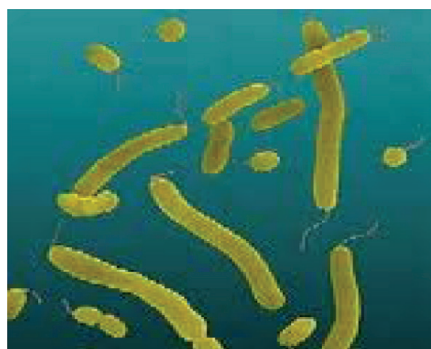


## ۶-۸- آزمون اختصاصی جستجو و شمارش ویبریو پاراهمولیتیکوس<sup>۱</sup> در ماهی



شکل ۱۵-۸- ویبریو پاراهمولیتیکوس با شکل خمیده و یک تازه قطبی

ویبریو پاراهمولیتیکوس یکی از گونه‌های مهم جنس ویبریو می‌باشد که همگی باکتری‌های گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری هستند و با تازه قطبی دارای حرکت می‌باشند. این باکتری‌ها در محیط‌های دریایی و آب‌های شیرین یافت می‌شوند و از مهم‌ترین ویژگی آنها رشد در مقادیر بالای نمک (NaCl) است. ویبریو پاراهمولیتیکوس بخشی از باکتری‌های ساکن طبیعی آبهای مصب رودخانه است که در طول ماه‌های زمستان در رسوبات پنهان شده و با گرم شدن آب، دوباره فعال شده و سخت‌پوستان و برخی از ماهیان را مورد حمله قرار می‌دهد و در بدن آنها تکثیر می‌کند. بنابراین بیشتر عفونت‌های مربوط به این باکتری با مصرف آبزیانی مانند ماهی، خرچنگ، میگو و صدف‌های خوراکی که یا به صورت خام مصرف می‌شوند و یا پس از پخت، آلوده شده‌اند صورت می‌گیرد. این باکتری نسبت به گرما حساس بوده و با پخت کامل ماده غذایی دریایی از بین می‌رود.

**نکته:** به دلیل این که ویبریو پاراهمولیتیکوس بیشتر در تعداد کم وجود دارد و بیشتر همراه با باکتری‌های خانواده اتروباکتریاسه (گرم منفی روده‌ای) در محیط‌های آب یافت می‌شود بنابراین برای جداسازی آن نیاز به دو مرحله غنی‌سازی در محیط‌های کشت انتخابی ضروری است.

### مراحل جداسازی ویبریو پاراهمولیتیکوس:

۱- غنی‌سازی در محیط کشت انتخابی

۲- جداسازی و شناسایی

۳- مرحله تأیید

### محیط کشت‌های مورد نیاز در آزمون:

— آبگوشت غنی کننده آب پپتونه آلکالین نمکی (ASPW)<sup>۲</sup>: این محیط به دلیل افزایش pH و مقادیر بالای نمک

انتخابی شده است.

— تیوسولفات سیتрат بایل ساکارز آگار (TCBS)<sup>۳</sup>: محیط کشت افتراقی انتخابی است. مواد انتخابی در محیط شامل

سیترات سدیم، تیوسولفات سدیم است که pH قلیایی ایجاد کند و از رشد کلی فرم‌ها و باکتری‌های گرم مثبت جلوگیری می‌نماید. تیوسولفات سدیم و سیترات فریک به عنوان معرف برای تعیین تولید H<sub>2</sub>S عمل می‌کنند.

### — محیط کشت TSI

— اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC)<sup>۴</sup>: محیط نمکی برای شناسایی

— لیزین دکربوکسیلاز (LDC)<sup>۵</sup>: محیط نمکی برای شناسایی

۱- *Vibrio parahaemolyticus*

۲- Alkaline pepton water

۳- Thiosulfate - citrate - bile salt sucrose agar

۴- L - Ornithine decarboxylase monohydrochloride

۵- L - Lysine decarboxylation medium

- آرژنین دهیدروکسیلاز (ADH)<sup>۱</sup> : محیط نمکی برای شناسایی
- محیط تریتوفان نمکی : برای شناسایی اندول
- محلول ONPG<sup>۲</sup> : برای شناسایی بتاگالاکتوزیداز
- محیط کشت آگار مغذی نمکی : همان آگار مغذی ولی همراه با کلرید سدیم ۳٪ است.
- معرف واکنش اکسیداز : N,N,N,N - تترامتیل - ρ - دی امین

#### مواد و وسایل مورد نیاز

- ظرف‌های شیشه‌ای سترون شده
- پی‌پت‌های سترون
- لوپ یا حلقه کشت
- سوزن کشت
- کاغذ صافی
- آب پیتونه آلکالین نمکی (ASPW)
- لوله دارای ۱۰ میلی لیتر آب پیتونه آلکالین نمکی
- پلیت دارای محیط کشت TCBS
- محلول کلرید سدیم ۳٪
- محیط کشت‌های مرحله تأییدی
- محیط کشت آگار مغذی نمکی
- معرف تولوئن
- گرمخانه قابل تنظیم با دمای ۳۷° C و ۴۲° C

#### روش کار

الف) مقدار ۲۵ گرم نمونه مورد نظر را با ۲۲۵ میلی لیتر محیط غنی کننده آب پیتونه آلکالین نمکی در یک ظرف شیشه‌ای خوب مخلوط کنید.

نکته : تعداد ویبریو پاراهمولیتیکوس در دمای یخچال کاهش می‌یابد بنابراین سوسپانسیون اولیه را تا جایی که امکان دارد در این دما نگهداری نکنید در صورت ضرورت، تا حد امکان، زمان نگهداری را کوتاه کنید.

ب) سوسپانسیون آماده شده را در دمای ۴۲° C به مدت ۶ ساعت گرمخانه گذاری کنید.

نکته : برای نمونه‌های فریز شده دمای گرمخانه گذاری ۳۷° C ولی برای نمونه‌های تازه و نمک زده شده دمای ۴۲° C مناسب است.

پ) پس از این مدت از سوسپانسیون نگهداری شده در گرمخانه ۱ میلی لیتر با پی‌پت سترون برداشته و به لوله دارای ۱۰ میلی لیتر محیط ASPW اضافه نمایید.

ت) لوله تلقیح شده را در دمای ۴۲° C به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه گذاری کنید.

۱- Arginine dehydroxylase

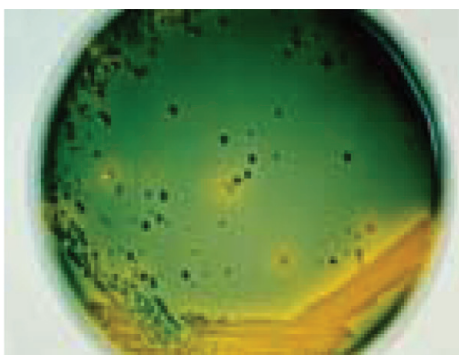
۲- Ortho-Nitrophenol-β-D-galactopyranoside

ث) پس از ۱۸ ساعت ابتدا لوله را به خوبی تکان داده و با لوپ یک حلقه کامل از محتویات داخل آن برداشته و بر روی سطح محیط کشت TCBS کشت دهید.

ج) پلیت‌های کشت شده را به صورت وارونه در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری کنید.  
چ) پس از این مدت پرگنه‌های تشکیل شده را از نظر وجود ویبرو پراهمولیتیکوس بررسی کنید و از پشت با ماژیک آنها را علامت بگذارید.

ح) از کلنی‌های ویبرو پراهمولیتیکوس با لوپ برداشت کرده و در محیط آگار مغذی کشت خطی انجام دهید و کشت‌ها را در گرمخانه با دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت نگهداری نمایید.

مشخصات کلنی ویبرو پراهمولیتیکوس در محیط TCBS آگار : پرگنه‌های ویبرو پراهمولیتیکوس در این محیط کروی و ۲-۳ میکرون قطر دارد و به رنگ سبز یا آبی دیده می‌شود در صورتی که کلنی‌های ویبروکلرا در این محیط به دلیل تخمیر ساکارز زرد رنگ دیده می‌شود.

