دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، آزمایشگاه میکروبیولوژی

روش جداسازی ، شمارش و شناسایی باسیلوس سرئوس در مواد غذایی:

تهیه کننده : سهیلا عباسی

مقدمه :

باسیلوس ها به خانواده باسیلاسه تعلق دارند. تا کنون ، ۳۱ گونه از آن ها شناسایی شده است. غالبا هوازی ، گرم مثبت و میله ای شکل بوده اند و اسپور تولید می کنند. در محیط های کشت اختصاصی ، اغلب به صورت زنجیره های بلند مشاهده می شوند. اکثر آن ها مزوفیل ، برخی سرما دوست و بعضی دیگر گرما دوست می باشند. در صنعت کنسرو سازی ، به خاطر مقاومت حرارتی بسیار بالای آن ها اهمیت زیادی دارند.

باسیلوس سرئوس به میزان وسیعی در طبیعت پراکنده است و از مواد غذایی گوناگون جدا می شود. مصرف مواد غذایی که در هر گرم دارای میلیون ها سلول با سیلوس سرئوس می باشد مسمومیت غذایی ایجاد می نماید که بیشتر شامل انواع دسرهای وانیل دار مانند پودینگ ، گوشت پخته و سبزی ها ، برنج پخته یا سرخ شده می گردد. بیماری ناشی از این میکروارگانیسم به دو صورت تظاهر می کند ، یکی با درد های شکمی و اسهال که دوره کمون آن ۱۶-۴ ساعت و علائم ۱۲ تا ۲۴ ساعت به طول می انجام و متداول ترین و مشخص ترین فرم بیماری است. نوع دوم با حالت تهوع و استفراغ شدید که بعد از ۵-۱ ساعت صرف غذای آلوده ایجاد می گردد مشخص می شود.

- در این نوع اسهال معمولا وجود ندارد. یافتن باسیلوس سرئوس در مدفوع برای تشخیص بیماری حاصله از این باکتری کافی نمی باشد چون ممکن است این باکتری این باکتری در نمونه های مدفوع افراد طبیعی هم وجود داشته باشند ولی اگر تعداد باکتری های مذکور از حد 10^{-5} عدد و یا بیشتر در هر گرم از غذا موجود باشند این حالت به عنوان بیماری در نظر گرفته می شود. باسیلوس سرئوس همانند باسیل های دیگر می تواند با عفونت های کلینیکی فرصت طلب متعددی همراه شود و در اغلب موارد افتراق آلودگی سطحی با باسیل ها از بیماری همراه با اسهال ارتباط با یک آنتروتکسین پروتئینی دارد ولی تا به حال این سم جدا و مشخص نشده است و حتی در مورد مکانیسم نوع استفراغ آور بیماری هم اطلاعات کافی وجود ندارد.
- ویژگی های باسیلوس سرئوس و گونه های شبیه آن از نظر کشت:
- مشخصات متداول بیوتیپ های گروه باسیلوس سرئوس و گونه های مشابه در جدول شماره (۱-۷) و (۲-۷) خلاصه شده است.

جدول ۱-۷ ویژگی های باسیلوس سرئوس و گونه های مشابه آن از نظر کشت

اشکال واکنش	باسلوس سرئوس	باسیلوس سرئوی وزاریته میکوئیدس (۱)	باسلوس تورینجنسیس (۲)	باسیلوس آنتراسیس (۳)
واکنش زرده تخم مرغ	+	+	+	+
رنگ آمیزی	+	+	+	+
کاتالاز	+	+	+	+
حرکت	+ -	-	+ -	-
ایجاد بلور های سم	-	-	+	-
رشد به صورت پرگنه های ۴ ریشه ای شکل	-	+	-	-

+ = ۹۰ تا ۱۰۰ درصد از سویه ها مثبت هستند.

+ = تا ۹۰ درصد سویه ها مثبت هستند.

