ریاست جمهوری
سازمان ملی استاندارد ایران

جزوه دوره کارآموزی

میکروبیولوژی انواع سوپ خشک

شماره مدرک : ۶۲۲/۱۹/ج
تاریخ تصویب : ۱۳۹۷

تاریخ تجدید نظر:

شماره تجدید نظر:

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

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استانداردایران به موجب بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفهٔ تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را بـه عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شـده تهیـه مـی‌کننـد درکمیته ملی طرح، بررسی و درصورت تصویب، بـه عنـوان اسـتاندارد ملـی ایـران چـاپ و منتشـر مـی‌شـود. بـدین ترتیـب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔملی اسـتاندارد مربـوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد(ISO)[1]،کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی(OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسـیون کـدکس غـذایی(CAC)[5] در کشـور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهایملی ایران ضمن تـوجه بـه شـرایط کلـی و نیازمنـدی‌هـای خـاص کشـور، از آخـرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصـول اطمینـان از کیفیـت محصـولات و ملاحظـات زیسـت‌محیطـی و اقتصـادی، اجـرای بعضـی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عـالی اسـتاندارد، اجبـاری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بـین‌المللـی بـرای محصـولات کشـور، اجـرای اسـتاندارد کالاهـای صـادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعـال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست محیطی، آزمایشگاه‌هـا و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضـوابط نظـام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌هـا نظارت میکند. ترویج دستگاه بین المللی یکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کـاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization
2- International Electrotechnical Commission
3- International Organization for Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)
4-Contact point
5- Codex Alimentarius Commission

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 آموزش‌ها 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 ۸۸۸۷۹۴۶۹-۰۲۱ 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

عنوان دوره کارآموزی:
میکروبیولوژی انواع سوپ خشک

گروه مخاطب:
کارشناسان ادارات کل استاندارد استان‌ها، مدیران کنترل کیفیت واحدهای تولیدی و کارشناسان آزمایشگاه‌های همکار

هدف از برگزاری دوره آموزشی:
هدف از برگزاری این دوره کارآموزی آشنایی با آزمون‌های میکروبیولوژی انواع سوپ خشک بر اساس استاندارد ملی ایران ۲۳۹۶ می باشد و موارد زیر را در برمی‌گیرد:

۱- آشنایی روش‌های بهینه و جدید آزمایشگاهی
۲- یکسان‌سازی رویه آزمایشگاه میکروبیولوژی سوپ خشک
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 انواع سوپ خشک
۵- آشنایی با الزامات آزمایشگاه میکروبیولوژی بر اساس استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹

توانایی های آموزشی گیرندگان پس از طی دوره:
- نحوه استفاده صحیح از تجهیزات مورد نیاز در آزمایشگاه
-روش تهیه و سترون‌سازی محیط کشت های مورد نیاز
-روش آماده‌سازی و سترون‌سازی وسایل مورد نیاز
- روش آلودگی زدایی مواد مصرفی و وسایل
- روش اجرای آزمون طبق استاندارد
- شناسایی و شمارش باکتری‌ها

پیش نیاز:
ندارد

رئوس مطالب آموزشی:

ردیف	رئوس مطالب	محتوای آموزشی	مدت آموزش (ساعت)		اجراکننده		منبع/ استانداردها
			تئوری	عملی	مدرس	کارآموز	
۱	آشنایی با الزامات فنی آزمایشگاه میکروبیولوژی	آشنایی با وسایل مورد نیاز آشنایی با اصول آزمایشگاهی آشنایی با قسمت های مختلف آزمایشگاه میکروبیولوژی	۱		*		جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹
۲	آشنایی با روش تهیه محیط کشت های مورد نیاز و روش سترون‌سازی	روش تهیه محیط کشت مرتبط با سوپ خشک و اتوکلاو کردن محیط‌ها	۰/۵	۰/۵	*	*	استانداردهای ملی ایران ۲۳۹۶ و ۹۸۹۹
۳	آماده‌سازی وسایل مورد نیاز و روش سترون‌سازی وسایل	روش آماده‌سازی و سترون‌سازی وسایل مورد نیاز	۰/۵	۰/۵	*	*	استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹
۴	آشنایی با استاندارد روش آزمون	هدف و دامنه کاربرد، مواد و دستگاه‌های مورد نیاز جهت انجام آزمون	۰/۵		*		جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۲۳۹۶
۵	آشنایی با شاخص‌های میکروبی و حدود مجاز آنها در سوپ خشک	آشنایی با باکتریهای احتمالی موجود در سوپ خشک	۱		*		جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۲۳۹۶
۶	روش آماده‌سازی نمونه در آزمایشگاه	تهیه سوسپانسیون اولیه و سایر رقت‌ها با استفاده از رقیق‌کننده مناسب	۰/۵	۰/۵	*	*	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۲۳۹۶
۷	روش شمارش و جستجوی باکتری ها	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	۱	۱	*	*	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۲۳۹۶
۸	گرمخانه‌گذاری	گرمخانه‌گذاری در دما و زمان مناسب بر حسب باکتری‌های مورد نظر	۰/۵		*		جزوه آموزشی و استانداردهای ملی ایران ۲۳۹۶

ردیف	رئوس مطالب	محتوای آموزشی	مدت آموزش (ساعت)		اجراکننده		منبع/ استانداردها
			تئوری	عملی	مدرس	کارآموز	
۹	تشخیص ، شمارش کلنی ها و آزمون تاییدی	بررسی و نحوه شمارش و محاسبه کلنی‌ها پس از گرمخانه‌گذاری -تعیین وجود یا عدم وجود باکتری‌ها - انجام آزمون‌های بیوشیمیایی مناسب جهت تایید	۱	۱	*	*	جزوه آموزشی و استانداردهای ملی ایران ۲۳۹۶
۱۰	ارائه گزارش آزمون	نحوه گزارش نتایج بررسی شده	۱	۱	*		استانداردهای ملی ایران ۲۳۹۶
مدت دوره: ۲ روز							

سایر استانداردها و منابع:

- استاندارد ملی ایران ۱۸۳۶ : ایین کار-اصول کلی بهداشت در مواد غذایی
- استاندارد ملی ایران ۲۰۸۳۴: میکروبیولوژی زنجیره مواد غذایی-روش‌های نمونه‌برداری برای آزمون‌های میکروب شناسی

نحوه برگزاری آزمون:

عملی	تئوری
*	*

جزوه کارآموزی میکروبیولوژی سوپ خشک

تهیه کننده/ تهیه کنندگان:
معصومه اطهری نیا

گروه پژوهشی/ آزمایشگاه:
گروه پژوهشی میکروبیولوژی/ آزمایشگاه فراورده های غلات
به سفارش دفتر آموزش و ترویج استاندارد

منابع و مآخذ:

۱- استاندارد ملی ایران ۲۳۹۶: انواع سوپ‌های خشک –ویژگی‌های میکروبیولوژی
۲- نجفی یاسوری. فاضل. میکروبیولوژی عمومی، دانشگاه گیلان
۳- جاوتز. میکروب شناسی پزشکی
۴- یگانه، مهرداد. استاندارد و استاندارد کردن، چاپ اول، موسسه دانش پارسیان، ۱۳۸۹

فهرست

عنوان	صفحه
آشنایی با پژوهشگاه استاندارد	ب
پیشگفتار	ج
محتوای دوره کارآموزی	د
جزوه کارآموزی میکروبیولوژی سوپ خشک	ز
مقدمه	ط
۱ هدف	۱
۲ استانداردهای مورد استفاده	۱
۳ انواع سوپ خشک	۲
۴ اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی	۳
۵ روش های آزمون میکروبیولوژی	۱۸
۶ آزمون های میکروبیولوژی	۲۰
۷ نمونه برداری	۲۱
۸ روش آزمون	۲۱
۹ روش کشت	۲۲
۱۰ آزمون شمارش کلی میکروارگانیسم ها	۲۲
۱۱ آزمون شمارش کپک	۲۳
۱۲ آزمون جستجوی اشریشیاکلی	۲۵
۱۳ آزمون شمارش کلستریدیوم پرفرژنس	۲۷
۱۴ آزمون شمارش کلی فرم ها	۲۸
۱۵ آزمون شمارش باسیلوس سرئوس	۲۹
۱۶ آزمون شمارش آنتروکوک‌های روده‌ای	۳۱
۱۷ آزمون جستجوی سالمونلا	۳۳
۱۸ آزمون جستجوی استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت	۴۰
پیوست الف انواع استانداردها	۴۳
پیوست ب مفاهیم مورد استفاده در کنترل کیفیت	۴۵
پیوست پ اطلاعاتی	۴۶
پیوست ت نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌های انواع سوپ های فوری خشک و نیمه آماده خشک طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۹۶	۵۰

مقدمه:

سوپ‌های خشک مخلوطی از مواد غذایی مختلف مانند سبزی‌ها، آرد، نشاسته، انواع قوام دهنده‌ها، چربی‌های گیاهی، شیر، ادویه و ... است که بعد از خشک کردن، مخلوط و به روش مناسب بسته‌بندی می‌گردد تا در شرایط معمولی (حرارت و رطوبت) برای مدتی قابل نگهداری باشند. سوپ‌های خشک کارخانه‌ای انواع مختلفی دارد، ولی مواد اولیه اغلب آنها از آرد، نشاسته، ادویه‌جات، چربی‌های گیاهی و افزودنی‌های قوام‌دهنده و تشدیدکننده طعم تشکیل می‌شود. این مواد به وسیله دستگاه‌های صنعتی خشک، مخلوط و پودری شده و برای افزایش ماندگاری با گازی خنثی مانند «ازت» بسته‌بندی می‌شود. البته برخی تولیدکنندگان برای کاهش بار میکروبی از فرآیند تشعشع استفاده می‌کنند که می‌تواند تا حدودی از ارزش تغذیه‌ای محصول بکاهد. این سوپ‌ها انواع فوری و نیمه‌آماده دارد. انواع نیمه آماده آن پس از مخلوط شدن با آب جوش نیاز به حرارت طبخ دارد، اما انواع فوری آن پس از ترکیب با مایعات آماده مصرف است. اغلب تولیدکنندگان ادعا می‌کنند که بیشتر سوپ‌های صنعتی دارای مواد نگهدارنده نبوده و در آن از مواد اولیه طبیعی استفاده می‌شود. برخی نیز معتقدند آن دسته از سوپ‌هایی که در مقایسه با سایر سوپ‌های صنعتی قیمت پایین‌تری دارد دارای اسانس، مواد رنگی و نگهدارنده هستند. در بیشتر سوپ‌های آماده مواد کربوهیدراتی و مقادیر زیاد سدیم حرف اول را می‌زند و در مقایسه با سوپ‌های خانگی کم‌مایه‌تر و رقیق‌تر بوده و هیچگاه ارزش تغذیه‌ای آن به پای سوپ خانه نمی‌رسد. چون در فرآیند خشک شدن مقادیر زیادی از ریزمغذی‌های حساس به حرارت محصول تخریب می‌شود. اما نکته مهم‌تر آن‌که اغلب سوپ‌های آماده دارای نوعی افزودنی به نام «مونوسدیم گلوتامات» است. مونوسدیم گلوتامات معروف‌ترین تشدیدکننده طعم و مزه غذاهای فرآوری شده از جمله سوپ‌های آماده پودری است که علاوه بر شوری، شیرینی، مزه تلخی و ترشی نیز از آن حس می‌شود و در واقع بهترین تشدیدکننده طعم گوشت در سوپ‌های آماده است. طبق یافته‌های علمی پژوهشگران ژاپنی، مصرف بیش از حد و مستمر فرآورده‌های دارای این افزودنی، در برخی افراد موجب حساسیت شده و می‌تواند به شبکیه چشم آسیب بزند و موجب بروز سردرد، تنگی نفس، تهوع و احساس سوزش در عضلات شود و احتمال تشدید آسم، حملات میگرن و اختلال در ریتم ضربان قلب را افزایش دهد. از طرفی این افزودنی به دلیل داشتن سدیم همراه نمک افزوده شده باعث شوری بیش از حد محصول می‌شود و برای کسانی که مبتلا به پرفشاری خون، بیماری قلبی و نارسایی کلیوی هستند و همچنین افراد سالمند و کودکان محدودیت مصرف دارد.

جزوه دوره کارآموزی میکروبیولوژی سوپ خشک

۱ هدف

هدف از تدوین این جزوه کارآموزی آشنایی با روش های میکروبیولوژی سوپ خشک بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۹۶ می‌باشد.

یادآوری۱- توصیه می‌شود کارآموزان این دوره با الزامات آزمایشگاهی میکروبیولوژی و نیز استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۹۶ 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 درخصوص روش‌های میکروبیولوژیکی انجام شود و داشتن مهارت‌های حرفه‌ای میکروبیولوژی در سطح مقدماتی الزامی است.

