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

# روش کشت و شناسایی کلی فرم های مدفوعی در مواد غذایی



تهیه کننده : سهیلا عباسی

# مقدمه :

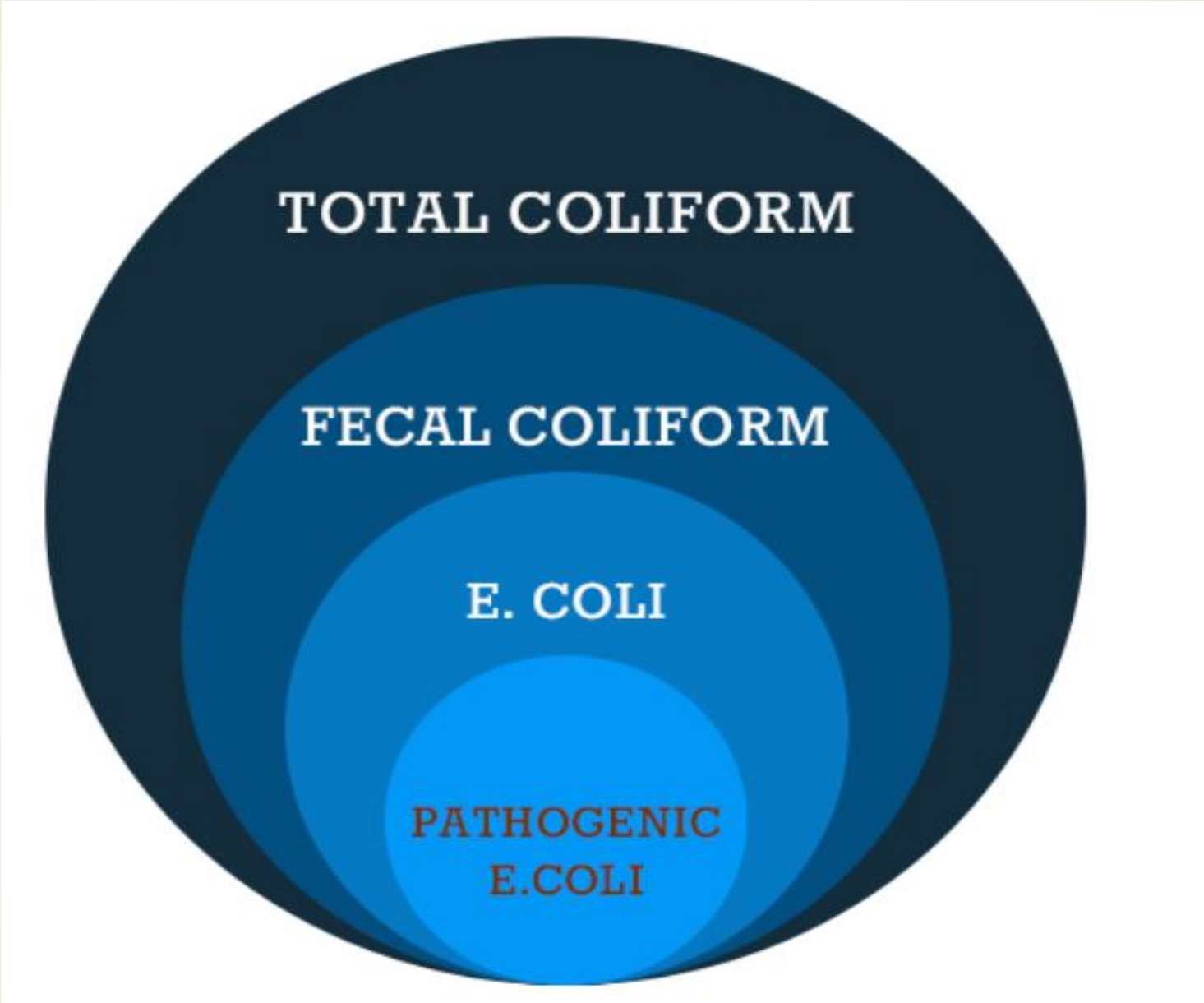
خانواده انترو باکتریاسه از با کتری های میله ای شکل، گرم منفی، هوازی و بی هوازی اختیاری تشکیل شده‌اند گه گلوکز و سایر کربوهیدرات ها راتخمیر و تولید گاز می نمایند. کلی فرم های شاخص، اعضاء بخصوصی از این خانواده را تشکیل می دهند که قادرند لاکتوز را تخمیر نموده و تولید گاز کنند.