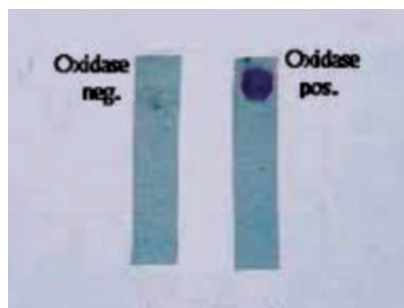


شکل ۱۶-۸ - پرگنه‌های ویبرو پراهمولیتیکوس (سبز)  
و ویبروکلرا (زرد) در محیط TCBS

خ) از پرگنه‌های تک ویبرو پراهمولیتیکوس در محیط آگار مغذی نمکی برداشت کرده و در محیط‌های مربوط به تست‌های بیوشیمیایی کشت دهید.

#### تست‌های بیوشیمیایی

— آزمون اکسیداز : با سوزن کشت از پرگنه ویبرو پراهمولیتیکوس تشکیل شده در محیط آگار مغذی نمکی برداشته و روی کاغذ صافی آغشته شده به معرف اکسیداز تترامیل - پارافنیل آمین کلراید بکشید. مشاهده رنگ ارغوانی پر رنگ پس از ۱۰ ثانیه نشان‌دهنده اکسیداز مثبت بودن واکنش است.



شکل ۱۷-۸ - نتیجه آزمون اکسیداز

— **تست TSI نمکی** : با سوزن کشت از پرگنه ویبرو پارهمولیتیکوس برداشت کرده و در محیط TSI کشت دهید. (ابتدا در عمق محیط فرو برده و سپس در روی سطح مورب محیط به شکل زیگزاگ کشت دهید)

**نتیجه کشت در محیط TSI نمکی** : ویبرو پارهمولیتیکوس در سطح شیبدار به دلیل عدم تجزیه لاکتوز یا ساکارز هیچ گونه تغییر رنگ، ایجاد نکرده، سطح محیط قرمز و عمق محیط کشت در اثر تولید اسید به رنگ زرد دیده می‌شود و به دلیل عدم تشکیل حباب و عدم تولید سولفید هیدروژن، بدون گاز بوده و به رنگ سیاه دیده نمی‌شود ولی ویبرو کلرا در سطح شیبدار به دلیل تجزیه لاکتوز یا ساکارز به رنگ زرد و عمق محیط کشت به رنگ زرد در اثر تولید اسید بدون حباب گاز و به علت تولید نشدن سولفید هیدروژن به رنگ سیاه دیده نمی‌شود.

— **آزمون اورنیتین دکربوکسیلاز** : با استفاده از لوپ از کلنی ویبرو پارهمولیتیکوس برداشت کرده و در محیط اورنیتین دکربوکسیلاز کشت دهید و در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت نگهداری نمایید.

**نتیجه** : پس از این مدت گرمخانه گذاری پیدایش رنگ صورتی مایل به بنفش در محیط نشانگر مثبت بودن و پیدایش رنگ زرد نشانه منفی بودن واکنش است.

— **آزمون لیزین — دکربوکسیلاز** : با حلقه کشت سترون شده، از کلنی‌های مشخص برداشته و به عمق محیط تلقیح کنید. پس از افزودن یک میلی لیتر روغن معدنی استریل به محیط آن را در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری کنید.

**نتیجه** : کدورت و ایجاد رنگ ارغوانی مایل به بنفش بعد از گرمخانه گذاری نشانگر واکنش مثبت و مشاهده رنگ زرد نشانگر واکنش منفی است.

— **آزمون هیدرولیز آرژنین دهیدروکسیلاز** : با استفاده از سوزن کشت بخشی از کلنی ویبرو پارهمولیتیکوس را برداشته و به محیط آبگوشت نمکی منتقل کنید و سپس سطح محیط مایع را با روغن معدنی استریل بپوشانید و سپس آن را در گرمخانه با دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت نگهداری کنید.

**نتیجه** : کدورت و ایجاد رنگ ارغوانی نشانه واکنش مثبت است ولی رنگ زرد نشانه واکنش منفی است.

— **آزمون بتاگالاکتوزیداز** : با استفاده از سوزن کشت مقداری از کلنی باکتری را برداشته و به لوله دریچ دار دارای محلول کلرید سدیم تلقیح کنید. سپس یک قطره از معرف تولوئن را به لوله اضافه نمایید و به خوبی تکان دهید. سپس محیط را در حمام آب با دمای  $37^{\circ}\text{C}$  قرار دهید و به مدت زمان ۵ دقیقه در آن نگه دارید. بعد از این مدت از محلول ONPG به لوله اضافه نموده و لوله را دوباره در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت قرار دهید.

**نتیجه** : ایجاد رنگ زرد در محیط نشانه واکنش مثبت است که کمتر از ۲۰ دقیقه ایجاد می‌شود و عدم مشاهده رنگ زرد پس از ۲۴ ساعت نشانه واکنش منفی است.

— **آزمون تحمل نمک** : با افزودن کلرید سدیم محیط کشت آب پیتونه با غلظت‌های ۰٪، ۲٪، ۴٪، ۶٪، ۸٪ و ۱۰٪ را تهیه کنید و از سوسپانسیون باکتری یک حلقه کامل توسط لوپ به لوله‌ها اضافه نمایید و لوله‌ها را در گرمخانه با دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت نگهداری کنید و در این فاصله لوله‌ها را بررسی نمایید.

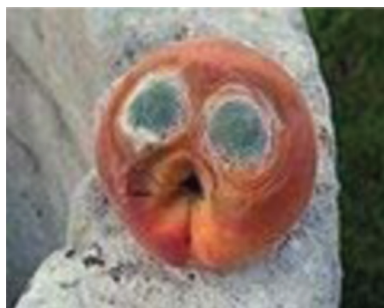
**نتیجه** : کدورت ایجاد شده در لوله‌ها نشانه رشد باکتری در غلظت نمک مربوطه است.

در جدول ۵ — ۸ نتیجه آزمون‌های بیوشیمیایی ویبرو پارهمولیتیکوس و ویبرو کلرا با هم مقایسه شده است.

جدول ۵-۸- یافته‌های تست‌های بیوشیمیایی ویبریو کلرا و ویبریو پاراهمولیتیکوس

آزمون	ویبریو کلرا	ویبریو پاراهمولیتیکوس
اکسیداز	+	+
تولید گاز از گلوکز	-	-
لاکتوز	-	-
ساکارز	+	-
اورنیتین دکروکسیلاز	+	+
لیزین دکروکسیلاز	+	+
آرژنین دهیدروکسیلاز	-	-
بتاگالاکتوزیداز	+	-
رشد در آب پیتونه با غلظت‌های :		
۰٪	+	د
۲٪	+	+
۶٪	-	+
۸٪	-	+
۱۰٪	-	-

## ۷-۸- روش‌های شناسایی کپک‌ها و مخمرها در مواد غذایی



شکل ۱۸-۸- نمونه‌ای از آلودگی میوه‌ها با کپک‌ها

کپک‌ها<sup>۱</sup> گونه‌هایی از قارچ‌ها هستند که به شکل چند سلولی و با تشکیل هیف<sup>۲</sup> رشد می‌کنند. به هیف‌هایی که به هم تابیده می‌شوند و شکل کلنی کپک‌ها را می‌سازند می‌سلیموم<sup>۳</sup> گفته می‌شود در صورتی که مخمرها<sup>۴</sup> گونه‌های تک سلولی هستند. جمعیت زیادی از کپک‌ها وجود دارند که می‌توانند روی

۱- moulds

۲- hyphae

۳- mycelium

۴- yeasts

غلات، حبوبات و میوه‌ها پیش از برداشت و طی زمان نگهداری پس از برداشت، رشد کنند. در مواد غذایی فرآیند شده نیز ممکن است یافت شوند. برخی از کپک‌ها به دلیل تولید سموم قوی به نام مایکوتوکسین<sup>۱</sup> و از جمله آفلاتوکسین که در برابر دما تا حدود ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد مقاوم بوده و بنابر این طی فرآیندهای گرمایی مواد غذایی و پختن از بین نمی‌روند و مشکلات زیادی را از نظر ایمنی مصرف ایجاد می‌کنند.

