



ریاست جمهوری
سازمان ملی استاندارد ایران



جزوه دوره کارآموزی
میکروبیولوژی آب لیمو



شماره مدرک : ۶۲۲/۳۱/ج

تاریخ تصویب : ۱۳۹۸

شماره تجدید نظر:

تاریخ تجدید نظر:

این جزوه آموزشی صرفاً برای اهداف آموزشی سازمان ملی استاندارد ایران تهیه شده است و تکثیر و انتشار آن بدون اجازه سازمان ملی استاندارد ایران غیر مجاز می باشد

پیشگفتار

یکی از مهمترین وظایف سازمان ملی استاندارد ایران، آموزش های اصولی و مدون در زمینه محصولات (کالا / خدمات) مشمول استاندارد اجباری از طریق برگزاری دوره های آموزشی می باشد. بخشی از این آموزش ها شامل کارآموزی مدیران کنترل کیفیت و کارشناسان آزمایشگاه های همکار سازمان می باشد که برگزاری این دوره ها از طریق استان ها، آزمایشگاه های همکار و پژوهشگاه استاندارد انجام می شود. برای ایجاد وحدت رویه و هماهنگی در نحوه برگزاری این دوره ها در مراکز مختلف به منظور ارتقاء کیفیت آموزش مخاطبین مورد نظر، دفتر آموزش و ترویج استاندارد با همکاری پژوهشگاه استاندارد، در راستای استاندارد سازی فرآیند کارآموزی، اقدام به تدوین برنامه مدونی برای انجام فرآیند کارآموزی در زمینه محصولات مشمول استاندارد اجباری نموده است.

در این راستا، جزوه حاضر جهت یک پارچه نمودن فرآیند کارآموزی و به منظور یکسان سازی محتوای آموزشی دوره های کارآموزی در کل کشور تهیه و در اختیار کارآموزان قرار داده شده است.

از مدرسین گرامی و فراگیران محترم تقاضا می گردد، در صورت وجود نقطه نظرات و پیشنهادات در جهت ارتقاء کیفیت آموزشی مربوطه با شماره تلفن ۰۲۱-۸۸۸۷۹۴۶۹ تماس حاصل نموده و یا از طریق پست الکترونیکی isiri.amozesh.qc@gmail.com و آدرس تهران، ضلع جنوب غربی میدان ونک شماره ۲۵۹۲ صندوق پستی ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ اقدام فرمایید. از بذل عنایتی که می فرمایید سپاسگزاریم.

محتوای دوره کارآموزی میکروبیولوژی آب‌لیمو

عنوان دوره کارآموزی:

میکروبیولوژی آب‌لیمو

گروه مخاطب:

کارشناسان ادارات کل استاندارد استان، مدیران کنترل کیفیت واحدهای تولیدی، کارشناسان آزمایشگاه‌های همکار

هدف از برگزاری دوره کارآموزی:

هدف از برگزاری این دوره کارآموزی آشنایی با آزمون‌های میکروبیولوژی آب‌لیمو بر اساس استانداردهای ملی ایران شماره ۶۲۷۴ می‌باشد و موارد زیر را در برمی‌گیرد:

- ۱- اطلاع رسانی روش‌های بهینه و جدید آزمایشگاهی
- ۲- یکسان سازی رویه آزمایشگاه میکروبیولوژی آب‌لیمو
- ۳- اطمینان از عملکرد صحیح آزمایشگاه‌ها و اعتماد به نتایج حاصله از آزمون در آزمایشگاه‌ها
- ۴- ارتقا سطح آگاهی و ایجاد مهارت در زمینه انجام آزمون‌های میکروبیولوژی آب‌لیمو
- ۵- آشنایی با الزامات فنی آزمایشگاه میکروبیولوژی بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹

توانایی‌های کارآموزان پس از طی دوره:

- روش تهیه و سترون‌سازی محیط کشت‌های مورد نیاز
- روش آماده‌سازی و سترون‌سازی وسایل مورد نیاز
- روش آلودگی‌زدایی مواد مصرفی و وسایل
- نحوه استفاده صحیح از تجهیزات مورد نیاز در آزمایشگاه
- روش بکارگیری از استانداردهای مرتبط
- روش اجرای آزمون طبق استاندارد
- شناسایی و تعیین هویت باکتری‌ها

پیش‌نیاز:

ندارد.

رئوس مطالب آموزشی:

منبع / استانداردها	اجراکننده		مدت آموزش (ساعت)		محتوای آموزشی	رئوس مطالب	ردیف
	کارآموز	مدرس	عملی	تئوری			
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹	*	*	-	۰/۵	آشنایی با وسایل مورد نیاز آشنایی با اصول آزمایشگاهی آشنایی با قسمت‌های مختلف آزمایشگاه میکروبیولوژی	آشنایی با الزامات فنی آزمایشگاه میکروبیولوژی	۱
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹	*	*	۰/۵	۰/۵	روش تهیه محیط کشت مرتبط با آب‌لیمو	آشنایی با روش تهیه محیط‌های مورد نیاز و روش سترون‌سازی	۲
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹	*	*	۰/۵	۰/۵	روش آماده‌سازی وسایل مورد نیاز و سترون‌سازی وسایل	آماده‌سازی وسایل مورد نیاز و روش سترون‌سازی وسایل	۳
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره ۶۲۷۴	*	*	۰/۵	۰/۵	هدف و دامنه کاربرد، مواد و دستگاه‌های مورد نیاز جهت انجام آزمون	آشنایی با استاندارد روش آزمون	۴
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره ۶۲۷۴	*	*	۱	۱	آشنایی با میکرو ارگانسیم‌های آب‌لیمو	آشنایی با شاخص‌های میکروبی و حدود مجاز آنها در کشت‌های آغازگر	۵
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره ۶۲۷۴	*	*	۰/۵	۰/۵	نمونه برداری از آزمايه ، توزین نمونه و تهیه سوسپانسیون اولیه و سایر رقت‌ها با استفاده از رقیق‌کننده مناسب	روش آماده‌سازی نمونه در آزمایشگاه	۶
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره ۶۲۷۴	*	*	۱	۱	استفاده از سوسپانسیون اولیه و یا رقت‌های مورد نیاز در پلیت، برای شمارش استفاده از سوسپانسیون اولیه و یا رقت‌های مورد نیاز در لوله‌های حاوی محیط کشت مناسب برای جستجو	روش شمارش و جستجوی باکتری‌ها	۷

منبع / استانداردها	اجراکننده		مدت آموزش (ساعت)		محتوای آموزشی	رئوس مطالب	ردیف
	کارآموز	مدرس	عملی	تئوری			
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره ۶۲۷۴		*		۰/۵	گرمخانه گذاری در دما و زمان مناسب بر حسب باکتری‌های مورد نظر	گرمخانه گذاری	۸
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره ۶۲۷۴	*	*	۱	۱	بررسی و نحوه شمارش و محاسبه کلنی‌ها پس از گرمخانه گذاری - تعیین وجود یا عدم وجود باکتری‌ها	تشخیص، شمارش کلنی ها و آزمون تاییدی	۹
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹	*	*	۰/۵	۰/۵	نحوه گزارش نتایج بررسی شده	ارائه گزارش آزمون	۱۰
مدت دوره کارآموزی: دو روز							

نحوه برگزاری آزمون:

عملی	تئوری
*	*

جزوه دوره کارآموزی میکروبیولوژی آب‌لیمو

تهیه کننده / تهیه کنندگان:

شهپر مقدمی

گروه پژوهشی / آزمایشگاه:

گروه پژوهشی میکروبیولوژی/آزمایشگاه آب‌لیمو

به سفارش دفتر آموزش و ترویج استاندارد

منابع و مأخذ:

- ۱ استاندارد ملی ایران شماره ۸۷۸۸، آب‌لیمو- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون میکروبیولوژی
- ۲ استاندارد ملی ایران شماره ۸۶۶۳، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - راهنمای آماده سازی و ساخت محیط‌های کشت
- ۳ استاندارد ملی ایران شماره ۸۹۲۳-۱، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -آماده سازی آزمایش-سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی-قسمت اول -مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری
- ۴ استاندارد ملی ایران شماره ۸۹۲۳-۴، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-آماده سازی آزمایش ، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون میکروبی- قسمت ۴- مقررات ویژه برای آماده سازی فرآورده‌ها به جز شیر، گوشت، ماهی و فرآورده‌های آنها
- ۵ استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- راهنمای الزامات کلی برای آزمون
- ۶ استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۲۲۵، آب نارنج ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- ۷ استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۸۹۹-۱، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جامع برای شمارش کپک‌ها و مخمرها - قسمت اول - روش شمارش کلنی در فرآورده- های با فعالیت آبی بیشتر از ۰/۹۵

۸ استاندارد ملی ایران شماره ۲۰۸۳۴، میکروبیولوژی زنجیره مواد غذایی - روش‌های نمونه برداری برای آزمون میکروب شناسی

۹ یگانه، مهرداد. استاندارد و استاندارد کردن، چاپ اول، موسسه دانش پارسیان، ۱۳۸۹.

۱۰ -Brackett R.E., Splittstoesser D.F, *Fruit and Vegetables in compendium of methods for the microbiological examination of foods*, third edition ., USA : APHA, ۲۰۰۵

فهرست

صفحه	عنوان
ب	آشنایی با سازمان ملی استاندارد
ج	پیشگفتار
د	محتوای دوره کار آموزی
ز	جزوه دوره کار آموزی
ی	مقدمه
۱	۱ هدف
۱	۲ استانداردهای ملی ایران
۱	۳ اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی
۲۷	۴ روش‌های آزمون میکروبیولوژی آب‌لیمو
۲۷	۵ اصول آزمون
۲۸	۶ محیط‌های کشت و رقیق‌کننده‌ها
۲۸	۷ روش اجرای آزمون
۳۴	۸ بیان نتایج
۳۷	پیوست الف- انواع استاندارد
۳۹	پیوست ب - مفاهیم مورد استفاده در کنترل
۴۰	پیوست ت - (اطلاعاتی)
۴۳	پیوست ث - نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌های میکروبیولوژی آب‌لیمو طبق استاندارد ملی ایران شماره ۸۷۸۸

مقدمه:

آب لیمو^۱، فرآورده‌ای است تخمیر نشده ملی قابل تخمیر که با روش‌های مکانیکی از اندوکارپ میوه تازه، رسیده و سالم میوه لیمو ترش، گونه و واریته *Citrus aurantifolia Persia* بدست می‌آید. آب لیمو دارای گروهی از آنتی‌اکسیدان‌های پلی‌فنولی^۲ است و رادیکال‌های آزاد تولید شده در بدن را خنثی کرده و عملکرد سیستم ایمنی را بهبود می‌بخشد و دارای خواص ضد میکروبی و ضد عفونی‌کنندگی می‌باشد. همچنین جایگزین مناسبی برای سس‌های پرچرب که به طور معمول برای سالاد استفاده می‌شود، باشد.

این فرآورده در طولانی مدت منجر به بهبود کنترل وزن و بهبود سطح چربی‌های خون می‌شوند. pH اسیدی (۳/۸-۲/۵) این چاشنی مهارکننده رشد اغلب باکتری‌ها است، اما زمینه مساعد برای رشد میکروارگانیسم‌های مقاوم به اسید مانند مخمرها و کپک‌ها را فراهم می‌کند. مخمرها با تجزیه اسیدهای آلی و تخمیر قندها تولید استالددید، الکل، دی‌اکسیدکربن و در نهایت منجر به ایجاد طعم نامناسب در انواع فرآورده‌های اسیدی، مانند آب لیمو، آب نارنج، آب غوره و انواع سرکه می‌شوند. استفاده از افزودنی‌های مجاز مانند: اسید اسکوربیک به عنوان آنتی‌اکسیدان و متابی‌سولفیت سدیم به عنوان نگه دارنده با رعایت شرایط خوب تولید و به میزان حداکثر ۲۵۰ ppm^۳ در آب لیمو ترش مجاز می‌باشد.

۱-Lemon juice

۲- پلی فنل‌ها از مواد شیمیایی طبیعی، سنتزی یا نیمه سنتزی آلی هستند که از واحدهای ساختاری فنلی تشکیل شده‌اند و جزو مواد فعال در هر موجود زنده می‌باشند.

۳-parts per million(mg/kg) یا (۰,۰۰۱/۱,۰۰۰)

جزوه دوره کارآموزی آب‌لیمو

۱ هدف

هدف از تدوین این جزوه آموزشی کارآموزی آشنایی با روش‌های آزمون میکروبیولوژی آب‌لیمو، بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۸۷۸۸ می‌باشد

یادآوری ۱- توصیه می‌شود کارآموزان این دوره با الزامات آزمایشگاهی میکروبیولوژی و نیز استانداردهای ملی ایران شماره‌های ۱-۸۹۲۳، ۴-۸۹۲۳ و ۹۸۹۹ آشنایی داشته باشند.

یادآوری ۲- به منظور رعایت نکات ایمنی و سلامت کارکنان آزمایشگاه، توصیه می‌شود آزمون‌ها توسط افراد با تجربه، متخصص و آموزش دیده در خصوص روش‌های میکروبیولوژیکی انجام شود و داشتن مهارت‌های حرفه‌ای میکروبیولوژی در سطح مقدماتی الزامی است.

۲ استانداردهای ملی ایران

استانداردهای ملی ایران مرتبط با آزمون میکروبیولوژی آب‌لیمو به شرح جدول ۱ می‌باشند.

جدول ۱- فهرست استانداردهای میکروبیولوژی آب‌لیمو

ردیف	عنوان استاندارد	شماره استاندارد
۱	میکروبیولوژی خوراک انسان و دام- راهنمای آماده‌سازی و تولید محیط‌های کشت	۸۶۶۳
۲	آب لیمو - ویژگی‌ها و روش‌های آزمون	۸۷۸۸
۳	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- راهنمای الزامات کلی برای آزمون.	۹۸۹۹
۴	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش شمارش کپک‌ها و مخمرها - قسمت اول: روش شمارش کپک‌ها و مخمرها - روش شمارش کلنی در فرآورده‌های با فعالیت آبی (aw) مساوی یا بیشتر از ۰/۹۵	۱-۱۰۸۹۹
۵	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - آماده سازی آزمایش-سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی- قسمت اول- مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری.	۱-۸۹۲۳
۶	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - آماده سازی آزمایش، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون میکروبیولوژی- قسمت چهارم- مقررات ویژه برای آماده سازی محصولاتی به غیر از شیر، گوشت، ماهی و فرآورده‌های آن.	۴-۸۹۲۳

۳ اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

با ورود به آزمایشگاه میکروبیولوژی و آغاز کار در این محیط لازم است یک سری اصول اولیه مورد توجه قرار گیرد. بخشی از این اصول و قواعد مربوط به ایمنی فرد آزمایش کننده بوده و برخی نیز به ایمنی محیط و ابزار آزمایشگاه مربوط می‌باشد.

۳-۱ فضای آزمایشگاه

آزمایشگاه باید دارای سه محل جداگانه برای نمونه‌ها، آزمون و فضای عمومی باشد.

۳-۱-۱ فضای مربوط به نمونه و آزمون

باتوجه به شرایط خوب آزمایشگاهی داشتن فضاهای جداگانه برای بخش‌های زیرالزام است:

- دریافت و انبارش نمونه‌ها؛
- آماده‌سازی نمونه‌ها خصوصاً برای مواد خام (مانند: فرآورده‌های پودری حاوی تعداد زیاد میکروارگانیسم‌ها)؛
- آزمون نمونه‌ها (ازسوسپانسیون اولیه) شامل گرمخانه‌گذاری میکروارگانیسم‌ها؛
- آزمون میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای احتمالی؛
- نگهداری سویه مرجع و سایر سویه‌ها؛
- آماده‌سازی و سترون‌سازی محیط‌های کشت و وسایل؛
- انبارش محیط‌های کشت و واکنشگرها؛
- آزمون سترونی مواد غذایی؛
- آلودگی زدایی؛
- شستشو و تمیزکردن وسایل شیشه‌ای و سایر تجهیزات؛
- انبارش موادشیمیایی مخاطره آمیز، ترجیحاً نگهداری در کابینت‌ها، قفسه‌ها، اتاق‌ها.