اشریش دانشمند آلمانی ثابت کرد که در مدفوع همه انسانها اشریشیا کلی وجود دارد.

شاردینگر پیشنهاد نمود که این میکرو ارگانیسم به عنوان شاخص آلودگی مدفوع به کار رود زیرا باز یابی آن از سالمونلا سهی الوصول تر و آسان تر است.

- کلی فرم ها به به صورت کلی زیر تعریف می کنند:
- کلی فرم ها عبارتند از تمام باکتری های میله ای شکل، هوازی و بی هوازی اختیاری، گرم منفی بدون اسپور که قادرند قند لاکتوز را در حرارت ۳۵ درجه ی سانتی گراد در طی مدت زمان ۴۸ ساعت تخمیر و تولید گاز کنند.

- گروه کلی فرم شامل باکتری هایی هستند که محل طبیعی زندگی آن ها در روده و مکان هایی غیر از روده مانند خاک، آب و غلات می باشند.


TOTAL COLIFORM
FECAL COLIFORM
E. COLI
PATHOGENIC
E.COLI

- درجه حرارت بالا با تغییراتی چند برای جدا کردن کلی فرم هایی که منشا مدفوعی دارند از آن هایی که منشا مدفوعی ندارند در اکثر نقاط دنیا به کار برده شده است.
- هیچ کدام از این روش ها نمی توانند به سرعت و به طور کامل کلی فرم های مدفوعی را از غیر مدفوعی جدا کنند اگر چه روش های علمی پیشنهاد و پیاده شده اند که نهایتا منتهی به انتخاب و رشد کلی فرم های مدفوعی شده و اکثر کلی فرم هایی را که از نظر بهداشتی اهمیت کمی دارند و یا اصلا ندارند حذف می نمایند.
- محیط آبگوشت سبز درخشان حاوی لاکتوز و صفرا به عنوان محیط غنی کننده به کار برده شده و جداسازی میکروارگانیسم ها در محیط جامد و ایولت رد بایل آگار حاوی یک درصد گلوکز انجام می گیرد.
- وجه تمایز این روش این است که کلیه ی انتروباکتریاسه موجود در ماده غذایی مشخص می گردند به این ترتیب نه تنها میکروارگانیسم هایی که قادر به تخمیر قند لاکتوز هستند و یا آن هایی که توانایی تخمیر قند لاکتوز را ندارند مشخص می شوند بلکه به مقیاس وسیعی این روش جهت تشخیص میکروارگانیسم هایی که فراورده غذایی را پس از فرایند آلوده نموده اند نیز به کار می رود.

- گروه باکتری های کلی فرم که در روده و مدفوع حیوانات خونگرم یافت می شود به طور کلی شامل ارگانیسم هایی هستند که قادر به تولید گاز از لاکتوز در یک محیط کشت مناسب در حرارت ۴۴/۵ درجه سانتی گراد هستند.
- در حالی که کلی فرم ها از منابع دیگری اغلب قادر به تولید گاز در چنین شرایطی نیستند. از این خصوصیت برای جدا کردن کلی فرم های مدفوعی استفاده می شود.

- در مرحله اول :
- برای این آزمایش محیط آبگوشت لاکتوز دار استفاده می شود در صورتی که بعد از ۴۸ ساعت در لوله تولید گاز شد، می توان فرض کرد که در نمونه مورد آزمایش کلی فرم موجود است. چون باکتری های دیگری غیر از کلی فرم ها نیز قادر به تخمیر لاکتوز هستند. در صورت استفاده از آبگوشت لاکتوز دار نمی توان گفت که گاز تولید شده در لوله های دورهام فقط مربوط به آلودگی کلی فرم است و باید حتما آزمایش تائیدی انجام شود.
- در مرحله دوم :
- این آزمایش به چندین روش انجام می شود، از آن جمله استفاده از محیط کشت آبگوشت سبز درخشان دارای لاکتوز و صفرا (BGLB) می باشد. در صورتی که در این محیط تولید گاز شد تایید کننده وجود کلی فرم در نمونه اولیه است.
- نهایتا در مرحله سوم برای آزمایش کلی فرم مدفوعی از کشت در حرارت ۴۴/۵ درجه سانتی گراد و معرف کواکس استفاده می شود و در صورت مثبت بودن (تشکیل حلقه قرمز زنگ) آزمایش از نظر وجود اشرشیاکلی در مواد غذایی مثبت می باشد.