**بین باکتری‌ها، مخمرها و کپک‌ها تفاوت‌های عمده‌ای وجود دارد که شامل موارد زیر است :**

– بیشتر مخمرها و کپک‌ها هوازی هستند، گونه‌هایی از مخمرها در شرایط هوازی اختیاری هم به خوبی رشد می‌کنند.  
– نسبت به باکتری‌ها سرعت رشد کمتری دارند به همین دلیل طول مدت نگهداری آنها برای رشد ۵ تا ۱۳ روز است، در صورتی که رشد باکتری‌ها ۴۸-۲۴ ساعت طول می‌کشد.

– دامنه تحمل pH در آنها وسیع است (۹-۲)

– دمای مورد نیاز مخمرها و کپک‌ها برای رشد °C ۲۵-۴ است در صورتی که بیشتر باکتری‌ها، غیر از سرما دوست‌ها، به دمای °C ۳۷ برای رشد نیاز دارند.

– بیشتر کپک‌ها در محیط‌های با میزان آب ( $aw < ۸۵\%$ ) رشد می‌کنند.

برای رشد مخمرها و کپک‌ها محیط‌های کشت انتخابی و دمای پایین به منظور جلوگیری از رشد باکتری‌ها استفاده می‌شود.

برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها در محیط رشد مخمرها و کپک‌ها روش‌های زیر نیز به کار گرفته می‌شود :

الف) اضافه کردن برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها مانند کلرامفنیکل<sup>۲</sup> به میزان ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر لیتر یا جنتامایسین<sup>۳</sup> به مقدار ۵۰ میلی گرم در لیتر.

ب) برای رشد کپک‌ها و مخمرها لازم است محیط‌های کشت اسیدی شوند. با افزودن اسید تارتاریک به محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار<sup>۴</sup> محیط اسیدی و برای رشد کپک‌ها مساعد می‌شود.

کپک‌ها با تولید اسپور تکثیر می‌کنند و روش تولید مثل آنها جنسی و یا غیر جنسی است. کلنی‌های کپک‌ها در محیط‌های کشت و در سطح مواد غذایی به گونه‌ای است که هیف و میسلیم‌های سطحی آنها و اسپورشان در سطح و بقیه قسمت‌ها درون محیط یا داخل ماده غذایی، قرار می‌گیرد. بنابراین ویژگی‌های کلنی کپک‌ها تا حدود زیادی به رنگ اسپور و ساختار میسلیم بستگی دارد.

کپک‌های زیادی در مواد غذایی رشد می‌کنند و باعث فساد می‌شوند که برخی از آنها شامل آسپرژیلوس<sup>۵</sup>، فوزاریوم<sup>۶</sup>، موکور<sup>۷</sup>، پنی سیلیوم<sup>۸</sup>، ریزوپوس<sup>۹</sup> و تریکودرما<sup>۱۰</sup> هستند که در این فصل ساختار سلولی چهار کپک مهم به طور خلاصه ارائه می‌شود.

۱- mycotoxine

۲- Chloramphenicol

۳- Gentamicin

۴- Potatodextrose agar

۵- Aspergillus

۶- Fusarium

۷- Mucor

۸- Penicillium

۹- Rhizopus

۱۰- Trichoderma





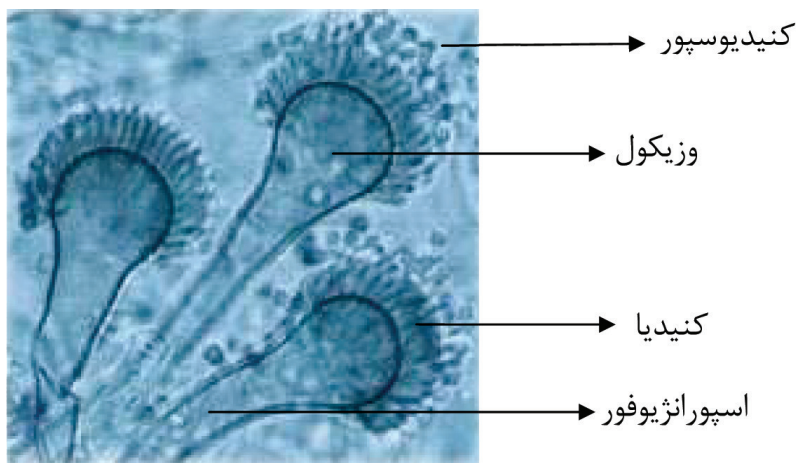
● **آسپرژیلوس**: گونه‌های آسپرژیلوس هوازی اجباری هستند و در محیط‌های غنی از اکسیژن یافت می‌شوند. بیشتر روی سطح مواد غذایی قادر به رشد هستند. گونه‌های آسپرژیلوس بیشتر در مواد غذایی نشاسته دار مانند نان و سیب زمینی رشد می‌کنند.

گونه آسپرژیلوس نیجر<sup>۱</sup> مهم‌ترین گونه آن است که در محیط کشت ساپرو دکستروز آگار پرگنه‌های پرزی و سیاه رنگ تولید می‌کند. گونه‌های دیگر دارای پرگنه‌هایی به رنگ‌های مختلف مانند سبز، زرد و سفید هستند (شکل ۱۹-۸).

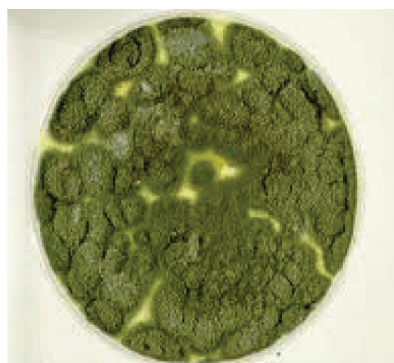
**ساختار میکروسکوپی آسپرژیلوس**: کپک آسپرژیلوس جزء کپک‌هایی

شکل ۱۹-۸- پرگنه‌های برخی از گونه‌های آسپرژیلوس

است که هیف آن دارای دیواره عرضی و شاخه دار است و روی ساختارهای هوایی خود اندامک‌هایی به نام کنیدیوفور (هیف حامل کنیدی<sup>۲</sup>، کنیدیوسپورها<sup>۳</sup>) را می‌سازد. در انتهای هیف حامل کنیدی که شاخه‌ها قرار دارند دارای یک ساختمان برآمده به نام ستونک است و در ابتدای هیف سلول پایه دارد.



شکل ۲۰-۸- ساختمان میکروسکوپی کپک آسپرژیلوس



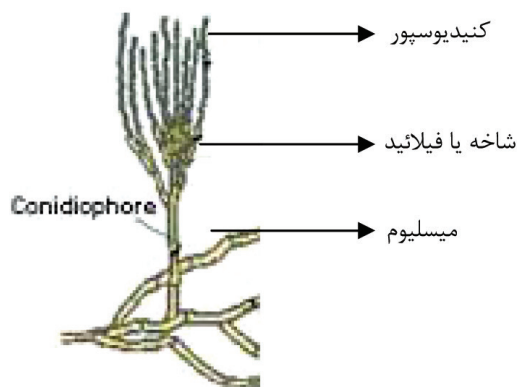
**پنی سیلیوم**: یکی از مهم‌ترین گونه‌های کپک‌ها در محیط‌های طبیعی است که رنگ پرگنه‌های آن به دلیل رنگ سبز کنیدیوسپورها بیشتر سبز رنگ است (شکل ۲۱-۸). *Penicillium notatum* (تولید کننده پنی سیلین) و *Penicillium camemberti* در تولید نوعی پنیر به نام پنیر کامبورت به کار می‌رود.