۳-۱-۲ فضای عمومی

فضاهای جداگانه برای موارد زیر توصیه می‌شود:

- ورودی، راهرو، راه پله و آسانسور؛
- فضای اداری (مانند دبیرخانه، دفتر کار و اتاق مستندسازی)؛
- رختکن و سرویس‌های بهداشتی؛
- اتاق بایگانی؛
- انبار؛
- اتاق استراحت.

۳-۲ بهداشت کارکنان

به منظور پیشگیری از آلودگی نمونه‌ها، محیط‌های کشت و خطر عفونت کارکنان اقدامات بهداشتی زیر باید انجام شود:

- استفاده از لباس و کفش مخصوص در محیط آزمایشگاه؛
- ناخن‌ها را تمیز و ترجیحاً کوتاه نگهداشتن؛
- هنگام کار در آزمایشگاه از صحبت کردن خودداری شود.

- از خوردن و آشامیدن در آزمایشگاه خودداری شود.
- کشیدن پپیت با دهان ممنوع می‌باشد.

۳-۳ وسایل و تجهیزات

توصیه می‌شود مطابق با شرایط خوب آزمایشگاهی، کلیه وسایل و تجهیزات تمیز و در محل مناسب نگهداری شوند.

پیش از استفاده بهتراست وسایل از نظر داشتن شرایط لازم برای کار تصدیق شوند و در صورت لزوم در طی استفاده، عمل کرد آن پایش شود.

از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ و همچنین وسایل زیر استفاده شود:

جدول ۲- فهرست تجهیزات مورد نیاز برای آزمون میکروبیولوژی

ردیف	نام تجهیزات
۱	ترازوی آزمایشگاهی
۲	حمام مایع بادمای ثابت (بن ماری)
۳	اتوکلاو
۴	سیستم فیلتراسیون
۵	وسایل و ظروف شیشه‌ای آزمایشگاهی
۶	pH متر
۷	شمارشگر کلنی
۸	انکوباتور
۹	میکروسکوپ
۱۰	فور
۱۱	تجهیزات کشت در شرایط اتمسفری تغییر یافته

ترازوی آزمایشگاهی

دستگاهی است که برای توزین اجسام یا مایعات، با دقت بالا و حساسیت بالا به کار می‌رود. آزمایشگاه‌ها با توجه به نیازشان از ترازوهایی با دقت ۰/۱ g، ۰/۰۱ g، ۰/۰۰۱ g، ۰/۰۰۰۱ g و ۰/۰۰۰۰۱ استفاده می‌کنند. ترازوهای آزمایشگاهی دقت ۱ mg و دقت بالاتر آن نیاز به محفظه دارند چون به علت حساسیت بالای آن‌ها در توزین جریان هوا نیز روی توزین این ترازوها تاثیر می‌گذارد. تمام دستگاه‌های توزین باید به طور دوره‌ای کالیبره^۱ شوند. کالیبره کردن باید در مدت زمان‌های

۱ - کالیبره کردن یعنی تنظیم درست ترازو با جسمی تا به درست ترین شکل کار کند.

معینی انجام شود، گاهی لازم است چند بار در سال یا گاهی بر اساس ضرورت یک یا دو بار در ماه، انجام گیرد. برای کالیبره کردن ترازوی دیجیتال نیاز به یک سنگ کالیبره استاندارد وجود دارد که معمولاً بر اساس ظرفیت ترازو دیجیتال انتخاب می‌شود. نحوه کالیبره کردن در تمام ترازوهای دیجیتالی یکسان است و فقط سنگ کالیبره متفاوت است کالیبراسیون باید طبق دستورالعمل سازنده با وزنه‌های استاندارد انجام گیرد با این روش ارزیابی‌های دقیق‌تر و قابل اطمینان هستند و درصد خطا بسیار کم است برای تجهیزات کالیبره شده گواهی کالیبراسیون صادر شده و ضمیمه دستگاه می‌گردد.



شکل ۱- ترازوی آزمایشگاهی

حمام مایع^۱ (بن ماری^۲) بادمای ثابت

این وسیله برای انجام تست‌های سرولوژیک، آگلوتیناسیون، بیوشیمی، تست‌های دارویی، در دمای تثبیت شده کار برد دارد. حرارت آب دستگاه به وسیله یک ترموستات قابل تنظیم است. بهتر است که برای جلوگیری از رسوب املاح بر روی المنت دستگاه از آب مقطر استفاده شود اگر چه در تعداد معدودی از آن‌ها از روغن نیز استفاده می‌شود. داغ شدن بیش از حد المنت‌ها، به علت کم آبی بن ماری، موجب آسیب رساندن به دستگاه می‌شود، باید به حداقل حجم آب مورد نیاز جهت حفظ کارکرد مطلوب دستگاه توجه گردد.

کاربرد اصلی این دستگاه در آزمایشگاه میکروبیولوژی به شرح زیر است:

- الف- گرمخانه‌گذاری محیط کشت تلقیح شده در یک دمای ثابت؛
- ب- نگهداری محیط کشت جامد سترون ذوب شده در طی آماده‌سازی محیط کشت؛
- پ- تعدیل دمای محیط کشت جامد ذوب شده سترون برای استفاده در روش‌های خاص؛
- ت- آماده‌سازی سوسپانسیون‌های اولیه یا محلول‌ها در یک دمای کنترل شده؛
- ث- فرآیند حرارتی سوسپانسیون‌های اولیه در یک دمای کنترل شده (مانند پاستوریزاسیون)؛ همچنین به منظور گرم کردن معرف‌ها و ذوب کردن نمونه‌ها نیز استفاده می‌شود.

۱-Water bath

۲-Bain marie



شکل ۲- انواع حمام مایع با دمای ثابت

اتوکلاو^۱

اتوکلاو برای استریل کردن ابزار پزشکی و آزمایشگاهی در فشار و دمای بالا و با استفاده از بخار آب کار برد دارد این دستگاه قادر است بخار آب اشباع شده با حرارت 121°C را ایجاد کند این درجه حرارت در شرایط بخار ایجاد شده می تواند موجب تخریب ساختمان میکروبه ها و اسپور آنها شده و تقریباً باعث نابودی تمام میکروارگانیسم های شناخته شده شود. بر اساس استاندارد در دمای 121°C ابزارآلات باید حداقل به مدت زمان ۱۵ min، تحت فرآیند استریلیزاسیون قرار گیرند کل مدت زمان کار دستگاه اتوکلاو از فشار دادن دکمه (شروع کار)^۲ تا پایان کار سیستم، مجموع سه زمان (زمان اولیه)^۳، (زمان استریلیزاسیون)^۴ و (زمان خشک شدن)^۵ است. کنترل کیفیت و عملکرد دستگاه اتوکلاو الزامی است.



شکل ۳- اتوکلاو

بررسی دما و زمان اتوکلاو با اندیکاتورهای شیمیایی، فیزیکی و بیولوژی انجام می شود. اندیکاتورهای شیمیایی : به صورت نوارهای اتوکلاو (چسب اتوکلاو) TST^۶ که سه عامل زمان، بخار و دما را کنترل می کند. یا بسته های پزشکی هستند که وقتی به دمای معینی رسیدند تغییر رنگ می دهند. اندیکاتور بیولوژی : شامل اسپور باکتری های مقاوم به حرارت، مانند *ژئوباسیلوس استئاروتروموفیلوس*^۷ است.

۱- Autoclave

۲- Start

۳ Preheating Time

۴- Sterilization Time

۵- Drying Time

۶- Time, Steam, Temperature

۷- *Geobacillus stearothermophilus*

اندیکاتور فیزیکی : از آلیاژهایی تشکیل شده‌اند که در دمای مورد نظر ذوب می‌شوند.

سیستم فیلتراسیون

برای سترون‌سازی محلول‌هایی که ساختمان شیمیایی آنها به حرارت حساس هستند مانند: ویتامین‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها از فیلتر غشایی استفاده می‌شود. همچنین برای آزمون‌های میکروبیولوژی مایعات با حجم بالا مانند: آب، از صافی غشایی استفاده می‌شود. در آزمایشگاه میکروبیولوژی اغلب از فیلتر غشایی‌های از جنس پلاستیک یا سلولز با منافذ $0.45\mu\text{m}$ و $0.22\mu\text{m}$ استفاده می‌شود.



شکل ۴- سیستم فیلتراسیون

وسایل و ظروف شیشه‌ای آزمایشگاهی

شامل انواع پی‌پت، ارلن، ظروف شیشه‌ای در پیچ‌دار، انواع لوله آزمایش، پتری‌دیش و غیره می‌باشد.



شکل ۵- وسایل شیشه‌ای

pH متر^۱

وسيله‌ای الکترونیکی است که جهت سنجش میزان pH (میزان اسیدی یا بازی بودن ماده) به کار می‌رود. (اندازه گیری غلظت یون هیدروژن H^+ را با استفاده از الکتروود حساس به یون H^+) این ابزار دارای الکترودهای خاصی است که با قرار دادن در محلول، عدد pH را روی صفحه نمایشگر خود نمایش می‌دهد. این دستگاه متشکل از دو بخش اصلی یعنی میله کاوشگر^۲ و اندازه‌گیر^۳ است. میله کاوشگر PH محلول را تبدیل به سیگنال الکتریکی کرده و اندازه‌گیر آن را تحلیل و میزان pH را نمایش می‌دهد. انتهای کاوشگر از غشاء شیشه‌ای و حباب مانند است که نسبت به یون‌ها حساس می‌باشد و رأس الکتروود داخلی در داخل آن قرار دارد. بخش داخلی و بیرونی محفظه حاوی HCl و KCl یک دهم مولار (محلول رفرانس) است. قبل از شروع کار با pH متر ابتدا باید

۱- pH meter

۲- probe

۳- meter

مطمئن شوید که میله کاوشگر در محلول نگهدارنده یا محلول با $\text{pH} = 4$ نگهداری شده است. در غیر این صورت ممکن است pH متر در تعیین pH محلول مورد مطالعه دچار خطا شود. لذا میله کاوشگر را به مدت ۲h در آب مقطر نگهداری کنید و سپس آن را در محلول نگهدارنده قرار دهید. کاوشگر را به وسیله آب مقطر بشویید. برای تنظیم^۱ pH متر، الکتروود را در محلول $\text{pH} = 7$ قرار داده، حداقل ۳۰ sec زمان بدهید تا عدد ثابتی را نشان دهد. سپس آن را روی عدد ۷ تنظیم کنید (pH متر عدد ۷ را نشان دهد) دوباره الکتروود را با آب مقطر بشویید و آن را در محلول $\text{pH} = 7$ قرار دهید. اجازه دهید اندازه گیر عدد ثابتی را نشان دهد. آن را روی عدد ۴ تنظیم کنید (pH متر عدد ۴ را نشان دهد). حالا pH متر شما تنظیم شده و آماده اندازه گیری pH محلول‌های مورد آزمایش است. قبل از قرار دادن اندازه گیر در محلول مورد آزمایش آن را دوباره با آب مقطر بشویید.



شکل ۶- pH متر

شمارشگر کلنی^۲

این دستگاه برای شمارش باکتری‌ها، به صورت دیجیتال کاربرد دارد. معمولاً دارای صفحه مدرج برای سهولت در شمارش، عدسی با قدرت بزرگنمایی ۸ برابر و ثبت در حافظه در هنگام قطع برق می‌باشد.



شکل ۷- شمارشگر کلنی

انکوباتور^۳ (اتو)

انکوباتور شامل اتاقک عایق‌بندی شده است که برای کشت و رشد دادن نمونه‌های زنده مانند: سلول‌ها یا میکروب‌ها به کار می‌رود. این دستگاه دارای قابلیت نگهداری دمایی ثابت و توزیعی یکنواخت دما با حداکثر خطای مجاز در مقدار نوسانات دمایی تعیین شده در روش‌های آزمون است. که درجه حرارت مناسب رشد، تکثیر و تشکیل کلنی را فراهم می‌کند. و در انواع انکوباتورهای آزمایشگاهی (معمولی، شیکردار، یخچالدار و مجهز به سیستم تزریق CO_2) در آزمایشگاه‌های میکرو بیولوژی و بیولوژی سلولی کاربرد اساسی دارد.

۱- calibration

۲- Colony counter

۳- Incubator



شکل ۸- انواع اتکوباتور

میکروسکوپ^۱

میکروسکوپ یکی از وسایل آزمایشگاهی اصلی در آزمایشگاه زیست شناسی است. از دو واژه یونانی میکرو به معنی کوچک و سکوپ، به معنی دیدن، گرفته شده است. اصول کلی در تمامی انواع میکروسکوپها بر اساس عبور نور با طول موجهای متفاوت از چندین عدسی محدب می باشد که هرچقدر طول موج نور به کار رفته در میکروسکوپ مزبور کوتاه تر باشد قدرت تفکیک و یا جداکنندگی آن میکروسکوپ بیشتر است. میکروسکوپها به طور کلی به دو دسته میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی تقسیم می شوند. میکروسکوپ های نوری به منظور سنجش و مشاهده سلولها با بزرگنمایی نسبتا کم و میکروسکوپهای الکترونی برای مشاهده سلولها و ساختارهای سلولی با بزرگنمایی بسیار زیاد مورد استفاده قرار می گیرند. سه تعریف مهم در کاربرد میکروسکوپ وجود دارد.

- **بزرگنمایی:** به نسبت اندازه تصویر نمونه، به اندازه واقعی آن گفته می شود. در همه میکروسکوپها از عدسیها برای بزرگنمایی تصویر استفاده می شود.
- **قدرت تفکیک:** توانایی تشخیص بین دو شیء نزدیک به هم به صورت دو شیء متمایز و جدا را قدرت تفکیک می گویند. قدرت تفکیک به کیفیت عدسیها و طول موج نور تابیده شده بستگی دارد. با کاهش طول موج، قدرت تفکیک افزایش می یابد.
- **کنتراست:** به تفاوت بین بخشهای مختلف یک نمونه می گویند. مثلا یک اندامک تیره تر از اندامک دیگر دیده شود.



شکل ۹- میکروسکوپ نوری

انواع مختلفی از میکروسکوپ‌ها شامل: استریو میکروسکوپ^۱، میکروسکوپ اینورت^۲، میکروسکوپ فلورسنت^۳، میکروسکوپ دوچشمی^۴ می‌باشند.

فور^۵ یا آون

فور یا آون دستگاهی است که قابلیت تنظیم در دما 300°C را دارد و برای استریل یا خشک کردن وسایل شیشه‌ای و یا فلزی که در محیط‌های آزمایشگاهی کاربرد دارند. عمل استریل و خشک کردن وسایل فلزی تمیز شده. بر اساس استاندارد در دمای $10^{\circ}\text{C} \pm 170^{\circ}\text{C}$ به وسیله حرارت خشک به مدت زمان حداقل ۱h انجام می‌شود. با بالا بردن تدریجی دمای داخل آون، رطوبت موجود در وسایل شیشه‌ای تبخیر و در نتیجه سبب حذف هر نوع فعالیت زیستی خواهد شد. پیش از سترون‌سازی، همه وسایل فلزی و شیشه‌ای را تمیز کرده، سپس در آون قرار دهید. توصیه می‌شود:

- از قرار دادن مواد قابل اشتعال و آتش‌زا در داخل و اطراف آون دوری شود.
- در زمان کارکردن با آون وسایل حفاظت فردی نظیر دستکش عایق، عینک محافظ و انبرک (برای گذاشتن و برداشتن وسایل) به کار گرفته شوند.
- از قرار دادن محلول‌های اسیدی و یا ایجاد بخارات خورنده در درون آون جلوگیری شود. این کار سبب از بین رفتن سطح درونی آون خواهد شد.
- به دلیل عایق بودن دستگاه، چند ساعت طول می‌کشد تا اشیاء داخل دستگاه آون خنک شود، مگر آن که مجهز به فن باشد. پس از سترون‌سازی، به منظور پیشگیری از شکستن وسایل شیشه‌ای درب آون را باز نکنید تا اتاقک، ظروف و مواد داخل آن تا دمای حدود 60°C خنک شوند. اگر هوای سرد ناگهان وارد دستگاه شود ممکن است ظروف شیشه‌ای ترک بخورند.
- کنترل کیفیت و عملکرد دستگاه آون الزامی است. و با آزمون شیمیایی و آزمون بیولوژیک انجام می‌شود.