# مواد و وسایل مورد نیاز:

1. نمونه ماده غذایی (پنیر)
2. ترازو
3. قاشقک چوبی استریل (آبسلانگ)
4. ارلن حاوی ۹۰ میلی لیتر رینگر استریل با غلظت یک چهارم
5. لوله آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر محلول رینگر استریل با غلظت یک چهارم
6. پی پت استریل
7. پتری دیش استریل
8. محیط کشت آبگوشت سبز درخشان حاوی لاکتوز و صفرا دارای لوله دورهام
9. محیط کشت مک کانگی آگار
10. محیط کشت آب پپتونه
11. بن ماری
12. معرف کواکس

# روش آزمایش:



- ابتدا ۱۰ گرم از ماده غذایی مورد آزمایش (پنیر) را به کمک ترازو وزن کرده و سپس آن را به ارلن حاوی ۹۰ میلی لیتر محلول رینگر استریل اضافه کرده و ارلن را به خوبی تکان می دهیم تا نمونه مورد آزمایش به خوبی با محلول رینگر مخلوط گردد.
- با اضافه کردن ۱ میلی لیتر از رقت فوق به یک لوله آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر محلول رینگر استریل اقدام به تهیه ی رقت ۰/۰۱می کنیم و آن گاه تهیه ی رقت را تا رقت $10^{-6}$ ادامه می دهیم سپس دو عدد از لوله های فوق را که یکی از آن ها دارای رقت زیاد و دیگری دارای رقت کم باشد را انتخاب کرده و به کمک پی پت استریل مقدار یک میلی لیتر از هر کدام از رقت ها را به صورت جداگانه در داخل در پتری دیش استریل می ریزیم

آن گاه مقداری از محیط کشت کانگی آگار (حدود ۱۰ الی ۱۲ میلی لیتر) را که بعد از خارج کردن از بن ماری اکنون دارای حرارت ۴۵ الی ۵۰ درجه سانتی گراد است را به آرامی در کنار شعله به پتری دیش اضافه می کنیم.

هر کدام از پتری دیش ها را به صورت علامت 8 لاتین چندبار روی میز آزمایش حرکت می دهیم تا محیط کشت اضافه شده با نمونه مورد آزمایش به خوبی مخلوط شود.

سپس صبر می کنیم تا محیط کشت ببندد سپس مابقی مک کانگی را که در حدود ۸ الی ۱۰ میلی لیتر است، با رعایت شرایط آسپتیک بر روی محیط قبلی اضافه می کنیم.

- در این حالت در صورتی که بعد از طی مدت زمان گرمخانه گذاری (اتوگذاری) در روی سطح محیط کشت کلنی باکتری رشد کند، نشان دهند بوجود آمدن آلودگی در حین کار بوده است و در ضمن این لایه اضافه شده دوم می تواند از عمل آلوده شدن سطح جلوگیری کند و همچنین تا اندازه ای شرایط بی هوازی را برای نشان دادن حالات تخمیری برای برخی باکتری ها ایجاد می کند.
- بعد از اتمام کار دو پتری دیش تهیه شده به روش فوق را به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در داخل گرمخانه (اتو) ۳۷ درجه سانتی گراد قرار می دهیم

در صورتی که بعداز این مدت زمان کلنی های صورتی پر رنگ نزدیک به قرمز با داشتن هاله ای در اطراف آن ها و با داشتن قطری حدود ۰/۲ میلی لیتر در محیط کشت فوق مشاهده گردید نشان دهند مثبت بودن واکنش است