۲ استانداردهای مورد استفاده

عنوان استاندارد	شماره استانداردها
میکروبیولوژی انواع سوپ خشک	۲۳۹۶
میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – راهنمای الزامات کلی برای آزمون	۹۸۹۹
آماده سازی آزمایه-سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمونهای میکروبیولوژی- قسمت اول -مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری	۸۹۲۳-۱
آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون میکروبیولوژی – قسمت چهارم : مقررات ویژه برای آماده سازی محصولاتی به غیر از شیر، گوشت، ماهی و فرآورده های آن	۸۹۲۳-۴
میکروبیولوژی زنجیره غذایی -روش جامع برای شمارش میکروارگانیسم ها -قسمت ۱- شمارش کلنی در ۳۰درجه سانتی گراد با استفاده از روش کشت آمیخته	۵۲۷۲-۱
میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش جامع برای شمارش کلی فرم ها-روش شمارش کلنی	۹۲۶۳
میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-روش شمارش باسیلوس سرئوس احتمالی به روش شمارش کلنی در دمای ۳۰ درجه سلسیوس -روش آزمون	۲۳۲۴
میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش جستجو و شمارش اشریشیاکلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی	۲۹۴۶
میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-روش جامع برای جستجو،شناسایی و شمارش کلستریدیوم پرفرنژانس	۲۱۹۷

شماره استانداردها	عنوان استاندارد
۲۱۹۸	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -جستجو ،شناسایی و شمارش انتروکوک های روده ای در مواد غذایی
۱۸۱۰	روش جستجو و شمارش سالمونلا
۶۸۰۶-۳	روش جامع برای شمارش استافیلوکوکوس های کواگولاز مثبت قسمت سوم : جستجو و شناسایی به روش محتمل ترین تعداد (MPN) برای تعداد کم میکروارگانیسم ها
۱۰۸۹۹-۳	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -روش شمارش کپک‌ها و مخمرها قسمت ۳- روش شمارش کلنی در فراورده‌های با فعالیت آبی (aw) مساوی یا کمتر از ٪ ۶۰

۳ انواع سوپ خشک

سوپ‌های خشک مخلوطی ازمواد غذایی مختلف مانند عصاره گوشت و یا مرغ، سبزی‌ها، آرد، نشاسته، انواع قوام دهنده‌ها، چربی‌های گیاهی، تخم مرغ، شیر، ادویه و ... می‌باشند که بعد از خشک شدن، مخلوط و به طور مناسب بسته بندی گردیده تا درشرایط معمولی (حرارت و رطوبت) برای مدتی قابل نگهداری باشند. این فرآورده از نظر چگونگی آماده سازی برای مصرف به دو دسته زیر تقسیم می‌شوند:

۳-۱ سوپ‌های نیمه آماده خشک

آن دسته از سوپ‌های خشک هستند که پس از افزودن آب و یا مایعات دیگر و سایر مواد، نیاز به جوشاندن برای مدت زمان لازم طبق دستورالعمل تولید کننده داشته تا برای مصرف آماده شوند. این فرآورده‌ها براساس زمان مورد نیاز برای آماده شدن به دو دسته سوپ‌های نیمه آماده خشک که نیاز به به ۱۰ دقیقه و یا کمتر جوشاندن دارند و سوپ‌های نیمه آماده خشک که نیاز به بیشتر از ۱۰ دقیقه جوشاندن دارد، تقسیم می‌شود.

۳-۲ سوپ‌های فوری خشک

آن دسته از سوپ‌های خشک هستند که پس از افزودن آب و یا مایعات داغ آماده مصرف می‌شوند.

شکل ۱ –سوپ خشک

۴ اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

در آزمایشگاه میکروبیولوژی رعایت اصول اولیه الزامی است. بخشی از این اصول و قواعد مربوط به ایمنی فرد آزمایش‌کننده بوده و برخی نیز به ایمنی محیط و تجهیزات آزمایشگاه مربوط می‌باشد.

۴-۱ فضای آزمایشگاه

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

۴-۱-۱ فضای مربوط به نمونه و آزمون

با توجه به شرایط خوب آزمایشگاهی داشتن فضاهای جداگانه برای بخش های زیر لازم است:

- دریافت و انبارش نمونه‌ها ؛
- آماده‌سازی نمونه‌ها به خصوص برای مواد خام (مانند فرآورده‌های پودری حاوی تعداد زیاد میکروارگانیسم‌ها)؛
- آزمون نمونه ها (از سوسپانسیون 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 تمیز کردن وسایل شیشه‌ای و سایر تجهیزات ؛

- انبارش مواد شیمیایی مخاطره‌آمیز، ترجیحاً نگهداری در کابینت‌ها، قفسه‌ها، اتاقها.

۴-۱-۲ فضای عمومی

فضاهای جداگانه برای موارد زیر توصیه می‌شود:

- ورودی، راهرو، راه پله و آسانسور ؛
- فضای اداری (مانند دبیرخانه، دفترکار و اتاق مستندسازی) ؛
- رخت کن و سرویس های بهداشتی ؛
- اتاق بایگانی ؛
- انبار؛
- اتاق استراحت.

۴-۲ بهداشت کارکنان

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

- از لباس و کفش مخصوص در محیط آزمایشگاه استفاده کنید؛
- ناخن‌ها را تمیز و ترجیحاً کوتاه نگه دارید ؛
- هنگام کار در آزمایشگاه از صحبت کردن خودداری کنید ؛
- از خوردن و آشامیدن در آزمایشگاه خودداری کنید ؛
- کشیدن پی‌پت با دهان ممنوع می باشد.

پیش از شروع کار و پس از انجام آزمون باید سطح میز با محلول ضدعفونی‌کننده مناسب ضدعفونی شود.

۴-۳ تجهیزات

توصیه می‌شود مطابق با شرایط خوب آزمایشگاهی، کلیهٔ وسایل و تجهیزات تمیز و در محل مناسب نگهداری شوند. پیش از استفاده بهتر است وسایل از نظر داشتن شرایط لازم برای کار تصدیق و در صورت لزوم در مدت استفاده، عملکرد آن پایش شود.

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

جدول ۱ – لیست تجهیزات مورد نیاز در آزمایشگاه میکروبیولوژی

ردیف	نام تجهیزات
۱	انواع ظروف شیشه ای آزمایشگاهی
۲	دستگاه فور
۳	دستگاه اتوکلاو
۴	دستگاه انکوباتور
۵	دستگاه بن ماری
۶	دستگاه شمارشگر کلنی
۷	میکروسکوپ
۸	pH متر
۹	همگن‌کننده، خردکن و مخلوط کن
۱۰	ترازو

وسایل شیشه‌ای

شکل۲ - وسایل شیشه‌ای

وسایل شیشه‌ای شامل انواع پی‌پت، ارلن، ظروف شیشه‌ای درپیچ‌دار، انواع لوله آزمایش، پتری‌دیش می‌باشد.

فور یا آون

شکل ۳- فور یا آون

آون اتاقکی است که قابلیت تثبیت دمای ۱۶۰°C تا ۱۸۰°C را برای از بین بردن میکروارگانیسم‌ها به وسیلهٔ حرارت خشک دارد. وقتی شرایط دمایی برقرار شد، روند سترون سازی باید برای حداقل یک ساعت در دمای ۱°C ± ۱۷۰°C یا ترکیب معادلی از دما / زمان ادامه یابد. آون فقط برای سترون‌سازی تجهیزات مقاوم به حرارت خشک مانند وسایل فلزی و شیشه‌ای استفاده می‌شود. از آون برای سترون‌سازی وسایل لاستیکی و پلاستیکی استفاده نکنید. پیش از سترون‌سازی، همه وسایل فلزی و شیشه‌ای را تمیز کنید و در آون قرار دهید. پس از سترون‌سازی، به منظور پیشگیری از شکستن وسایل شیشه‌ای بهتر است پیش از خارج کردن از آون، آن‌ها را خنک کنید.

اتوکلاو

شکل ۴- اتوکلاو

وسیله است که توسط آن کلیه وسائل آزمایشگاهی و محیط‌های کشت قبل از استفاده و محیط‌های کشت میکروبی و غیره توسط حرارت مرطوب، سترون می‌شوند. این دستگاه قادر است بخار آب اشباع شده را با حرارت ۱۲۱°C ± ۳ °C ایجاد نماید که این درجه حرارت در شرایط بخار ایجاد شده می‌تواند موجب تخریب ساختمان میکروب‌ها و هاگ آنها شده و تقریبا باعث نابودی تمام میکروارگانیسم‌های شناخته شده شود. اتوکلاوهای آزمایشگاه میکروبیولوژی اغلب روی فشار ۱۵ پوند تنظیم شده‌اند که در این فشار بخار آب دمای آن به ۱۲۱°C ± ۳°C می‌رسد. این دستگاه طوری تنظیم شده است که بعد از رسیدن به این فشار بخار و درجه حرارت بلافاصله وارد مرحله سترون کردن می‌شود و مدت ۱۵ دقیقه به همان حالت باقی می‌ماند. قبل از شروع مرحله سترون کردن ابتدا مدتی شیر خروج هوا را باز می‌کنیم تا هوای داخل دستگاه تخلیه شده و بخار آب تمام سطوح و منافذ را بپوشاند و عمل استریلیزلاسیون کامل انجام گیرد.

انکوباتور

شکل ۵- انکوباتور

انکوباتور شامل اتاقک عایق‌بندی شده با قابلیت نگهداری دمای ثابت و توزیع یکنواخت دما با حداکثر خطای مجاز در مقدار نوسانات دمایی تعیین شده در روش آزمون است. دستگاهی است که درجه حرارت مناسب رشد، تکثیر و تشکیل کلنی را فراهم می‌کند.

حمام مایع با دمای ثابت

شکل۶- حمام مایع با دمای ثابت

حمام با دمای ثابت که با یک مایع (مانند آب، اتیلن گلیکول) پر می‌شود و دارای در یا بدون در یا ملحقات دیگر برای محدود کردن تبخیر است و به منظور تثبیت دمای مشخص استفاده می‌شود .
کاربرد اصلی این دستگاه 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 شدهٔ 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).

شمارشگر کلنی

شکل ۷ -شمارشگر کلنی

میکروسکوپ

شکل ۸ - میکروسکوپ نوری

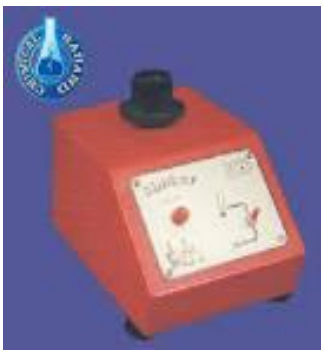
انواع مختلفی از میکروسکوپ‌ها شامل : یک چشمی ، دو چشمی، با دوربین یا تجهیزات فلورسنس و یک منبع نوری داخلی یا خارجی، وجود دارد.

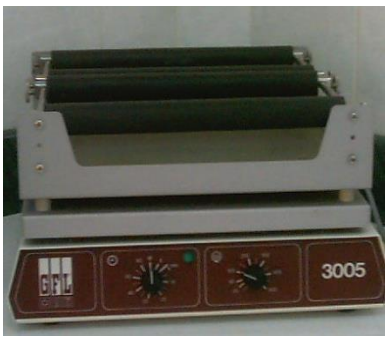
pH متر

شکل۹- pH متر

pH متر برای اندازه‌گیری اختلاف پتانسیل در یک دمای معین بین الکترود سنجش و الکترود مرجع یا قرار دادن هر دو الکترود داخل فرآورده به کار می‌رود. قابلیت اندازه‌گیری باید با دقت ۰/۰۵ واحد pH باشد.

همگن‌کننده، خردکن و مخلوط کن





شکل ۱۰–همگن‌کننده، خردکن و مخلوط کن

این تجهیزات برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه از فرآورده‌های مورد آزمون استفاده می‌شود.
وسایلی که ممکن است به کار رود عبارت است از:

الف- مخلوط‌کن ضربه‌ای (استومیکر) با کیسه‌های سترون و در صورت امکان مجهز به وسیلهٔ تنظیم‌کنندهٔ سرعت و زمان ؛

ب- مخلوط‌کن چرخشی

ت - مخلوط‌کن ارتعاشی ؛

ث- سایر سیستم‌های مخلوط کردن با کارایی مشابه.

ترازو

شکل ۱۱- ترازو

وسیله‌ای برای توزین با دقت‌های ۰/۱ و۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ در آزمایشگاه می‌باشد. ترازوهای با دقت بالا بعلت ظرافت و حساسیت باید از جریان هوا دور نگه داشته شده و در یک جای مسطح و محکم قرار داده شوند و جای آن حتما باید تراز باشد.

۴-۴ 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. روش حرارتی به وسیله دستگاه های مانند اتوکلاو و فور که در این روش از تاثیر گرما و فشار بخار آب برای کشتن میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود.

۲. روش شیمیایی به وسیله مواد ضدعفونی کننده مانند آب اکسیژنه و انجام واکنش های شیمیایی (مانند رادیکالهای آزاد) برای سترون کردن استفاده می‌شود.

۳. روش پرتودهی به وسیله تابش پرتو گاما، پرتو ایکس و پرتو فرابنفش.

۴. روش فیلتراسیون برای مایعات استفاده شده و شامل عبور دادن مایع از فیلترهای مخصوص می‌باشد.

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) انجام می‌شود. برای تشخیص بین مواد سترون شده و سترون نشده می‌توان از نشانگرهای سترون‌سازی استفاده کرد.

۴-۵ آب

برای آماده‌سازی محیط‌های کشت، فقط از آب خالص یعنی آب مقطر، آب بدون املاح، آب یون زدایی شده یا تولید شده با استفاده از اسمز معکوس یا کیفیتی معادل استفاده می‌شود که عاری از موادی مانند مهارکننده یا عامل موثر رشد میکروارگانیسم‌ها در شرایط آزمون، برای مثال اثر کلراید، اثر آمونیاک و اثر یون‌های فلزات می‌باشد.

آب خالص باید در ظروفی که بطور محکم بسته شده نگهداری شود و از مواد بی اثر (شیشه خنثی، پلی اتیلن وغیره) که عاری از تمام مواد مهارکننده است ساخته شده باشد. همچنین توصیه می‌شود آب تولید شده هر چه زودتر استفاده شود.

۴-۶ محیط کشت

کشت و تکثیر باکتری‌ها در محیط‌های مصنوعی از مهمترین روش‌های تشخیصی در باکتری‌شناسی است. برای کشت موفق باید شرایط مناسب برای رشد باکتری فراهم گردد. ازجمله این شرایط مواد غذایی، حرارت، رطوبت کافی، نمک، pH مناسب، حضور یا عدم حضوراکسیژن می‌باشد.

از آنجا که میکروب یک موجود تک سلولی بوده، قادر است کلیه اعمال حیاتی خود را مستقلاً انجام دهد بدون آنکه نیاز به سلول دیگری داشته باشد. این اصل بیانگر آن است که میکروبها هم احتیاج به غذا و آب و مواد آلی و معدنی دارند. محیطی مغذی که دارای کلیه احتیاجات یک میکروب اعم از مواد غذایی و عناصر و غیره باشد که موجب رشد میکروب شود را اصطلاحاً محیط کشت می‌گویند.

بعضی مواقع محیط‌های کشت 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. نمونه‌هایی از این مواد مغذی عبارتند از : شیر بی چربی ، خون گوسفند ، زرده تخم مرغ و ....