-
- ۱- دارای بزرگنمایی ۵۰ برابر و قابلیت نصب دوربین می‌باشد و در بررسی اجزا و موجوداتی که دارای بعد و حجم می‌باشند.
 - ۲- این دستگاه دارای قابلیت فاز کنتراست و نصب دوربین عکاسی و فیلمبرداری می‌باشد و در بررسی نحوه حرکت، تولید مثل، شناسایی، شمارش زئو و فیتو پلانکتون‌ها و سایر میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌گردد.
 - ۳- جهت بررسی و مشاهده اجزا و اندام‌هایی از سلول و میکروارگانیسم‌هایی که با رنگ فلورسنت رنگ آمیزی شده باشند، استفاده می‌گردد. این دستگاه دارای قابلیت عکس برداری از نمونه‌ها و ثبت اطلاعات نیز می‌باشد.
 - ۴- این دستگاه میکروسکوپ دوچشمی نوری است دارای عدسی‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۱۰۰ و قابلیت فاز کنتراست و نصب دوربین عکسبرداری می‌باشد که برای مشاهده معمولی و نمونه‌هایی که رنگ آمیزی نشده‌اند مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۵- Oven



شکل ۱۰- فور یا آون

آزمون شیمیایی: استفاده از ویال شیشه‌ای Browne و مشاهده تغییر رنگ مناسب از قرمز به سبز. از این ویال در هر سری کاری استفاده می‌شود.
آزمون بیولوژیک: استفاده از نوار کاغذی دارای اسپور باسیلوس سوبتیلیس^۱، واریته نایجر ATCC ۹۳۷۲ و یا اسپور باسیلوس آتروفئوس^۲ به طور هفتگی توصیه می‌شود.

تجهیزات کشت در شرایط اتمسفری تغییر یافته

تجهیزات کشت در شرایط اتمسفری تغییر یافته ممکن است یک جار غیر قابل نفوذ یا هر وسیله مناسب دیگری باشد که قادر به ایجاد و حفظ شرایط اتمسفری تغییر یافته (مانند: شرایط بی‌هوایی) در طی مدت گرمخانه گذاری محیط کشت، باشد.
 ترکیب اتمسفر مورد نیاز می‌تواند به وسیله افزودن مخلوطی از گاز پس از تخلیه هوای جار به-وسیله جایگزینی اتمسفر مورد نظر در یک اتاقک یا به وسیله هر روش مناسب دیگر مانند: (گاز پک‌های قابل دسترسی از بازار) انجام شود.



شکل ۱۱- تجهیزات کشت در شرایط اتمسفری تغییر یافته

۳-۴ استریلیزاسیون

استریلیزاسیون یا سترون‌سازی به معنای از بین بردن تمامی اشکال زنده در یا روی یک محیط آماده است. این اشکال مختلف شامل سلول‌های زنده باکتری‌ها و اسپور قارچ‌ها و... می‌باشد.
 روش‌های رایج سترون کردن عبارتند از:

۱- *Bacillus subtilis*

۲- *Bacillus atrophaeus*

- ✓ **روش حرارتی** : در آزمایشگاه میکروبیولوژی برای استریلیزاسیون محیط‌های کشت و وسایل مورد نیاز روش حرارتی به دو صورت خشک (با استفاده از فور) و مرطوب (با استفاده از اتوکلاو) از تاثیر گرما و فشار بخار آب برای کشتن میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود. برای تشخیص بین مواد سترون شده و سترون نشده می‌توان از نشانگرهای سترون‌سازی استفاده کرد. نشانگرهای بیولوژیک به صورت مختلف نواری، ویال یا آمپول کوچک موجود هستند. عملکرد سترون‌سازی را می‌توان با استفاده از اندیکاتورهای شیمیایی و اندیکاتورهای بیولوژیک ارزیابی کرد. در پایش بیولوژیک، از اسپورهای *باسیلوس سوبتیلیس*^۱ و *باسیلوس استئروترموفیلوس*^۲ استفاده می‌شود.
- ✓ **روش شیمیایی** : به وسیله مواد ضد عفونی کننده مانند: آب اکسیژنه و انجام واکنش‌های شیمیایی (مانند: رادیکال‌های آزاد) برای سترون کردن استفاده می‌شود.
- ✓ **روش پرتودهی** : به وسیله تابش پرتوهای ایکس و گاما نیز می‌توان برای سترون کردن مواد بیولوژیک، داروها، گاز، باند، نخ‌های کات گوت و لوازم یکبار مصرف استفاده کرد.
- ✓ **روش فیلتراسیون** : معمولاً برای سترون سازی مایعات استفاده می‌شود و شامل عبور دادن مایع از فیلترهای مخصوص می‌باشد.

۳-۵ محیط کشت

کشت و تکثیر باکتری‌ها در محیط‌های مصنوعی از مهمترین روش‌های تشخیصی در باکتری شناسی است. برای کشت موفق باید شرایط مناسب برای رشد باکتری فراهم گردد. از جمله این شرایط مواد غذایی و مغذی، حرارت، رطوبت کافی، مواد آلی و معدنی pH مناسب، حضور یا عدم حضور اکسیژن می‌باشد. بیشتر محیط‌های کشت که در پلیت مصرف می‌شوند، محیط‌های کشت عمومی هستند که اساساً برای تهیه مواد غذایی لازم جهت رشد باکتری ساخته شده‌اند. بعضی مواقع این محیط‌های کشت عمومی را با اضافه کردن اجزای مغذی که موجب افزایش سریع رشد ارگانیسم‌های سخت رشد می‌شوند، غنی می‌کنند.

ماهیت این مواد مغذی چنان است که نمی‌توان آنها را همراه با محیط اصلی سترون کرد، بلکه باید بعد از اتوکلاو شدن محیط بطور سترون این مواد اضافه شوند. نمونه هایی از این مواد مغذی عبارتند از: شیر بدون چربی، خون گوسفند، زرده تخم مرغ و

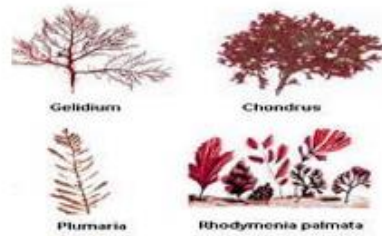
۳-۵-۱ اجزای تشکیل دهنده محیط کشت

محیط کشت فرمولاسیونی است از مواد، به صورت مایع، نیمه جامد یا جامد، که دارای اجزای تشکیل دهنده خاص بوده و به منظور تکثیر میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. آگار به عنوان عامل سفت کننده در

۱- *Bacillus subtilis*

۲- *Bacillus. Stearothermophilus*

محیط کشت‌های جامد و نیمه جامد کار برد دارد. آگار ترکیبی است پلی ساکاریدی که از دیواره سلولی برخی از گونه‌های جلبک^۱ قرمز (از جنس گراسیلاریا^۲ و جیلیدیوم^۳) استخراج می‌شود.



شکل ۱۲- گونه‌های از جلبک دریایی جنس جیلیدیوم

آگار به‌عنوان عامل سفت کننده در محیط کشت‌های جامد و نیمه جامد کار برد دارد. آگار ترکیبی است پلی ساکاریدی که از دیواره سلولی برخی از گونه‌های جلبک^۴ قرمز (از جنس گراسیلاریا^۵ و جیلیدیوم^۶) استخراج می‌شود. آگار برای میکروارگانیسم‌ها ارزش غذایی ندارد و هیچ میکروارگانیسمی نمی‌تواند آنرا هضم کند نقطه ذوب آن ۹۵ °C و با رسیدن دمای آن به حدود ۴۳ °C شبکه ای ایجاد می‌کند که سبب جامد شدن محیط می‌شود. محیط‌های کشت جامد معمولاً دارای ۱۵g/L تا ۱۳ g/L آگار هستند.

۳-۵-۲ آب

آب قابل استفاده برای آماده‌سازی محیط‌های کشت باید آب مقطر و عاری از مواد تاثیر گذار بر رشد میکروارگانیسم‌ها، در شرایط آزمون مانند: اثر کلراید، اثر آمونیاک و اثر یون‌های فلزات، باشد. آب مقطر به‌روش جوشاندن و تقطیر کردن، عبور آب از روی رزین و تصفیه بوسیله فیلترهای اسمز معکوس و نانو فیلتر تولید می‌شود. آب مقطر دارای pH خنثی و در حدود ۷ می‌باشد. دمای جوش آن به‌دلیل خالص بودن پایین‌تر از آب‌های طبیعی بوده و خاصیت خوردگی ندارد و آب مقطر باید در ظروف در دار و ساخته شده از مواد بی اثر مانند: شیشه خنثی، پلی‌اتیلن و غیره نگهداری شود و همچنین توصیه می‌شود، آب مقطر تولید شده هر چه زودتر استفاده شود.

۳-۵-۳ ویژگی محیط کشت

- تمام محیط کشت‌ها باید دارای مواد غذایی ضروری برای رشد میکروب‌ها باشند .
- pH محیط کشت باید در حد معین قبل از استفاده برای کشت تنظیم شود.

۱-Algae

۲-Gracilari

۳-Gelidium

۴-Algae

۵-Gracilari

۶-Gelidium

- ظروف مورد استفاده برای تهیه محیط‌های کشت باید کاملاً تمیز و عاری از مواد خارجی باشند
- آب مقطر مورد استفاده باید صحیح تهیه شود.
- درجه حرارت استریل کردن محیط کشت، باید متناسب با نوع مواد مغذی محیط کشت در نظر گرفته شود. درجه‌های بالا باعث از بین رفتن برخی از مواد شیمیایی موجود در محیط کشت می‌شوند.

محیط‌های کشت و معرف‌های مورد استفاده در آزمون باید مناسب برای اهداف آزمون‌های میکروبیولوژی و دارای کیفیت آزمایشگاهی بوده، همچنین باید عاری از مواد سمی یا مهارکننده میکروارگانیسم‌های آزمون باشند. برای بهبود تکثیرپذیری توصیه می‌شود محیط کشت‌های تجارتي مورد استفاده قرار گیرد. چنانچه محیط‌های کشت به‌صورت آماده در بازار در دسترس باشند، آنها را مطابق با دستورالعمل سازنده تهیه کنید. برای هر محیط کشت و معرف، بهتر است یک محدودیت زمانی برای استفاده تعیین شود. برای کنترل عمل‌کرد و تضمین کیفیت محیط‌های کشت به‌استاندارد ملی ایران شماره ۸۶۶۳ مراجعه کنید.

۳-۵-۴ طبقه بندی محیط کشت

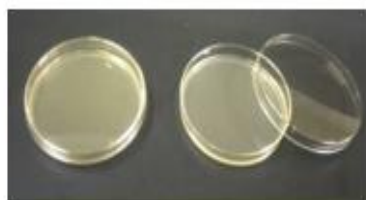
محیط کشت را از جنبه‌های مختلف طبقه بندی می‌کنند:

۳-۵-۴-۱ طبقه بندی محیط کشت بر اساس ترکیبات

۳-۵-۴-۲ طبقه بندی محیط کشت بر اساس قوام فیزیکی

۳-۵-۴-۱-۲ محیط کشت جامد^۱

محیط‌های جامد به‌علت دارا بودن آگار در ترکیب خود به‌صورت جامد بوده و متناسب با میکروارگانیسم‌ها و آزمایش‌های مورد نظر می‌توان آنها را در لوله -ظروف پتری (پلیت) و یا ظروف دیگر مورد استفاده قرار داد تشکیل کلنی، تولید پیگمانت، خصوصیات خاص هر کلنی، تشخیص انواع باکتری‌ها، دیدن منطقه همولیز، دلیل به‌کارگیری محیط جامد است.



شکل ۱۲- محیط کشت آگار دار

کشت در پلیت جامد به‌سه صورت و برای اهداف خاص انجام می‌گیرد:

الف کشت در داخل محیط جامد^۲

۱-Solid media

۲-Shake Cultures

بهلوله‌های آزمایش محتوی محیط کشت جامد پس از ذوب شدن که تا 45°C سرد شده است. باکتری مورد نظر را تلقیح کرده و لوله را بین دست‌ها تکان می‌دهند تا باکتری‌ها کاملاً با محیط کشت مخلوط شوند، سپس لوله آزمایش را به‌طور عمودی قرار می‌دهند تا محیط بسته شود.

ب کشت شیب دار^۱

برای کشت میکروارگانیسم‌ها، سوزن کشت (آنس) در عمق و سطح و/یا به‌وسیله فیلدوپلاتین حلقه‌ای (لوپ) در سطح شیب‌دار کشت می‌دهند.



شکل ۱۴- محیط کشت شیب‌دار

پ کشت‌های عمقی^۲

با این روش می‌توان میکروارگانیسم را بطور عمودی توسط سوزن کشت (آنس) در عمق محیط جامد کشت داد.

۳-۵-۴-۲- محیط کشت مایع یا آبگوشتی^۳

محیط‌های مایع به‌علت نداشتن آگار در ترکیب خود به‌صورت جامد در نیامده و متناسب با نوع میکروارگانیسم و آزمایش‌های مورد نظر می‌توان آنها را در لوله‌های آزمایش، ارلن مایر و یا ظروف دیگر مورد استفاده قرار داد.

یادآوری ۱- در بعضی موارد ذرات جامد به محیط کشت مایع اضافه می‌شود، مانند محیط کشت "کوکد میت" یادآوری ۲- محیط کشت مایع در لوله‌ها، ارلن‌ها، یا بطری‌ها به‌طور معمول "براث" نامیده می‌شوند.

۳-۵-۴-۲- محیط کشت نیمه جامد^۴

محیط‌های نیمه جامد که میزان آگار آن نسبت به محیط‌های جامد کمتر است 0.1% تا 0.5% برای مشاهده حرکت باکتری‌ها استفاده می‌شود. مانند: "SIM" چنانچه این نوع محیط کشت هنگام جامد شدن، به‌حالت شیب‌دار جامد شوند "اسلنت" گفته می‌شود. و اگر محیط کشت در ته ظروف ریخته شود به آن "بات" گفته می‌شود.