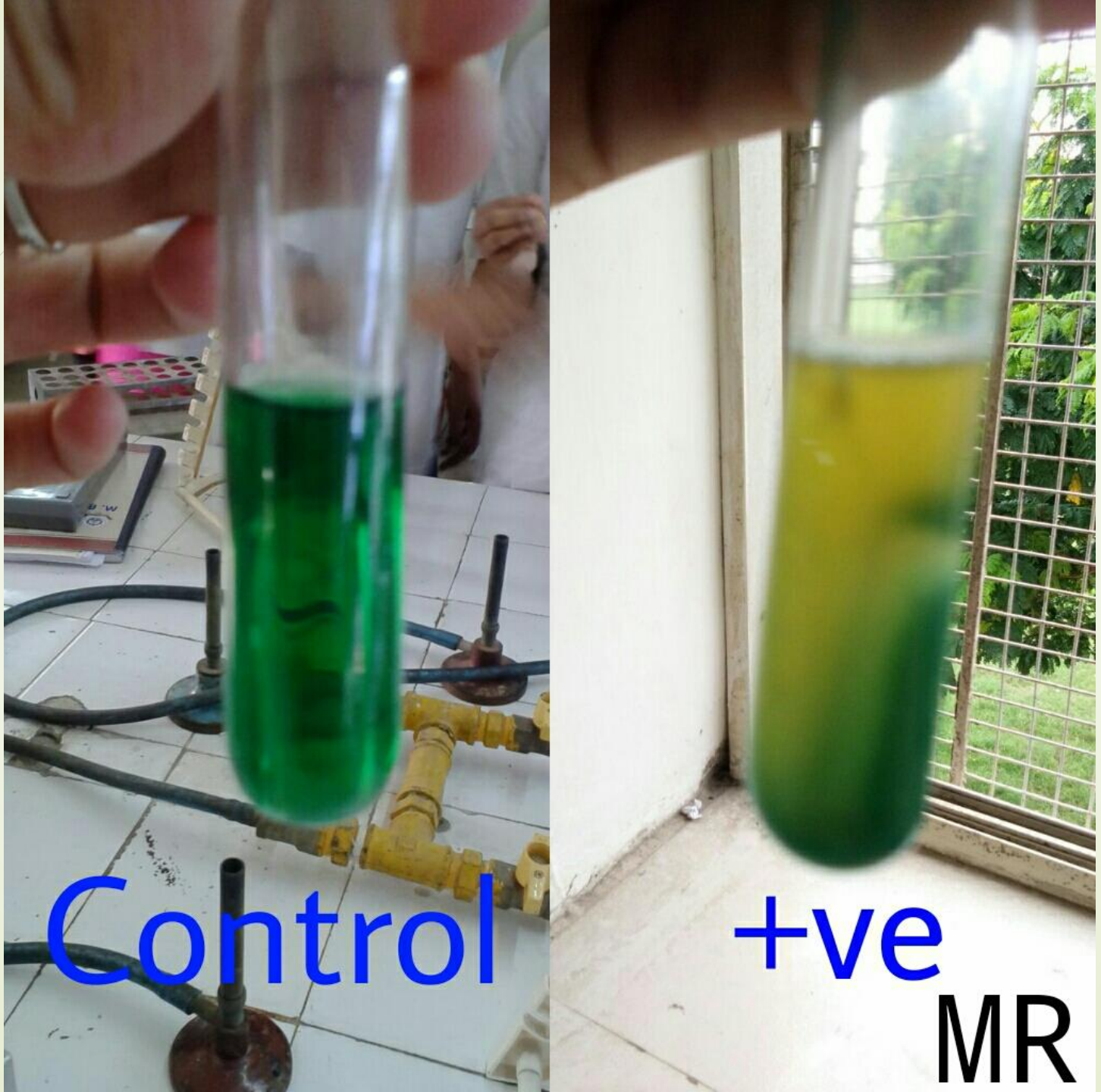
زیرا محیط کشت مک کانگی آگار دارای نمک های صفراوی و کریستال ویوله است که در نتیجه تا حد زیادی از رشد باکتری های گرم مثبت جلوگیری می کند و همچنین دارای قند لاکتوز و اندیکاتور (معرف) قرمز خنثی است که در اثر تخمیر قند لاکتوز در محیط کلنی های با رنگ قرمز پر رنگ تا صورتی که توسط هاله کدری در اطراف که ناشی از رسوب اسید های صفراوی به علت سقوط pH در محیط می باشد به وجود می آید.

