

بررسی وجود باکتری های مولد بیماری عفونی سالمونلوسیس در مواد غذایی (بخش چهارم)

پس از مشاهده ظاهری پرگنه های رشد یافته در محیط کشت M.C.A و تشخیص احتمالی نوع باکتری ها بر اساس رنگ ظاهری آنها، لازم است تا برای تشخیص و شناسایی کامل تر، علاوه بر جنس گونه را نیز شناسایی کنیم. جهت این امر از پرگنه مشکوک به سالمونلا (پرگنه های زرد رنگ در محیط M.C.A) در یک محیط کشت مشخص کننده اولیه کشت می دهیم.

یکی از مناسب ترین محیط های کشت برای این منظور، محیط تریپل شوگر آیرون آگار (Triple Sugar Iron Agar) است که به دو صورت شیبدار و بدون شیب تهیه می شود. ترکیبات این محیط کشت عبارتست از:

- ✓ عصاره گوشت
- ✓ عصاره مخمر
- ✓ پپتون
- ✓ لاکتوز
- ✓ ساکاروز
- ✓ دکستروز (گلوکز خالص)
- ✓ نمک سولفات فرو (FeSO_4)
- ✓ نمک تیوسولفات سدیم ($\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$)
- ✓ کلرور سدیم (NaCl)
- ✓ معرف فنل رد
- ✓ آگار

زمانیکه باکتری ها در محیط T.S.I.A شروع به فعالیت می کنند:

الف) اگر باکتری سالمونلا باشد: در ۲۴ ساعت اولیه، باکتری در ابتدای رشد از کربوهیدرات ها و قندها کسب انرژی می کند. سالمونلاها تنها می توانند از قند دکستروز در این محیط کشت استفاده کنند (قادر به هیدرولیز لاکتوز و ساکاروز نمی باشند) که در نتیجه تخمیر این قند تولید اسید فرمیک، CO_2 ، H_2 و انرژی می کنند. با تولید شدن اسید و CO_2 طی ساعات اولیه رشد، رنگ محیط کشت (نارنجی رنگ) تحت اثر معرف فنل رد به رنگ زرد متمایل می شود. این تغییر رنگ معمولاً در لوله های Stab تا عمق محیط کشت و در لوله های Slant تا انتهای محیط کشت صورت می گیرد. همچنین وجود گاز موجب بروز شکستگی هایی در برخی نقاط یا انتقال محیط به بالا می شود.

در ادامه فعالیت سالمونلاها و پس از اتمام ذخیره قندی، این باکتری ها از سایر ترکیبات محیط کشت از جمله عصاره های گوشت، مخمر و پپتون کسب انرژی کرده و با تجزیه آنها تولید نمک های آمونیوم می کنند. به دنبال قلیایی شدن محیط در اثر تولید نمک های آمونیوم، تحت اثر معرف فتل رد رنگ محیط کشت از زرد به قرمز می گراید.

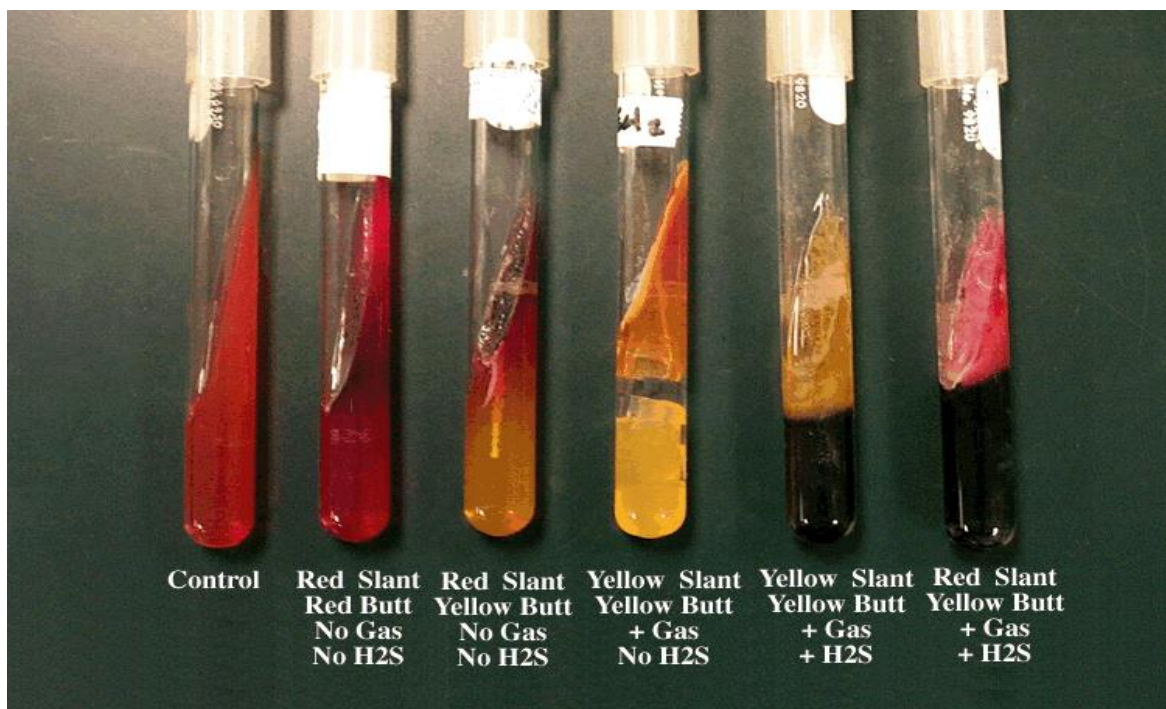
در ۲۴ ساعت ثانویه، سالمونلاها می توانند بر روی دیگر ترکیبات محیط نیز اثرگذار باشند که از مهم ترین این ترکیبات سولفات فرو و تیوسولفات سدیم است که در ترکیب با آمونیاک به تیوسولفات فرو آمونیاکی مبدل می شوند. همچنین نمک های گوگردی موجود در محیط همراه با H_2 تولیدی از مصرف قند، مقداری گاز SH_2 ایجاد می کنند که این گاز با نمک تیوسولفات فرو آمونیاکی ترکیب شده و سولفید آهن (سیاه رنگ)، اسید سولفوریک، گاز آمونیاک و H_2 تولید می کنند. با تولید شدن سولفید آهن می توان در زیر لایه های قرمز رنگ در لوله های شیدار نقاط یا لایه سیاه رنگ را مشاهده نمود. در محیط های بدون شیب به دلیل کمبود اکسیژن رنگ سیاه دیده نمی شود.