۱-Slant media

۲-Stab Cultures

۳-Liquid or broth media

۴-Semi Solid media



شکل ۱۵- محیط کشت نیمه جامد

۳-۴-۵-۳ طبقه بندی محیط کشت بر اساس کاربرد آنها

۱-۳-۴-۵-۳ محیط کشت انتقالی^۱

محیط کشتی است که به منظور نگهداری و حفظ قابلیت زیستی میکروارگانیسم‌ها در ضمن به حداقل رساندن تغییر در شمارش در دوره زمانی بین جمع آوری نمونه و کار آزمایشگاهی بر روی آن، طراحی شده است. مانند: "محیط کشت استوارت یا آمیس"^۲

۲-۳-۴-۵-۳ محیط کشت نگهداری کننده^۳

محیط کشتی است که به منظور نگهداری و حفظ قابلیت زیستی میکروارگانیسم‌ها در یک دوره زمانی طولانی طراحی شده، تا از آنها در برابر اثرات نامطلوبی که ممکن است در طی ذخیره‌سازی طولانی مدت به وجود آید محافظت کرده و پس از این مدت، به آنها قدرت بازیابی دهد. مانند: "محیط کشت دورستاگ"^۴، اسلپ‌های "نوترینت آگار"^۵

۳-۳-۴-۵-۳ محیط کشت بازیابی^۶

محیط کشتی است که به میکروارگانیسم‌های آسیب دیده و تحت تنش امکان ترمیم و بازیابی می‌دهد تا رشد طبیعی را بدست آورند، ولی لزوماً باعث تکثیر آنها نمی‌شوند. مانند "آب پپتونه بافری"^۷

یادآوری- محیط کشت بازیابی می‌تواند به عنوان یک محیط پیش غنی کننده نیز به کار رود برای مثال "آب پپتونه بافری"

۱-Transport medium

۲-Stuart or amies transport medium

۳-Preservation medium

۴-Dorset agar medium

۵-Nutrient medium

۶-Resuscitation medium

۷-Buffered peptone water

۳-۵-۴-۳-۴ محیط کشت پیش غنی کننده^۱ و غنی کننده^۲

به طور کلی محیط کشت مایع به دلیل ترکیبات تشکیل دهنده آن، شرایط مطلوب خاصی برای رشد و تکثیر میکروارگانیسم را فراهم می کند. مانند: "تریپتون سوی برات"

۳-۵-۴-۳-۴-۱ محیط کشت غنی کننده انتخابی^۳

محیط کشت غنی کننده ای است که به میکروارگانیسم های خاص امکان رشد می دهد و به واسطه یک ماده مهار کننده، رشد تمام میکروارگانیسم ها بجز میکروارگانیسم مورد نظر را کاملاً یا تا حدودی مهار می کنند. مانند: محیط کشت "پیتون سوی راپاپورت- واسیلادیس"^۴

۳-۵-۴-۳-۴-۲ محیط کشت غنی کننده غیر انتخابی^۵

این محیط به طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها امکان رشد می دهد. مانند: "برین هارت اینفیوژن برات"

۳-۵-۴-۳-۴-۳ محیط کشت جداکننده^۶

محیط کشت جامد یا نیمه جامدی است که به میکروارگانیسم ها امکان رشد می دهد.

۳-۵-۴-۳-۴-۴ محیط کشت جداکننده انتخابی^۷

محیط کشتی که به میکروارگانیسم خاص و هدف امکان رشد می دهد و از رشد سایر میکروارگانیسم ها به طور کامل یا قسمتی جلوگیری می کند. مانند: "XLD آگار"

۳-۵-۴-۳-۴-۵ محیط کشت جداکننده غیر انتخابی^۸

محیط کشتی که در آن میکروارگانیسم به صورت انتخابی، مهار نمی شوند. مانند: "نوترینت آگار"

۳-۵-۴-۳-۴-۶ محیط کشت انتخابی کروموژنیک^۹ / فلوروژنیک^{۱۰}

محیط کشت کروموژنیک / فلوروژنیک دارای ترکیبات انتخابی است که همه یا بخشی از فلور همراه با میکروارگانیسم های هدف در نمونه را مهار می کند و منجر به تقویت ردیابی دقیق می شود مانند: "TBX آگار"، "MUG/EC"

۱-Pre- enrichment medium

۲-Enrichment medium

۳-Selective enrichment medium

۴-Rappaport-Vassiliadis (RV)

۵-Non- selective enrichment medium

۶-Selective isolation medium

۷-Selective enrichment medium

۸- Non-selective isolation medium

۹- Chromogenic selective culture medium

۱۰- Fluorogenic selective culture medium

۳-۵-۴-۳-۴ محیط کشت افتراقی^۱

محیط کشتی است که مشخصات و خصوصیت فیزیولوژیک یا بیوشیمیایی میکروارگانیسم‌ها را به منظور شناسایی فراهم می‌کند. مانند: "ترجیتول"^۷ و "TBX، TTC"

۳-۵-۴-۳-۸ محیط کشت شناسایی^۲

محیط کشت با قدرت تشخیصی بالا برای ایجاد یک واکنش تشخیصی خاص که نیاز به استفاده از محیط کشت‌های تاییدی ندارد. مانند "بایل اسکولین آزاید"^۳

۳-۵-۴-۳-۹ محیط کشت شمارش^۴

محیط کشت انتخابی یا غیرانتخابی که برای شمارش میکروارگانیسم‌ها به کار می‌رود. مانند: "برد پارکر"^۵ "یست اکسترکت آگار"^۶

یادآوری- محیط کشت شمارش می‌تواند خصوصیات محیط کشت بازیابی و/یا محیط کشت غنی کننده را داشته باشد.

۳-۵-۴-۳-۱۰ محیط کشت تاییدی^۷

محیط کشتی است که برای شناسایی یا تعیین هویت مشخصات میکروارگانیسم‌ها پس از یک مرحله بازیابی مقدماتی و/یا غنی سازی و/یا جداسازی، بکار گرفته می‌شود مانند: "کلینگر آبرون آگار"^۸

۳-۵-۴-۳-۱۱ محیط کشت دارای ترکیبات خنثی کننده^۹

محیط کشت انتقالی، محیط کشت رقیق کننده یا محیط کشت دارای ترکیبات خنثی کننده‌ای است که برای غیرفعال کردن عوامل در سطح و/یا ضد عفونی کننده یا سایر عوامل میکرووب کش به کار می‌رود.

۳-۵-۴-۳-۱۲ محیط کشت با موارد استفاده متعدد

-
- ۱- Differential medium
 - ۲- Identification medium
 - ۳- Bile Esculin Azide Agar (Enterococcus Selective Agar)
 - ۴- Enumeration medium
 - ۵- Baird-Parker Agar
 - ۶- Yeast Extract Agar
 - ۷- Confirmation medium
 - ۸- Kligler Iron Agar (KIA)
 - ۹- Medium containing neutralisers

محیط کشتی است که در دسته بندی‌های متعدد قرار می‌گیرد. مانند: "بلاد آگار"^۱ که یک محیط بازیابی است، می‌تواند به‌عنوان محیط کشت جداکننده و همچنین محیط کشت افتراقی برای ردیابی همولیز بکار رود. و یا "بافر پپتون واتر" که یک رقیق کننده است می‌تواند یک محیط کشت پیش غنی کننده نیز باشد.

۳-۵-۴-۳-۴-۱۳ محیط کشت مرجع

محیط کشت غیر انتخابی مانند: "تریپتون سوی آگار"^۲ که برای ارزیابی مقایسه‌ای کنترل عملکرد محیط کشت به‌کار می‌رود.

۳-۵-۴-۴-۴-۴ طبقه بندی محیط کشت بر اساس آماده سازی

۳-۵-۴-۴-۱-۴-۱ محیط کشت آماده مصرف

محیط کشت مایع، جامد یا نیمه جامدی است که در پلیت‌ها، بطری‌ها، لوله‌ها، یا ظروف دیگر، به‌شکل آماده مصرف، یا به‌شکل آماده مصرف پس از ذوب کردن یا به‌شکل آماده مصرف پس از ذوب کردن مجدد و افزودن مکمل به‌کار می‌رود.

۳-۵-۴-۴-۲-۴-۲ محیط کشت کامل شده

محیط کشتی است که برای تلقیح آماده باشد.

۳-۵-۴-۴-۳-۴-۳ محیط کشت آماده مصرف بعد از ذوب مجدد

محیط کشت ذوب مجدد شده‌ای است که برای استفاده در روش کشت آمیخته یا برای ریختن در پلیت‌ها به‌کار می‌رود.

۳-۵-۴-۴-۴-۴-۴ محیط کشت آماده مصرف بعد از ذوب مجدد و افزودن مکمل

محیط کشتی است که باید قبل از استفاده (محیط کشت آماده مصرف کامل نشده) ذوب مجدد شده، مکمل افزوده و توزیع شود.

مانند "تریپتون سولفیت سیکلو سرین (TSC) آگار" ، "برد پارکر آگار" یا "رابیت پلاسما فیبرینوزن (RFP) آگار"

۳-۵-۴-۴-۵-۴-۵ محیط کشت آماده شده از فرمولاسیون‌های بدون آب تجارتي

محیط کشتی است که به‌صورت خشک موجود است، و لازم است قبل از مصرف، به‌آن آب افزوده شده و فرآوری گردد.

۳-۵-۴-۴-۶-۴-۶ محیط کشت آماده شده از اجزای مجزا

محیط کشتی است که به‌وسیله آزمایشگاه میکروبیولوژی کاملاً از ترکیبات مجزای خود تهیه می‌شود.

۳-۶ آماده سازی و استریلیزاسیون محیط‌های کشت در آزمایشگاه

۱- Blood agar

۲- Tryptic Soy Agar(TSA)

۳-۶-۱ آماده سازی صحیح محیط کشت یکی از مراحل اصلی برای تضمین کیفیت نتایج آزمون میکروبیولوژی است که باید با دقت خاصی انجام شود.

با رعایت دستور العمل تولید کننده، و با توجه به نشانه گذاری آن، مقدار لازم از محیط کشت (پودر خشک) با دقت توزین می شود. و با آب خالص (مقطر)، آب بدون املاح یا آب یون زدایی شده با استفاده از اسمز معکوس یا کیفیتی معادل آن، در داخل ارلن مخلوط کنید سپس در صورت لزوم همراه با گرم کردن، سریعاً یکنواخت کنید. و به حجم برسانید. آلودگی میکروبی آب از 10^2 cfu در هر میلی لیتر بیشتر نباشد و طبق استاندارد ملی ایران شماره ۵۲۷۱ پایش شود.

هدایت الکتریکی^۱ آب استفاده شده برای تهیه محیط کشت نباید بیشتر از ۲۵ میکروزیمنس^۲ باشد و طبق استاندارد ملی ایران شماره ۸۰۹۷ پایش شود.

۳-۶-۲ pH

pH محیط کشت را با استفاده از pH متر اندازه گیری کنید. در صورت لزوم، قبل از سترون سازی pH تنظیم شود، به این ترتیب که pH محیط کشت پس از سترون سازی و رسیدن دما به 25°C ، باید در محدوده مورد نظر ± 0.2 واحد اندازه گیری باشد، مگر اینکه مقادیر دیگری توصیه شده باشد. pH معمولاً با استفاده از محلول سدیم هیدروکسید با غلظت تقریبی: 40g/L یا هیدروکلریک اسید انجام می شود. اگر تنظیم pH پس از سترون سازی انجام شود، باید از محلول های سترون استفاده شود.

۳-۶-۳ توزیع

محیط کشت را در ظروف مناسب توزیع کنید به طوری که مطمئن شوید فضای کافی مناسب برای جلوگیری از سر رفتن محیط در طی فرآیند سترون سازی وجود ندارد.

۳-۶-۴ سترون سازی

محیط های کشت تهیه شده را در روز آماده سازی سترون کنید. سترون سازی محیط های کشت و معرف ها معمولاً با استفاده از حرارت مرطوب با استفاده از اتوکلاو یا فیلتراسیون انجام می شود. بعضی از محیط های کشت به سترون سازی با اتوکلاو نیاز ندارند، ولی می توان آنها را با دمای جوش سترون نمود. برای مثال: محیط های کشت آنتروباکتریاسه ها که حاوی برلیانت گرین بوده و بخصوص به حرارت و نور حساس هستند و بهتر است به سرعت پس از جو شیدن سرد شده و در برابر نور شدید محافظت شوند. همچنین، بعضی از معرف ها را نیز می توان بدون سترون سازی مورد استفاده قرار داد. در همه موارد طبق دستورالعمل های تولید کننده یا استانداردهای مناسب انجام دهید. پس از سترون کردن، محیط ها را در شرایطی که از تغییر

۱ - هدایت الکتریکی آب نشان دهنده میزان املاح هادی موجود در آب می باشد. واحد هدایت الکتریکی که آن را با EC نیز نمایش می دهند.

۲ - میکروزیمنس بر سانتیمتر واحد هدایت الکتریکی ویژه آب می باشد که در سیستم SI با $\mu\text{Siemens/cm}$ نشان داده می شود.

ترکیبات جلوگیری کند، نگهداری کنید برای مثال: از نور و خشک شدن محافظت کنید. اگر محیط کشت بلافاصله استفاده نشده یا شرایط دیگری در استاندارد خاصی مشخص نشده باشد، در یخچال با دمای 3°C $\pm 5^{\circ}\text{C}$ نگهداری کنید. اگر محیط‌های کشت در یخچال نگهداری شود معمولاً توصیه می‌شود مدت زمان نگهداری برای پلیت‌ها از دو تا چهار هفته و برای بطری‌های بسته شده و لوله‌ها سه تا شش ماه بیشتر نشود. برای ذوب مجدد، محیط‌های کشت را به‌وسیله قرار دادن آن در حمام آب جوش و یا هر فرآیند دیگری که همان نتیجه را دهد، ذوب کنید (مانند: قرار دادن در بخار اتوکلاو) محیط کشت ذوب شده، در حمام آب گرم با دمای تنظیم شده، با دمای 47°C تا 50°C ، خنک کنید.

۳-۶-۵ افزودن مکمل‌ها

مکمل‌هایی که حساس به‌حرارت هستند، باید بعد از اینکه دمای محیط به‌کمتر از 50°C رسید، به‌محیط اضافه شوند. مکمل سترون شده باید قبل از افزودن به‌محیط آگاردار مای اتاق برسد. افزودن مکمل‌های مایع سرد ممکن است سبب بسته شدن آگار یا تشکیل پرک‌های شفاف شود و از توزیع مناسب جلوگیری کند. مکمل‌ها را در محیط کشت به‌آرامی و کامل مخلوط کرده و به‌سرعت در ظروف نهایی تقسیم کنید. در هر صورت طبق دستورالعمل تولیدکننده عمل کنید.

۳-۶-۶ آماده سازی محیط‌های کشت جامد در پلیت‌ها

محیط کشت آگاردار ذوب شده را در پلیت‌ها بریزید تا حداقل ضخامت آن ۳mm گردد. برای مثال: در ظروف با قطر ۲۰mm، معمولاً ۱۸mL تا ۲۰mL محیط کشت آگاردار کافی است یا مقداری که در استانداردهای مربوطه بیان شده است. اگر پلیت‌ها باید نگهداری شوند، یا زمان گرمخانه‌گذاری آنها بیش از ۷۲h به طول می‌انجامد، یا دمای گرمخانه‌گذاری بیش از 40°C است، محیط کشت بیشتری ممکن است در پلیت‌ها ریخته شود. پلیت‌ها را به‌صورت در بسته روی یک سطح افقی و خنک قرار دهید تا آگار سرد شده و ببندد.

۳-۶-۷ نگهداری و مدت زمان نگه داری محیط کشت آماده شده

شرایط نگهداری، تاریخ انقضاء و توصیه‌های دیگر مربوط به‌محیط کشت و پلیت‌های آگاردار آماده شده تجارתי بهتر است طبق دستورالعمل تولیدکننده باشد.

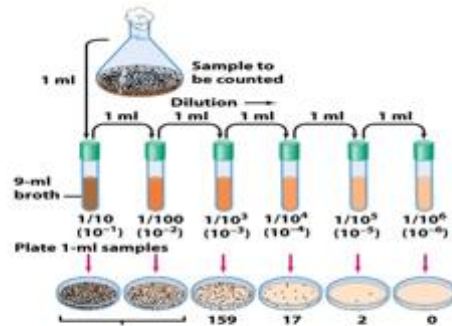
۳-۷ آماده سازی نمونه

برای دستیابی به‌توزیع یکنواخت میکروارگانیسم‌ها، پیش از انجام آزمون، نمونه‌ها را با تکان دادن شدید کاملاً مخلوط کنید. و بسته به‌ماهیت نمونه و میزان آلودگی مورد انتظار، رقت‌های لازم را تهیه کنید.

برای آزمون شمارش، رقت‌های دهدهی را با رعایت شرایط اسپتیک تهیه کنید.

یادآوری - برای تهیه سوسپانسیون فرآورده‌های اسیدی، pH را نزدیک خنثی و برابر با 7.0 ± 0.5 تنظیم کنید. از آب پیتونه بافری و برای بیشتر فرآورده‌های با pH بیشتر یا برابر ۴/۵ استفاده کنید.