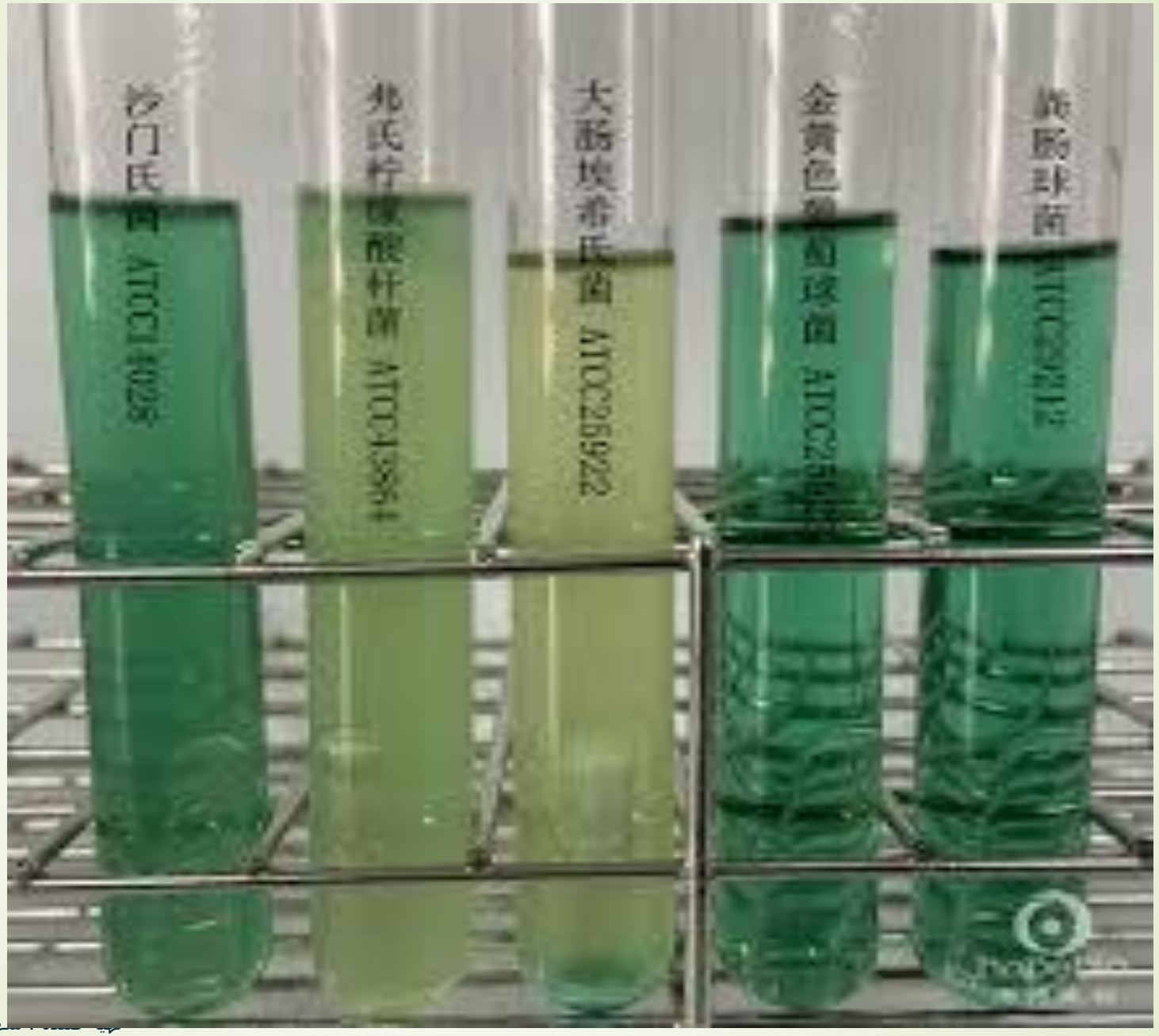
محیط مکانکی آگار

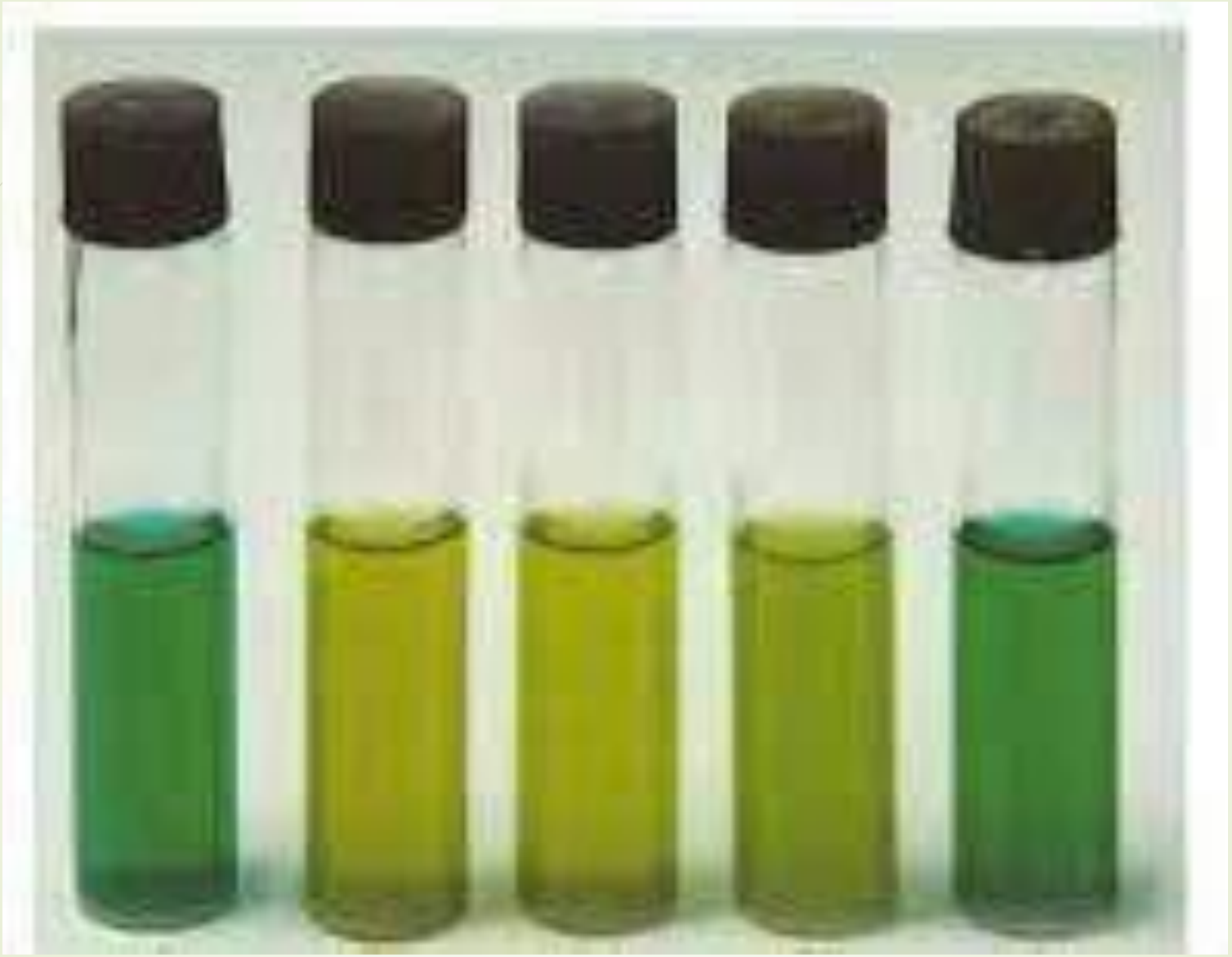
- همزمان با قرار دادن پتری دیش ها در داخل گرمخانه دو عدد لوله محیط کشت آبگوشت سبز درخشان حاوی لاکتوز و صفرا را که دارای لوله دورهام می باشد، برداشته و به کمک پی پت به داخل هر لوله مقدار ۱ میلی لیتر از رقت های مورد آزمایش را اضافه کرده و لوله های فوق را نیز در داخل گرمخانه (اتو) با حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید.
- در صورتی که بعداز ۲۴ ساعت در داخل لوله کدورتی ناشی از رشد میکروارگانیسم مشاهده شود، مرحله دوم آزمایش نیز مثبت خواهد بود و نشان دهنده این است که باکتری جداشده از نمونه ماده غذایی از گروه کلی فرم ها می باشد.

بعداز این که مرحله ی دوم آزمایش مثبت بود،

اقدام به تلقیح از محیط کشت آبگوشت سبز درخشان حاوی لاکتوز و صفرا که در مرحله ی قبلی مثبت گردیده بود به میزان ۰/۵ میلی لیتر به داخل یک عدد محیط کشت آبگوشت سبز درخشان همراه با لاکتوز و صفراوی دارای لوله دورهام کرده و آنگاه لوله فوق را به مدت زمان ۴۸ ساعت در داخل بن ماری با حرارت ۴۴/۵ درجه سانتی گراد قرار داده و در صورتی که بعداز طی این مدت زمان باز هم تولید کدورت و تجمع گاز در لوله دورهام مشاهده گردد، نشان دهند مثبت بودن مرحله ی دوم می باشد و باکتری کلی فرم جداشده کلی فرم مدفوعی است.