شکل ۲۱-۸- پرگنه‌های سبز رنگ کپک پنی سیلیوم

۱- *Aspergillus niger*

۲- Conidiophore

۳- Conidiospore



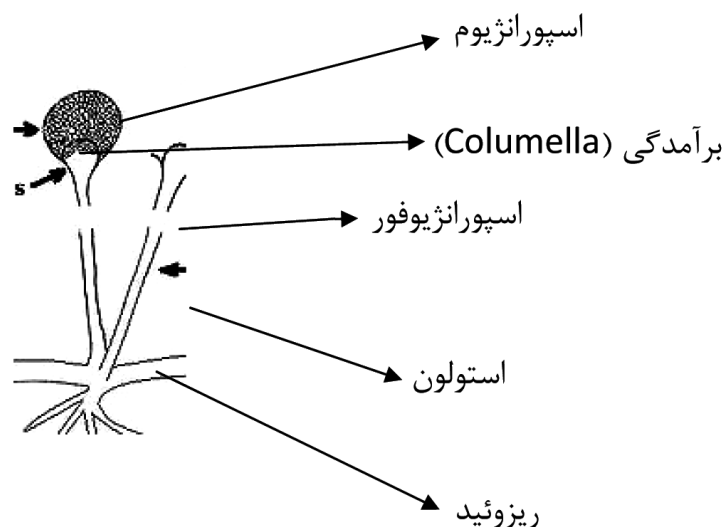
شکل ۲۲-۸ - ساختار کپک پنی سیلیوم

**ساختار پنی سیلیوم:** میسلیوم این کپک به طور معمول از شبکه‌های منشعب تشکیل شده است و هیف آن دارای دیواره عرضی است. مانند آسپرژیلوس دارای کنیدیوفور و کنیدیوسپور است. اما وزیکول یا برآمدگی نداشته در نتیجه شکل گرز مانند آسپرژیلوس را ندارد و شکلی شبیه به جاروهای دسته بلند دارد (شکل ۲۲-۸).

● **ریزوپوس:** ریزوپوس یکی از کپک‌های غیر بیماری‌زا برای انسان (سپروفیت) است که از باقیمانده‌های گیاهان و جانوران تغذیه می‌کند و روی بسیاری از ترکیبات آلی به ویژه مواد غذایی مانند سبزی‌ها و میوه‌ها و نان قادر به رشد است. این کپک به روش تکثیر جنسی و غیرجنسی تولید مثل می‌کند. گونه‌های مختلفی از این کپک

عامل فساد در مواد غذایی هستند مانند *Rhizopus nigricans* که کپک شایع در نان است و *Rhizopus stolonifer* کپک سیاه نان و سیب زمینی و گوجه فرنگی است. پرگنه‌های ریزوپوس در محیط کشت دارای رنگ خاکستری و یشمی می‌باشد که کل تشتک را پر می‌کند؛ زیرا رشد میسلیوم آن خیلی سریع است.

**ساختار میکروسکوپی ریزوپوس:** هیف فاقد دیواره عرضی است. در انتهای هیف دارای ساختاری کیسه مانند به نام اسپورانژیوم می‌باشد که درون آن اسپورانژیوسپورها قرار دارند. هیف حامل اسپورانژیوم اسپورانژیوفور نام دارد و دارای یک برآمدگی است. مهم‌ترین ویژگی ساختاری ریزوپوس وجود ساختمان ریشه مانند یا ریزوئید در محل اتصال هیف‌ها می‌باشد (شکل ۲۳-۸).



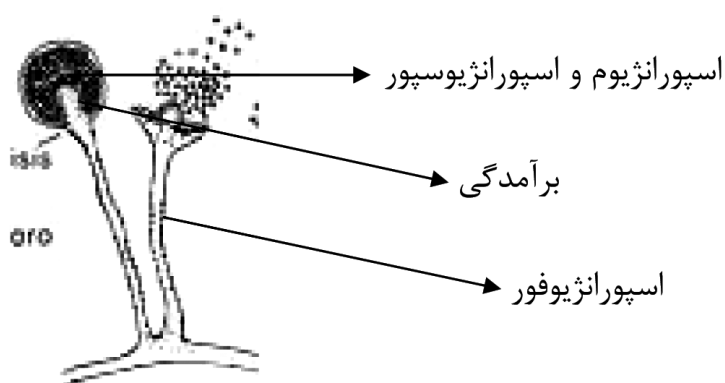
شکل ۲۳-۸ - ساختار میکروسکوپی ریزوپوس





شکل ۲۴-۸ - پرگنه کپک موکور

● **موکور** : موکور دارای ۳۰۰۰ گونه است که کپک‌های شایع در خاک، سطح گیاهان و سبزی‌ها هستند. کلنی‌های این کپک در محیط کشت به رنگ سفید، بزرگ و خاکستری با رشد سریع میسلیوم هستند که کل تشتک را پر می‌کنند.



شکل ۲۵-۸ - ساختار میکروسکوپی کپک موکور

**ساختار میکروسکوپی** : مانند ریزوپوس هیف آنها دیواره عرضی ندارد و اسپورانژیوم، اسپورانژیوسپور و اسپورانژیوفور دارد و بر خلاف ریزوپوس، ریزوید ندارند.

روش‌های آزمون میکروسکوپی کپک‌ها

۱-۷-۸ - روش خرد کردن پرگنه<sup>۱</sup> :

مواد و وسایل مورد نیاز

➤ لام

➤ لامل

➤ سوزن کشت

➤ محیط کشت دارای کپک مورد نظر

➤ لاکتوفنل کاتن بلو

➤ شعله

روش کار

الف) توسط سوزن کشت قسمت کوچکی از پرگنه قارچ را برداشته و بر روی لام دارای یک قطره محلول لاکتوفنل کاتن بلو

<sup>۱</sup> - Teased mount

قرار داده و با لامل سطح آن را بپوشانید.

**نکته:** بهتر است برای مشاهده همه ساختار کپک با سوزن کشت از قسمت عمقی تر پرگنه برداشت کنید و با سوزن دیگر روی لام داخل قطره رنگ پرگنه‌ها را از هم باز کنید.

(ب) رنگ اضافی را خارج نموده و با ۳ بار عبور دادن لام از روی شعله نمونه را تثبیت کنید.

(پ) لام آماده شده را در زیر میکروسکوپ قرار داده با عدسی با بزرگنمایی ۱۰ و در صورت لزوم با عدسی با بزرگنمایی ۴۰ نمونه را مورد بررسی قرار دهید.

**نکته:** با توجه به این که در روش خرد کردن پرگنه، اغلب ساختمان‌های کپک و ارتباط آن از بین می‌رود، برای مطالعه ساختمان کپک‌ها بطور کامل از روش‌های مختلف اسلاید کالچر استفاده می‌شود.

## ۲-۷-۸- اسلاید کالچر<sup>۱</sup>:

مواد و وسایل مورد نیاز

➤ تشتک‌های خالی

➤ لوله شیشه‌ای خمیده U شکل

➤ لام و لامل

➤ پنس

➤ بیستوری

➤ محلول لاکتوفنل کاتن بلو

➤ محیط کشت ساپرو دکستروز آگار

روش کار

الف) ۱۵ میلی لیتر از محیط کشت

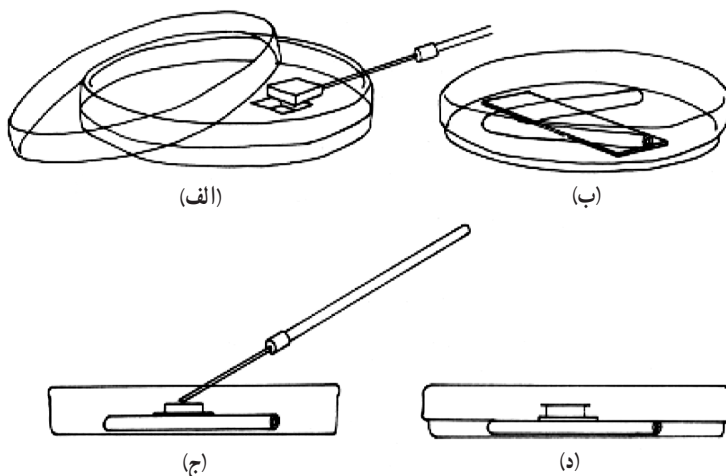
ساپرو دکستروز آگار را درون تشتک خالی سترون ریخته و پس از سفت شدن محیط توسط تیغ بیستوری سترون آن را به قطعات چهارگوش ۱×۱ سانتی متری تقسیم نمایید (شکل ۲۶-۸-الف).