برای فرآورده‌های اسیدی‌تر (بیشتر یا برابر ۳/۵) می‌توان pH را با استفاده از آب پیتونه بافری با غلظت دو برابر تنظیم کرد، چنانچه این فرآورده‌ها برای اولین با آزمون می‌شوند بهتر است pH آنها بررسی شود تا اطمینان حاصل شود که به‌دامنه مورد نظر رسیده‌اند.



شکل ۱۶- سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها اعشاری بعدی

برای رقت‌های ۱۰ برابر، ۹ mL یا ۹۰ mL از محلول‌های رقیق‌کننده را به ارلن یا لوله‌های سترون اضافه کنید با انتقال یک حجم نمونه به ۹ حجم محلول رقیق‌کننده، رقت‌های ۱۰ برابر را تهیه کنید. سوسپانسیون اولیه را کاملاً مخلوط کنید. برای تهیه رقت‌های دهمی بعدی، ۱ mL از سوسپانسیون اولیه را، با استفاده از پی‌پت سترون به ۹ mL محلول رقیق‌کننده سترون که دمای مناسبی دارند، منتقل کنید. و با استفاده از یک همزن مکانیکی به مدت زمان ۵ sec تا ۳ sec مخلوط کنید. رقت بدست آمده 10^{-2} می‌باشد. در صورت لزوم، به همین ترتیب و رقت‌های بعدی (10^{-3} ، ...) را تهیه کنید تا حدی که برای شمارش میکروارگانیزم‌ها مناسب باشند. مراقب باشید، پی‌پت را بیش از ۱ cm داخل سوسپانسیون اولیه فرو نکنید و از تماس پی‌پت حاوی سوسپانسیون اولیه با محلول رقیق‌کننده سترون جلوگیری کنید. هنگام آماده‌سازی رقیق‌کننده سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری بعدی، زمان بین پایان آماده‌سازی تا لحظه تماس ماده تلقیحی با محیط کشت یا آبگوشت غنی‌کننده نباید بیش از ۴۵ min باشد.

۳-۷-۱ روش‌های کشت در میکروبیولوژی

کشت در پلیت به سه روش قابل انجام است.

- کشت خطی^۱
- کشت سطحی^۲
- کشت آمیخته یا پور پلیت^۳

۳-۷-۱-۱ کشت خطی

در این روش از محیط پیش‌ریخته استفاده می‌شود. به این ترتیب که ابتدا به وسیله یک حلقه کشت سترون شده مقداری از کلنی باکتری را برداشته و آن را روی سطح محیط پیش‌ریخته بصورت خط‌های موازی و در

۱- Streak plate

۲- Surface plate

۳- Pour plate

چند جهت کشیده می‌شود.. در کشت‌های خطی برای بدست آوردن کلنی‌های تک، پلیت را به ۴ قسمت تقسیم می‌شود و با نوک حلقه کشت که محتوی کلنی باکتری است، بصورت خط‌های موازی کشیده و بعد خطوط را در منطقه دوم از انتهای خط انتهایی منطقه اول در جهت دیگر ادامه داده و در منطقه سوم و چهارم هم به همین صورت عمل می‌شود. خصوصیت این روش این است که وقتی خطوط موازی را روی سطح محیط می‌کشید به ترتیب از تراکم باکتری‌ها کاسته می‌شود و در انتهای خط، تراکم باکتری بسیار کمتر خواهد بود تا جایی که در منطقه چهارم دسترسی به کلنی‌های تک وجود خواهد داشت. که کلنی خالص نامیده می‌شود.



شکل ۱۷ - کشت خطی

در مورد محیط‌های کشت باکتریایی که بصورت مایع می‌باشند برای انجام کشت خطی روی محیط پیش ریخته فقط یکبار حلقه کشت از سوسپانسیون میکروبی برداشته، روی محیط کشت از پیش ریخته قرار داده و بصورت خطوط موازی در چند جهت کشیده می‌شود.

۳-۷-۱-۲ کشت سطحی

این روش کشت اغلب برای شمارش میکروارگانیسم‌های فرآورده‌های مورد مصرف انسان و خوراک دام، نمونه های محیطی و همچنین در مورد فرآورده‌هایی که دارای میکروارگانیسم‌های حساس به گرما^۱ هستند و احتمال دارد قسمت معنی داری از فلور کل را تشکیل دهند (مانند: ارگانیسم‌های سرماگرا^۲) کاربرد دارد. همچنین در غذاهای خشک شده، غذاهای یخ‌زده و منجمد، که ممکن است دارای میکروارگانیسم‌های حساس به گرما باشند یا فرآورده‌هایی که دارای باکتری‌های هوازی اجباری هستند که احتمال دارد قست معنی داری از فلور کل را تشکیل دهند (مانند: گونه‌های سودو مونس^۳) و فرآورده‌هایی که داری ذرات کوچکی هستند که تشخیص آنها از کلنی‌های تشکیل شده در کشت آمیخته به سختی انجام می‌شود، همچنین فرآورده‌هایی که رنگ شدید آنها باعث جلوگیری از تشخیص کلنی در کشت آمیخته می‌شود، فرآورده‌هایی که برای تشخیص بین انواع مختلف کلنی به عنوان قسمتی از ارزیابی کمیت غذا مورد نیاز است و بالاخره برای کشت میکرو ارگانیسم‌هایی است که قابلیت رشد و تشکیل کلنی در سطح محیط کشت جامد را دارند، به کار برده می‌شود. در این نوع کشت، از محیط پیش ریخته استفاده می‌شود. در روش سطحی، برای پلیت‌هایی با قطر ۹۰mm تا ۱۰۰mm، حجم آزمونه و یا رقتی از آن باید بین

۱- Heat-sensitive organisms
 ۲- Psychrotrophic
 ۳- Pseudomonas spp.

۰/۱ mL تا ۰/۵ mL باشد. رقت را باید به گونه‌ای انتخاب کرد که در آن تعداد مورد انتظار کلنی‌های تشکیل شده بین ۱۰ تا ۱۵۰ کلنی تپیک باشد. تعداد کل کلنی‌های تپیک و غیر تپیک روی پلیت باید کمتر از ۲۰۰ کلنی باشد.



شکل ۱۸- کشت سطحی

یاد آوری - تعداد کل کلنی‌های قابل شمارش، به اندازه کلنی‌ها بستگی دارد و برای کلنی‌های بزرگتر تعداد کلنی‌ها ممکن است کاهش یابد.

پلیت‌های دارای حدود ۱۵mL محیط کشت را آماده و نشانه گذاری کنید و در صورت لزوم سطح محیط کشت پیش از استفاده خشک می‌شود. معمولاً ۰/۱mL از آزمایش (فرآورده‌های مایع) و یا ۰/۱ mL از سوپانسیون اولیه (سایر فرآورده‌ها) در سطح محیط جامد از پیش ریخته تلقیح شده و توسط میله پخش کننده یا وسایل مکانیکی سترون روی سطح پخش می‌شود. و بعد از جذب ماده تلقیحی، پلیت‌ها گرمخانه گذاری می‌شود

یاد آوری- توجه داشته باشید که هنگام انجام کشت سطحی باید سطح محیط خشک باشد

هنگام تهیه محیط کشت به صورت پیش ریخته، ممکن است بخار آب روی درب پلیت و سطح محیط جمع شود برای خشک کردن پلیت‌ها توجه به نکات زیر مهم است.

الف - میزان رطوبت مهم است زیرا رشد بهینه باکتری‌ها به شرایط رطوبت درون و سطح محیط کشت بستگی دارد. از دست دادن رطوبت زیاد ممکن است منجر به افزایش غلظت مواد باز دارنده در محیط‌های کشت انتخابی و کاهش فعالیت آب در سطح محیط کشت شود.

ب - در مورد باکتری‌هایی که کلنی آنها به سرعت روی محیط کشت پخش نمی‌شود و سطح محیط کشت در پلیت‌ها خشک به نظر می‌رسد، خشک کردن سطح پلیت ضرورت ندارد. در این موارد می‌توانید خشک کردن سطح پلیت را حذف کنید. زیرا باعث افزایش احتمال آلودگی و از دست دادن بی مورد رطوبت می‌شود.

پ - درجه حرارت و زمان خشک شدن را به گونه‌ای انتخاب کنید که احتمال آلودگی تا حد ممکن پایین نگه داشته شود. و درجه حرارت اثر سوئی روی کیفیت محیط کشت نداشته باشد. زمان خشک شدن به میزان بخار آب سطح محیط کشت درون پلیت‌ها بستگی دارد.

ت - چنانچه برای خشک شدن پلیت‌ها از اتاقک با جریان هوای لایه‌ای^۱ استفاده نمی‌کنید، برای پیشگیری از آلودگی پلیت‌ها، سطح محیط کشت را پایین قرار دهید.

۱- Laminsr-flow safety cabinet

ث- در عمل پلیت‌ها را با قرار دادن در دمای تا 25°C تا 50°C به‌گونه‌ای که سطح آگار پلیت‌ها به طرف پایین باشد و در پلیت نیمه باز باشد، خشک می‌شود. خشک کردن پلیت را تا زمان ناپدید شدن قطرات در سطح آگار یا روی در پلیت ادامه دهید بیش از آن خشک کردن را ادامه ندهید همچنین می‌توانید پلیت‌ها را در اتاقک ایمنی با جریان هوای لایه‌ای در دمای محیط برای مدت 30 min تا 60 min ، یا به مدت یک شب به صورت در بسته در درجه حرارت محیط خشک کنید. همچنین می‌توانید پس از ریختن محیط کشت در پلیت در صورت تجمع حباب هوا، آنها را با شعله دادن سطح محیط حذف کنید. اینکار باعث سترون شدن سطح محیط کشت هم می‌شود.

۳-۱-۷-۳ کشت آمیخته یا پورپلیت

در روش کشت آمیخته، حجم آزمون و یا رقتی از نمونه بسته به اندازه پلیت و حجم محیط کشت مورد استفاده بین 0.1 mL تا 5 mL است. رقت را باید به‌گونه‌ای انتخاب کرد که تعداد مورد انتظار کلنی‌های تیپیک تشکیل شده روی پلیت‌هایی با قطر 90 mm تا 100 mm بین 10 تا 150 کلنی باشد. تعداد کل کلنی‌های تیپیک و غیر تیپیک روی پلیت باید کمتر از 300 کلنی باشد. **یادآوری** - تعداد کل کلنی‌های قابل شمارش، به اندازه کلنی‌ها بستگی دارد و برای کلنی‌های بزرگتر تعداد کلنی‌ها ممکن است کاهش یابد.

محیط کشت مورد استفاده را در حمام آب جوش ذوب کنید از سایر فرآیندهای مناسب مانند: قرار دادن در جریان بخار آزاد اتوکلاو و یا ماکروویو و سایر فرآیندهای مناسب که ترکیب دما و زمان آن برای آماده سازی محیط کشت، صحه گذاری شده است نیز می‌توانید استفاده کنید از حرارت دادن زیاد محیط کشت خودداری کنید و آن را به محض ذوب شدن از حمام خارج کنید و محیط کشت ذوب شده را در حمام آب با دمای 45°C قرار داده تا دمای آن به 45°C برسد پس از تهیه و آماده سازی پلیت‌ها و دقت‌های لازم، آزمون را کاملاً مخلوط و در پلیت‌ها تقسیم کنید. **یادآوری ۱**- محیط‌های کشت را برای مدت زمان بیشتر از 4 h به صورت ذوب شده نگه داری نکنید **یادآوری ۲**- محیط‌های کشت آگاردار را بیشتر از یکبار ذوب نکنید.

ارلن دارای محیط کشت را از حمام آب خارج کنید پس از خشک کردن قسمت بیرونی آن، گردن ظرف را از روی شعله عبور دهید. محیط کشت را بدون تاخیر به پلیت‌ها به‌گونه‌ای بیافزایید که ایجاد شوک حرارتی به حد اقل برسد. به‌طور کلی برای یک 1 mm تا 2 mm آزمون مقدار 15 تا 20 mm محیط کشت سترون که حرارت آن به حدود 45°C رسیده، استفاده می‌شود. برای حجم‌های بیشتر آزمون، مقدار محیط کشت را بر همین اساس تنظیم کنید. سپس با حرکات دورانی به صورت 8 کاملاً مخلوط می‌شود. و تا سرد شدن، روی سطح افقی قرار گرفته و محیط جامد می‌شود. پس از جامد شدن آگار، پلیت‌ها بدون تاخیر در گرمخانه قرار می‌گیرد.



شکل ۱۹- کشت پورپلیت

۳-۷-۳-۱ کشت‌های دو لایه

در کشت دو لایه، پس از تلقیح و کشت آمیخته یا پور پلیت در صورت لزوم سطح محیط کشت با باکتری، مجدداً با یک لایه نازکی از همان محیط کشت پوشانده می‌شود در این حالت به آن کشت دو لایه هم گفته می‌شود. پس از بسته شدن محیط ظرف‌های پتری را به‌طور واژگون در گرمخانه قرار می‌دهند تا از ریختن قطرات آب در سطح محیط جلوگیری گردد.

۳-۸-۳-۱ رنگ آمیزی

۳-۸-۳-۱-۱ رنگ آمیزی گرم

۳-۸-۳-۱-۱-۱ تهیه گسترش روی لام:

ابتدا از نمونه باکتری یک گسترش روی لام تهیه شود.

۳-۸-۳-۱-۲ رنگ آمیزی با کریستال ویوله:

در این مرحله مقداری از رنگ کریستال ویوله را با قطره چکان به‌روی سطح گسترش میکروبی روی لام بریزید و به‌مدت زمان ۱ min، صبر کنید تا رنگ در دیواره سلولی میکروب‌ها نفوذ کند.

۳-۸-۳-۱-۳ مرحله شستشو:

پس از سپری شدن مدت زمان ۱ min، رنگ اضافی روی لام را خالی کرده، در حالی که لام را به صورت مایل نگهداشته شده است با استفاده از آب مقطر به‌آرامی به‌مدت چند ثانیه سطح روی گسترش را شستشو شود.

۳-۸-۳-۱-۴ مرحله اضافه کردن محلول ید:

با چند قطره از محلول ید^۱ روی گسترش را پوشانیده و به‌مدت زمان ۱ min صبر کنید.

۳-۸-۳-۱-۵ مرحله شستشو:

پس از سپری شدن مدت زمان ۱ min، در حالی که لام را به‌صورت مایل نگهداشته‌اید با استفاده از آب مقطر به‌آرامی به‌مدت چند ثانیه سطح روی گسترش را شستشو دهید.

۳-۸-۳-۱-۶ مرحله رنگ بری با استفاده از استن - الکل:

۱- Iodine

در حالی که لام را با زاویه ۴۵ درجه نگهدارید بعد با استفاده از محلول رنگ بر الکل - استن به سرعت آن را بی‌رنگ کنید. دقت کنید مرحله بی‌رنگ سازی بیش از اندازه نباشد. بعد از آن لام را به سرعت بشوئید. این عمل، بی‌رنگ شدن را متوقف خواهد کرد.

۳-۸-۱-۷ رنگ آمیزی با محلول سافرانین:

در این مرحله سطح لام را با محلول سافرانین را با رنگ ثانویه یعنی سافرانین، به مدت زمان SEC ۱ صبر بپوشانید سپس رنگ اضافی را خالی کرده و با آب مقطر لام را شستشو دهید.

۳-۸-۱-۸ خشک کردن لام:

لام رنگ آمیزی شده را آهسته روی کاغذ خشک کن قرار دهید ولی کاغذ را روی گسترش نکشید.

۳-۸-۱-۹ مشاهده و تفسیر

در مشاهده لام زیر میکروسکوپ دارای عدسی روغنی با بزرگنمایی بالا، ظاهر باکتری‌ها در ۵ گروه تقسیم بندی می‌شوند:

۱- میله ای (باسیل) گرم مثبت ۲- میله‌ای گرم منفی ۳- کوکوس (گرد) گرم مثبت ۴- کوکوس گرم منفی ۵- باکتری‌های بدون واکنش به رنگ آمیزی گرم.