Control
+ve
MR

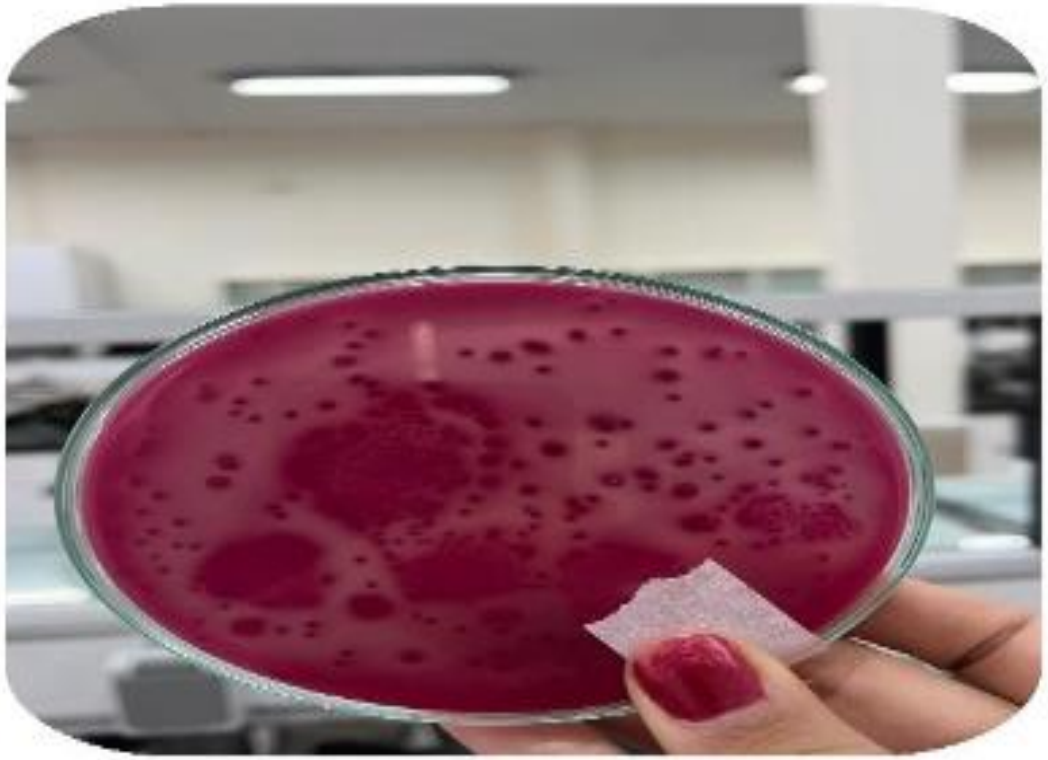

沙门氏菌 ATCC14028
大肠埃希氏菌 ATCC25922
金黄色葡萄球菌 ATCC25923
粪肠球菌 ATCC29212



- همراه با لوله محیط کشت آبگوشت سبز درخشان، یک لوله محیط کشت آب پپتونه ای که به میزان ۰/۵ میلی لیتر از محیط کشت مثبت مرحله دوم به آن تلقیح شده باشد در داخل بن ماری ۴۴/۵ درجه سانتی گراد به مدت زمان ۴۸ ساعت قرار دهید و سپس همزمان با بررسی کردن مرحله آخر اقدام به اضافه کردن چند قطره معرف کواکس به لوله محیط کشت فوق کنید و در صورتی که یک حلقه قرمز رنگ در سطح محیط آب پپتونه حاصل گردید نشان دهنده تجزیه اسیدآمینه تریپتوفان و تولید اندول توسط باکتری است (مرحله تکمیلی مثبت).
- در صورتی که باکتری در ۴۴/۵ درجه قادر به تخمیر قند لاکتوز باشد و بتوان گاز تولید کند و همچنین دارای آنزیم تریپتوفاناز باشد و بتواند از اسید آمینه تریپتوفان اندول تولید کند، نشان دهنده حضور باکتری کلی فرم مدفوعی در مواد غذایی است.

تهیه کننده : سهیلا عباسی

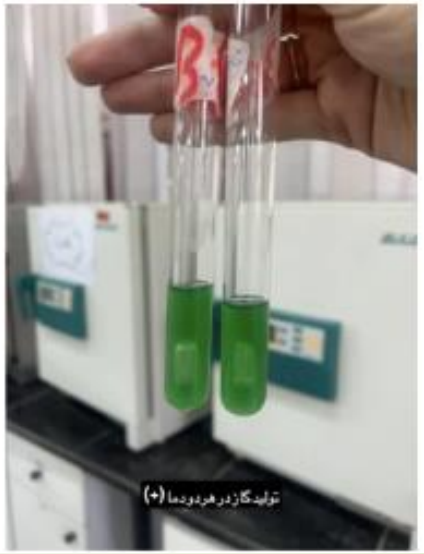
| | |
|---|---|
| ۰/۱ | ع قابل شمارش |
| ۰/۰۱ | ع قابل شمارش |
| ۰/۰۰۱ | ۶۰۰۰۰۰ |
| ۰/۰۰۰۱ | ۵۲۰۰۰۰ |
| ۰/۰۰۰۰۱ | بدون رشد |
| ۰/۰۰۰۰۰۱ | بدون رشد |