(ب) اگر باکتری شیگلا باشد: مانند سالمونلاها در اثر تجزیه قند و تولید اسید رنگ محیط T.S.I.A ابتدا زرد می شود و در نهایت نیز با تولید آمونیاک حاصل از تجزیه منابع پروتئینی لایه قرمز رنگ بر روی سطح محیط کشت ایجاد می گردد. تفاوت شیگلا با سالمونلاها در عدم تولید H_2 حاصل از تجزیه قند است. بنابراین تولید SH_2 و به تبع آن SFe نکرده و رنگ سیاه در لوله ها دیده نمی شود. اما شکستگی در اثر وجود گاز CO_2 دیده می شود.

(ج) اگر باکتری پروتئوس باشد: پروتئوس ها علاوه بر دکستروز از ساکاروز نیز می توانند استفاده کنند و بنابراین نسبت به سالمونلا و شیگلا اسید بیشتری تولید می کنند. در نتیجه رنگ محیط های کشت کاملاً زرد رنگ می شود. با تولید شدن آمونیاک یک نوار کوچک قرمز رنگ در روی سطح محیط ایجاد می شود. (چون اسید تولیدی توسط پروتئوس بیش از آمونیاک است، نوار قرمز رنگ بسیار کوچک است) پروتئوس نیز مانند سالمونلا CO_2 و H_2 تولید می کنند که گاز CO_2 موجب شکستگی محیط و H_2 سبب تشکیل رنگ سیاه SFe در زیر لایه قرمز در محیط شیدار می شود.

(د) اگر باکتری کلی فرم باشد: چون کلی فرم ها قابلیت مصرف هر سه نوع قند لاکتوز، ساکاروز و دکستروز را دارند بنابراین نسبت به غیر کلی فرم ها اسید بسیار زیادتری تولید می کنند که آمونیاک تولیدی در مراحل بعدی را نیز خنثی می کند. بنابراین رنگ محیط T.S.I.A کاملاً زرد رنگ می شود. با تولید CO_2 و H_2 رنگ سیاه و شکستگی در محیط دیده می شود.

❖ محیط T.S.I.A به دلیل داشتن تیوسولفات سدیم از رشد باکتری های گرم مثبت جلوگیری کرده و چنانچه در محیط فقط باکتری گرم مثبت داشته باشیم، به دلیل داشتن تیوسولفات سدیم در محیط T.S.I.A این باکتری ها رشد نکرده و رنگ محیط پس از اینکوباتور گذاری همچنان نارنجی باقی خواهد ماند.



شرح آزمایش:

- ۱- برداشتن مقداری از پرگنه مشکوک به سالمونلا از محیط M.C.A توسط آنس حلقوی استریل
- ۲- انتقال نمونه به سطح محیط کشت شیدار T.S.I.A و انجام کشت مارپیچ از داخل به خارج
- ۳- برداشتن مجدد مقداری از پرگنه مشکوک به سالمونلا از محیط M.C.A توسط آنس سوزنی استریل
- ۴- انتقال نمونه به عمق محیط کشت بدون شیب T.S.I.A و انجام کشت ضربه ای (عمقی)
- ۵- ثبت مشخصات بر روی لوله های حاوی محیط کشت و اینکوباتور گذاری به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در حرارت ۳۷-۳۵°C
- ۶- تهیه لام از پرگنه محیط کشت M.C.A ، رنگ آمیزی گرم و مشاهده میکروسکوپی