در آزمون LAL ، نوعی پروتئین حاصل از تجزیه سلولهای خونی (همولنف حقیقی) خرچنگ نعل اسبی

مورد استفاده قرار می گیرد که این پروتئین، حساس ترین ماده شناخته شده در مقابل اندوتوکسینهاست. مراحل آزمون LAL بدین ترتیب است که قسمتی از سوسپانسیونهای غذایی را با مقدار کمی از ماده ((لیسات)) مخلوط کرده سپس در ۳۷ ·C به مدت ۱ ساعت انکوباسیون می کنیم. حضور اندوتوکسین در نمونه مورد آزمایش منجر به تشکیل ژل می شود. گرچه این تکنیک در میکروبیولوژی بالینی و صنعت داروسازی کاربرد بسیار دارد با این حال کاربردهای غذایی آن نیز مد نظرقرار گرفته است میزان اندوتوکسین متناسب با شمار زنده باکتریهای گرم منفی افزایش می یابد.

این آزمون به منظور ارزیابی سریع کیفیت بهداشتی شیر - در ارتباط با تعیین و شناسایی کلی فرمها- قبل و بعد از پاستوریزاسییون مناسب شناخته شده است. از انجا که در آزمون LAL ، باکتریهای گرم منفی اعم از زنده و مرده تعیین می گردند، لذا استفاده از یک((پلیتینگ)) همزمان جهت تعیین تعداد کلنی های تشکیل دهنده آنها ضروری است.

۳- آزمون هیبریداسیون DNA-DNA (DNA-DNA Hybridixtion) :

با فرض تشابه توالی ژنتیکی DNA در کلیه اعضای یک جنس باکتریایی و عدم وجود چنین ترتیبی در دیگر ارگانیسم های مربوط به این گروه، می توان باکتری های نامعلوم را تشخیص داد.

٤- اندازه گیری ATP :

یک روش سریع برای برآورد تعداد میکروب ها، در میکروبیولوژی بالینی بوده و به صورت توسعه یافته در مواد غذایی نیز تا حدودی استفاده می شود. به این ترتیب که آنزیم لوسیفراز یک نوع حشره، در حضورATP ، نور تولید کرده که نور حاصله با دستگاهLuminomter و یا اسپکترومتر قابل اندازه گیری است. میزان نور متناسب با مقدارATP است.

همچنین نمونه با (Triton-100) یا (Apyrase) مخلوط می کنند تا ATP های غیر میکروبی از بین بروند.

لازم به ذکر است این روش ممکن است در برخی موارد مفید واقع نشود از جمله در غذاهای دریایی که حاوی باکتری های Biolominescent (مولد نور) نظیر Vibrio harvcye و Photobacterium fishery می باشند چرا که چنین باکتری هایی خود نیز دارای آنزیم لوسیفراز هستند.

۵- رادیومتری:

در این روش از یک سوبسترای نشان دار(حاوی C^{14}) در محیط کشت میروارگانیزم استفاده شده و سپس میزان CO_2 تولیدی را که نشانداراست با استفاده از یک شمارشگر رادیواکتیویته اندازه گیری می کنند. حال هرچه زمان تعیین وشناسایی CO_2 نشاندار (C^{14})تولید شده بیشتر باشد یعنی تعداد میکروارگانیزم های کمتر است. یعنی زمان تعیین مقدار CO_2 با تعداد میکروارگانیزم ها رابطه عکس دارد. این روش، یک روش وقت گیر است.

٦- آنزیم گلوکورونیداز:

برای باکتری های E.coli استفاده می شود. زیرا درصد بالایی از سویه های آن(۹۷٪) قادر به تولید آنزیم فوق هستند، درحالیکه در باکتریهای دیگر این نسبت کمتر است(نظیر سالمونلاها و شیگلاها)، سوبسترای این آنزیم MUG (4-Methyl Umebelli-B-D-Glucoronide) است که در اثر عمل آنزیم محصولی تولید می شود که دارای خاصیت فلوئورسانس بوده ودر زیر نور بسیار قابل رؤیت است.