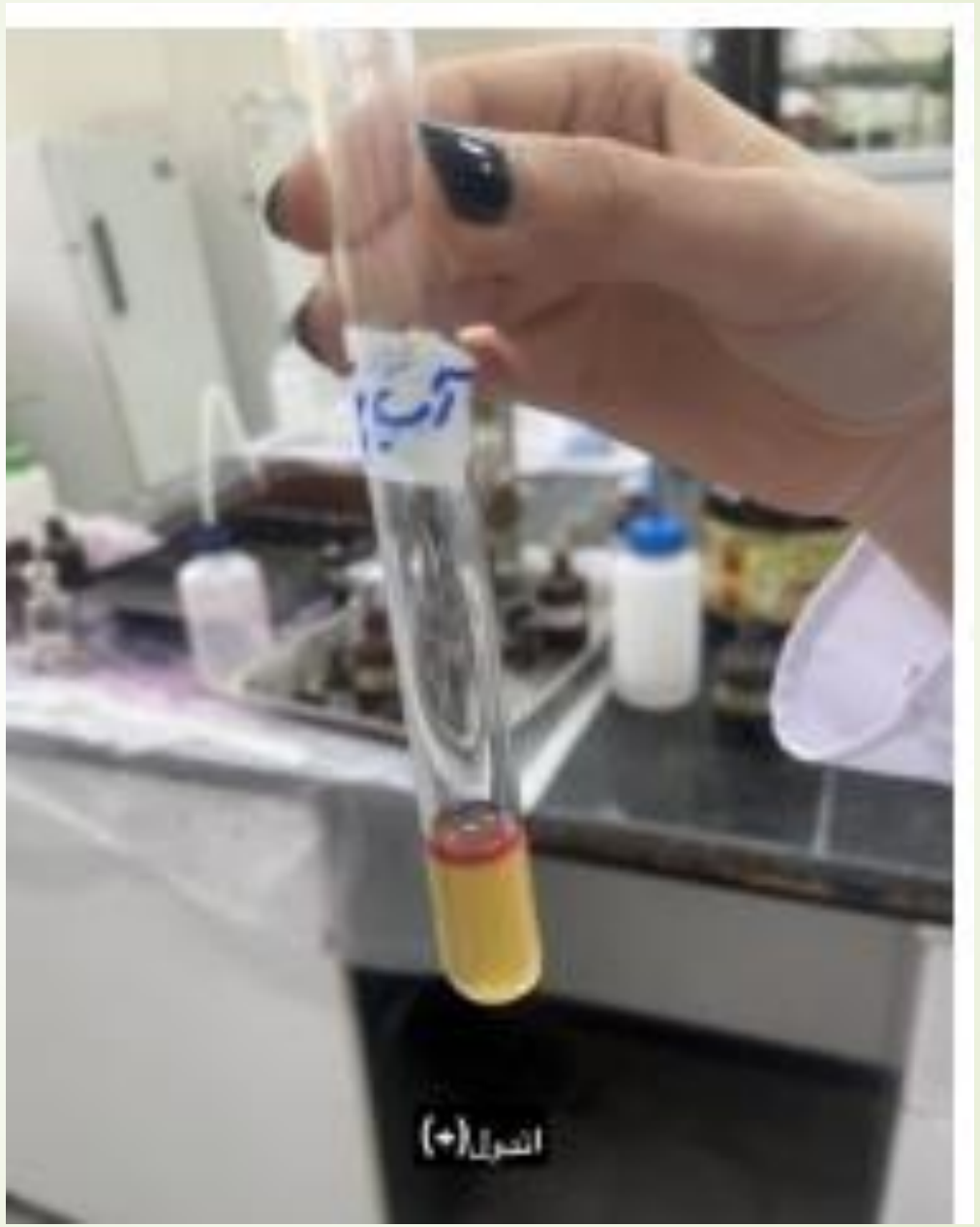


تهیه کننده : شهید عباسی

تهیه کننده : سهیلا عباسی

با کشت در محیط BGLB و تولید گاز در مرحله تاییدی حضور کلی فرم تایید شد.




اندول(+)

با سپاس فراوان از توجه شما