۴-۶-۱ محیط های متداول در کشت میکروبی

برای مطالعه میکروارگانیسم‌ها باید بطریقی آنها را بر روی محیط‌های کشت مناسب از نظر شرایط فیزیکی و شیمیایی کشت داد. مطالعه زیاد درباره میکروارگانیسم‌ها و نحوه زندگی آنها باعث شده که تاکنون انواع زیادی از محیط‌های کشت با ترکیبات متفاوت به طور مصنوعی برای استفاده در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی تهیه شود. هرچند انواع این محیط‌های کشت زیاد می باشند، با این وجود در مواردی برای کشت نوع بخصوصی از یک میکروارگانیسم باید از یک نوع محیط کشت بخصوص با ترکیبات مشخص استفاده شود. بطور کلی محیط‌های کشت باید دارای مشخصات معینی باشند و هنگام تهیه و استفاده از محیط‌های کشت باید به نکات زیر توجه شود :

- تمام محیط‌های کشت باید واجد مواد غذایی ضروری برای رشد میکروب ها باشند.

- pH محیط کشت باید در حد معین قبل از استفاده برای کشت تنظیم شود.
- ظروف مورد استفاده برای تهیه محیط‌های کشت باید کاملاً تمیز و عاری از مواد خارجی باشند.
- آب مقطر مورد استفاده باید به روش صحیح تهیه شود.
- درجه حرارتی که برای استریل کردن محیط کشت مصرف می شود باید نسبت به نوع مواد غذایی مربوط در محیط کشت در نظر گرفته شود. درجات بالا باعث از بین رفتن برخی از مواد شیمیایی موجود در محیط کشت می‌شوند .

محیط‌های کشت و معرف‌های مورد استفاده در آزمون باید دارای کیفیت آزمایشگاهی بوده و یا برای اهداف میکروبیولوژی مناسب باشند. آنها باید عاری از مواد سمی یا مهارکننده ارگانیسم‌های آزمون باشند. برای بهبود تکثیرپذیری توصیه می‌شود که مواد بدون آب قابل دسترس تجارتی برای آماده‌سازی محیط‌های کشت مورد استفاده قرار دهید. چنانچه محیط‌های کشت به صورت آماده در بازار در دسترس باشند، آنها را مطابق با دستورالعمل سازنده تهیه کنید. دستورالعمل سازنده برای آماده‌سازی این فرآورده‌ها بهتر است با دقت دنبال شود.

برای هر محیط کشت و معرف، بهتر است یک محدودیت زمانی برای استفاده تعیین شود.

برای کنترل عملکرد و تضمین کیفیت محیط‌های کشت به استاندارد ملی ایران ۸۶۶۳ مراجعه کنید.

۴-۶-۱-۱ انواع تقسیم بندی محیط‌های کشت

محیط‌های کشت را از جنبه‌های مختلف تقسیم بندی می کنند:

۱- تقسیم بندی بر اساس میزان آگار

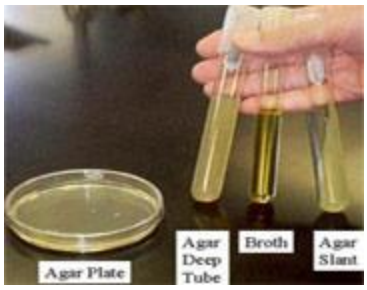
آگار یک نوع آلگ دریایی می باشد که بر خلاف ژلاتین می‌تواند حرارت ۳۷ °C را که برای رشد تمام باکتری‌های بیماریزای انسان مناسب است را تحمل نماید و هیچ میکروبی نمی‌تواند آنرا ذوب و هضم نماید. آگار ساختمان پلی‌ساکاریدی دارد که بوسیله یکسری از جلبک‌های دریایی ساخته می‌شود. نقطه ذوب آن ۹۵°C و نقطه انجماد آن حدود ۴۳°C است . محیط‌های جامد که دارای ۱۵- ۱۳ گرم آگار در لیتر محیط هستند

محیط های کشت به سه صورت زیر می‌باشند :

محیط کشت مایع یا آبگوشتی (liquid or broth media)

محیط کشت جامد (solid media)

محیط کشت نیمه جامد (semi solid media)



شکل ۱۲- محیط کشت نیمه جامد و جامد

شکل ۱۳- محیط کشت مایع

- محیط کشت مایع: این محیط کشت به صورت مایع می باشد مانند: نوترینت براث و مولر هینتون براث (در این نوع محیط‌های کشت که به صورت سوسپانسیون هستند حرکت دیده نمی‌شود.) محیط‌های مایع معمولاً فاقد آگار هستند یا مقدار آگار آنها بسیار کم است.

- محیط کشت جامد: این محیط کشت دارای آگار می‌باشد (به نام آگار هم خوانده می‌شود) مانند نوترینت آگار و مولر همینتون آگار

دلیل بکارگیری محیط جامد، تشخیص باکتری‌ها به وسیله :

- تشکیل کلنی
- تولید پیگمانت
- خصوصیات خاص هر کلنی
- تشخیص انواع باکتری‌ها که چند نوع باکتری در نمونه میکروبی وجود دارد.
- موکوئیدی بودن باکتری
- دیدن منطقه همولیز .

- محیط کشت نیمه جامد: مقدار آگار آن‌ها نسبت به محیط جامد کمتر است (۱ تا۵٪ آگار دارند).
این نوع محیط های کشت زمانی استفاده می‌شوند که لازم باشد حرکت باکتری‌ها را مشاهده کرد.

۲- تقسیم بندی بر اساس نوع کاربرد محیط کشت

محیط های کشت باکتری را از نظر نوع مواد تشکیل دهنده و از نظر کاربرد به چهار دسته تقسیم می‌شوند:

- محیط کشت پایه (Basic Media) :

این محیط کمترین مقدار مواد غذایی برای رشد باکتریها را دارد. مبنای تهیه انواع و اقسام محیط‌های کشت می‌باشد. اکثر انواع باکتری‌ها در آن رشد می‌کنند زیرا فاقد ماده ضد میکرب است. مانند محیط نوترینت آگار، نوترینت براث.

- محیط کشت غنی‌کننده (Enrichment Media) :

محیط مقوی بوده که دارای مواد تغذیه‌ای زیادی نظیر ویتامین‌ها، لیپیدها، اسیدهای آمینه برای رشد باکتری است. بنابراین تعداد زیادی از باکتریها روی آن بخوبی رشد می کنند. مانند شکلات آگار، بلاد آگار

- محیط کشت افتراقی(Differential Media) :

محیط کشت تشخیصی بوده که کلنی باکتریهای مختلف روی آن کاملا از همدیگر متمایز می‌گردد. مانند محیط E.M.B، Mac . این محیطها دارای املاح صفراوی، قند و معرف شیمیایی هستند که باکتری‌های لاکتوز مثبت برروی آنها کلنی‌های صورتی رنگ و باکتری‌های لاکتوز منفی نظیر سالمونلا ، شیگلا بر روی این محیطها کلنی‌های سفید رنگ تشکیل می‌دهند. از محیطهای افتراقی دیگر محیط TSI ، سیمون سیترات را می‌توان نام برد. این محیط ها برای رشد باکتریهای گرم منفی روده‌ای (انتروباکتریاسه) مناسب هستند. وجود املاح صفراوی در این محیط مانع از رشد باکتری‌های گرم مثبت در محیط می شوند.

- محیط کشت اختصاصی (Special Media) :

این محیطها برای رشد باکتری‌های خاصی مناسب هستند. از این محیطها برای ایزوله کردن نوع خاصی از باکتری در یک مخلوط میکربی استفاده می‌شود. مانند محیط SS آگار که برای جدا کردن سالمونلا و شیگلا بکار میرود یا مانیتول سالت آگار که برای تشخیص گونه بیماریزای استافیلوکوکوس اورئوس استفاده می شود .

- محیط کشت انتخابی (Selective Media) :

محیط‌هایی وجود دارند که دارای یک ماده مهارکننده رشد می‌باشند این مواد رشد تمام ارگانیسم‌ها بجز ارگانیسم مورد نظر را مهار می‌کنند. از آنجائی که این محیط ها برای ارگانیسم مورد نظر انتخاب شده‌اند و برای سایر ارگانیسم ها مضر می باشند آنها را محیط‌های انتخابی می نامند . مثالی از این نوع محیطها ، محیط کشت فنیل اتیل الکل آگار است که از رشد باسیل‌های گرم منفی هوازی و بی‌هوازی اختیاری ممانعت بعمل آورده و به ارگانیسم‌های گرم مثبت اجازه رشد می‌دهد.

۲-۶-۴ آماده سازی و استریلیزاسیون محیطهای کشت

مطابق دستورالعمل سازنده مقدار لازم از محیط کشت که بصورت پودری می‌باشد را برداشته و با مقدار توصیه شده آب مقطر در داخل ارلن مخلوط کنید سپس در صورت لزوم همراه با گرم کردن، سریعاً یکنواخت کنید.
pH را با استفاده از pH متر اندازه‌گیری کنید و باید در صورت لزوم، قبل از سترون‌سازی تنظیم شود، به این ترتیب پس از سترون‌سازی و رسیدن دما به ۲۵°C، pH محیط کشت باید در محدوده مورد نظر ۰/۲± واحد pH باشد، مگر اینکه مقادیر دیگری توصیه شده باشد. تنظیم pH معمولاً با استفاده از محلول سدیم هیدروکسید با غلظت تقریبی ۴۰ g/l (c(NaOH) = 1 mol/l) یا هیدروکلریک اسید رقیق شده با غلظت

تقریبی ۳۶٫۵ g/l ([c(HCl) = 1 mol/l]) انجام می‌شود. اگر تنظیم pH پس از سترن‌سازی انجام شود، باید از محلول‌های سترون استفاده شود. جهت کسب اطلاعات بیشتر به استاندارد ملی ایران ۱۱۰۶۸ مراجعه کنید.
محیط کشت را در ظروف مناسب توزیع کنید بطوری که مطمئن شوید فضای کافی مناسب برای جلوگیری از سر رفتن محیط در طی فرآیند سرد کردن بعد از عملیات حرارتی بوسیله اتوکلاو یا ذوب مجدد، یا از لبریز شدن بعد از اضافه کردن مکمل‌ها وجود دارد.
محیط‌های کشت تهیه شده را در روز آماده‌سازی سترون کنید.
سترون‌سازی محیط‌های کشت و معرف‌ها معمولاً با استفاده از حرارت مرطوب با استفاده از اتوکلاو یا فیلتراسیون انجام می‌شود.
بعضی از محیط‌های کشت به سترون‌سازی با اتوکلاو نیاز ندارند، ولی می‌توان آنها را با دمای جوش سترون نمود. برای مثال محیط‌های کشت آنتروباکتریاسه‌ها که دارای برلیانت گرین بوده و بخصوص به حرارت و نور حساس هستند و بهتر است به سرعت پس از جوشیدن سرد شده و در برابر نور شدید محافظت شوند. همچنین، بعضی از معرف‌ها را نیز می‌توان بدون سترون‌سازی مورد استفاده قرار داد. در همه موارد طبق دستورالعمل‌های سازنده یا استانداردهای مناسب انجام دهید.
پس از سترون کردن، محیط‌ها را در شرایطی که از تغییر ترکیبات جلوگیری کند نگهداری کنید برای مثال از نور و خشک شدن محافظت کنید. اگر محیط کشت بلافاصله استفاده نشوده یا شرایط دیگری در استاندارد خاصی مشخص نشده باشد، در یخچال در دمای ۵°C±۳ °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 به وسیله قرار دادن آن در حمام آب جوش و یا هر فرایند 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 ، به دمای ۴۷ °C تا ۵۰°C، خنک کنید.

- افزودن مکمل‌ها

مکمل‌هایی که حساس به حرارت هستند، باید بعد از اینکه دمای محیط به کمتر از ۵۰°C رسید، به محیط کشت اضافه شوند. مکمل سترون شده باید قبل از افزودن به محیط آگاردار به دمای اتاق برسد. افزودن مکمل‌های مایع سرد ممکن است سبب بسته شدن آگار یا تشکیل پرک‌های شفاف شود و از توزیع مناسب جلوگیری کند. طبق دستورالعمل تولیدکننده عمل کنید. همه مکمل‌ها را در محیط کشت به‌آرامی و کامل مخلوط کرده و به سرعت در ظروف نهایی تقسیم کنید.

- آماده‌سازی محیط‌های کشت جامد در پتری دیش‌ها

محیط کشت آگاردار ذوب شده را در پتری‌دیش‌ها بریزید تا حداقل ضخامت آن ۳ mm گردد (برای مثال در ظروف با قطر ۹۰mm، 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 ۷۲ h بطول می‌انجامد، یا دمای گرمخانه‌گذاری بیش از ۴۰°C است، محیط کشت بیشتری ممکن است در پتری دیش‌ها ریخته شود. پلیت‌ها را به‌صورت در بسته روی یک سطح افقی و خنک قرار دهید تا آگار سرد شده و ببندد.

۴-۷ روش‌های کشت در میکروبیولوژی

کشت در پلیت به سه روش زیر قابل انجام است .