-= کمتر از درصد سویه ها مثبت می باشد.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

جدول ۲-۷ صفات برخی از باسیلوس ها

B.subtilis	B.cereus	B.anthracis	B.Coagulans	B.megaterium	
+	+	+	+	+	تولید اسید از گلوکز
–	–	–	–	۷	تولید اسید از گریولز
+	–	–	–	+	تولید اسید از مانیتولز
–	–	–	–	۷	تولید اسید از لاکتوز
+	۷	+	–	+	تولید اسید از سوکروز
۷	+	+	+	۷	تولید اسید از مالتوز
۷	+	–	۷	۷	تولید اسید از سالیسین
۷	۷	+	+	+	هیدرولیز نشاسته
۷	۷	+	–	–	احیای نیترات
–	+	+	–	–	لسیتیناز
+	+	+ کند	–	+	هیدرولیز ژلاتین

- در انجام آزمایشات فوق به منظور تشخیص باسیلوس سرئوس باید دقت نمود زیرا معمولا حتی در بین گونه ها نیز تغییرات و اختلافاتی وجود دارند. همچنین باید این نکته را مورد نظر قرار داد که برخی از آزمایشات فوق از نظر تشخیص ارزش بیشتری داشته ، امکان انجام آن ها ساده تر از آزمایش های دیگر است و به همین جهت بیشتر مورد استفاده قرار می گیرند.

- پرگنه های باسیلوس سرئوس در روی محیط آگار غذایی مدور و به قطر ۵-۳ میلیمتر برجسته به رنگ سفید خاکستری با اطراف چین دار است. این باکتری در حرارت ۱۰ تا ۴۸ درجه ی سانتی گراد تکثیر می یابد ولی بهترین درجه حرارت برای رشد آن ۲۸ تا ۳۵ درجه ی سانتی گراد می باشد اسپور آن نسبتا در برابر حرارت مقاوم است.این میکروب معمولا بیماریزا نیست ولی برخی از انواع آن در زخم ها دیده شده است. طبق گزارش Hauge در تعدادی از همه گیری های مسمومیت غذایی این میکروب عامل بیماری بوده است. در روی ژلوز خون دار پس از ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه پرگنه های بزرگ به قطر ۷-۴ میلیمتر ، پهن ، کدر با سطح خشن و رنگ متمایل به سبز با همولیز ناقص آلفا یا کامل بتا ایجاد می کند.

- در موارد که بخواهند دخالت این میکروب را در ایجاد مسمومیت نشان دهند یا امکان ایجاد مسمومیت از ماده غذایی را در نتیجه باسیلوس سرئوس مطالعه کنند باید شمارش میکروبی انجام شود.
- این باکتری در روی محیط های معمولی رشد می کند ، خون گوسفند را همولیز کرده و لسیتیناز ترشح می نماید. گلوگز ، مالتوز ، سوکروز ، دکسترین ، سالیسین و کلیسرول را تجزیه کرده تولید اسید بدون گاز می کند ، ولی مانیتول و آرابینوز یا گزیلوز را تجزیه نمی کند.
- اندول تولید نمی نماید و واکنش VP آن مثبت است ، نیترات ها را احیا می نماید . SH2 منفی و کاتالاز مثبت است ، نشاسته ، ژلاتین و کازئین را هیدرولیز کرده و بلودومتیلن را احیا و سیترین را تجزیه می کند. واکنش زرده تخم مرغ بدین معنی است که کدورت در زرده تخم مرغ یا آگار حاوی زرده تخم مرغ ایجاد می شود که به علت یک ماده خارج سلولی است که در بعضی از موارد به آن فاکتور یا عامل کدورت زرده تخم مرغ ، لسیتیناز ، یا فسفولیپاز می گویند.
- شمارش باسیلوس سرئوس در بیشتر کشور ها به وسیله ی روش کشت سطحی انجام می گیرد که پرگنه های ایجاد شده : (الف) با کدورت اطراف خود در روی آگار حاوی زرده تخم مرغ ، و (ب) مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک پلی میکسین B مشخص می گردند که یک محیط انتخابی را برای این میکروارگانیسم ایجاد می کند.

مواد و وسایل مورد نیاز:

1. نمونه ماده غذایی
   - الف) رشته
   - ب) ماکارونی
1. ترازو
2. مخلوط کن
3. ارلن حاوی ۹۰ میلی لیتر محلول رینگر استریل با یک چهارم غلظت
4. لوله آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر محلول رینگر استریل با یک چهارم غلظت
5. شیشه درب دار استریل

1. پی پت استریل
2. محیط کشت فنل ردمانیتول آگار
3. میله ی شیشه ای سر کج
4. محلول های رنگ آمیزی گرم
5. محلول رنگ آمیزی اسپور
6. محیط کشت آگار غذایی به صورت اسلنت یا مورب

روش آزمایش:

- جهت انجام آزمایش ابتدا در حدود ۳۰ گرم از نمونه ماده غذایی (ماکارونی یا رشته) را توزین کرده و سپس آن را به داخل مخلوط کن اضافه و دستگاه را به مدت ۱ دقیقه روشن نمایید تا نمونه ماده غذایی مورد آزمایش به صورت پودر در آید.
- سپس مقدار ۱۰ گرم آن را توزین کرده و آن را به داخل یک شیشه درب دار استریل اضافه کرده و مقدار ۹۰ میلی لیتر محلول رینگر استریل به نمونه فوق اضافه و بعد از بستن درب ظرف آن را تکان دهید تا نمونه فوق به خوبی با محلول رینگر مخلوط شود.
- بعد از تهیه ی رقت ۰/۱ از نمونه ماده غذایی به کمک لوله های آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر محلول رینگر اقدام به تهیه سایر رقت ها تا رقت مورد نظر کنید و سپس با انتخاب دو رقت متفاوت یکی از آن ها از رقت های پایین و دیگری از رقت های بالا باشد اقدام به کشت بر روی محیط کشت فنل رد مانیتول آگار با اضافه کردن مقدار ۰/۱میلی لیتر از رقت مورد نظر نمایید.

- محیط کشت فنل رد مانیتول آگار دارای ۳ فاکتور می باشد که عبارت است از:

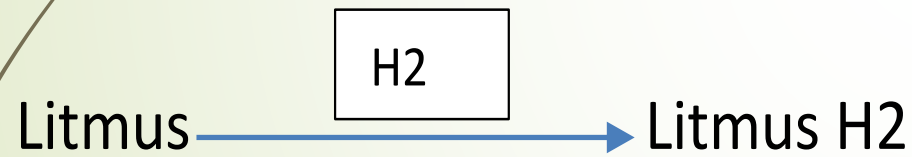
1. معرف فنل رد
2. قند مانیتول
3. زرده تخم مرغ

- این باکتری به لحاظ تولید آنزیم لیسیتیناز قادر به ایجاد رسوب در اطراف کلنی های خود خواهد بود و در نتیجه در صورتی که بعد از طی مدت زمان ۲۴ الی ۴۸ ساعت قرار گرفتن پتری دیش مورد آزمایش در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد بر روی محیط کشت فوق کلنی های به رنگ صورتی رنگ با هاله ای پر رنگ و رسوب دار در اطراف آن تشکیل شود.
- به وجود باکتری باسیلوس سرئوس در ماده غذایی مشکوک خواهید شد که در این صورت بعد از شمارش تعداد کلنی های مشکوک و تعین رقت مورد آزمایش تعداد باکتری موجود در یک گرم از ماده غذایی را حساب کنید. جهت شناسایی دقیق باکتری با کشت باکتری مورد نظر بر روی محیط کشت اسلنت آگار مغذی اقدام به انجام تست های بیوشیمیایی برای شناسایی باکتری نمایید.

- واکنش شیر لیتموس دار :
- هدف آزمایش : نشان دادن انواع مختلف واکنش های باکتریایی در شیر لیتموس و چگونگی اثر این واکنش ها در شناسایی باکتری ها .
- اصول آزمایش:
- شیر لیتموس یک محیط مایع غنی است که در تشخیص باکتری ها ارزش زیادی دارد. زیرا بر اثر رشد باکتری ها در آن واکنش های متعدد می تواند ایجاد شود. شیر خود محیط مناسبی برای رشد باکتری ها است. این محیط دارای پرتئین شیر (کزئین) قند شیر (لاکتوز) و نیز ویتامین ها و مواد معدنی است. محیط شیر لیتموس شامل ۱۰٪ پودر شیر بدون چربی و یک مولکول رنگ به نام لیتموس است. وقتی لیتموس به محلول پودر شیر اضافه شود رنگ سوسپانسیون کلوئید شیر از سفید به آبی مایل به ارغوانی تبدیل می شود. لیتموس یک معرف pH و نیز یک مولکول رنگ قابل احیا است. بنابراین این رنگ لیتموس درمحیط شیر لیتموس دارای دو نقش زیر است.

۱- به عنوان یک معرف pH لیتموس در محیط اسیدی از آبی مایل به ارغوانی به رنگ قرمز و در شرایط قلیایی به آبی متمایل به بنفش تبدیل می شود.

۲- به عنوان یک مولکول قابل احیا وقتی که مولکول رنگ با افزوده شدن هیدروژن به مولکول احیا می شود رنگ آبی مایل به ارغوانی شیر دوباره به رنگ سفید طبیعی خود بر می گردد. وقتی لیتموس در حالت احیا شده است دیگر نمی تواند به عنوان معرف pH عمل کند معادله احیای مولکول لیتموس چنین است.