۷- روش PCR (Polymerase Chain Reaction) :

در این روش ژن خاصی از کروموزوم باکتری وسعت داده شده وبدین طریق تشخیص میکروب با رقت متوالی فوق العاده امکان پذیر است. به طورکلی این تکنیک روش قدرتمندی است جهت تشخیص حضور میکروبهای بیماریزای غذایی که در حال حاضر نمی توان آن ها را سریع تر جداسازی نمود. با این روش می توان تعداد ۱۰ سلول از یک میکروب هدف را در یک نمونه ۱۰ گرمی غذایی مشخص نمود. همچنین از روش فوق العاده ای در جداسازی ویروس های غذایی دارد.

ج) روشهای ایمونولوژی

۱) آنتی کورفلئورسنت(Fluorescence):

اساس کار افزودن آنتی کورهای نشان دار به نمونه موردنظر است که بین آنتی ژن و آنتی کور یک کمپلکس به وجود می آید که دارای تشعشعات فلئورسانس است زیرا ترکیبات نشاندار مواد فلئورسنتی هستند که از جمله می توان به ایزوسیانات، ایزوتیوسیانات و rhodamin B اشاره کرد. این روش به دو صورت مستقیم و غیر مستقیم است که در روش مستقیم، آنتی کور مستقیماً با آنتی ژن کمپلکس می دهد ولی در روش غیر مستقیم از طریق یک آنتی کور دیگر با آنتی ژن کمپلکس می دهد.

۲) روش RIA (Radio Immuno Assay) :

ماده رادیواکتیوی رابه یک آنتی ژن افزوده، اجازه می دهد تا این آنتی ژن نشاندارشده با آنتی کور خود واکنش دهد. سپس میزان آنتی ژن که با آنتی کور ترکیب شده است به کمک یک شمارنده رادیواکتیو اندازه گیری می شود. ماده رادیواکتیو بیشتر I 125 (ید رادیواکتیو) می باشد.

۳) آزمون EIA یا ELISA

مشابه تکنیک RIA است با این تفاوت که در آزمون EIA از یک آنزیم متصل شده با آنتی کور یا آنتی ژن استفاده می شود که این آنزیم با یک ایزوتوپ رادیواکتیو نشان دارشده است.

باروش ELISA می توان تعیین و شناسایی آفلاتوکسین ها (نوع B1) را تا حد کمتر ۱pg/mg انجام داد و لذا با این آزمون، بهتراز روش های RIA ، TLC (کروماتوگرافی لایه نازک) و یا HPLC می توان آفلاتوکسین ها را شناسایی کرد.

۴) روش های دیگر ایمونولوژیکی:

- **آزمون Lysis Inhibition و Passive Immuno Hemolysis :**

آزمون اول یا LIT به منظور تعیین و شناسایی سویه هایی از اشرشیاکلی بکار می رود که انتروتوکسین حساس به حرارت تولید می کند.

آزمون دوم یا نیز PIHT نیز مشابه آزمونLIT بوده و به منظور تعیین و شناسایی سویه های مولد LT در اشرشیاکلی بکار می رود.