۱- کشت خطی

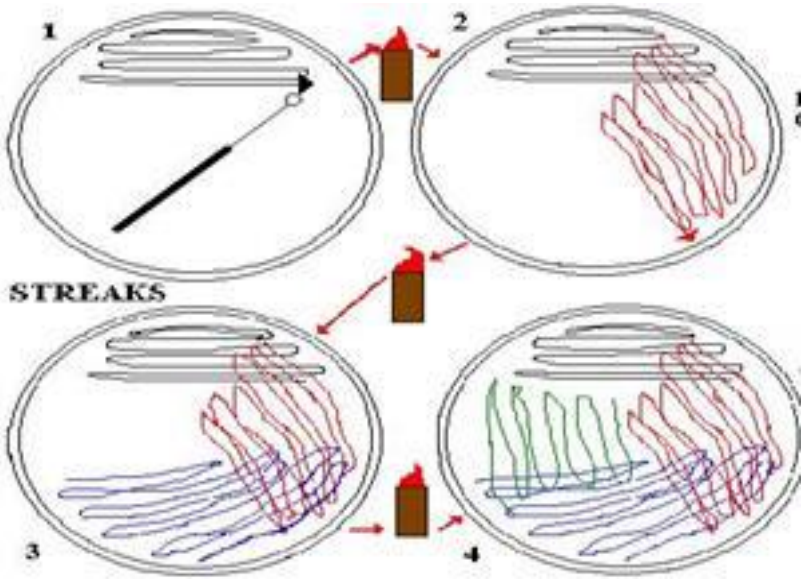
۲- کشت سطحی

۳- کشت آمیخته یا پورپلیت

- روش کشت خطی

در این روش از محیط پیش ریخته استفاده می‌شود. به این ترتیب که ابتدا بوسیله یک حلقه کشت سترون شده مقداری از کلنی باکتری را برداشته و آنرا روی سطح محیط پیش ریخته بصورت خطهای موازی و در چند جهت می‌کشید . در کشتهای خطی برای بدست آوردن کلنی های تک می‌توانید پلیت را به ۴ قسمت تقسیم کنید بعد در قسمت اول ابتدا نوک حلقه کشت را که محتوی کلنی باکتری است را بصورت خطهای موازی کشیده و بعد خطوط را در منطقه دوم از انتهای خط انتهایی منطقه اول در جهت دیگر ادامه می‌دهید و در منطقه سوم و چهارم هم به همین صورت عمل می‌کنید . خصوصیت این روش این است که وقتی خطوط موازی را روی سطح محیط می کشید به ترتیب از تراکم باکتری‌ها کاسته می‌شود و به انتهای خط که می‌رسید تراکم باکتری کمتر است و در منطقه دیگر وقتی از انتهای خط منطقه قبلی استفاده می کنید در واقع تراکم بسیار کمتر از تراکم باکتریها در ابتدا می باشد و در نتیجه در مناطق دیگر هم به ترتیب از تعداد باکتری‌ها کاسته می شود تا جائی‌که در منطقه چهارم می‌توانید کلنی‌های تکی داشته باشید که کلنی خالص نامیده می شود.

در مورد محیط‌های کشت باکتریایی که بصورت مایع می باشند برای انجام کشت خطی روی محیط پیش ریخته فقط یکبار حلقه کشت را داخل محیط محتوی باکتری کرده و یک حلقه کشت از آن بردارید سپس آنرا روی محیط پیش ریخته قرار داده و بصورت خطوط موازی آنرا در چند جهت بکشید و یا مراحل فوق را روی آن انجام دهید.



شکل ۱۴- روش انجام کشت خطی

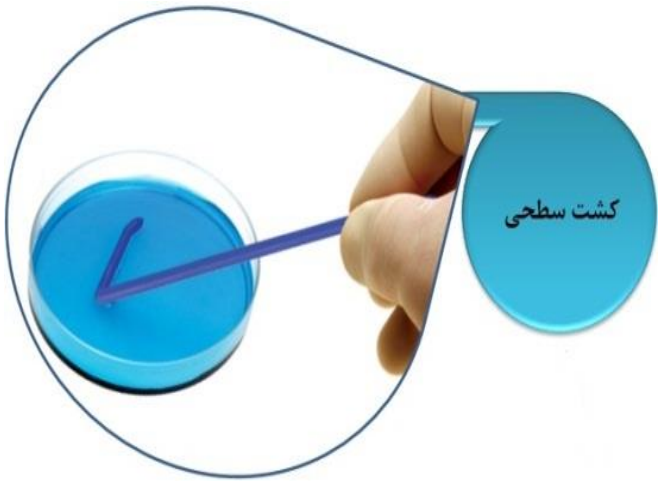
- کشت سطحی

در این نوع کشت هم از محیط پیش ریخته استفاده می‌شود.

این روش کشت بیشتر برای محیط‌های کشت مایع میکروبی کاربرد دارد. برای اینکار ابتدا یک رقت معینی از محیط مایع تهیه نمائید. سپس با استفاده از پیپت سترون مقدار مشخصی از آن رقت را برداشته و در سطح محیط جامد پیش ریخته توسط میله پخش کننده یا توک حلقه کشت پخش نمائید. و بعد از گرمخانه‌گذاری می‌توانید کلنی‌های رشد یافته در سطح محیط کشت را مشاهده کنید توجه داشته باشید که هنگام انجام کشت سطحی باید سطح محیط خشک باشد .

هنگام ریختن محیط کشت بصورت پیش ریخته ممکن است بخار آب روی درب پلیت و سطح محیط جمع شود برای خشک کردن آن می توان محیط‌های کشت را در یک گرمخانه با دمای ۵۰ ^{o}C تا ۲۵ ^{o}C قرار داده و خشک نمود. به این ترتیب که درب پلیت را برداشته و قسمت محتوی محیط کشت را وارونه روی لبه درب قرار دهید تا قطرات رطوبت حذف گردد.

همچنین می‌توانید پس از ریختن محیط کشت در پلیت در صورت تجمع حباب هوا، آنها را با شعله دادن سطح محیط حذف نمائید. اینکار باعث سترون شدن سطح محیط کشت هم می شود.



شکل ۱۵- روش انجام کشت سحطی

- کشت آمیخته یا پورپلیت

در این روش کشت هم نیاز به تهیه سوسپانسیون از باکتری می باشد. یعنی باید از باکتری مورد نظر در محیط مایع رقت معینی را تهیه نموده بعد به میزان ۱ ml از آنرا در کف پلیت استریل ریخته سپس از محیط کشت مورد نظر که قبلا سترون شده و حرارت آن به حدود ۴۵ ^{o}C رسیده به میزان ۱۸ ml تا ۲۰ml به پلیت اضافه نمائید. سپس با حرکات دورانی بصورت عدد ۸ انگلیسی آنرا کاملا مخلوط کنید. اگر نیاز بود مجددا سطح محیط آمیخته با باکتری را با یک لایه نازکی از همان محیط کشت بپوشانید در این حالت به آن کشت دولایه هم گفته می شود.

۵ روش های آزمون میکروبیولوژی

روش های آزمون میکروبیولوژی سوپ خشک بر اساس جدول زیر می باشد.

جدول۲ - روش آزمون میکروبیولوژی سوپ‌های نیمه آماده خشک

ردیف	نوع میکروارگانیسم‌ها	روش مرجع
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم ها	طبق استاندارد ملی ۱- ۵۲۷۲
۲	اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ۲۹۴۶
۳	کلستریدیوم پرفرژنس	طبق استاندارد ملی ۹۴۳۲
۴	سالمونلا	طبق استاندارد ملی ۱۸۱۰
۵	باسیلوس سرئوس*	طبق استاندارد ملی ۲۳۲۴
۶	کپک	طبق استاندارد ملی ۳-۱۰۸۹۹
۷	استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت	طبق استاندارد ملی ۳-۶۸۰۶
۸	آنتروکوکوس های روده ای	طبق استاندارد ملی ۲۱۹۸
*در صورت عدم استفاده از برنج یا آرد برنج در ترکیبات این ویژگی مورد آزمون قرار نمی‌گیرد.		

جدول۳- روش آزمون میکروبیولوژی سوپ‌های فوری خشک

ردیف	نوع میکروارگانیسم‌ها	روش مرجع
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم ها	طبق استاندارد ملی ۱- ۵۲۷۲
۲	کلی فرم	طبق استاندارد ملی ۹۲۶۳
۳	اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ۲۹۴۶
۴	کلستریدیوم پرفرژنس	طبق استاندارد ملی ۲۱۹۷
۵	سالمونلا	طبق استاندارد ملی ۱۸۱۰
۶	باسیلوس سرئوس*	طبق استاندارد ملی ۲۳۲۴
۷	کپک	طبق استاندارد ملی ۳-۱۰۸۹۹
۸	استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت	طبق استاندارد ملی ۳-۶۸۰۶
۹	آنتروکوکوس های روده ای	طبق استاندارد ملی ۲۱۹۸
*در صورت عدم استفاده از برنج یا آرد برنج در ترکیبات این ویژگی مورد آزمون قرار نمی‌گیرد.		

۶ آزمون های میکروبیولوژی

۶-۱ محیط‌های کشت

۶-۱-۱ محیط‌های کشت مورد استفاده

جدول ۴- محیط های کشت مورد استفاده

ردیف	نام فارسی	نام انگلیسی
۱	پلیت کانت آگار	PCA (plate count Agar)
۲	ویولت رد بایل آگار	VRBG (Violet red bile agar)
۳	آبگوشت لوریل سولفات تریپتوز	LS (Lauryl Sulfate tryptose broth
۴	آبگوشت اشریشیاکلی	EC (E.C Broth)
۵	آب پپتونه بدون اندول	TW (Peptone water indol free)
۶	دی کلران ۱۸٪ گلیسرول آگار	DG18 (Dichloran 18% mass fraction glycerol agar)
۷	آب پپتونه بافری	BPW (Buffered Pepton Water)
۸	آبگوشت مولر کافمن تتراتیونات نئوبیوسین	MKTTn (Muller – Kauffman tetrathionate/ novobiocine Broth)
۹	آبگوشت راپاپورت واسیلیادیس منیزیوم کلراید	RV(Rappaport-Vassiliadis Magnesium Chloride)
۱۰	گزیلوز لیزین دزوکسی کولات آگار	XLD (Xylose Lysine Deoxycholate Agar)
۱۱	آگار سبز درخشان / قرمز فنل	BGA (Phenol red / Brilliant green agar)
۱۲	عصاره مخمر-دکستروز – کلرامفنیکل	YGC (Yeast extract dextrose Chloramphenicol)
۱۳	سولفیت آهن آگاردار	SIA (Iron Solfite Agar)
۱۴	مانیتول اگ یولک پلی‌میکسین آگار	MYP (Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar)
۱۵	بلاد آگار	Blood agar
۱۶	آبگوشت اصلاح شده جیولیتی کانتونی	GC (Modified Giolitti and Cantoni broth
۱۷	برد پارکر	BP (Baird – Parker agar)
۱۸	سولفیت سیکلوسرین آگار بدون زرده تخم‌مرغ	SC (Egg-yolk-free tryptose-sulfite-cycloserin agar
۱۹	بروموکروزول پرپل آزاید براث	BPB (Bromocresol purple broth
۲۰	KF آگار	KF (Kenner Fecal Agar)

۶-۲ محلول های رقیق کننده

به منظور تجدیدپذیری در نتایج حاصله، توصیه می شود که برای تهیه محلول رقیق کننده از مواد تشکیل دهنده پایه خشک یا ترکیب کامل خشک استفاده شود و آماده سازی آن مطابق با دستورالعمل سازنده انجام شود. مواد شیمیایی باید از کیفیت مطلوب برخوردار بوده و برای آزمایش های میکروبیولوژی مناسب باشند. محلول های رقیق کننده برای کاربرد کلی شامل موارد زیر می باشد:

- محلول پپتون نمکی
- آب پپتونه بافری

محلول های رقیق کننده را در حجم های لازم برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه درلوله، ارلن یا بطری با ظرفیت مناسب تقسیم کنید. در لوله ها، ارلن ها یا بطری ها را بسته و سپس آن را در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ ^{o}C به مدت زمان ۱۵ دقیقه سترون کنید.

۷ نمونه‌برداری

نمونه‌برداری باید در شرایط بهداشتی و به روشی انجام شود که نمونه هایی که به آزمایشگاه تحویل داده می شود نماینده واقعی کل نمونه بوده و علاوه براین در طی حمل ونقل و نگهداری، تا زمان انجام آزمون صدمه ندیده و/یا تغییری در آن ایجاد نشده باشد. همچنین نمونه ها باید در ظروف تمیز، خشک، سترون و در شرایط آسپتیک جمع آوری شده و در شرایطی نگهداری شوند که امکان رشد میکروارگانیسم ها وجود نداشته باشد. پس از نمونه‌برداری فرآورده باید درشرایط مناسب به آزمایشگاه منتقل شود و تا هنگام انجام آزمایش نیز در آزمایشگاه در شرایط مناسب نگهداری شود. نمونه های جمع آوری شده باید درصورت امکان در همان روز نمونه برداری، مورد آزمون قرار گیرد.

۸ روش آزمون

۸-۱ آماده سازی نمونه

قبل از همگن سازی نمونه ها، آنها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار دهید. جهت جلوگیری از آلودگی میکروبی نمونه ها با منابع خارجی، تمام مراحل آماده سازی و دست کاری نمونه ها باید رعایت شرایط آسپتیک و تجهیزات سترون و در کنار شعله انجام شود. پیش از انجام آزمون، سطح میزکار و همچنین دست ها باید با یک محلول گندزدای مناسب مانند الکل اتیلیک ۷۰ درجه گندزدایی شود. قسمت خارجی بسته و به خصوص قسمتی که باز می شود نیز باید با الکل ۷۰ درجه پاکیزه شود. هنگام آماده سازی نمونه ضمن ایجاد شرایط بهداشتی در محل انجام آزمون مقدار مناسبی از نمونه را خرد کرده و سپس ۱۰ g از آن را با ۹۰ ml رقیق کننده مناسب رقیق نمائید.

۹ روش کشت

۹-۱ کشت آمیخته (Pour plate)

این روش براساس مخلوط کردن حجم معینی از نمونه و یا رقتی از آن به محیط کشت ذوب شده می باشد. پس از گرمخانه گذاری کلنی‌ها روی سطح محیط و یا درون آن شمارش می‌شود. حجم برداشت شده بطور معمول ۱ میلی‌لیتر می‌باشد. محیط کشت باید پس از ذوب شدن در حمام بخار آب در دمای ۴۵ $^{o}C \pm ۱ ^{o}C$ قرارداده شود. حجم معین از رقت مورد آزمون را بردارید، برای زدودن مایع اضافی چسبیده به قسمت خارجی پی پت، نوک پی پت را به کناره لوله تماس دهید. در پلیت را فقط به اندازه ای که پی پت وارد آن شود باز کنید و سپس محتویات آن را داخل پلیت خالی کنید. پس از ریختن حجم مورد نظر نمونه در پلیت بلافاصله محیط کشت به آن اضافه می شود و پس از چندبار حرکت دورانی نمونه را به محیط کشت مخلوط نمایید. پلیت را در یک سطح افقی و صاف قرار دهید تا سرد شود و سپس در دمای مناسب گرمخانه‌گذاری نمایید.