آبی متمایل به ارغوانی بی رنگ

- علاوه بر واکنش های رنگ در شیر لیتموس با استفاده از روشی که در آن باکتری های مختلف از ترکیبات شیر استفاده می کنند ، واکنش های دیگری می توان یافت. برخی از باکتری ها لاکتوز را تخمیر می کنند برخی کازئین را هیدرولیز می کنند و عده ای دیگر آنزیمی مشابه رنین تولید می کند و باز باکتری های هستند که به طور همزمان قند را تخمیر و پروتئین را هیدرولیز می کنند.
- موارد زیر واکنش های احتمالی باکتریایی را بسته به اجزا مورد استفاده باکتری ها در شیر نشان می دهد. هر یک از این واکنش ها به نوع آنزیم هایی بستگی دارد که باکتری ها تولید می کنند.

1. تشکیل لخته:

- الف) لخته اسیدی: اگر لاکتوز به اسید های آلی تخمیر شود لخته ای بسیار سفت و اسیدی تشکیل می شود با افزایش اسیدیته ، شیر لخته شده چنان سفت می شود که مایعی شفاف از آن جدا می شود. به موازات کاهش pH رنگ لیتموس از آبی مایل به ارغوانی به قرمز و لخته تشکیل می شود.
- ب)لخته ی رنینی: برخی از باکتری ها آنزیمی شبیه به رنین تولید می کنند. رنین آنزیمی منعقد کننده کازئین است. انعقاد رنینی نرم و شبیه فرنی است و در pH خنثی انجام می شود. اگر لوله کج شود لخته نرم و به آهستگی جاری می شود در انکوباسیون طولانی پپتونیزه شدن کازئین همراه با واکنش های قلیایی بعدی انجام می گردد.

2.پپتونیزه شدن:

- بعضی از باکتری ها نمی توانند لاکتوز را تخمیر کنند و رنین تولید نمی کنند. اما آنزیم های پروتئولیتیک دارند که می تواند کازئین را هیدرولیز کنند (پپتونیزه شدن). پپتونیزه شدن منجر به رهایی مقادیر زیادی آمونیاک می شود. سپس با ایجاد شرایط قلیایی لیتموس به رنگ آبی مایل به بنفش در می آید با انکوباسیون بیشتر به موازات هیدرولیز کازئین و تبدیل آن به پپتید ها و اسید های آمینه کدورت شیر کاهش می یابد. مایع کدر رویی اغلب به رنگ قهوه ای در می آید.

- تولید گاز:
- اگر ارگانیسم بتواند لاکتوز را به اسید و گاز تخمیر کند گاز ایجاد می شود. تولید گاز معمولا با ایجاد حباب های گاز در لخته های گاز در لخته های اسیدی شناخته می شود ، باکتری های پروتئولیتک ، مانند کلستریدیوم ها از تجزیه پروتئین های لخته شده آنقدر گاز تولید می کنند که منجر به خرد شدن لخته ها می شود. خرد شدن لخته ها را بر اثر تولید مقادیر زیادی گاز ((تخمیر آشوت زای)) یا ((لخته طوفانی)) شیر می نامند.
- ممکن است یک باکتری موجب انجام چند واکنش فوق شود. معمولا سری واکنش ها به دنبال یکدیگر رخ می دهند و با طولانی شدن زمان انکوباسیون این واکنش ها گسترش می یابند.

- تغییرات ناشی از رشد میکروب ها در شیر لیتموس می تواند با سرعت زیاد طی مدتی طولانی رخ دهد.
- به عنوان مثال میکروب هایی که مقدار کمی لاکتوز شیر را تخمیر می کند این کار را در چند ساعت انجام می دهند. در حالی که برای پپتونیزه کردن کامل پروتئین شیر یک هفته یا بیشتر وقت لازم است بدین جهت کشت های شیر لیتموس را در صورت امکان باید بطور روزانه بررسی کرد این بررسی به ویژه در پایان ۲۴ ساعت و دوباره در ۴۸ ساعت بسیار مهم است
- نتایج مندرج در کتاب باکتری شناسی تشخیص برگی بر اساس بررسی طولانی (۷روزه) استوار شده است. برای این که از تاثیر لیپولیتیک باکتری ها جلوگیری کرده باشند قبل از اضافه نمودن لیتموس چربی شیر را می گیرند

- محیط کشت شیر لیتموس دار :
- از شیر کاملا تازه استفاده شود. ابتدا شیر را یک شب در یخچال نگهداشته و بعد به کمک سیفن لایه چرب را از شیر جدا نموده و شیر را یک بار طوری حرارت داده که به مدت یک ساعت بخار آب از آن متصاعد شود.
- شیر را در یخچال خنک و سپس آن را صاف می کنند. بعد آنقدر محلول لیتموس اضافه نماییم تا رنگ آبی مایل به ارغوانی بدست آید.
- برای استریل کردن مایع را در حرارت می دهیم که مدت ۳۰ دقیقه بخار آب از آن متصاعد گردد. این مایع با گرم شدن بی رنگ و یا سرد شدن مجددا برنگ اول خود بر می گردد.