- هماگلوتیناسیون تراکمی: به منظور تعیین و شناسایی انتروتوکسین باسیلوس سرئوس بکاربرده می رود.
- Monocolonal Antibucly : برای جداسازی انتروتوکسین استافیلوکوکس اورئوس بکار می رود .
- آزمون EC یا Enyiechment Seordeyy : برای شناسایی سالمونلا بکارمی رود.
- برای شناسایی فعالیت میکروبها درمواد غذایی مایع که در حجم زیادی، دارای تعداد کمی میکروب هستند، از روش فیلتر غشایی استفاده می شود. آب و سایر مایعات غذایی را از غشاهای مخصوص که میکروب ها را در خود نگه می دارند، عبور می دهند. سپس غشا ها را به محیط کشت انتخابی انتقال می دهند و یا میکرو ارگانیزم های موجود را به طور اختصاصی رنگ آمیزی نمود و از روش شمارش مستقیم میکروسکوپی تعداد آن ها را تعیین می کنند. لذا استفاده از این روش باعث سریعتر شدن روش DMC می شود.
- در گذشته از آزمایش کواگولاز (Coagulase test) برای تشخیص انتروتوکسیژنیک ها استفاده می شد. به این معنی که اگر استافیلوکوکوس کواگولاز مثبت است مولد انتروتوکسین می باشد. اما این روش صد در صد مطمئن نبوده، زیرا حدود ۹۳ درصد از استافیلوکوکوس های کواگولاز مثبت، انتروتوکسیژنیک هستند درحالیکه روش نوکلئاز مقاوم به حرارت مطمئن تر(۹۵٪) است. از دیگر فواید نوکلئاز مقاوم به حرارت به عنوان شاخصی از رشد و فعالیت st.aureous می توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱- نوکلئاز به دلیل طبیعت مقاومت به حرارتش در شرایطی که سلول های باکتریایی توسط حرارت، مواد شیمیایی و باکتریوفاژها از بین رفته یا آسیب می بینند، بدون تغییر باقی می ماند.

۲- سریعتر از انتروتوکسین شناسایی می شود.

۳- سلولهای انتروتوکسین زا، نوکلئاز بیشتری در مقایسه با انتروتوکسین تولید می کنند.

جستجوی شیرهای بروسلوزی (ایجاد کننده تب مالت)

شیرهای بروسلوزی عبارتند از شیرهایی که حاوی بروسلاها به خصوص بروسلا آبورتوس و بروسلا ملیتنسیس می باشند. آلودگی شیر به بروسلا ها معمولا از راه شیر دام صورت می گیرد و در انسان ایجادتب مالت می کند. جستجوس بروسلا ها ممکن است در مورد شیر یک دام یا مخلوطی از شیر چند دام در محل تولید (در داخل اصطبل) یا در آزمایشگاه انجام شود.

یکی از آزمایشاتی که برای جستجوی شیرهای بروسلوزی انجام می شوند آزمایش حلقه است:

اصول آزمایش حلقه: وجود بروسلا ها در بدن دام (در پوششهای داخل رحم، پستان و غیره) موجب پیدایش پادتن در خون و شیر می گردد حال چنانچه پادگن رنگی مربوطه به شیر را اضافه کنیم آگلوتیناسیون ایجاد شده و به علت بالا آمدن چربی حلقه رنگی مشخصی در بالای لوله آزمایش تشکیل می گردد.

وسایل لازم برای آزمایش:

لوله همولیز به طول ۱۰ سانتی متر و قطر ۱۰ میلی متر با چوب پنبه (که بلافاصله قبل از استعمال به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار گرفته باشد)، پیپت یک میلی لیتری، معرفهای لازم برای آزمایش: پادگن رنگی (که از یک سوسپانسیون غلیظ و رنگی پیکرهای کشته بروسلا آبورتوس بوویس تشکیل گردیده است).

رنگهایی که معمولا مورد استفاده قرار می گیرند عبارتند از : هماتوکسیلین، ویوله دوژانسیان یا ملحی از تترازولیوم مانند تری فنیل تترازولیوم که به ترتیب آبی، بنفش و گلی رنگ می باشند. پادگن را باید در یخچال نگهداری نمود ولی باید دقت نمود که در موقع نگهداری منجمد نشود.

طرز عمل: در یک لوله همولیز یک میلی لیتر شیر وارد نموده و یک قطره پادگن به آن اضافه می نماییم. دهانه لوله را با چوب پنبه مسدود نموده لوله را فورا چندین مرتبه وارونه می نماییم تا شیر و پادگن خوب مخلوط شود. لوله را باید بملایمت تکان داد تا از ایجاد کف جلوگیری شود. چنانچه بعد از چند دقیقه در سطح فوقانی شیر

طبقه رنگی تیره ایجاد گردد دلیل بر این است که لوله خوب تکان داده نشده است. سپس لوله را به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه در اتو یا حمام آب ۳۷ درجه سانتی گراد قرار می دهیم و پس از این مدت نتیجه را قرائت می کنیم. برای صرفه جویی در وقت و سرعت در قرائت نتیجه پس از اینکه لوله یک ربع ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت می توان آنرا به مدت یک دقیقه سانتریفوژ کرد و بلافاصله نتیجه را قرائت کرد.