۹-۲ گرمخانه‌گذاری و شمارش

با استفاده از رابطه زیر تعداد میکروارگانیسم های موجود در آزمایه (N) بر حسب میانگین تعداد شمارش شده از دو رقت متوالی را محاسبه کنید:

$$N = \frac{\sum C}{v\left(n_1 + 0.1 n_2\right) d}$$

که در آن

$\sum C$: مجموع پرگنه‌های شمارش شده بر روی تمام ظروف پتری مورد نظر

V: حجم تلقیح شده در هر ظرف پتری بر حسب میلی‌لیتر

n_1 : تعداد ظروف پتری شمارش شده در اولین رقت مورد نظر (یعنی رقتی که حاوی غلظت بیشتر نمونه باشد)

n_2 : تعداد ظروف پتری شمارش شده در دومین رقت مورد نظر (یعنی رقتی که حاوی غلظت کمتر نمونه باشد)

d : ضریب رقت برحسب اولین رقت مورد نظر

عدد بدست آمده را تا دو رقم معنی‌دار گرد کنید و سپس تعداد میکروارگانیسم ها در گرم را به صورت عددی بین ۹٫۹ – ۱٫۰ ضربدر توانی از ۱۰ گزارش نمائید.

۱۰ آزمون شمارش کلی میکروارگانیسم ها

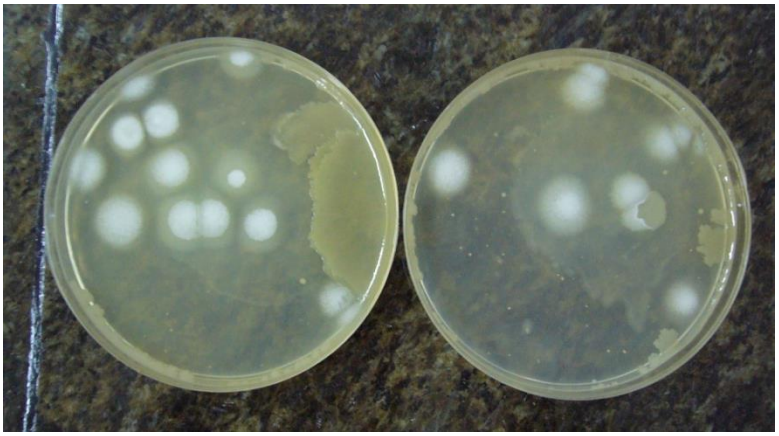
این ویژگی بیانگر رعایت بهداشت در تولید و نیز چگونگی وضعیت بهداشتی مواد اولیه بکار رفته در فرآورده می باشد. از آنجا که دمای گرمخانه گذاری در این ویژگی ۳۰^{o}C می باشد و محیط کشت بکار رفته نیز یک محیط عمومی است. لذا در برگیرنده طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها بوده و می تواند شاخصی از کیفیت میکروبی فرآورده باشد.

۱۰-۱ محیط کشت

محیط کشت مورد استفاده پلیت کانت آگار (Plate count agar) می باشد.

۱۰-۲ روش آزمون

با یک پیپت سترون به طور جداگانه یک میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه را به طور جداگانه به دو پتری سترون اضافه کنید. سپس به مقدار مناسب از محیط کشت PCA به پلیت های محتوی نمونه اضافه کرده و با چرخاندن بر روی سطح افقی به خوبی مخلوط کنید و پلیت های آماده شده را پس از بستن محیط کشت به صورت وارونه در دسته های کمتر از شش تایی و با فاصله معین از یکدیگر، سقف و دیواره های گرمخانه به مدت ۷۲ h ± ۳h در دمای ۳۰°C ± ۱°C گرمخانه گذاری کنید. بعد از پایان زمان گرمخانه گذاری تمامی کلنی های موجود در پلیت ها از جمله کلنی های سر سوزنی را در نور ملایم شمارش و طبق فرمول ذکر شده محاسبه کنید. برای به دست آوردن نتیجه قابل قبول، پلیت های با دورقت متوالی که حداقل ۱۵ و حداکثر ۳۰۰ کلنی داشته باشند باید شمارش شوند.



شکل ۱۶- کلنی های میکروارگانیسم ها در محیط کشت PCA

۱۱ آزمون شمارش کپک

کپک‌ها را با ظاهری کرکدار و پنبه‌ای شکل که گاهی اوقات رنگی هستند همه می‌شناسند. معمولاً غذاهای کپک زده قابل خوردن نیستند. با اینکه کپک ها در فساد بسیاری از غذاها دخالت دارند بعضی از انواع آنها در ساخت یا ترکیب تعدای از غذاها به عنوان مثال بعضی پنیرها مفید می‌باشد علاوه برآن کپک‌ها می‌توانند موادی را که در بعضی غذاها استفاده می گردند، تولید نمایند مانند آمیلاز که در تهیه نان و اسید سیتریک که در تهیه نوشابه‌های غیرالکلی بکاربرده می‌شوند. کپک‌ها می‌توانند باعث ایجاد اشکالاتی شوند :

- سنتز متابولیت‌های سمی (مایکوتوکسین)

- مقاومت در برابر گرما، انجماد، آنتی بیوتیک و تشعشات
- قدرت تغییر ماهیت مواد نامطلوب جهت رشد باکتریهای بیماریزا که در ماده غذایی وجود دارند.

این میکروارگانیسم گاهی باعث ایجاد بو و طعم نامطبوع و تغییر رنگ در سطح مواد غذایی می‌گردند. این میکروارگانیسم ها در محیط زندگی اطراف ما به طور گسترده‌ای پراکنده می‌باشند و می‌توان آنها را به عنوان قسمتی از فلور طبیعی یک ماده غذایی، وسایل و تجهیزات مورد استفاده در صنایع غذایی که به طور کامل و کافی به سازی نشده‌اند و یا به عنوان آلوده‌کننده‌های ناشی از هوا پیدا کرد.

از آنجا که رشد این میکروارگانیسم ها کند بوده و دارای قدرت رقابتی کمی می‌باشند لذا رشد آنها در و یا بر سطح آن دسته از مواد غذایی صورت می‌گیرد که دارای شرایط زیست مناسب برای باکتری ها نیستند به همین دلیل برای کشت این میکروارگانیسم ها از محیط‌های حاوی آنتی بیوتیک استفاده می‌شود تا مشکلات ناشی از رشد باکتری ها کاهش یابد.

۱۱-۱ محیط کشت

محیط کشت مورد استفاده برای شمارش کپک دی کلران ۱۸٪ گلیسرول آگار DG18 می باشد.

۱۱-۲ روش آزمون

با استفاده از پیپت سترون مقدار ۰/۱ میلی لیتر از آزمایه یا ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه را به یک پلیت دارای محیط کشت DG18 انتقال دهید . به کمک میله شیشه ای سترون مایعات تلقیحی را روی سطح محیط کشت پخش کنید تا همه مایعات به طور کامل جذب شوند. پلیت ها را در دمای ۲۵ºC به مدت پنج تا هفت روز گرمخانه گذاری کنید. پس از سپری شدن مدت زمان گرمخانه گذاری پلیت های دارای کمتر از ۱۵۰ کلنی، پروپاگول یا جوانه را انتخاب کرده و همه آنها را شمارش کنید.

شکل ۱۷–کلنی های کپک

۱۲ آزمون جستجوی اشریشیاکلی

اشریشیاکلی یکی از اولین باسیل‌های روده‌ای است که شرح و کشت داده شده است و ساکن طبیعی روده انسان و حیوانات می‌باشد. این باسیل تخمیر کننده لاکتوز می‌باشد و انتشار وسیعی داشته و در سراسر دنیا در روده انسان و حیوانات خونگرم و خونسرد یافت می‌شود. به همین دلیل از آنها به‌عنوان معرف آلودگی آب با مدفوع استفاده می‌کنند. این باکتری مدت‌ها جزو باکتری‌های همسفره غیر بیماریزا محسوب می‌شد ولی امروزه نقش آن به عنوان فرصت طلب و عامل مولد عفونت مورد قبول همگان قرار گرفته است.

این باکتری بر روی محیط‌های غذایی عادی رشد فراوان داشته و رشد در میدان حرارتی ۴۶-۱۰ درجه سلسیوس با حرارت میانه ۳۷ ^{o}C انجام می‌گیرد. انواع قندها از جمله لاکتوز را به سرعت تخمیر کرده، اسید و گاز تولید می‌کند.

زیستگاه این میکروارگانیسم بطور طبیعی خاک و نیز در سطح و یا داخل ظروف و وسایل تهیه مواد غذایی که خوب تمیز نشده است می‌باشد. آلودگی مواد غذایی با این باکتری از طریق دست آلوده، خاک، آب، مدفوع و حشرات امکان‌پذیر است. از آنجا که شناسایی اشریشیاکلی در مقایسه با سایر باکتریهای مدفوعی آسانتر است از این باکتری به عنوان شاخص جهت تشخیص آلودگی مدفوعی در آب و غذا استفاده می‌شود.

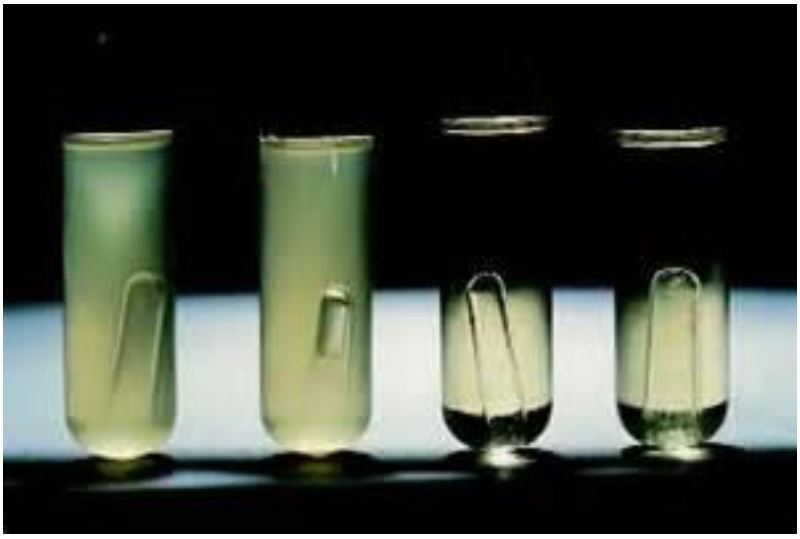
اشریشیا به خانواده آنتروباکتریاسه تعلق داشته و باسیل های کوتاه میله‌ای شکل (کوکوباسیل) و گرم منفی هستند.

۱۲-۱ محیط کشت

محیط کشت مورد استفاده جهت جستجوی اشریشیاکلی آبگوشت لوریل سولفات تریپتوز Lauryl Sulfate tryptose broth با غلظت مضاعف می باشد.

۱۲-۲ روش جستجوی اشریشیاکلی

جستجوی اشریشیاکلی به معنی تعیین وجود یا عدم وجود این باکتری در مقدار مشخصی از فرآورده، می باشد. برای این منظور مقدار ۱۰ml از سوسپانسیون اولیه تهیه شده را در ۱۰ml از محیط کشت لوریل سولفات تریپتوز براث با غلظت مضاعف (LS^{+}) دارای لوله درهام بوسیله یک پی پت سترون بریزید. لوله آزمایش تلقیح شده را در دمای ۳۷ ^{o}C به مدت زمان ۲۴ h ± ۲h گرمخانه گذاری کنید. پس از سپری شدن مدت زمان گرمخانه گذاری لوله را از لحاظ تولید گاز یا کدورت بررسی کنید. در صورت وجود گاز آزمون تاییدی را جهت مشخص کردن باکتری اشریشیاکلی انجام دهید.



شکل ۱۸- تشکیل گاز و وجود کدورت در لوله های LS

۱۲-۳ آزمون تاییدی

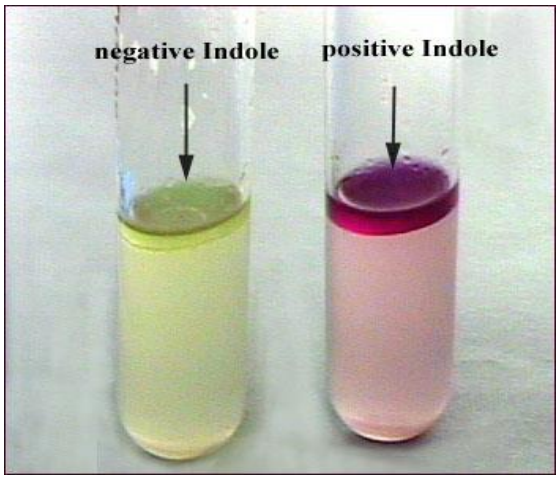
۱۲-۳-۱ محیط کشت

جهت آزمون تائیدی اشریشیاکلی از محیط کشت های آبگوشت اشریشیاکلی (EC Broth) و آب پپتونه (Peptone water) استفاده می‌شود،

۱۲-۴ روش آزمون تاییدی اشریشیاکلی

از لوله مشکوک به اشریشیاکلی یک الی دو قطره به داخل محیط‌های مذکور ریخته و به مدت ۲۴ h تا ۴۸ h در دمای ۴۴ °C گرمخانه گذاری کنید. وجود گاز در محیط EC و تشکیل حلقه ارغوانی در محیط کشت Tw هردو با هم نشانه وجود باکتری اشریشیاکلی در ماده غذایی می‌باشد.

لازم به ذکر است که جهت تشکیل حلقه ارغوانی از یک الی دو قطره معرف کواکس استفاده می‌شود.