شکل ۲۰- مراحل روش رنگ آمیزی

یادآوری نکات مهم:

- حرارت بیش از اندازه هنگام تثبیت گسترش باعث پاره شدن دیواره سلولی باکتری شده بنا بر این باکتری گرم مثبت رنگ اولیه (کریستال ویوله) را هنگام رنگ بری از دست می‌دهد و رنگ ثانویه را جذب می‌کند و در نتیجه باکتری گرم مثبت، به صورت گرم منفی دیده می‌شود.
- اگر گسترش ضخیم باشد هنگام مرحله بی‌رنگ شدن، ممکن است مانند یک گسترش معمولی رنگ نشود و این مسئله باعث خطا در تشخیص شما در گرم منفی یا مثبت بودن باکتری خواهد شد.
- غلظت درست و تازه بودن رنگ‌ها هم در رنگ آمیزی موثر است .
- رنگ بری بیش از حد ممکن است باعث پاره شدن جدار باکتری‌های گرم مثبت شده در نتیجه این باکتری‌ها رنگ کریستال ویوله خود را از دست داده و رنگ ثانویه را جذب می‌کنند و به صورت گرم منفی دیده می‌شود.

- دقت شود هنگام تهیه گسترش روی لام از محیط کشت، سن کشت باکتری باید h ۲۴ یا کمتر باشد. بنابر این در محیط کشت‌هایی که از عمر آنها گذشته و کهنه شده‌اند، در قابلیت نفوذ دیواره سلولی باکتری‌ها تغییراتی حاصل می‌شود که خاصیت گرم مثبت بودن را از دست می‌دهد.

۳-۸-۲ رنگ آمیزی شفر- بولتون

رنگ آمیزی شفر- بولتون یک رنگ آمیزی افتراقی است که برای مشاهده آندوسپور و سلول رویشی ابداع شده است. با استفاده از این روش، اسپور رنگ می‌گیرد و اسپورهای آزاد به‌آسانی قابل روئیت خواهند بود. در این روش برای نفوذ رنگ اولیه (مالاشیت گرین) به‌داخل پوشش هاگ از حرارت استفاده می‌شود. همان خصوصیتی که رنگ آمیزی اسپور را مشکل می‌کند، رنگ را پس از نفوذ آن به‌داخل هاگ بخوبی حفظ می‌کند. مالاشیت گرین به‌آسانی از باکتری‌های مولد شسته می‌شود زیرا دیواره سلولی باکتری‌های بدون هاگ بر اثر حرارت آسیب دیده و پاره شده است بنابراین سلول رویشی رنگ دوم، یعنی سافرانین را جذب می‌کند.

۳-۸-۲-۱ تهیه گسترش روی لام:

ابتدا از نمونه باکتری یک گسترش روی لام تهیه کنید و با حرارت ثابت کنید.

۳-۸-۲-۲ رنگ آمیزی با مالاشیت گرین

مقداری از رنگ مالاشیت گرین را با قطره چکان به‌روی سطح گسترش میکروبی روی لام بریزید. لام آغشته به‌رنگ را حرارت دهید تا رنگ بخار شود. این عمل را با وارونه کردن شعله گاز بر روی لاک و عبور شعله به‌تناوب از روی رنگ انجام دهید. وقتی که رنگ شروع به‌بخار شدن کرد شعله را کنار ببرید همین که تبخیر متوقف شد دو بار کار را تکرار کنید و نگذارید رنگ بجوشد. مدت ۳ min تا ۵ min به‌ترتیب ذکر شده عمل کنید و اگر مالاشیت گرین کاملاً از روی لام تبخیر شد دوباره مقداری رنگ به‌لام اضافه کنید. بگذارید لام سرد شود تا از شکستن آن جلوگیری شود. به موازات سرد شدن لام به‌اضافه کردن رنگ ادامه دهید زیرا رنگ هنوز در حال تبخیر است.

۳-۸-۲-۳ مرحله شستشو:

رنگ اضافی روی لام را خالی کرده در حالی که لام را به‌صورت مایل نگهداشته‌اید با استفاده از آب مقطر به آرامی به‌مدت زمان ۳۰ sec سطح روی گسترش را شستشو دهید.

۳-۸-۲-۴ رنگ آمیزی با سافرانین:

سطح گسترش میکروبی را با رنگ سافرانین به‌مدت زمان ۱ min بشویند.

۳-۸-۲-۵ مرحله شستشو:

رنگ اضافی روی لام را خالی کرده. در حالیکه مایل نگهداشته‌اید با استفاده از آب مقطر به‌آرامی به‌مدت زمان ۳۰ sec سطح روی گسترش را شستشو دهید.

۳-۸-۲-۶ مشاهده و تفسیر:

در مشاهده میکروسکوپی لام رنگ آمیزی شده، اسپورها گرد بیضی به رنگ سبز مشاهده می-شوند. و سلول‌های رویشی، قرمز دیده می‌شوند.

چون هاگ پوشش مقاومی است که در برابر نفوذ رنگ مقاومت می کند بنابراین در رنگ آمیزی معمولی می‌توان اسپورها را به صورت ناحیه رنگ نشده در داخل سلول رویشی (باکتری مولد) مشاهده نمود.

اگر تعداد اسپورها موجود کم باشد و یا اگر از داخل باکتری مولد خارج شده و در گستره به صورت پراکنده باشند، اغلب توسط رنگ آمیزی ساده و یا گرم قابل مشاهده نخواهند بود.



شکل ۲۱- اسپور

۴ نمونه برداری

نمونه‌هایی که به آزمایشگاه ارسال می‌شود، باید نماینده واقعی کل کالا بوده و در طی حمل، جابجائی و نگه داری آن صدمه ندیده و یا تغییرات فیزیکی و شیمیایی در آن ایجاد نشده باشد. همچنین، نمونه‌ها باید در شرایطی نگه داری شوند که امکان رشد میکروارگانیسم‌ها در آن وجود نداشته باشد. برای کسب آگاهی‌های بیش‌تر از شرایط کلی نمونه برداری و نگه‌داری نمونه، به منظور انجام آزمون‌های میکروبیولوژی، به استاندارد ملی ایران شماره ۲۰۸۳۴، مراجعه کنید.

یادآوری- نمونه ارسالی به آزمایشگاه در صورت عدم مطابقت نمونه با مندرجات نامه، نقص در بسته بندی، کافی نبودن مقدار نمونه، مشاهده آثار ظاهری رشد میکروبی، شرایط نامناسب حمل به آزمایشگاه، نامناسب بودن درجه حرارت نمونه‌ها، سپری شدن تاریخ مصرف، عدم وجود استاندارد میکروبی، قابلیت انجام آزمون میکروبیولوژی را دارا نبوده و به ارسال کننده عودت داده می‌شود.

۵ روش‌های آزمون میکروبیولوژی آب‌لیمو

روش‌های آزمون میکروبیولوژی آب‌لیمو در جدول زیر آورده شده است:

جدول ۳- روش‌های میکروبیولوژی آزمون آب‌لیمو

ردیف	نوع میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	باکتری‌های مقاوم به اسید	طبق استاندارد ملی ایران شماره ۸۷۸۸
۲	کپک و مخمر	طبق استاندارد ملی ایران شماره ۱-۱۰۸۹۹

۵-۱ اصول آزمون

الف- شمارش

برای ارزیابی کیفیت میکروبی و/ یا ایمنی فرآورده تنها شناخت میکروارگانیسم‌های موجود در آنها کافی نیست و در بیشتر موارد، کمیت میکروارگانیسم‌ها هم به همان اندازه حائز اهمیت است که باعث ضرورت شمارش میکروارگانیسم‌ها می‌شود. شمارش میکروارگانیسم‌ها به روش‌های مختلف انجام می‌شود. اگر چه در این فرآورده‌ها فقط روش شمارش با استفاده از محیط آگار غیرانتخابی و با استفاده از روش کشت آمیخته یا پورپلیت انجام می‌شود. شمارش در محیط کشت جامد بر اساس توانایی برخی میکروارگانیسم‌ها در تشکیل کلنی روی محیط کشت جامد یا داخل آن می‌باشد که با چشم مسلح یا با کمک وسایل بزرگنمایی ساده قابل تشخیص است .

ب- روش جستجو (روش کیفی)

این روش وجود یا عدم وجود میکروارگانیسم‌های خاص را در مقدار معین از فرآورده تعیین می‌کند.

۶ محیط‌های کشت و رقیق‌کننده‌ها

دستورالعمل‌های کلی برای تهیه محلول‌های رقیق‌کننده و محیط‌های کشت در استانداردهای ملی ایران به شماره‌های ۱-۸۹۲۳، ۴-۸۹۲۳ و ۹۸۹۹ تعیین شده است.

جدول ۴ - فهرست محیط‌های کشت و رقیق‌کننده‌ها

نام مواد	ردیف
Peotone salt solation (PSS _{BCP}) ^a	۱
Orange Serum Agar (OSA)	۲
Rogosa and Sharpe (MRS)	۳
Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar(YGC)	۴
a از این محلول رقیق‌کننده اختصاصی برای آزمون فرآورده‌های اسیدی، برای تهیه سوسپانسیون اولیه استفاده می‌شود	

۷ روش اجرای آزمون

۱-۷ آماده سازی آزمایه

برای جلوگیری از آلودگی میکروبی نمونه‌ها با منابع خارجی، تمام مراحل آماده‌سازی و دست کاری نمونه باید رعایت شرایط اسپتیک و تجهیزات سترون انجام شود. برای آماده سازی این فرآورده‌ها به بند ۳-۷ این جزوه آموزشی مراجعه کنید .

- برای باز کردن در ظروفی که دارای در آسان باز شو^۱ هستند، از قسمت دیگر آن (غیر از قسمت آسان باز شو) استفاده کنید.
- برای تهیه آزمون حد اقل از دو بسته نمونه استفاده کنید.
- از عبور دادن ظروف باد کرده از روی شعله خودداری کنید.
- محتویات بطری در بسته را به وسیله تکان دادن و وارونه کردن آن به طور کامل مخلوط کنید.
- یادآوری** - برای شمارش اسپورها، بلافاصله پس از تهیه سوسپانسیون اولیه باید شوک حرارتی دهید، سپس به سرعت خنک کنید.
- برای اطلاعات بیشتر در باره فرآورده‌های اسیدی، قبل از آزمون گروه‌های خاص میکرو ارگانیسم‌هایی مانند اسید دوست‌ها، به استاندارد ملی ایران ۴-۸۹۲۳ مراجعه کنید.

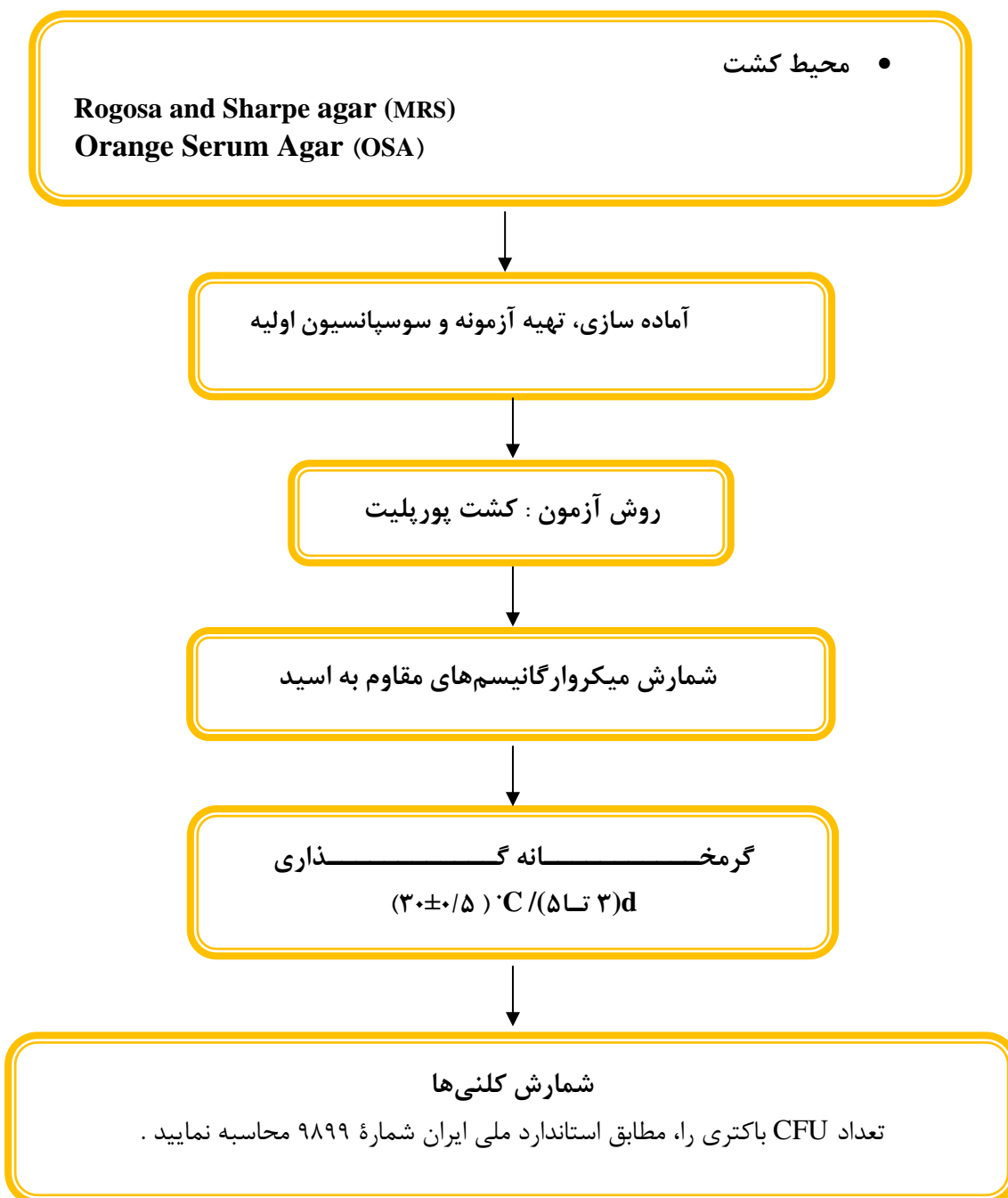
۲-۷ کشت میکروبی

کشت کشت آمیخته یا پورپلنت را مطابق بند ۳-۷-۳ این جزوه آموزشی انجام دهید.

۱-۲-۷ گرمخانه گذاری

بسته به نوع میکروارگانیسم مورد بررسی دمای گرمخانه و مدت زمان گرمخانه گذاری متفاوت است که در ادامه، برای هر یک از میکروارگانیسم‌ها که در این فرآورده آزمون می‌شوند، نوشته شده است.

۳-۷ شمارش باکتری‌های مقاوم به اسید
۱-۳-۷ استاندارد ملی ایران شماره ۸۷۸۸، آب لیمو - ویژگی‌ها و روش‌های آزمون میکروبیولوژی



۷-۳-۲ قارچ‌ها^۱

قارچ‌ها یوکاریوت، هتروتروف، غیر فتوسنتتیک بوده و برای رشد و تکثیر به ترکیبات آلی و کربن نیاز دارند قارچ‌ها هوازی و یا بیهوازی اختیاری هستند. تولید مثل آنها بصورت جنسی یا غیر جنسی با تشکیل اسپور، جوانه زدن و تقسیم سلولی می‌باشد قارچ‌ها توانایی رشد در رطوبت کم و دمای پایین را دارند pH مناسب برای بیشتر گونه‌ها ۵/۶ و محدوده pH برای آنها بین ۲ تا ۹ است ساختار اغلب قارچ‌ها از رشته‌ها و یا ریشه های نخی شکل به نام هیف تشکیل شده است. در قارچ-های پست، ریشه‌ها یا هیف‌ها فاقد دیواره عرضی هستند. انشعابات هیف‌ها یا ریشه‌ها شبکه‌ای به نام میسیلیوم را به وجود می‌آورند. شبکه میسیلیوم را می‌توان به صورت کپک بر روی مواد آلی مختلف مشاهده کرد. آنزیم‌هایی که توسط قارچ‌های مختلف به وجود می‌آیند می‌توانند انواع مواد آلی را تجزیه کرده و به مواد ساده‌تری تبدیل کنند. قارچ‌ها از لحاظ ساختار یاخته‌ای جزء یوکاریوت‌ها هستند، در اطراف هسته و دیگر اجزای یاخته غشای دو لایه وجود دارد. در اطراف یاخته، دیواره‌های یاخته‌ای حاوی کیتین قرار می‌گیرند. قارچ‌ها به کپک‌ها، مخمرها تقسیم می‌شوند. میزان رشد قارچ^۲، سطح کلنی^۳، رنگ کلنی^۴، وجود رنگدانه، مشاهده میکروسکوپی^۵ دارای ارزش تشخیصی است.