ب) ۷ الی ۸ میلی لیتر آب مقطر سترون

در تشتک دیگری ریخته و یک میله U شکل روی آب بگذارید و یک لام آزمایشگاهی روی آن قرار دهید و سترون کنید. این کار برای تأمین رطوبت لازم جهت رشد قارچ لازم است.

پ) یک تکه از محیط کشت چهارگوش

بریده شده را در شرایط سترون بر روی لام درون تشتک قرار دهید و در وسط آن با سوزن کشت سترون چند پرگنه قارچ مورد نظر را تلقیح نمایید (شکل ۲۶-۸).



شکل ۲۶-۸- مراحل آماده‌سازی آزمون اسلاید کالچر

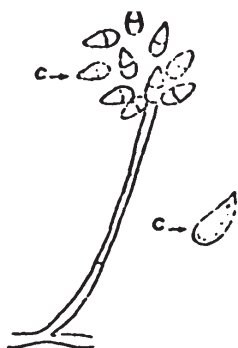
ت) یک لامل سترون را بر روی محیط کشت تلقیح شده قرار داده و کمی فشار دهید تا به خوبی به سطح آگار بچسبد. درب تشتک را گذاشته و آن را در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار دهید و به طور مرتب کشت را از نظر رشد و رطوبت موجود در تشتک مورد بررسی و کنترل قرار دهید و پس از اطمینان از رشد کافی کپک با روش زیر دو نمونه تهیه کنید (شکل ۲۶-۸).

الف) نمونه تهیه شده از لامل: به آرامی و توسط پنس لاملی را که در اطراف آن کپک رشد نموده از سطح محیط برداشته و بر روی یک لام تمیز دارای یک قطره لاکتوفنل کاتن بلو قرار دهید. اگر کپک در اطراف لامل نیز رشد کرده، یک قطره دیگر از لاکتوفنل کاتن بلو بر روی لامل ریخته و با لامل بزرگتری آن را بپوشانید.

نکته: هنگام برداشتن لامل از روی تکه آگار باید از لغزیدن اسلاید روی محیط جلوگیری شود، در غیر این صورت قسمت‌هایی از ساختمان کپک کنده یا جابجا می‌شود و کار شناسایی را با مشکل مواجه می‌کند.

ب) نمونه تهیه شده از لام: محیط کشت را به آرامی از سطح لام بردارید و داخل تشتک بگذارید. سپس لام را از تشتک خارج کرده و یک قطره لاکتوفنل کاتن بلو را در محل رشد پرگنه کپک اضافه نموده و لاملی را بر روی آن قرار دهید. در صورت وجود رنگ اضافی در خارج لامل توسط کاغذ خشک کن آن را خشک و برای مسدود نمودن اطراف لامل از لاک ناخن و یا هر ماده مشابه دیگری استفاده نمایید و سپس لام‌های مزبور را در زیر میکروسکوپ بررسی کنید.

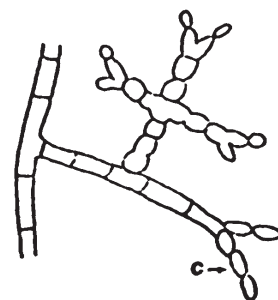
به جای استفاده از تکه آگار در آزمون بالا می‌توان وسط لام قرار گرفته روی میله U شکل مربعی به ابعاد حدود ۱ cm فرض کرده، سه ضلع آن را یک لایه و اسپار سترون قرار داده روی آن یک لامل سترون شده گذاشته و از محل ضلع چهارم با پی‌پت پاستور سترون شده تعداد کمی سلول کپک وارد کرده و بعد با پی‌پت پاستور سترون شده محیط کشت اختصاصی رشد کپک را وارد کرده و پس از پر شدن فضای بین لام و لامل آن را (ضلع چهارم) با واسپار سترون پوشانده و گرمخانه‌گذاری نمایید. یافته‌های این روش کامل تر و واضح تر دیده می‌شود.



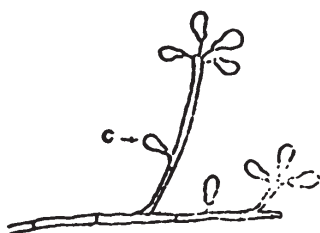
Trichothecium



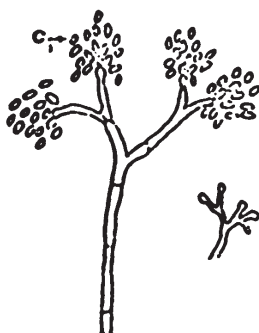
Geotrichum



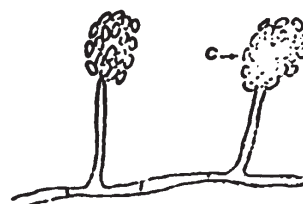
Monilia



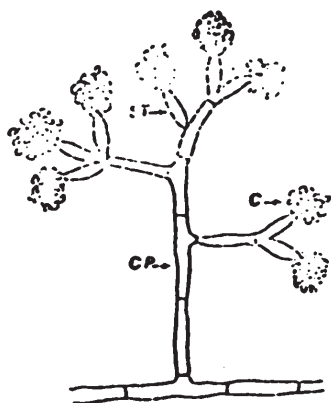
Sporotrichum



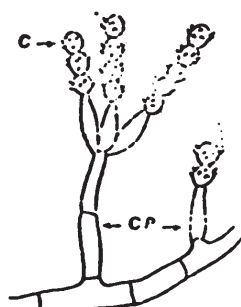
Butyris



Cephalosporium



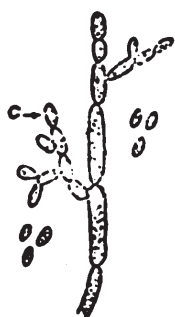
Triohoderma



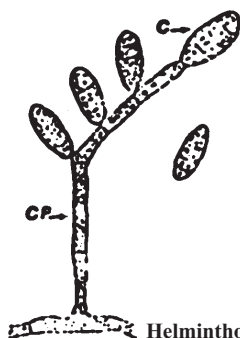
Scopulariopsis



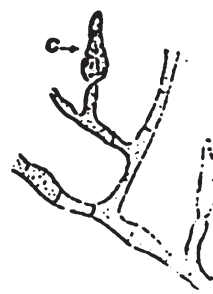
Pullularia



Cladosporium



Helminthosporium



Alternaria

شکل ۲۷-۸ - اشکال بعضی از کپک ها و مخمرها

# آزمون‌های میکروبی تعیین نوع و میزان آلودگی محیط کار

## ۹-۱- آزمون‌های میکروبی تعیین نوع و میزان آلودگی محیط کار

محیط کار و محیط زیست انسان از نظر آلودگی میکروبی تأثیر بسیار زیادی در به خطر انداختن سلامت مصرف کنندگان مواد غذایی و کارکنان آن دارد. از یک طرف محیط کار خود با هوا، آب، خاک، اندام‌های انسان، حیوانات اهلی و وحشی، حشره‌ها و جونده‌ها به میکروارگانیسم‌های گوناگون آلوده می‌شود و از طرف دیگر خود می‌تواند موجبات آلودگی مواد اولیه، فرآورده‌های غذایی و اندام‌های کارکنان را فراهم نماید.

✓ **خاک** - منبع اصلی همه میکروب‌ها شناخته شده است و این میکروب‌ها از راه محل کاشت و گرد و خاک ناشی از جریان‌های هوا به مواد غذایی، آب، هوا و گیاهان و همچنین محیط کار در کارخانه‌های مواد غذایی منتقل می‌شوند، از طرفی خاک می‌تواند به وسیله انسان، حیوان‌ها، آب و هوا و به‌ویژه پساب‌های خانگی و صنعتی آلوده شود.

✓ **آب** - میکروب‌های موجود در آب بیشتر از گونه‌های میکروارگانیسم‌های موجود در خاک، پساب و هواست. آب‌های سطحی دارای مقداری مواد آلی هستند و محیط آنها کم و بیش برای رشد میکروب‌ها مناسب است. در حالی که آب خالص برای زندگی میکروب‌ها نامساعد بوده و پس از مدت کوتاهی مقاومت میکروبی در آن کم می‌شود و نابود می‌شوند. در مواردی که پساب‌ها و زباله‌ها به آب‌های سطحی ریخته می‌شوند، میکروب‌هایی مانند استروپتوکوکوس فکالیس، کلیفرم‌ها، سالمونلا و کلوستریدیوم در آن حضور دارند و مشکلات زیادی را برای سلامت محیط کار و مصرف کنندگان مواد غذایی فراهم می‌کند.