شکل ۱۹- تشکیل حلقه اندول در محیط کشت TW

۱۳ آزمون شمارش کلستریدیوم پرفرژنس

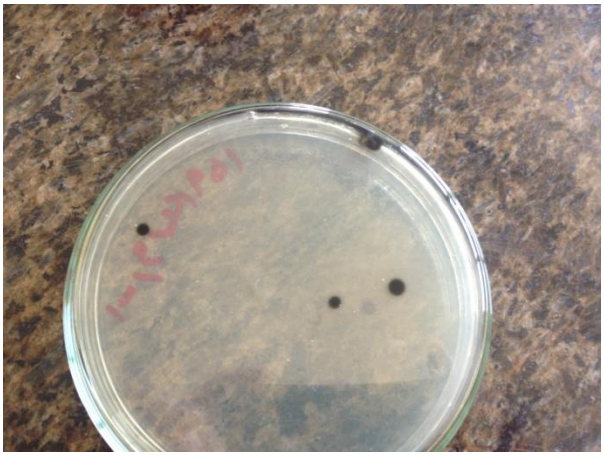
کلستریدیوم جنسی از باکتری‌های میله‌ای شکل و گرم مثبت است. که در وضعیت کم اکسیژن (بی هوازی) بهتر رشد می‌کند. این باکتری دارای اسپور و خاکزی می‌باشد. اسپور در جنس کلستریدیوم معمولاً انتهایی یا نزدیک به انتها می‌باشد . اغلب متحرک دارای تاژک از نوع پری تریش می‌باشند. آزمون‌های کاتالاز و اکسیداز در جنس کلستریدیوم منفی می‌باشد. اسپور کلستریدیوم‌های احیاءکننده سولفیت، بطور وسیعی در محیط پراکنده هستند و در مدفوع انسان، حیوان، فاضلاب و خاک یافت می‌شوند. تولید آنتروتوکسین درکلستریدیوم پرفرژنس علت شایعی برای مسمومیت غذایی است. بعضی از سوش‌های کلستریدیوم پرفرژنس به ویژه هنگامی که بر روی ظروف گوشت رشد کرده باشند آنتروتوکسین قدرتمندی تولید می‌کنند. آنتروتوکسین در مدت ۱۸-۶ ساعت اسهال شدیدی (معمولاً بدون استفراغ یا تب) را موجب می‌شود. علائم بیمار فقط برای مدت زمان ۲-۱ روز ادامه می‌یابد.

۱۳ -۱ محیط کشت

محیط کشت مورد استفاده برای شمارش کلستریدیوم پرفرژنس سولفیت سیکلوسرین آگار بدون زرده تخم‌مرغ (SC) می‌باشد.

۱۳-۲ روش آزمون

با استفاده از پی پت سترون یک میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه را به طور جداگانه به هر یک از دو پلیت منتقل کنید. سپس به هریک از دوپلیت حدود ml ۱۵ از محیط کشت SC را افزوده و کاملاً مخلوط کنید. زمان لازم بین تلقیح و افزون محیط کشت نباید از ۱۵ دقیقه بیشتر باشد. پس از جامد شدن محیط حدود ml ۵ تا ml ۱۰ دیگر از همان محیط کشت را به عنوان لایه رویی داخل پلیت ها بریزید. پلیت ها را داخل جار بی‌هوازی قرار دهید و در دمای ^{o}C ۳۷ به مدت زمان h ۲۴ تا h ۴۸ گرمخانه گذاری کنید. کلنی‌های سیاه که احتمالاً دارای هاله سیاه در محیط کشت هستند نشان‌دهنده باکتری‌های بی‌هوازی احیاء کننده سولفیت می‌باشند.



شکل ۲۰- کلنی کلستریدیوم پرفرژنس

۱۳-۳ آزمون تاییدی بیوشیمیایی

۱۳-۳-۱ جهت آزمون تائیدی کلستریدیوم پرفرژنس از محیط کشت لاکتوز سولفید استفاده می‌شود.

۱۳-۳-۲ روش آزمون تاییدی

هر یک از کلنی های انتخاب شده را به لوله های دارای محیط کشت تیوگلیکولات مایع منتقل کرده و در شرایط بی هوازی در دمای ۳۷ ^{o}C به مدت زمان ۱۸ h تا ۲۴ h گرمخانه گذاری کنید. پس از گرمخانه گذاری ۵ قطره از محلول فوق را به محیط کشت لاکتوز سولفیت اضافه کنید. سپس در دمای ۴۶ ^{o}C به مدت زمان ۱۸ h تا ۲۴ h در حمام آب گرمخانه گذاری کنید. پس از پایان گرمخانه گذاری لوله های لاکتوز سولفیت را از نظر وجود گاز و رنگ سیاه بررسی کنید. درصورت که درلوله درهام گاز و رسوب سیاه در لوله دیده شد واکنش را مثبت درنظر بگیرید.

۱۴ آزمون شمارش کلی فرم ها

کلی فرم ها باکتری های میله ای کوتاه، هوازی و بی هوازی اختیاری، گرم منفی و غیر اسپورزا هستند که لاکتوز را همراه با تولید گاز تخمیر می کنند. اشریشیاکلی و انتروباکتر آئروژنز از مهمترین گونه های کلی فرم ها هستند. حدود ۲۰ گونه در این گروه قرار می گیرند. گروه کلی فرم های مدفوعی قادر هستند در صورت افزایش دما ۴۴/۵^{o}C تا ۴۵^{o}C رشد کنند. هدف اصلی از انجام آزمون ها در دمای بالای اینکوباسیون، جداکردن کلی فرم های مدفوعی از غیر مدفوعی است.

اهمیت کلی فرم ها در فساد مواد غذایی به دلیل داشتن ویژگی های زیر است:

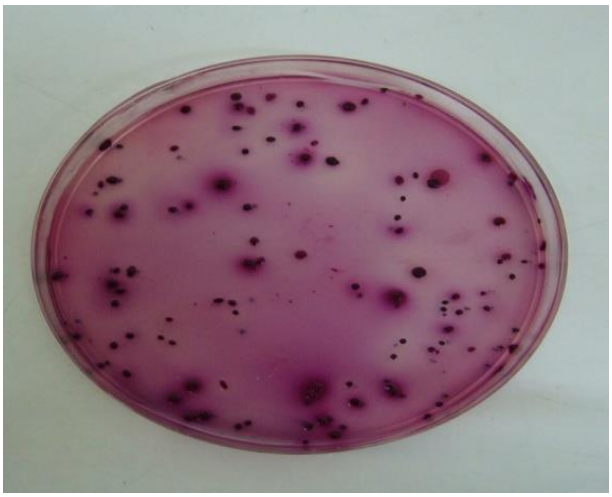
- توانایی رشد در سوبستراهای مختلف و استفاده از تعداد زیادی از کربوهیدارتها و سایر ترکیبات آلی به عنوان منبع انرژی و توانایی استفاده از تعداد زیادی از ترکیبات ازته ساده به عنوان منبع انرژی
- توانایی سنتز اکثر ویتامین های مورد نیاز خود
- توانایی رشد در محدوده وسیعی از درجه حرارت (از کمتر از ۱۰^{o}C تا حدود ۴۶ ^{o}C)
- توانایی تولید مقدار زیادی اسید و گاز از قندها
- توانایی تولید طعم های نامطلوب
- توانایی تولید مواد لزج یا حالت طنابی در مواد غذایی توسط انتروباکتر آئروژنز
-

۱۴-۱ محیط کشت

محیط کشت مورد استفاده برای شمارش کلی فرم ها کریستال ویوله دارای قرمز خنثی، نمک های صفراوی، لاکتوز و آگار VRBL می باشد

۱۴-۲ روش آزمون

با استفاده از پی پت سترون یک میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه را به طور جداگانه به هر یک از دو پلیت منتقل کنید. سپس به هریک از دوپلیت حدود ۱۵ میلی لیتر از محیط کشت VRBL را افزوده و کاملاً مخلوط کنید. زمان لازم بین تلقیح و افزون محیط کشت نباید از ۱۵ دقیقه بیشتر باشد. به علت متحرک بودن باسیل های کلی فرم از دولایه محیط کشت استفاده می‌گردد بدین صورت که پس از ریختن محیط کشت به داخل پلیت و بستن لایه اول، لایه دوم به آن اضافه می‌شود. پس از بستن لایه دوم پلیت ها به صورت وارونه به مدت ۴۸ h در دمای ۳۷ ^{o}C گرمخانه گذاری می شود. پس از سپری شدن مدت زمان مورد نظر تمامی کلنی‌های صورتی رنگ دوکی شکل شمارش می‌شوند.



شکل ۲۱- کلنی کلی فرم

۱۵ آزمون شمارش باسیلوس سرئوس

باسیل گرم مثبت باسیلوس سرئوس *Bacillus cereus* اسپوردار از خانواده باسیلاسه است. اسپور این باکتری به صورت گسترده‌ای در طبیعت، آب و خاک پراکنده شده به طوری که می‌توان آن را از مواد غذایی گوناگون جدا نمود. این باکتری مولد انتروتوکسین‌های مولد اسهال و تهوع بوده و قادر به ایجاد سندرم اسهال و سندرم تهوع است. این باکتری در نقاط مختلف جهان به عنوان عامل مسمومیت غذایی گزارش شده است. اسپور (شکل مقاوم باکتری) معمولاً در حبوبات، سبوس گندم، برنج، شیر، گوشت پخته، سوسیس، سوپ، سبزیجات، مرغ و سایر مواد غذایی وجود دارد. در بین مواد غذایی احتمال آلودگی برنج (چلوخورشت و انواع پلوها) از همه بیشتر می باشد. برخی از اسپورها حتی پس از پختن در غذا باقی می‌مانند و در صورتی که مواد غذایی در شرایط گرم و مرطوب نگهداری شوند، اسپورها به باسیل تبدیل شده و پس از تکثیر در غذا یا روده نوعی سم روده‌ای (انتروتوکسین) ترشح می‌نمایند که منجر به مسمومیت غذایی می‌گردد. این باکتری را به تعداد کم (۱۴درصد)

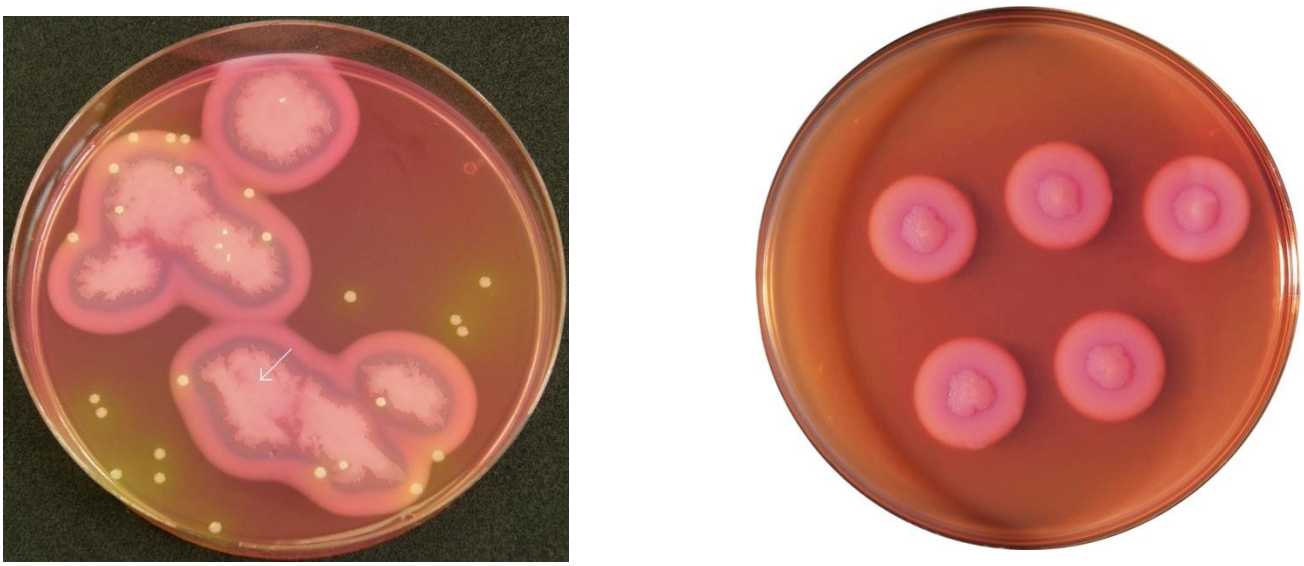
از مدفوع افراد سالم نیز به دست آورده‌اند. سم این باکتری پروتئین حساس به حرارت و دارای وزن مولکولی متوسط می‌باشد. اخیراً مشخص شده است که انواع باسیل سرئوس دو نوع انتروتوکسین تولید می‌کنند. برای ایجاد مسمومیت غذایی ناشی از این باکتری به دو صورت اسهالی و استفراغی بروز می نماید. این باکتری علاوه بر مسمومیت غذایی به عنوان بیماریزای فرصت طلب عمل می‌کند و در افراد دارای ضعف سیستم ایمنی، بیماری شدیدی ایجاد می‌نماید.

۱۵ -۱ محیط کشت

محیط کشت مورد استفاده برای شمارش باسیلوس سرئوس مانیتول اگ یولک پلی‌میکسین آگار MYP می‌باشد.

۱۵-۲ روش آزمون

با استفاده از پی پت سترون، ۰٫۱ml سوسپانسیون اولیه را به هر یک از دو پلیت دارای محیط کشت MYP که قبلاً در پلیت‌های سترون ریخته شده است، منتقل کنید. در صورت نیاز، این عمل را برای رقت‌های اعشاری بعدی تکرار نمایید. با دقت و تا حد امکان به سرعت، مایع تلقیح شده را به کمک پخش کننده شیشه‌ای به طوری که با جدار پلیت تماس نداشته باشد در سطح محیط کشت پخش نمایید . برای هرپلیت از یک پخش کننده سترون جداگانه استفاده شود. پلیت‌ها را حدود ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده تا مایع کشت داده شده ، جذب محیط کشت شود. پلیت‌های فوق را به صورت وارونه به مدت ۱۸h تا ۲۴h در دمای ۳۰ ^{o}C گرمخانه گذاری کنید. کلنی‌های باسیلوس به صورت کلنی های بزرگ و صورتی با هاله رسوب دارکه نشان دهنده تولید لستیناز می باشد در سطح محیط کشت دیده خواهند شد.