۷-۳-۱ کپک‌ها^۶

کپک‌ها، قارچ‌های رشته‌ای، هوازی هستند آنها غیر فتوسنتتیک، چند سلولی، هتروتروف، هوازی، هستند. کپک‌ها تولید واحدهای میکروسکوپی بنام تال^۷ می‌کنند که با تجمع آنها، جرم رشته‌ای تشکیل می‌گردد که به آن میسیلیوم گفته می‌شود. معمولاً به صورت کلنی^۸ پروپاگول^۹ یا جوانه^{۱۰} صاف یا کرکدار، اغلب با ساختار اسپورزایی یا تولید مثل رنگی در سطح محیط‌های کشت قارچی رشد می‌کنند. بهترین رشد کپک‌ها در محیط اسیدی با غلظت بالای قند می‌باشد. کلنی‌های ایجاد

۱-Fungi

۲ - مسطح، برجسته، منظم یا غیر منظم

۳ - صورت پودری باشد و یا به صورت شبه مخمری، دانه‌ای، پنبه‌ای، پشمی، پرزی و مویی باشد.

۴ - ممکن است در مورد یک قارچ رنگ‌های مختلفی دیده شود بنابر این شناخت قارچ‌ها از روی کلنی آنها بسیار مشکل است. در قارچ‌های بیماری‌زا تنوع رنگ کمتر است و معمولاً سفیدند. تنوع رنگ مربوط به ساپروفیت‌ها است.

۵ - مشاهده میکروسکوپی قارچ‌ها، مانند: وجود میسیلیوم یا عدم وجود آن و این که میسیلیوم دیواره عرضی دارد یا خیر، دارای ارزش تشخیصی است.

۶- Mold

۷- Hypha(Tall)

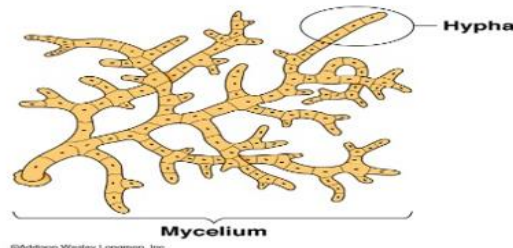
۸- پروپاگول(Propagule) به اجتماع قابل مشاهده و متمرکز توده میکروبی ناشی از یک ذره زنده رشد یافته در سطح یا داخل محیط کشت مغذی گفته می‌شود.

۹- به موجودات زنده مانند سلول رویشی، گروه سلول‌ها، اسپور، خوشه‌های اسپوریا قطعه‌ای از یک میسیلیوم قارچی گفته می‌شود که قادر به رشد در محیط کشت مغذی می‌باشد .

۱۰- Germ

شده توسط کپک‌ها، به رنگ‌های مختلف سفید، آبی، سبز، خاکستری و بنفش می‌باشد کلنی ممکن است بصورت برجسته یا فرورفته، چین دار یا مسطح، خامه‌ای با قوام بسیار محکم باشند در پاره‌ای از موارد کلنی‌ها به صورت کرکی شکل یا پنبه‌ای شکل می‌باشند کپک‌ها علاوه بر سطح در عمق محیط کشت نیز می‌توانند کلنی‌های گرد عدسی شکل ایجاد کنند. طبقه بندی کپک‌ها بر اساس شکل ظاهری (مورفولوژی) و تشکیل یا عدم تشکیل اسپور جنسی استوار است. وقتی شرایط برای فعالیت آن‌ها نامساعد شود فوراً ایجاد اسپور می‌کنند، اسپورها در برابر خشکی و سرما مقاوم می‌باشند و در فضا پراکنده می‌شوند و با مساعد شدن شرایط به سرعت تبدیل به شکل فعال می‌گردند کپک‌ها با تجزیه مواد غذایی موجب فساد مواد غذایی می‌شوند

مهمترین کپک‌های مواد غذایی از دسته پنی‌سیلیوم^۱، موکور^۲، رایزوپوس^۳، فوزاریوم^۴ و اسپرژیلوس^۵ می‌باشند. گروهی از کپک‌ها دارای اگزوتوکسین^۶ هستند ترشح اگزوتوکسین کپک‌ها غالباً در حرارت بالاتر از ۱۰ °C صورت می‌گیرد.



شکل ۲۲- میسیلیوم و هیف

۷-۳-۲- مخمرها

مخمرها یکی از گروه‌های قارچ‌های فاقد رشته هستند به همین دلیل تک سلولی می‌باشند و بوسیله جوانه زدن تکثیر پیدا می‌کنند مخمرها پروتئولیتیک نیستند این میکروارگانیسم تحت شرایط بی‌هوازی، قند را متابولیزه می‌کند و تولید الکل و به میزان کمی تولید سلول جدید می‌کند در شرایط هوازی تولید سلول بیشتری می‌کند و الکل تولید نمی‌شود کلنی‌های مخمرها خامه‌ای با قوام بسیار نرم است غالباً تک یاخته هستند و ایجاد میسیلیوم‌های کاذب می‌کنند. تولید مثل غیرجنسی آن‌ها اغلب بصورت جوانه زدن و در برخی به صورت تقسیم دوتائی می‌باشد. بیشتر گونه‌های آن تخمیرکننده و غیر بیماری‌زا هستند.

۱- Penicillium

۲- Mucor

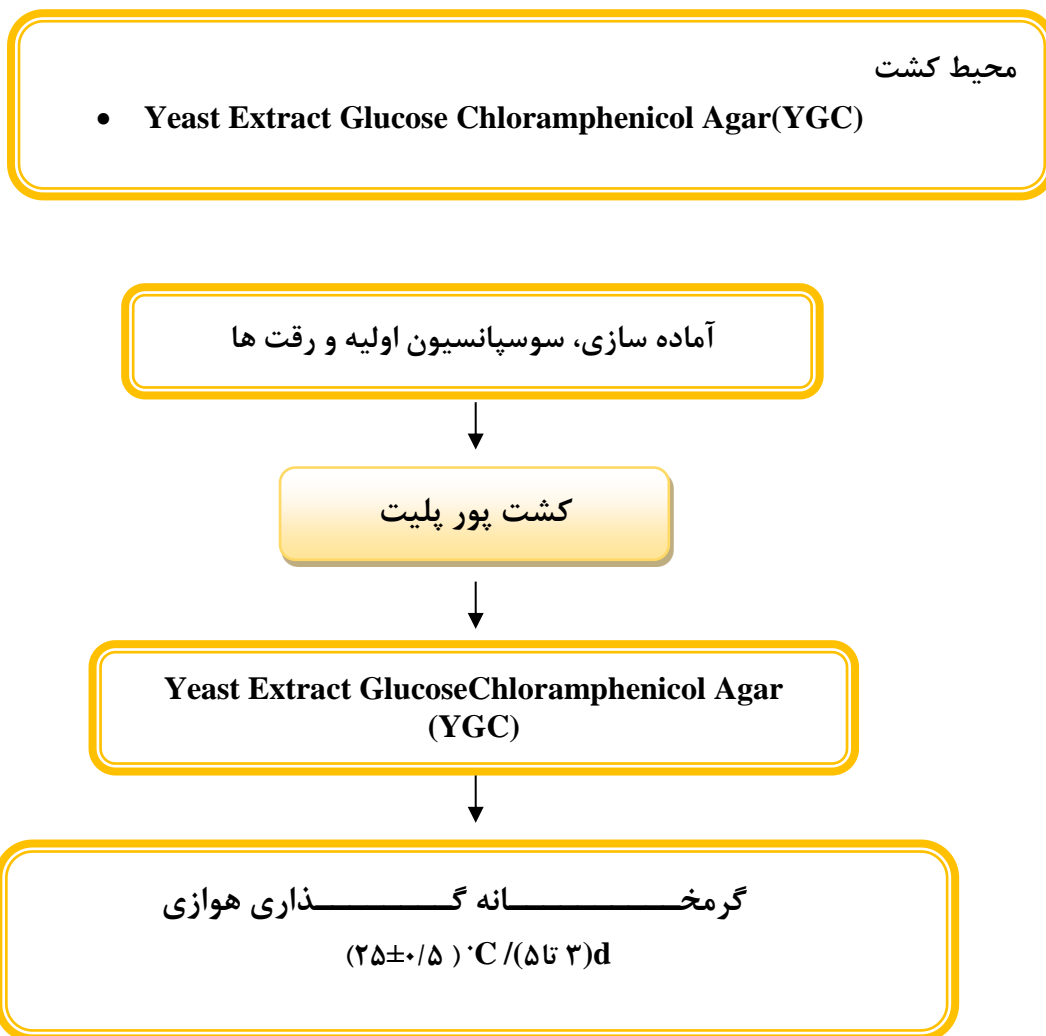
۳- Rhizopus

۴- Fusarium

۵- Aspergillus

۶- اسپرژیلوس فلاووس و اسپرژیلوس پارازیتیکوس سم آفلاتوکسین ترشح می‌کند این سم علاوه بر آن که سرطان‌زا است موجب هموگلوبیناسیون نیز می‌شود.

۷- Yeast



- ✓ به دلیل رسوب سریع اسپورها در پی‌پت، پس از پر کردن پی‌پت‌ها با سوسپانسیون اولیه یا رقت‌ها، آن را به صورت افقی نگه دارید. برای جلوگیری از رسوب ذرات دارای میکروارگانیسم، سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها را به هم بزنید.
- ✓ به منظور افزایش رطوبت داخل انکوباتور، یک بشر آب مقطر داخل آن قرار دهید. گرمخانه گذاری بیشتر از ۵ روز بستگی به دما و میزان رشد دارد.

- ✓ اگر احتمال حضور *Xeromyces bisporus*^۱ وجود داشته باشد، پلیت‌ها را به مدت زمان ۱۰ d گرمخانه گذاری کنید.
- ✓ توصیه می‌شود که پلیت‌ها، در یک کیسه پلاستیکی در باز قرار داده شوند تا از انتشار کپک‌ها از داخل پلیت‌ها سبب آلودگی انکوباتور نشود.
- ✓ اسپورهای کپک‌ها به راحتی در هوا پخش می‌شوند لذا، پلیت‌ها را با احتیاط جابجا کنید تا از پیدایش کلنی‌های اقماری جلوگیری شود در غیر این صورت شمارش، غیر واقعی و بالا خواهد بود.
- ✓ کلنی‌های مخمرها و کلنی‌ها یا پروپاگول‌های کپک‌ها را در صورت نیاز، جدا گانه شمارش کنید.
- ✓ در صورتی که انتظار دارید تعداد زیادی میکروارگانیسم مورد شمارش قرار گیرند، برای دستیابی به شمارش کلنی‌ها، رقت‌های بیشتری را کشت دهید.



شکل ۲۴- کلنی‌های مخمرها



شکل ۲۳- کلنی‌های کپک‌ها

خصوصیات کلنی مخمر

- گرد
- مات یا درخشان، معمولا دارای پیرامون منظم و با تحدب کم یا زیاد

شمارش کلنی‌ها

تعداد CFU قارچ‌ها را در هر میلی لیتر نمونه، مطابق استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ محاسبه نمایید.

۸ بیان نتیجه آزمون

۱-۸ شمارش

تعداد N میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه S را با استفاده از پارامترهای زیر محاسبه کنید:

m میانگین حسابی^۲ به دست آمده از دو پلیت در فرمول ۱ است،

c تعداد کلنی‌های شمارش شده یک پلیت در فرمول ۲ است،

۱- *Xeromyces bisporus*

۲- Arithmetic mean

\bar{x}_c میانگین ارزیابی شده^۱ شمارش به دست آمده از دو رقت متوالی در فرمول ۳ است، مطابق فرمول های ۱، ۲ و ۳ تعداد میکروارگانیزم های موجود در نمونه را محاسبه کنید:

$$N = \frac{m}{(V \times d)} \quad (۱)$$

$$N = \frac{c}{(V \times d)} \quad (۲)$$

$$N = \frac{\bar{x}_c}{(V \times d)} \quad (۳)$$

که در این فرمول‌ها،

m میانگین حسابی به دست آمده از دو پلیت ،

V حجم ماده تلقیحی به هر پلیت، به میلی لیتر ،

d ضریب رقت مربوط به رقت آماده شده برای تهیه سوسپانسیون اولیه یا برای اولین رقت مورد استفاده برای شمارش ،

c تعداد کلنی‌های شمارش شده روی یک پلیت ،

\bar{x}_c میانگین ارزیابی شده^۱ شمارش کلنی ها، از دو رقت متوالی می‌باشد و با استفاده از فرمول (۴) محاسبه

می شود :

$$\bar{x}_c = \frac{\sum c}{n_1 + 0.1n_2} \quad (۴)$$

که در آن :

$\sum c$ مجموع کلنی‌های شمارش شده از تمام پلیت های حاصل از دو رقت متوالی می باشد،

n_1 تعداد پلیت‌های شمارش شده برای سوسپانسیون اولیه (یا اولین رقت شمارش شده) می باشد،

n_2 تعداد پلیت‌های شمارش شده برای رقت ۱ به ۱۰ از سوسپانسیون اولیه (یا دومین رقت شمارش شده) می باشد.

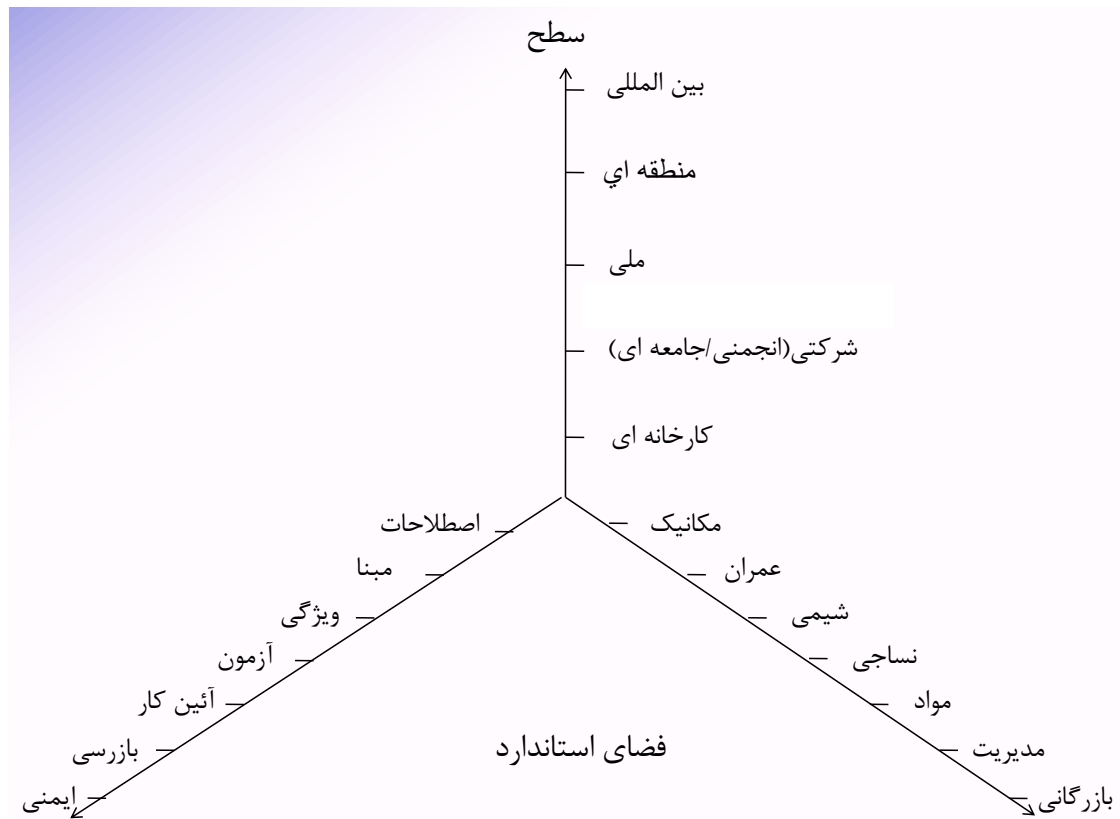
نتیجه را تا دو رقم معنی‌دار گرد کنید.