✓ **هوا** - در حالت طبیعی دارای بار میکروبی ویژه‌ای نیست و عوامل آلوده کننده آن از راه خاک، اندام‌های موجودات زنده وارد می‌شوند. ذرات معلق در هوا با قطرات آب موجود در آن محیط مناسبی برای جذب و انتقال میکروب‌هاست. بدیهی است مقدار و گونه‌های میکروارگانیسم‌های موجود در هوا بسیار گوناگون است و بستگی به عواملی مانند میزان رطوبت، دمای محیط کار، جریان هوا، شرایط خاک و میزان آلودگی آن دارد. منبع دیگر آلودگی هوا دستگاه تنفس انسان و حیوان‌هاست که در موارد بسته بودن محیط و حضور فرد بسیار تشدید می‌شود. پساب‌های خانگی، کارگاه‌ها و کارخانه‌های مواد غذایی از منابع مهم آلودگی خاک و سایر عوامل محیط زیست هستند. مجموعه میکروبی پساب‌ها عبارتند از میکروب‌های هوازی، هوازی اختیاری، بی‌هوازی اختیاری و حتی بی‌هوازی اجباری که از منشأ خاک و دستگاه گوارش انسان و دام‌هاست. میکروارگانیسم‌هایی مانند گونه‌های استرپتوکوک فکال، کلوستریدیوم پرفرنزان، شیگلا، سالمونلا، میکروکوک، پseudomonas، لاکتوباسیلوس و در پاره‌ای موارد حتی ویروس‌ها، مخمرها و به‌ویژه کپک در پساب یافت می‌شوند که همگی ممکن است میکروب‌های بیماری‌زا برای انسان باشند و سلامت مردم و محیط کار را به خطر بیندازند و بنابراین کنترل آلودگی و سالم سازی آن بسیار ضروری است.

✓ و اما انسان خود یکی از جدی‌ترین عوامل آلوده کننده محیط کار است. بدیهی است انسان در حالت ابتلا به بیماری یا

گذراندن دوره نقاهت بیماری عامل میکروب بیماری زای مربوطه است و در صورت تماس با مواد غذایی و محیط کار موجب آلودگی آنها می‌شود. اما در بسیاری موارد انسان در حالت سلامت هم ممکن است ناقل میکروب بیماری‌زا باشد و چنین افرادی از نظر سازمان‌هایی که به نحوی با مواد غذایی سروکار دارند دارای اهمیت ویژه‌ای هستند. ناقل بیماری فردی است که میکروب بیماری‌زا در اندام‌های بدنش وجود دارند اما علائم بیماری در او آشکار نیست و به دلایلی در برابر میکروب مورد نظر مصون است و افراد ناقه بیماری افرادی هستند که یا از بیماری مربوطه شفا یافته‌اند و دوره نقاهت کوتاه و گاه طولانی خود را سپری می‌نمایند و یا هرگز به بیماری مبتلا نشده‌اند. منبع اصلی میکروب در بدن افراد ناقل و ناقه ممکن است در یکی از اندام‌های زیر باشد:

— پوست: پوست اندامی است که هرگز بدون میکروب نیست، حتی لای پوست‌های بسیار تمیز هم همواره تعدادی از گونه‌های میکروبی که مجموعه طبیعی آن را تشکیل می‌دهد زیست می‌کنند. اما زمانی که پوست تمیز نباشد تعداد گونه‌های میکروبی و میزان آلودگی بسیار گوناگون و متنوع است. باکتری‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها از راه‌های گوناگون به پوست منتقل می‌شوند، زیرا انسان دست خود را برای کارهای گوناگون به کار می‌برد که از راه هر یک از آنها تعدادی میکروب به دست می‌چسبد که ممکن است همان‌جا تکثیر هم بشوند و یا از راه دست آلوده به نقاط دیگر منتقل شوند.

تکثیر میکروب‌ها در روی پوست‌های مرطوب و عرق‌کننده بیشتر است. گذشته از میکروب‌هایی که روی پوست دست وجود دارند و منشأ خارجی دارند، مجموعه میکروبی پوست دست را گونه‌های مختلف شامل استافیلوکوک اپیدرمیس که از گونه‌های بی‌آزار است و استافیلوکوک طلایی که از گونه‌ای خطرناک و بیماری‌زاست که چنانچه از راه پوست وارد مواد غذایی شود و شرایط رشد و نمو و تکثیر آن فراهم باشد به سرعت تکثیر شده و سم خطرناک و کشنده‌ای سنتز کرده و مصرف چنین غذایی سلامت مصرف‌کننده را به خطر انداخته و ممکن است منجر به مرگ شود. سم این باکتری در برابر دمای تا حدود ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت حدود یک تا دو ساعت مقاوم است و بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که حدود ۵۰ تا ۶۰٪ کارکنان و سایر مردم ناقل گونه‌ای از استافیلوکوک به‌وسیله دست‌های خود هستند که عامل بیماری‌هایی مانند جوش‌ها، کورک‌ها، آکنه‌ها، ورم‌های پوستی و مانند اینهاست.

در کارگران کارخانه‌های مواد غذایی نوعی عفونت استافیلوکوکی به صورت جوش‌های زیاد به نام کاربونکل یا دمل چرکی در نقاط عمیق پوست و نوعی عفونت چرکی به نام فورونکلوزیس یا سالک روی محل بریدگی‌های پوست ایجاد می‌شود که به علت کار مداوم کارکنان و تماس با مواد غذایی دیر ترمیم می‌شود و بنابراین نوعی کانون دایم آلودگی است. نوعی عفونت ناخن به نام عفونت پارونشیا هم در کارگران کارخانه‌های مواد غذایی شایع است. عامل تمام این عفونت‌ها گونه‌های استافیلوکوک هستند، بدیهی است چنانچه افراد مبتلا به این عفونت به نوعی با مواد غذایی سروکار داشته باشند موجب آلودگی می‌شوند و این امر به‌ویژه زمانی که این افراد در تماس مستقیم با مواد غذایی مساعد برای رشد این باکتری‌ها باشند دارای اهمیت زیادی است زیرا در چنین مواردی مقادیر بسیار زیادی از مواد غذایی آلوده شده و بین توده‌های جمعیت توزیع گشته و سلامت مردم را به خطر می‌اندازد.

— دهان، حلق، بینی، گوش و چشم: در این قسمت از اندام‌های بدن انسان به دلیل بالا بودن رطوبت و دما و باقیمانده‌های مواد غذایی امکان رشد و نمو و تکثیر میکروارگانیسم‌ها بیشتر است. از میان میکروب‌هایی که در این اندام‌ها رشد می‌کنند می‌توان استافیلوکوک اورئوس را نام برد. این باکتری به‌ویژه از نظر این که از راه تنفس هم امکان انتقال آن وجود دارد مهم است، زیرا گونه‌های این باکتری عامل اصلی سینوزیت و سرماخوردگی است و افراد مبتلا به این بیماری پس از شفا یافتن تا دو سال ناقل میکروب هستند. بنابراین افرادی که مبتلا به عفونت‌های دستگاه تنفس، چشم و گوش هستند و در کارخانه‌های مواد غذایی یا مراکز تغذیه گروهی کار می‌کنند باید مورد مراقبت‌های ویژه باشند و پیش از شفا یافتن از بیماری و گذراندن دوره نقاهت نباید در اموری که لازمه آن تماس با مواد غذایی و سطوح کار است فعالیت نمایند.