شکل ۲۲ – کلنی باسیلوس سرئوس

۱۵-۳ آزمون تاییدی

۱۵-۳-۱ محیط کشت

جهت آزمون تائیدی باسیلوس سرئوس از محیط کشت بلاد آگار Blood agar استفاده می‌شود.

۱۵-۴ روش آزمون تاییدی باسیلوس سرئوس (آزمون همولیز)

کلنی‌های انتخاب شده را روی سطح آگار خوندار به صورت خطی یا عمقی و یا نقطه ای کشت داده به گونه‌ای که امکان بررسی واکنش همولیز به خوبی میسر باشد. پلیت ها را در دمای ۳۰°C به مدت ۲۴h ± ۲h گرمخانه‌گذاری کرده سپس واکنش همولیز را بررسی کنید. کلنی‌های باسیلوس سرئوس واکنش همولیز مثبت می‌باشد و هاله کاملاً شفاف در اطراف کلنی روی محیط آگار خوندار مشاهده خواهد شد.

شکل ۲۳ – همولیز محیط کشت BA

۱۶ آزمون شمارش آنتروکوک‌های روده‌ای

انتروکوک‌ها، کوکسی‌های گرم مثبت بوده که به صورت جفت (دیپلوکوک) یا زنجیره‌های کوتاه دیده می‌شوند. تمایز انتروکوک‌ها از استرپتوکوک‌ها از روی ویژگی‌های ظاهری، بسیار مشکل است. دو گونه مهم همزیست از انتروکوک در روده انسان عبارتند از :انتروکوک فکالیس(٪۹۰ تا ٪۹۵) و انتروکوک فاسیوم (٪۵ تا ٪۱۰). سایر گونه‌های انتروکوک که به ندرت ایجاد بیماری می‌کنند، بی هوازی اختیاری هستند و اسپور تولید نمی‌کنند. آن‌ها گستره بزرگی از شرایط محیطی را تحمل می‌نمایند: دمای ۱۰°C تا ۴۰°C، pH از ۴ تا ۱۰ و غلظت‌های بالای کلرید سدیم. انتروکوک‌ها بر روی آگار خوندار گوسفندی، همولیز گاما ایجاد می‌کنند. اعضای جنس انتروکوک تا سال ۱۹۸۴ همراه با استرپتوکوک‌های گروهD طبقه بندی می‌شدند. آنالیز ژنومی انتروکوک‌ها نشان داد که آن‌ها، جنس متفاوتی از استرپتوکوک‌های D هستند. مهمترین عفونت‌های ایجاد شده توسط انتروکوک‌ها عبارتند از: عفونت‌های مجرای ادراری، باکتریمی، اندوکاردیت و مننژیت. از دیدگاه پزشکی،

انتروکوک‌ها از نظر مقاومت آنتی بیوتیکی ذاتی اهمیت دارند. برخی از انتروکوک‌ها بطور ذاتی به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام (پنی سیلین، سفالوسپورین‌ها و کارباپنم) و آمینوگلوکوزیدها مقاوم هستند. در دو دهه گذشته، سویه‌های انتروکوکی مقاوم به وانکومایسین (VRE) در بیماران بستری در بیمارستان‌ها افزایش یافته‌اند. برای درمان سویه‌های مقاوم به وانکومایسین، از آنتی بیوتیک‌هایی مانند کوئینوپریستین/دالفوپریستین (سینرسید) یا تیگسیکلین استفاده می‌شود.

۱۶ -۱ محیط کشت

محیط کشت مورد استفاده برای شمارش آنتروکوک‌های روده‌ای بروموکروزول پرپل براث BPB می باشد.

۱۶-۲ روش آزمون

جستجوی آنتروکوک‌های روده‌ای به معنی تعیین وجود یا عدم وجود این باکتری در مقدار مشخصی از فرآورده، می باشد. برای این منظور مقدار ml ۱ از سوسپانسیون اولیه تهیه شده را در ۱۰ml از محیط کشت بروموکروزول پرپل براث انتقال دهید. لوله آزمایش تلقیح شده را در دمای ۳۷°C به مدت زمان ۲۴ h تا ۴۸h گرمخانه‌گذاری کنید. پس از سپری شدن مدت زمان گرمخانه‌گذاری لوله را از لحاظ تغییر رنگ محیط کشت بررسی کنید. درصورت تغییر رنگ محیط کشت به رنگ زرد آزمون تاییدی را جهت مشخص کردن آنتروکوک روده‌ای انجام دهید.

۱۶-۳ آزمون تائیدی

۱۶-۳-۱ محیط کشت

جهت آزمون تائیدی آنتروکوک روده‌ای از محیط کشت KF آگار استفاده می‌شود.

۱۶-۳-۲ روش آزمون تاییدی

از لوله مشکوک روی محیط کشت KF که به صورت پیش ریخته می‌باشد، کشت خطی دهید. پلیت‌ها را در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴h تا ۴۸ h گرمخانه‌گذاری کنید. پس از سپری شدن مدت زمان گرمخانه‌گذاری پلیت ها را از نظر وجود کلنی های صورتی، قرمز، ارغوانی به صورت برجسته بررسی کنید. اگر چنین کلنی‌هایی مشاهده شد، آن را به عنوان آنتروکوک‌های روده‌ای جهت آزمون های تاییدی انتخاب کنید. روی کلنی های مشاهده شده آزمون های تاییدی هیدرولیز اسکولین را انجام دهید. به این منظور کلنی های انتخاب شده را روی محیط کشت صفرا اسکولین کشت دهید و در دمای ۴۴ °C ± ۰/۵ °C به مدت دوساعت گرمخانه گذاری کنید. آنتروکوک‌های روده‌ای اسکولین را در مدت دو ساعت هیدرولیز کرده و کلنی‌هایی به رنگ خرمایی تا سیاه رنگ ایجاد می‌کنند.

۱۷ آزمون جستجوی سالمونلا

سالمونلا بیماریزای مهم انسانی بوده که در روده انسان و تعدادی از حیوانات ساکن می‌شود. سالمونلا باسیل گرم منفی و از نظر شکلی شبیه سایر باسیل‌های روده‌ای است و براحتی با رنگ های عادی رنگ گرفته و در زیر میکروسکوپ آرایش خاصی نشان نمی‌دهند. کپسول غیرقابل تشخیص بدون هاگ بوده و معمولاً گلوکز را تخمیر و تولید گاز می‌نمایند. در غذاهایی که اسیدی نباشند در حرارت ۳۷ درجه سلسیوس بخوبی رشد و تکثیر می‌نمایند ولی در یخچال رشد آنها متوقف می‌شود. همچنین پاستوریزاسیون باعث از بین رفتن این باکتری می‌شود.

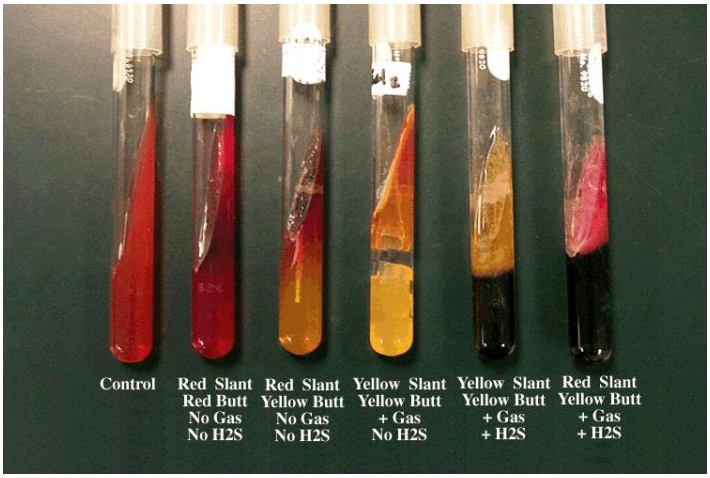
همه سالمونلاها انگل اجباری بوده و در عده‌ای از میزبانهای حیوانی از جمله انسان یافت می‌شوند، برخی از این باکتری ها به انسان محدود گشته نظیر سالمونلا تیفی که در انسان بیماری ایجاد کرده یا انسان ناقل آنها می‌باشد. عفونتهای سالمونلایی در انسان تقریباً همیشه با وارد شدن میکروب به همراه مواد غذایی آلوده، شیر و آب از راه دهان ایجاد می‌شود. دو نوع سالمونلوز وجود دارد : ۱- گاستروآنتریت حاد که به استفراغ و اسهال مشخص می‌گردد. ۲- تب تیفوئید که آنرا تب روده نیز می‌نامند. وجود سالمونلا حتی به تعداد زیاد در مواد غذایی از نظر ظاهری مانند بو، رنگ و حتی مزه تغییری نمی‌دهد. این میکروارگانیسم پس از یک دوره کمون ۱۲-۲۴ ساعته علائم خود را آشکار می‌سازد.

۱۷-۱ محیط کشت

محیط کشت مورد استفاده برای جستجوی سالمونلا، محیط کشت آب پپتونه بافری BPW برای پیش غنی سازی، آبگوشت مولر کافمن تتراتیونات نئوبیوسین MKTTnو آبگوشت راپاپورت واسیلیادیس منیزیوم کلراید R.V برای غنی سازی و گزیلوز لیزین دزوکسی کولات آگار XLD و آگار سبز درخشان / قرمز فنل BGA برای تایید نهایی می باشد.

۱۷-۲ روش آزمون

۲۵ گرم نمونه یکنواخت شده مورد آزمایش را در ml ۲۲۵ محیط کشت آب پپتون بافر (BPW) ریخته به مدت h ۲۴ در دمای ºC ۳۷ گرمخانه گذاری کنید. سپس به محیط کشت مولر کافمن تتراتیونات نئوبیوسین MKTTn، ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اولیه اضافه کنید و به مدت h ۲۴ در دمای ºC ۳۷ و به محیط کشت ml RV ۰/۱ از سوسپانسیون اولیه اضافه کنید سپس به مدت h ۲۴ در دمای ºC۴۱ گرمخانه‌گذاری کرده بعد از آن از هر یک روی محیط‌های کشت XLD, BGA کشت خطی دهید. به مدت h ۲۴ در دمای ºC ۳۷ گرمخانه‌گذاری کرده در صورت وجود سالمونلا پرگنه‌های صورتی بر روی محیط کشت BGA و پرگنه‌های سیاه بر روی محیط کشت XLD مشاهده خواهد شد. در صورت مشاهده چنین کلنی‌هایی تست‌های تائیدی و بدنبال آن تست سرولوژیکی انجام می‌گیرد.



شکل ۲۴- کلنی های سالمونلا در محیط XLD و BGA

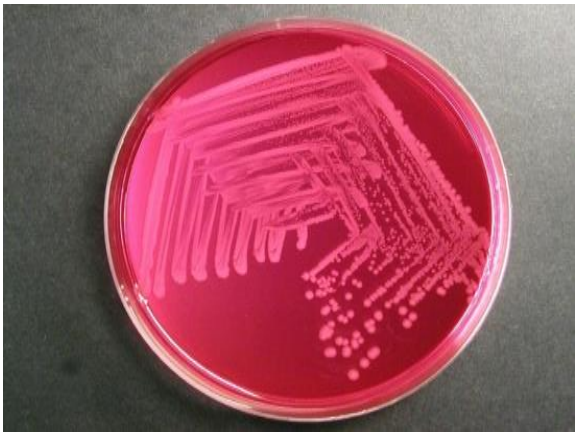
۱۷- ۳ کشت‌های تائیدی

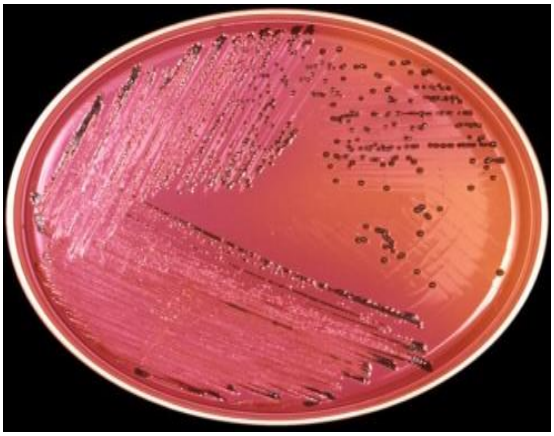
کلنی‌های مشکوک به سالمونلا را تجدید کشت کرده و پس از کشت مجدد با آزمون‌های سرولوژیکی بیوشیمیایی مناسب آزمون تاییدی انجام می‌شود.

۱۷-۳-۱ تایید بیوشیمیایی

۱۷-۳-۱-۱ محیط کشت TSI آگار

با استفاده از سوزن کشت آغشته به کلنی ها، ابتدا سطح شیب دار محیط کشت را به صورت خطی کشت دهید، سپس سوزن را به عمق محیط کشت فرو ببرید. محیط کشت را در دمای ۳۷ $^{o}C \pm 1^{o}C$ به مدت زمان $h \pm 3$ h ۲۴ ساعت گرماخانه‌گذاری کنید. در صورتی که کشت، از کلنی مشخص سالمونلا انجام گرفته باشد، سطح شیب دار محیط کشت، قلیایی (قرمز رنگ) همراه با تشکیل گاز و عمق محیط کشت اسیدی (زرد رنگ) همراه با تشکیل ۹۰٪ گاز و هیدروژن سولفید سیاه رنگ می باشد. باید توجه کرد که تایید وجود سالمونلا نباید تنها براساس نتایج آزمون کشت TSI انجام گیرد.





شکل ۲۵- آزمون محیط کشت TSI

۱۷-۳-۱-۲ محیط کشت اوره آگار

با استفاده از سوزن کشت آغشته به کلنی ها، سطح شیب دار محیط کشت را به صورت خطی کشت دهید. محیط کشت را در دمای ۳۷ $^{o}C \pm 1^{o}C$ به مدت زمان ۲۴ $h \pm 3$ h ساعت گرماخانه‌گذاری کنید. چنانچه واکنش مثبت باشد، از تجزیه اوره، آمونیاک به دست می آید، که رنگ قرمز فنل را به صورتی قرمز تغییر می دهد. اکثر سالمونلاها از نظر این واکنش منفی هستند.