- مواد و وسایل لازم جهت آزمایش شیر لیتموس دار:

1. کشت ۲۴ ساعت باکتری باسیلوس سرئوس
2. لوله حاوی شیر لیتموس

- روش انجام آزمایش :
- لوله شیر لیتموس را با باکتری مورد نظر تلقیح کنید سپس لوله تلقیح شده را به مدت یک هفته یا بیشتر در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید لوله در فواصل ۲۴ ساعت ۴۸ ساعت ۹۶ ساعت ، ۷ روز بررسی کنید.
- یک لوله تلقیح نشده از شیر لیتموس را به عنوان شاهد برای مقایسه در یخچال بگذارید با تهیه جدول نتایج بررسی روزانه خود را از لوله ها تلقیح شده فهرست نمایید.

- آزمایش احیای نیترات
- مواد و وسایل لازم:

1. محیط کشت نیترات برات
2. محیط اسید سولفانیلیک
3. محلول آلفانفتیل آمین
4. پودر روی
5. کشت باکتری

- روش آزمایش:
- ابتدا باکتری مورد نظر را در محیط کشت تلقیح کنید و سپس لوله آزمایش را به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری کنید و سپس بعد از طی مدت زمان لازم جهت بررسی احیای نیترات به لوله آزمایش مقدار ۰/۵ الی ۱ میلی لیتر محلول اسید سولفانیک و محلول آلفانفتیل آمین اضافه کنید.
- سپس در صورتی که بعد از اضافه کردن معرف ها رنگ قرمز آجری رنگ پدید آمده نشان دهنده مثبت بودن جواب آزمایش است.
- در صورتی که رنگ قرمز آجری ایجاد نگردید نشان دهنده ی مبهم بودن جواب آزمایش است و برای رفع ابهام به این لوله آزمایش مقدار بسیار کمی (به اندازه نوک اسپاتول) پودر روی اضافه کنید و در صورتی که بعد از اضافه کردن پودر روی رنگ قرمز گشت نشان دهند منفی بودن جواب آزمایش احیا نیترات می باشد.

- آزمایش هیدرولیز نشاسته :
- مواد و وسایل لازم:

1. محیط کشت نشاسته آگار
2. کشت ۲۴ ساعته باکتری
3. معرف ید (لوگل)

- روش آزمایش :
- در ابتدا باکتری مورد آزمایش را به روش استریک پلیت متد بر روی محیط نشاسته آگار تلقیح کنید و سپس محیط کشت را به مدت ۲۴ ساعت تا ۴۸ ساعت در حرارت ۳۷ درجه ی سانتی گراد اتوگذاری (گرمخانه گذاری) کنید ، سپس با اضافه نمودن چند قطره از محلول ید (لوگل) در اطراف کلنی ها باکتری نتیجه را به صورت زیر بخوانید.
- مثبت: بدون تغییر رنگ
- منفی: پیدایش رنگ آبی مایل به بنفش
- باید دقت داشت که محلول ید اضافه شده باید به اندازه ای باشد که سطح محیط را کاملا بپوشاند در این موارد در پیرامون کلنی باکتری هایی که از نظر هیدرولیز نشاسته منفی هستند حتی در پیرامون کلنی ، رنگ آبی تولید می گردد.