— دستگاه گوارش: در دستگاه گوارش انسان و حیوان گونه‌های مختلف میکروب‌ها زندگی می‌کنند و مجموعه میکروبی دستگاه گوارش افراد سالم در حالت طبیعی یکسان نیست و هر یک از قسمت‌های دستگاه گوارش مجموعه میکروبی ویژه خود را دارد. محیط معده و روده برای رشد میکروب‌ها مساعد نیست اما قسمت‌های پس از آن شامل ناحیه ژژونوم و ایلئوم کم کم برای زیست میکروب‌ها مساعد می‌شوند و به همین جهت در این قسمت میکروب‌های مختلفی وجود دارند و هرچه از قسمت اول روده کوچک به سمت آخر آن پیش برویم به تعداد و نوع میکروب‌ها افزوده می‌شود. مهم ترین میکروب‌های این قسمت شامل کلیفرم‌ها به‌ویژه گونه‌های استرپتوکوک فکال، سالمونلا، اشریشیاکلی، آئروباکتر آئروژنز و گاهی استافیلوکوک است. گاه ممکن است گونه‌هایی از انگل‌های گوارشی هم حضور داشته باشند.

با توجه به این که در بخش‌هایی از دستگاه گوارش مقدار اکسیژن کم است امکان حضور و رشد و نمو و تکثیر گونه کلسترییدیوم و لشای یا پرفرنژان وجود دارد، این باکتری بی‌هوازی اختیاری و اسپورساز است و بنابراین از باکتری‌های مشکل‌ساز در صنایع غذایی است.

با توجه به آنچه گفته شد افراد مبتلا به دیسانتري میکروبی و شیگلوز، سالمونلا، دیسانتري آمیبی نباید در بخش‌هایی از مواد غذایی که مواد اولیه و غذاهای بسته بندی نشده در معرض هواست شاغل باشند. افراد مبتلا به دیسانتري باسیلی و شیگلوز برای مدت کوتاهی ناقل عامل بیماری هستند اما ناقل دایم نمی‌شوند. در مورد سالمونلا و عفونت ناشی از اشریشیاکلی فرد مبتلا برای همیشه ناقل عامل بیماری می‌شود. همچنین افراد مبتلا به دیسانتري آمیبی پس از شفا یافتن برای همیشه ناقل بیماری می‌شوند. افراد مبتلا به هیاتیت ویروسی برای حدود ۵ سال ناقل هستند.

— حیوانات اهلی و دام‌ها از مهم‌ترین عوامل آلوده کننده محیط زیست و محیط کار هستند. استافیلوکوک طلایی، استرپتوکوک فکال، کلسترییدیوم پرفرنژان و کلیفرم‌ها در دهان، بینی، دستگاه گوارش، پوست و سایر اندام‌های این موجودات به تعداد زیاد یافت می‌شود. گونه‌های سالمونلا هم ممکن است موجب آلودگی مواد غذایی و اندام‌های انسان، محیط کار و سطوح در تماس با مواد غذایی بشود. حیوان‌هایی که زیست جمعی دارند به سادگی میکروب‌های اندام‌های خود را به سایرین منتقل می‌کنند و موجب تشدید آلودگی می‌شوند.

— موش و سایر جووندها در فاصله بین تولید تا مصرف و بیشتر در انبارهای نگهداری مواد غذایی موجب آلودگی می‌شوند. جووندها منبع اصلی گونه‌های سالمونلا آتریدیس و سالمونلا تایفی میوریوم هستند. گاه جووندها غذای پرنده‌ها، انسان و محیط زیست را به میکروب‌های اندام‌های خود آلوده می‌کنند و بنابراین لازم است مواد غذایی و محیط کار از دسترس آنها دور باشند. — حشره‌های محیطی و خانگی به شکل‌های گوناگون موجب آلودگی می‌شوند و چون سرعت تکثیر آنها بسیار زیاد و رفت و آمد آنها در محیط بسیار زیاد است از منابع مهم آلودگی محیط زیست و محیط کار به حساب می‌آیند.

— مگس خانگی هر بار ۱۲۰ عدد تخم می‌گذارد. تخم‌ها پس از ۵ تا ۷ روز بالغ و آماده تکثیر می‌شوند. مگس خانگی تخم‌های خود را بر روی زباله‌ها، پساب‌ها، و فضولات حیوانی می‌گذارد و از این محل‌ها برای تغذیه خود هم استفاده می‌کند و برای نرم کردن مواد غذایی مقداری از بزاق دهان خود را روی آنها می‌ریزد و آلودگی را تشدید می‌کند.

— سوسک حمام هم دارای گونه‌های زیادی است که همه آنها در محیط کار صنایع غذایی و بویژه محل‌هایی که در آنجا باقیمانده‌های غذایی مانند آب، نشاسته، مواد پروتئینی، پنیر، کاغذ وجود دارد حاضر می‌شوند. سرعت حرکت و جابجایی این حشره خیلی زیاد است و محتویات دستگاه گوارش آن به صورت مایع است که آن را بر روی سطح کار و مواد غذایی ریخته و آنها را آلوده می‌کند.



## ۹-۲- روش‌های تشخیص آلودگی میکروبی محیط کار

### ۹-۲-۱- تشخیص آلودگی هوای محیط کار : برای تشخیص آلودگی میکروبی هوای محیط کار و هوای محیط زیست

می‌توان از راه‌های گوناگون استفاده نمود که مهم‌ترین آنها عبارتند از :

الف) روش باز کردن تشتک دارای محیط کشت و قرار دادن یا چرخاندن آن در هوا. برای این منظور لازم است ابتدا بسته به نوع آلودگی، محیط کشت جامد و مناسب را به شرحی که در پیش گفته شد آماده سازی، سترون و در پی‌ت ریخته و به صورت در بسته به حال خود قرار داد تا آگار سفت شود. مهم‌ترین عامل آلوده کننده هوای محیط کار اسپر کپک‌ها است و برای رشد کپک‌ها محیط Malt Extract Agar یکی از مناسب‌ترین محیط‌هاست.

پس از سفت شدن محیط آگار می‌توان درب آن را باز کرده و برای چند ثانیه در هوای مورد نظر برای تعیین آلودگی میکروبی چرخاند. به این ترتیب اسپوره‌های معلق در هوا به سادگی روی سطح آگار قرار می‌گیرند و با بستن درب و قرار دادن تشتک‌ها در گرمخانه با دمای مناسب و حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد کلنی کپک‌های آلوده کننده هوا روی سطح آگار ظاهر می‌شوند. برای این منظور زمانی حدود ۴۸ ساعت کفایت می‌کند، اما اگر طی این مدت کلنی‌ها ظاهر نشوند می‌توان گرمخانه‌گذاری را تمدید نمود. به جای چرخاندن تشتک در باز در هوا می‌توان آن را برای چند ثانیه و کمتر از یک دقیقه در معرض هوا قرار داد. به این ترتیب ذرات معلق آلوده به اسپوره‌های موجود در هوا در اثر وزن خود سقوط کرده و روی سطح محیط قرار می‌گیرند و پس از آن لازم است در تشتک‌ها را بسته و آنها را در گرمخانه با دمای مناسب و زمان لازم قرار داد.

ب) فیلتره کردن هوا : برای این منظور می‌توان با نصب فیلتر با منافذ ریزتر از اسپور کپک‌ها جلوی خروجی هواکش و عبور هوا از فیلتر برای حدود ۵ ثانیه و قرار دادن فیلتر روی سطح محیط کشت آگار، شرایطی فراهم کرد که اسپره‌های معلق در هوا آسان‌تر روی محیط کشت قرار گرفته و آماده تکثیر و تشکیل کلنی شوند.

لازم به یادآوری است که فیلترها را می‌توان در محل هوای ورودی قرار داد.

در هر دو روش بالا پس از ظاهر شدن کلنی‌ها می‌توان ضمن شمارش آنها در صورت نیاز آزمون‌های مربوط به شناسایی گونه‌ها را با روش مربوط انجام داد که شرح آن در فصل ۷ ارایه شده است.

چنانچه مشکوک به آلودگی هوای محیط کار با سایر میکروارگانیسم‌ها باشیم لازم است به جای محیط کشت ویژه کپک‌ها از محیط‌های کشت اختصاصی میکروب‌های مورد نظر استفاده شود و برای شناسایی گونه میکروبی از آزمون‌های تأییدی استفاده به عمل آید که در جای خود در این کتاب به آنها اشاره شده است.

### ۹-۲-۲- تشخیص آلودگی میکروبی سطوح در تماس با مواد غذایی : سطوح در تماس با مواد غذایی شامل، دست

و پوست کارکنان، میزهای کار، لوله‌های انتقال، زمین، دیوار، درب، پنجره و سقف است.