قرائت نتیجه: (پادگن رنگی با هماتوکسیلین)

- حلقه آبی ولی ستون لوله آزمایش حاوی شیر سفید رنگ +++
- حلقه آبی ولی ستون شیر کمی آبی رنگ ++
- حلقه آبی روشن ولی ستون شیر آبی رنگ +
- حلقه کمی آبی رنگ یا همرنگ با ستون شیر + (مشکوک)
- حلقه سفید یا کمی آبی رنگ ولی ستون شیر آبی روشن -

تعبیر نتایج: واکنش مثبت همیشه دلیل بر این نیست که میکروب بروسلا حتما در شیر موجود است و برای اطمینان بیشتر باید به آزمایشهای دقیق تر (تلقیح به خوکچه هندی) متوسل گردید

اهمیت بروسلا:

- به لحاظ اقتصادی: اگردامها دچار بیماری بروسلاز شوند تولید شیر در آنها به میزان ۳۰ درصد کاهش یافته و در ترکیبات شیر هم تغییراتی ایجاد می شود از طرفی این بیماری باعث سقط جنین درحیوان شده و ایجاد نازایی موقت یا دائم درحیوان می کند در برخی موارد فاصله بین ۲ دوره شیرداری درحیوان زیاد می شود.
- به لحاظ بهداشتی: اگر شیر حیوان مبتلا به بروسلوز مصرف شود در انسان ایجاد تب مالت یا بروسلوز می کند که تب مواج هم می گویند چون تب حالت مداوم ندارد مثل مالاریاست. این باکتری در آب و هوایی معتدل به

مدت ۱۰۰ روز در خاک و ۲۵ روز در آب قادر است زنده بماند ونسبتا به خشکی و حرارت حساس تر از سرما است.

بروسلا شرایط پاستوریزاسیون را تحمل نکرده و در غلظت ۱۰٪ نمک به بالا از بین می رود. در تهیه پنیر سنتی که شیر را تا ۴۰ درجه سانتی گراد حرارت می دهند تا کاپاکازئین منعقد نشود خطرآلودگی باقی مانده است بنابراین آن را در غلظت نمک بالای ۱۰٪ نگهداری می کنند (مثل پنیر لیقوان که شور است).

علائم بیماری تب مالت:

دوره کمون بیماری ۲-۳ ماه (ورود به بدن تا ظهور علائم) طول می کشد و شباهت زیادی به علائم بیماری مالاریا در ابتدا دارد. معمولا شبها تب زیاد و در روز کم است ممکن است چند روز تب بیمار قطع و دوباره شروع شود بنابراین به تب مواج معروف است و با ضعف عمومی و دردهای استخوانی بخصوص در ناحیه کمر ، ساق پا و مفاصل توام است بیمار در شب معمولا زیاد عرق می کند بروسلوز در حیوانات یک بیماری موضعی است (سقط جنین) است و در انسان به صورت عمومی وارد بدن می شود. هرچند در بدن انسان هم می تواند موضعی شده و باعث تورم کبد-کلیه-پرده مغز (آنسفالیت) و تورم رگها شود. به علاوه بدن نسبتا به ترکیبات سلول باکتری حساسیت نشان می دهد. به این صورت که ممکن است دانه های ریز قرمز رنگی در سطح بدن ظاهر شده که سریعا چرکی شوند در انسان کمتر این باکتری ایجاد سقط جنین یا ورم پستان می کند و برای شناسایی بروسلا از شیر، سرم خون و یا از ترشحات دیگر بدن (درحیوانات از ترشحات رحمی آنها) استفاده می شود.