- آزمایش ذوب ژلاتین :
- مواد و وسایل لازم :

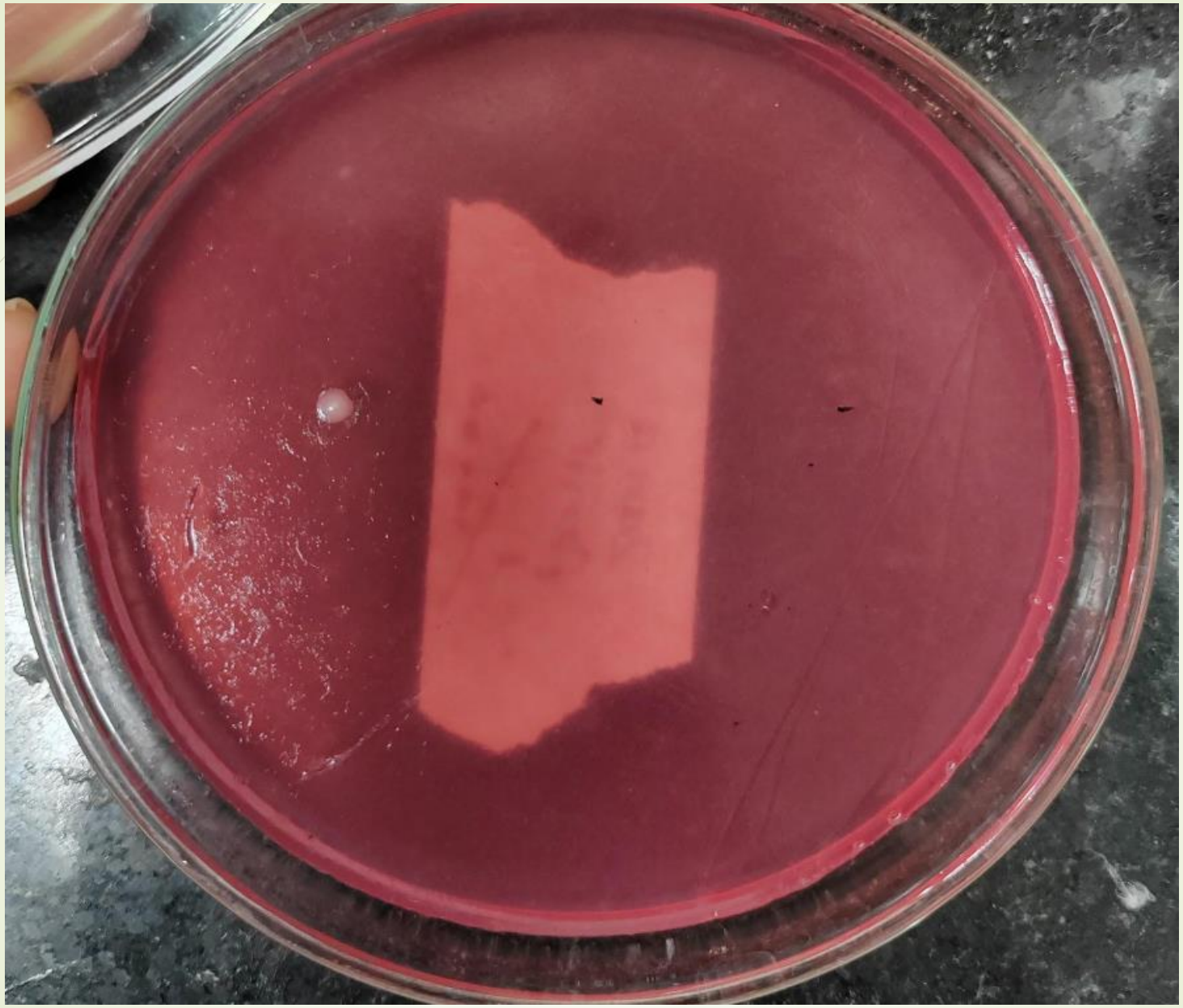
1. لوله حاوی محیط کشت ژلاتین برات
2. کشت ۲۴ ساعته باکتری

- روش آزمایش :
- باکتری مورد آزمایش را به صورت عمقی در محیط کشت ژلاتین برات کشت بدهید و سپس آن را در حرارت ۳۷ درجه ی سانتی گراد به مدت زمان لازم گرمخانه گذاری لوله ها را از داخل انکوباتور خارج کنید و آن ها را به مدت ۳۰ دقیقه در داخل یخچال قرار دهید و در صورتی که بعد از قرار دادن لوله ها در یخچال ژلاتین هنوز به حالت مایع باقی مانده بود نشان دهنده مثبت بودن جواب آزمایش است و در غیر این صورت عمل گرمخانه گذاری را باید تا مدت ۳۰ روز ادامه داد و در پایان هر هفته لوله ها را بررسی کرد و در نهایت جواب آزمایش را با بررسی ذوب ژلاتین یا عدم ذوب در پایان هفته چهارم بررسی کنید.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

ماکارونی

تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی

تهیه کننده : سهیلا عباسی

تهیه کننده : سهیلا عباسی