الف) دست و پوست کارکنان، برای این منظور از روش سواب‌گیری<sup>۱</sup> (پنبه استریل دسته‌دار) استفاده می‌شود، پنبه استریل دسته دار را در محلول رقیق کننده مناسب مانند سرم فیزیولوژی، محلول رینگر، محیط کشت نوترینت پراث خیس کرده و اطراف آن را روی سطح پوست مورد نظر مانند انگشتان دست، کف دست یا هر جای دیگر کشیده و سپس آن را وارد محلول رقیق کننده کرده و دسته اضافی آن را با شکستن خارج نموده و با استفاده از شیکر محتوی محلول رقیق کننده را یکنواخت نموده، سپس آن را تا حد لازم رقیق کنید (مطابق با روش تهیه رقت‌های متوالی در فصل ششم) و به محیط کشت مورد نظر انتقال دهید، بدیهی است محیط کشت

برای شناسایی، باکتری‌های گوناگون متفاوت است اما در بیشتر موارد لازم است آلودگی دست به میکروارگانیسم‌های طبیعی مانند استافیلوکوک طلایی و استافیلوکوک اپیدرمیس و کلی‌فرم‌ها به عنوان شاخص آلودگی دست با دستگاه گوارش مورد ارزیابی قرار گیرد. (ب) سطوح محیط کار و دستگاه‌ها، این سطوح را می‌توان به دو دسته سطوح افقی و عمودی تقسیم کرد، برای سطوح افقی و در مواردی که رطوبت نسبی هوا زیاد بوده و موجب تبخیر آب محیط کشت نمی‌شود می‌توان بسته به نوع میکروب تعدادی محیط کشت جامد عمومی و یا اختصاصی را روی سطح معینی از محل ریخته و به حال خود قرار داد تا میکروارگانیسم‌ها در صورت حضور تکثیر کرده و تشکیل کلنی بدهند. برای سقف و حتی کف می‌توان محیط کشت آگار را در تشتک ریخته و منتظر شد که سفت شود، سپس تکه‌ای از آن را بریده و روی سطح مورد نظر برای تشخیص آلودگی چسباند.

در مواردی که سطوح مورد نظر برای تشخیص آلودگی در جای خشک یا سرد قرار داشته باشند دو روش بالا عملی نیست و لازم است با استفاده از سواب از میکروب‌های سطح معینی از محیط کار نمونه برداری شده و به محلول‌های رقیق کننده و یا محیط‌های کشت انتقال یافته و در گرمخانه قرار داده شود.

(پ) دیوارها، پنجره و سطوح عمودی دستگاه‌ها و مخازن را هم می‌توان با سواب نمونه‌برداری کرده و یا تکه آگار محیط کشت جامد مورد نظر را روی آن چسباند. استفاده از تکه آگار زمانی امکان پذیر است که پیش از تکثیر میکروب‌ها و ظاهر شدن کلنی‌ها آنها خشک نشود.

(ت) لوله‌های انتقال باز شونده و کوتاه را می‌توان با ریختن محیط کشت جامد روی سطح معینی از آن و یا با جاری کردن محیط کشت مایع از داخل آن و یا با جاری کردن ماده رقیق کننده از داخل آن و یا جاری کردن ماده رقیق کننده از داخل آن نمونه‌برداری و مورد آزمون قرار داد؛ نحوه رقیق کردن نمونه و گزینش محیط کشت برای شناسایی میکروارگانیسم‌ها در جای دیگر این مجموعه مورد بحث قرار گرفته است.

(ث) استفاده از تشتک‌های فشاری: این امکان وجود دارد که محیط کشت عمومی یا اختصاصی را در تشتک‌های یکبار مصرف ریخته و بطور کامل پر کرده و پس از سفت شدن آن را روی سطح مورد نظر برای تعیین آلودگی چسباند تا میکروب‌ها به سطح محیط کشت منتقل شوند و با گرمخانه گذاری رشد کرده و کلنی‌های قابل شمارش و شناسایی تشکیل دهند.

**۳-۲-۹- روش پیشرفته و دستگاهی برای ارزیابی آلودگی محیط کار:** در بسیاری از موارد برای ارزیابی سلامت محیط کار در کارخانه‌های مواد غذایی فرصت‌ها اندک بوده و مجال برای انجام کار با روش‌های یاد شده نیست زیرا در بیشتر روش‌های یاد شده کمینه زمان مورد نیاز حدود ۴۸ ساعت است و برای تشخیص نهایی گاه لازم است مراحل تکمیلی با نیاز به زمان بیشتر انجام گیرد. در چنین شرایطی لازم است ارزیابی با روش‌های سریع انجام گیرد. این روش‌ها از سال‌ها پیش در کشورهای پیشرفته به مرحله اجرایی رسیده که چند مورد از آنها در اینجا برای آشنایی مقدماتی ارائه می‌شود.

**۱- روش شمارنده الکتریکی Coulter Counter:** در این روش با استفاده از سواب گیری محل‌های مورد نظر نمونه‌برداری شده، در صورت نیاز رقت‌های مورد نیاز تهیه شده و وارد مخزن می‌شود که در آن لوله موئینی قرار دارد. رقت‌های تهیه شده به ترتیب وارد این مخزن می‌شوند و از داخل لوله موئین و از زیر چشم الکتریکی عبور می‌کنند. چشم الکترونیکی به صورت دیجیتالی، میکروب‌های عبور کرده از لوله موئین و زیر چشم الکترونیکی را شمارش می‌کند.

**۲- روش اندازه گیری آدنوزین تری فسفات:** این روش بر اساس این وضعیت طراحی شده که بین مقدار ATP موجود در یک محلول و تعداد سلول میکروبی رابطه مستقیمی برقرار است و هرچه بار آلودگی میکروبی محیطی بیشتر باشد مقدار ATP آن هم بیشتر است زیرا سلول‌های میکروبی هم کم و بیش دارای مقدار معینی ATP هستند و با تعیین مقدار ATP در هر محیط می‌توان عدد حاصل را بر مقدار ATP یک سلول تقسیم کرد تا تعداد میکروب تعیین شود. مقدار ATP یک سلول  $10^{-1} \times 22/66$  میکروگرم است.

## کتابنامه

- 1- The Bacteriological Examination of water supplies, Her Majestys stationery office.
- 2 – Harrigan W.F. 1996, Laboratory Methods in microbiology Academic press.
- 3- Frazier W.C. 1997, Food Microbiology, McGraw – Hill Book company.
- 4- Thatcher R.S. and clarrk. D.S. 1988, Microorganisms in Foods. University of Toronto press.
- 5- Principles of microbiology for students of Food Technology, Hutchinson Educational.
- 6-Stanier R.Y. etal 1996, General Microbiology Macmillan.
- 7- Davis B.D. etal 1988, Principles of microbiology and Immunology, A Harper International Edition.
- 8- Food Microbiology, 2005, Neelaw Khetrpaul.
- 9- Food Microbiology laboratory, 2005, linne Mac Landzbrough.

- ۱۰- رسول پایان ۱۳۵۶. جزوه آزمایشگاه میکروبی شناسی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
- ۱۱- رسول پایان، ۱۳۹۰، مبانی کنترل کیفیت در صنایع غذایی (ویرایش چهارم چاپ دوم) انتشارات آبیژ
- ۱۲- رسول پایان ۱۳۸۸، کنسروسازی (ویرایش سوم) انتشارات آبیژ
- ۱۳- رسول پایان ۱۳۸۰، مقدمه ای بر تکنولوژی فرآورده های غلات (ویرایش سوم) انتشارات آبیژ
- ۱۴- سحر هنرمند جهرمی ۱۳۸۷، آزمایشات میکروبی شناسی مواد غذایی
- ۱۵- دکتر گیتی کریم، آزمون های میکروبی مواد غذایی
- ۱۶- دکتر رضویلر ۱۳۷۵، میکروبی های بیماری زا در مواد غذایی
- ۱۷- استانداردهای ملی ایران در رابطه با کلیه آزمون های ارائه شده در کتاب