۸-۲ صحه‌گذاری

در صورتی که شمارش پلیت صحه‌گذاری حداقل ۵۰٪ شمارش پلیت شاهد باشد، محلول رقیق‌کننده و روش مورد استفاده (کشت آمیخته یا کشت سطحی یا صافی غشایی) صحه‌گذاری شده است.

پیوست الف انواع استاندارد

الف-۱ استانداردها با موضوعات مختلف در زمینه ها و سطوح متفاوت تهیه می شوند. ارتباط بین جنبه، رشته و سطح استاندارد در نمودار زیر نمایش داده شده است.



الف-۲ سطح استاندارد

استانداردها دارای سه سطح کلی می باشند که می توان آن ها را به صورت زیر تقسیم بندی کرد:
الف- استانداردهای کارخانه ای، این گونه استانداردها توسط کارخانجات و به منظور استفاده در همان واحد تدوین می شود. در تدوین استاندارد کارخانه ای ضمن بررسی شرایط داخلی کارخانه باید شرایط و عوامل خارجی از قبیل مواد اولیه و منابع تهیه آن، چگونگی تهیه تجهیزات، بازاریابی و رقابت، نیاز مشتری و امثال آن باید مورد توجه قرار گیرد.

ب- استانداردهای ملی (مانند ISIRI, BS, BIS ASTM , و ...)، این گونه استانداردها به وسیله سازمان استاندارد در یک کشور که به عنوان مقام ذی صلاحی برای این کار شناخته شده است، تهیه می شود. در

تدوین این استانداردها تمامی افراد ذی نفع از قبیل تولید کنندگان، مصرف کنندگان، اعضای مراکز علمی و فنی، مراکز تجاری کارشناسان مرتبط از سازمان ها یا مراکز دولتی و امثال آن شرکت دارند.

پ- استانداردهای منطقه ای (مانند استانداردهای اتحادیه اروپا CEN)، عواملی نظیر موقعیت جغرافیایی، فرهنگ، سیاست، شکل تولید و مصرف و امثال آن برخی از کشورها را بر آن داشته تا مشترکا مبادرت به تدوین استانداردهای منطقه ای نمایند.

ت- استانداردهای بین المللی (ISO)، هدف از تدوین استانداردهای بین المللی حفظ و نگهداری پیشرفت های فنی در یک سطح معین در تمام دنیا و طرح و ارائه تکنولوژی های پیشرفته در این استانداردها و انتقال آن به استانداردهای ملی با توجه به نیاز و موقعیت زمانی کشورها از نظر توسعه فنی و صنعتی می باشد.

ب-۳- جنبه استاندارد

در راستای رشد و تکامل دانش بشری جنبه های مختلف استاندارد نیز گسترش یافته و می تواند موضوعات مختلفی را شامل شود.

الف- استاندارد های ویژگی

ب- استاندارد های روش آزمون

پ- استانداردهای آیین کار

ت- استانداردهای ایمنی

ث- واژه نامه

ت- سایر استانداردها (شامل طبقه بندی، بازرسی و نمونه برداری، بسته بندی، حمل و نگهداری، راهنما و ...)

ب-۴- اجرای استاندارد

استانداردهای ملی از نظر اجرایی به دو دسته زیر تقسیم بندی می شوند:

الف- استانداردهای اجباری، شامل استانداردهایی می باشد که در رابطه مستقیم با ایمنی و بهداشت، محیط زیست و یا تجارت خارجی (صادرات و واردات) بوده و به صورت قانونی از نظر اجرا اجباری اعلام می شوند.

ب- استانداردهای تشویقی، شامل استانداردهایی است که تولید کننده با توجه به توان بالای تولید و هم چنین علاقمندی و موافقت خود، داوطلبانه تمایل به اجرای آن دارد.

متن کامل استانداردهای ملی ایران از طریق سایت سازمان ملی استاندارد ایران به آدرس زیر و لینک «استانداردهای ملی» در دسترس می باشد.

www.isiri.gov.ir

پیوست ب
مفاهیم مورد استفاده در کنترل کیفیت

ب-۱- نمونه (Sample)

یک یا چندین قلم، قطعه یا واحد که از یک جامعه یا مجموعه یا محموله انتخاب می شوند را نمونه گویند.

ب-۲- حجم نمونه (Sample Size)

مقدار مواد یا تعداد اقلام یا واحدهای تشکیل دهنده یک نمونه را، حجم نمونه گویند.

ب-۳- نمونه برداری (Sampling)

رویه ای است که بر طبق آن از جامعه یا محموله مورد بررسی بخش یا بخش های کوچکی انتخاب می شود تا بر اساس نتایج حاصل از بازرسی آن ها بتوان در مورد کل جامعه یا محموله قضاوت کرد.

ب-۴- بازرسی (Inspection)

مجموع بررسی ها، اندازه گیری و آزمون هایی است که جهت مقایسه مشخصات مواد محصولات نیمه ساخته و محصولات تمام شده با مشخصات فنی یا استانداردها انجام می گیرد.

ب-۵- درستی (Accuracy)

نزدیکی نتیجه اندازه گیری یک کمیت با مقدار واقعی آن کمیت است.

ب-۶- دقت (Precision)

نزدیکی بین جواب های تکراری حاصل از چند آزمایش بر روی یک نمونه است.

ب-۷- تجدید پذیری (Reproducibility)

نزدیکی میزان مقادیر بدست آمده از آزمون ها بر روی یک نمونه است در شرایطی که روش، آزمایش کننده، تجهیزات، محل و شرایط و زمان متفاوت باشد.

ب-۸- تکرار پذیری (Repeatability)

نزدیکی مقدار نتایج اصل از یک آزمایش در شرایطی است که شرایط اندازه گیری، تجهیزات، آزمایش کننده و محل همگی یکسان باشد.

ب-۹- رواداری (Tolerance)

حداکثر میزان انحراف قابل قبول برای یک کالا از اندازه خود (حداکثر خطای قابل قبول در یک اندازه گیری)

پیوست پ (اطلاعاتی)

پ-۱ مدیر کنترل کیفیت و آیین نامه تایید صلاحیت علمی و فنی

مدیر کنترل کیفیت در واحد های تولیدی فردی است که صلاحیت وی طبق آیین نامه تایید صلاحیت علمی و فنی مدیران کنترل کیفیت، مورد بررسی قرار گرفته و پس از تایید سازمان ملی استاندارد و یا اداره کل استاندارد استان، پروانه تایید صلاحیت دریافت می نماید.

مدیر کنترل کیفیت واحد تولیدی طبق آیین نامه مذکور، علاوه بر انجام وظایف خود از جمله حضور تمام وقت در یک نوبت کاری و بازرسی، کنترل و نظارت کامل بر مواد اولیه، شرایط فرآورده حین ساخت، محصول نهایی و شرایط نگهداری در کلیه مراحل تولید و یا خدمت و سایر وظایف و موارد ذکر شده، موظف است نتایج آزمون نمونه های تولید شده در کارخانه را روزانه ثبت نموده و به صورت کتبی ماهیانه (حداکثر تا پایان هفته اول ماه بعد) به اداره کل استاندارد استان (با امضاء مدیر کنترل کیفیت و مدیر عامل کارخانه) ارسال نماید.

عدم انجام هر یک از وظایف مدیر کنترل کیفیت و تخطی شغلی و قانونی او طبق آیین نامه ذکر شده می تواند منجر به اعمال تنبیهاتی به ترتیب شامل: تذکر شفاهی به عنوان کمترین و **ابطال دائم پروانه** به عنوان بیشترین، برای مدیر کنترل کیفی اجرا شود.

یادآوری می گردد در صورت تعلیق یا لغو پروانه تایید صلاحیت مدیر کنترل کیفیت واحد مربوطه، موظف است ظرف مدت یک هفته نسبت به معرفی فرد جایگزین اقدام و اداره کل نیز موظف است نسبت به احراز شرایط فرد معرفی شده و تأیید صلاحیت وی اقدام نماید.

برای اطلاع از وظایف، قوانین، تخلفات، تنبیهات و سایر موارد مهم، به آخرین و جدیدترین "آیین نامه تایید صلاحیت علمی و فنی مدیران کنترل کیفیت" موجود در سایت سازمان ملی استاندارد WWW.ISIRI.GOV.IR مراجعه شود.

پ-۲ خلاصه ای از دستورالعمل نحوه تذکر، اخطار، تعلیق و ابطال پروانه کاربرد علامت استاندارد ایران

به علت عدم تداوم انطباق فرآورده با استاندارد مربوطه

پ-۲-۱ درجه بندی نواقص موجود در کالاهای تولیدی

بر اساس دستورالعمل نحوه تذکر، اخطار، تعلیق و ابطال پروانه کاربرد علامت استاندارد ایران به علت عدم تداوم انطباق فرآورده با استاندارد مربوطه (مدرک شماره ۵۰/۱۱۹/د)، نواقص موجود در کالاهای تولید شده به سه دسته به شرح زیر تقسیم می گردند:

پ-۲-۱-۱-۱ نقص بحرانی:

نقص موجود در یک محصول است که برای افرادی که از آن استفاده یا نگهداری می کنند، خطرناک بوده و یا وضعیت ناامنی را به وجود آورد.

پ-۲-۱-۲ نقص عمده:

نقصی است متفاوت با نقص بحرانی که فقدان را به وجود آورده یا به نحو قابل ملاحظه ای امکان استفاده از کالای مورد نظر را برای منظور خاص، کاهش می دهد.

پ-۲-۱-۳ نقص جزئی:

نقصی است جدا از نقایص بحرانی و عمده که امکان استفاده از محصول مورد نظر را برای منظور خاص کاهش نمی دهد یا آنکه اختلاف آن با مشخصات فنی به میزانی است که کارآیی آن کالا را چندان کاهش نمی دهد. نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون ها به پیوست می باشد.

پ-۳ نحوه برخورد کالاهای تولید شده نامنطبق با استاندارد مربوطه

در صورتی که در نتایج آزمون فرآورده نمونه برداری شده، هر یک از نواقص فوق مشاهده شوند، امتیاز منفی به شرح جدول زیر (جدول ۱) به واحد تولیدی تعلق گرفته و ادارات کل استاندارد استان بر اساس جمع امتیازات منفی در طول یک دوره (از هنگام صدور و یا تمدید پروانه کاربرد علامت استاندارد برای هر محصول و هر واحد تولیدی مورد نظر در مدت اعتبار تعیین شده) تصمیماتی را به شرح مندرج در جدول ۲ اتخاذ می نمایند.

جدول ۱- امتیازات منفی نواقص موجود در فرآورده

نوع نقص	امتیاز منفی
بحرانی	۳۰
عمده	۱۵
جزئی	۵

جدول ۲- اقدامات اجرایی بر اساس جمع امتیازات منفی در طول یک دوره

جمع امتیاز منفی	اقدام اجرایی
۱۵	تذکر کتبی در خصوص الزام رفع نقص یا نواقص
۳۰	اخطار کتبی در خصوص الزام رفع نقص یا نواقص
۶۰	مطابق بند ۲-۱
۹۰	مطابق بند ۲-۲
۱۲۰	مطابق بند ۲-۳

پ-۳-۱ در صورتیکه جمع امتیاز منفی یک گزارش نتیجه آزمون یا جمع امتیازات منفی نتایج چند آزمون به ۶۰ رسید، اداره کل استاندارد استان مربوط به واحد بصورت کتبی اخطار داده و در مورد واحدهای مشمول استاندارد اجباری برای جمع آوری کالای مغایر با استاندارد ملی با شماره سری ساخت مربوط موضوع را به کمیسیون ماده ۱۹ ضوابط اجرایی استانداردهای اجباری و تشویقی و طرز به کار بستن علایم آنها ارجاع می دهد.

پ-۳-۲ در صورتیکه جمع امتیاز منفی گزارش نتیجه یک آزمون یا جمع امتیازات منفی نتایج چند آزمون به ۹۰ رسید، اداره کل استاندارد استان مربوط، علاوه بر اخطار کتبی، در مورد واحدهای مشمول استاندارد اجباری برای جمع آوری کالای مغایر با استاندارد ملی با شماره سری ساخت مربوط موضوع را به کمیسیون ماده ۱۹ ارجاع می نماید. همچنین در صورتیکه امتیاز منفی مذکور ناشی از حداقل نتایج آزمون دو نمونه برداری مختلف بوده و حداقل ۳۰ امتیاز از جمع امتیازات منفی گزارش نتیجه آزمون آخر به واسطه نقایص عمده و بحرانی باشد، نسبت به تشکیل کمیته علایم برای تعلیق پروانه کاربرد علامت استاندارد اجباری و یا ابطال پروانه کاربرد علامت استاندارد تشویقی اقدام می کند. در صورت تعلیق یا ابطال پروانه، آن اداره کل واحد مربوط را ملزم به عدم تولید (در ارتباط با استانداردهای اجباری) و یا عدم عرضه کالا با علامت استاندارد ایران (در ارتباط با استانداردهای تشویقی) نموده و مراتب را به ادارات کل استاندارد سایر استانها منعکس می کند.

پ-۳-۳ در مورد کالاهای مشمول استاندارد اجباری، در صورتیکه امتیاز منفی یک گزارش نتیجه آزمون و یا جمع امتیازات منفی نتایج چند آزمون به ۱۲۰ رسید، اداره کل استاندارد استان مربوط، علاوه بر اخطار کتبی، برای جمع آوری کالای مغایر با استاندارد ملی با شماره سری ساخت مربوط موضوع را به کمیسیون ماده ۱۹ ارجاع می نماید. همچنین در صورتیکه امتیاز منفی مذکور ناشی از حداقل نتایج آزمون سه نمونه برداری مختلف بوده و حداقل ۳۰ امتیاز از جمع امتیازات منفی گزارش نتیجه آزمون آخر به واسطه نقایص عمده و بحرانی باشد، نسبت به تشکیل کمیته علایم برای ابطال پروانه کاربرد علامت استاندارد اجباری اقدام نموده و در صورت ابطال پروانه، موضوع را از طریق روابط عمومی به اطلاع عموم می رساند.

یادآوری ۱- رفع تعلیق و تجدید پروانه کاربرد علامت استاندارد ایران، در صورت رفع کلیه نقایص و انطباق با موازین استاندارد ملی مربوط و احراز کلیه شرایط مندرج در دستورالعملهای مرتبط صورت می گیرد.

یادآوری ۲- انجام هریک از اقدامات ذکر شده در جدول ۲، نافی و مانع یکدیگر نمی باشد و تنها ملاک هر یک از اقدامات رسیدن به حد نصاب امتیاز منفی ذکر شده در بندهای مذکور است.

منبع: دستورالعمل نحوه تذکر، اخطار، تعلیق و ابطال پروانه کاربرد علامت استاندارد ایران به علت عدم تداوم انطباق فرآورده با استاندارد مربوطه (مدرک شماره ۵۰/۱۱۹/د)

پیوست ت

نقایص بحرانی ، عمده و جزئی آزمون های میکروبیولوژی آب لیمو

طبق استاندارد ملی ایران شماره های ۸۷۸۸

ردیف	شرح آزمون	درجه اهمیت
۱	باکتری های مقاوم به اسید	عمده
۲	کپک	عمده
۳	مخمر	عمده