Urea Agar

Indicator: Phenol red.
Component : Urea

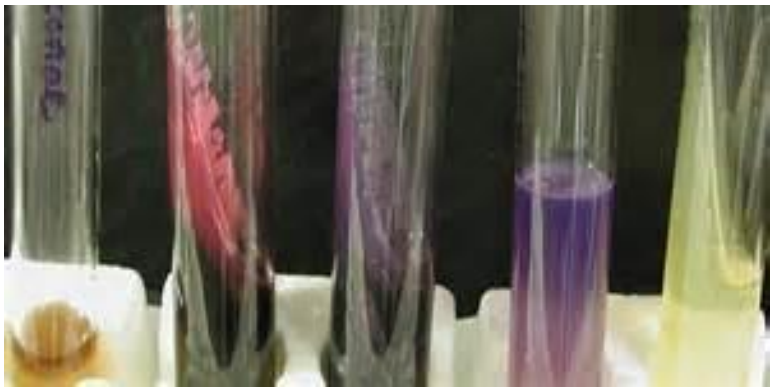
If the bacterium Produces urease:
Urea is **hydrolyzed to NH_3** and **CO_2** ---> light orange changes to reddish purple (in Proteus and K pneumoniae

FIGURE 9-11 ■ Urease test. *Left*, Positive result; *right*, negative result.

شکل ۲۶- آزمون محیط کشت اوره آگار

۱۷-۳-۱-۳ L- لیزین - دکربوکسیلاز

با استفاده از سوزن کشت آغشته به کلنی ها، داخل محیط کشت مایع را کشت دهید. محیط کشت را در دمای ۳۷ ºC ±۱ºC به مدت زمان ۲۴ h ±۳ h گرماخانه‌گذاری کنید. واکنش مثبت با ایجاد کدورت و رنگ ارغوانی مشاهده می شود. رنگ زرد نشان دهنده واکنش منفی است. اکثر سالمونلاها از نظر این واکنش مثبت هستند.



شکل ۲۷- آزمون L لیزین – دکربوکسیلاز

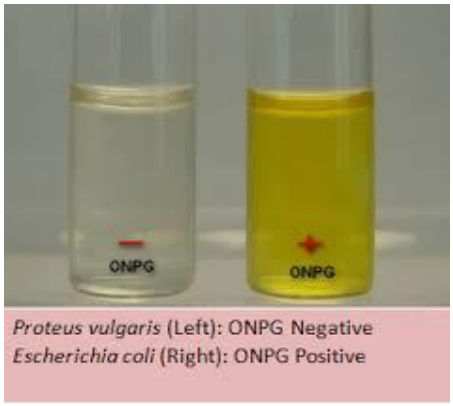
۱۷-۳-۱-۴ شناسایی بتا - گالاکتوزیداز

با استفاده از لوپ، یک حلقه کامل از کلنی مشکوک را به یک لوله آزمایش دارای ۰/۲۵ ml سرم فیزیولوژی اضافه کنید. سپس یک قطره تولوئن به آن افزوده و لوله را تکان دهید. لوله را به مدت ۵ دقیقه در حمام آب با دمای ۳۷ ºC ±۱ºC قرار دهید، سپس ۰/۲۵ ml از معرف بتا-گالاکتوزیداز افزوده و مخلوط کنید. لوله را به مدت زمان ۲۴ h ±۳ h در حمام آب با دمای ۳۷ ºC ±۱ºC قرار دهید. رنگ زرد نشاندهنده واکنش مثبت است که اغلب پس از مدت زمان ۲۰ دقیقه ظاهر می شود، اغلب سالمونلاها از نظر این واکنش منفی هستند.

شکل ۲۸ – شناسایی بتا - گالاکتوزیداز

۱۷-۳-۱-۵ وژس پروسکوئر

با استفاده از لوپ، یک حلقه کامل از کلنی مشکوک را به یک لوله آزمایش دارای ml ۳ محیط کشت VP حل کنید، آن را در دمای ۳۷ ºC ±۱ºC به مدت زمان ۲۴ h ±۳ h گرمخانه‌گذاری کنید. پس از گرمخانه گذاری دو قطره محلول کراتین و سه قطره محلول اتانوئیک ۱- نفتول و دوقطره محلول هیدروکسید پتاسیم به آن بیفزایید. با مشاهده رنگ صورتی تا قرمز روشن درطی ۱۵ دقیقه واکنش مثبت است. سالمونلاها از نظر این واکنش منفی هستند.



شکل ۲۹- آزمون وژس پروسکوئر

۱۷-۳-۱-۶ واکنش اندل

یک کلنی مشکوک را به لوله دارای ml ۵ محلول تریپتون- تریپتوفان تلقیح کنید و در دمای ۳۷ ºC ±۱ºC به مدت زمان ۲۴ h ±۳ h گرمخانه‌گذاری کنید. پس از گرمخانه گذاری یک میلی لیتر معرف کواکس به آن بیفزایید. تشکیل حلقه قرمز رنگ نشاندهنده واکنش مثبت است و تشکیل حلقه زرد-قهوه ای واکنش منفی را نشان می دهد. اکثر سالمونلاها از نظر این واکنش منفی هستند.

شکل ۳۰- آزمون اندول

۱۷-۳-۱-۷ تفسیر آزمون های بیوشیمیایی

مشخصات سالمونلاها از نظر واکنش های بیوشیمیایی در جدول ۵ شرح داده شده است.

جدول ۵- تفسیر آزمون های بیوشیمیایی (مشخصات سالمونلاها از نظر واکنش های بیوشیمیایی)

آزمون (از بند ۹-۵-۳-۲ تا بند ۹-۵-۳-۷)	سویه های سالمونلا									
	سالمونلا تیفی		سالمونلاپاراتیفی A		سالمونلا پاراتیفی B		سالمونلا پاراتیفی C		سایر سویه های سالمونلا	
	واکنش	درصد[1]	واکنش	درصد[1]	واکنش	درصد[2]	واکنش	درصد[2]	واکنش	درصد[1]
تشکیل اسید از تخمیر گلوکز در محیط کشت سه قندی TSI	+	۱۰۰	+	۱۰۰	+		+		+	۱۰۰
تشکیل گاز از تخمیر گلوکز در محیط کشت سه قندی TSI	[3]	۰	+	۱۰۰	+		+		+	۹۲
تشکیل اسید از تخمیر لاکتوز در محیط کشت سه قندی TSI	-	۲	-	۱۰۰	-		-		-	۱
تشکیل اسید از تخمیر ساکاروز در محیط کشت سه قندی TSI	-	۰	-	۰	-		-		-	۱
تولید هیدروژن سولفید (H_2S) در محیط کشت سه قندی TSI	+	۹۷	-	۱۰	+		+		+	۹۲
تجزیه اوره	-	۰	-	۰	-		-		-	۱
لیزین دکربوکسیلاسیون	+	۹۸	-	۰	+		+		+	۹۵
واکنش بتا-گالاکتوزیداز	-	۰	-	۰	-		-		-	۲[4]
واکنش وژس پروسکوئر	-	۰	-	۰	-		-		-	۰
واکنش اندل	-	۰	-	۰	-		-		-	۱

[1]- این درصدها نشان دهنده کلیه سویه های سالمونلا های جداشده در واکنش های مثبت یا منفی نمی باشند این درصد ها ممکن است بین و درون سروتیپ‌های عامل مسمومیت غذایی در منابع غذایی مختلف، متفاوت باشند.

[2]- این درصد در منابع شناخته شده نیست.

[3]- سالمونلا تیفی یک آن آنروژنیک است.

[4]- سالمونلا انتریکا گونه آریزونا واکنش لاکتوز مثبت یا منفی می‌دهد ولیکن همیشه بتا- گالاکتوزیداز مثبت است برای مطالعه گونه‌های آن، آزمون‌های تکمیلی نیاز است.

۱۷-۳-۲ تایید سرولوژیکی و سروتایپی

تشخیص وجود آنتی ژن‌های O و Vi و H سالمونلا، با مشاهده آگلوتیناسیون بر روی لام، هنگامی که از کلنی‌های خالص و آنتی سرم مناسب استفاده شود، صورت می گیرد.

۱۷-۳-۳ تایید درآزمایشگاه مرجع

سویه هایی که به عنوان سالمونلا در نظر گرفته می شوند و یا مشکوک به سالمونلا می باشند، باید برای تایید گونه به آزمایشگاه مرجع سالمونلا ارسال شوند.

۱۸ آزمون جستجوی استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت

استافیلوکوک ها سلولهای کروی گرم مثبت هستند که معمولاً در شکل دستجات نامنظمی شبیه به خوشه های انگور ، آرایش می یابند. آنها به سهولت در بسیاری از محیط های کشت رشد می کنند. بعضی از آنها فلور طبیعی پوست و غشاهای مخاطی انسان بوده و بقیه آنها عامل بروز عفونت های چرکی، تشکیل آبسه هستند. شایعترین نوع مسمومیت غذایی مربوط به انتروتوکسین مقاوم- در برابر حرارت استافیلوکوکی است. رشد استافیلوکوکوس اورئوس در مواد غذایی موجب به مخاطره افتادن بهداشت عمومی می گردد زیرا بسیاری از سویه های این میکروارگانیسم سم آنتروتوکسین ترشح می کنند که در صورت بلع موجب مسمومیت غذایی می شود. مواد غذایی که بعد از فرآیند بوسیله سویه های استافیلوکوک مولود آنتروتوکسین آلوده می شوند بسیار خطرناک می باشند. زیرا میکروارگانیسم های رقیب که رشد استافیلوکوک ها را محدود می سازند موجود نیستند. در مواد غذایی فرآیند شده وجود استافیلوکوکوس اورئوس در غذا معمولاً مبین آلودگی به وسیله پوست، دهان یا بینی افرادی است که با غذا سروکار دارند که ممکن است مستقیماً در خط تولید به وسیله کارگرانی که دارای زخم های استافیلوکوکی در روی دست و بازوها هستند و یا در نتیجه سرفه و عطسه که معمولاً در عفونت های دستگاه تنفسی ایجاد می گردد ، وارد غذا شود. باقیمانده موادغذایی آلوده که در سطح یا مجاورت سطوح تولید قرار می گیرند نیز باعث آلودگی ماده غذایی فرآیند شده می شوند. وجود مقادیر زیاد استافیلوکوکوس اورئوس در ماده غذایی فرآیند شده دلیل بر عدم رعایت بهداشت و یا عدم کفایت کنترل درجه حرارت یا هر دو آنها می باشد.

در مواد غذایی خام مخصوصاً فرآورده های غذایی دامی ، وجود استافیلوکوکوس اورئوس متداول بوده و ارتباطی با آلودگی آنها توسط انسان ندارد.

استافیلوکوکوس های کواگولاز مثبت در بیشتر موارد استافیلوکوکوس اورئوس می باشند اما استافیلوکوکوس اینترمدیوس و بعضی از سویه های استافیلوکوکوس هاییکوس نیز کواگولاز تولید می کنند.

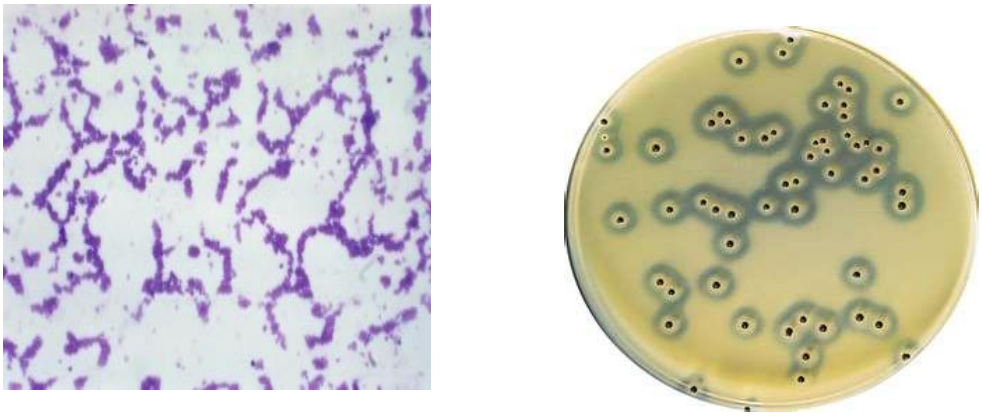
۱۸-۱ محیط کشت

محیط کشت مورد استفاده برای جستجوی استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت آبگوشت اصلاح شده جیولیتی کانتونی GC و برای کشت تایید محیط کشت برد پارکر BP می باشد.

۱۸-۲ روش آزمون

یک میلی لیتر از فرآورده های مایع یا یک گرم از سایر فرآورده ها را به ۱۰ ml محیط کشت آبگوشت اصلاح شده جیولیتی و کانتونی با غلظت معمولی (GC) ویا با توجه به ماهیت نمونه، ۱۰ml از سوسپانسیون اولیه (معادل ۱ گرم نمونه) را به ۱۰ml از محیط کشت آبگوشت اصلاح شده جیولیتی و کانتونی با غلظت دوبرابر (GC^+) اضافه کنید. به دقت محلول آگار یا پارافین را که به دمای ۴۴°C تا ۴۷°C رسیده است به گونه ای به محیط کشت اضافه کنید تا سطح محیط کشت تلقیح شده کاملاً پوشانده شود. برای بی هوازی کردن به عنوان روش جایگزین می توان از جار یا گرمخانه بی هوازی نیز استفاده شود.

لوله ها به مدت ۲۴h ± ۲h ساعت در دمای ۳۷ °C گرمخانه گذاری کنید. اگر محیط کشت تلقیح شده، سیاه رنگ شد یا رسوب سیاه در آن ایجاد شد کشت سطحی در محیط انتخابی را انجام دهید. برای این کار ، در شرایط آسپتیک، آگار یا پارافین روی لوله ها را با استفاده از اسپاچول سترون به صورت دو خط عمود بر هم ببرید و در صورت لزوم اطراف آگار یا پارافین را از پیرامون لوله جدا کنید. از محیط کشت درون لوله با استفاده از حلقه کشت سترون بر سطح پلیت دارای محیط کشت برد – پارکر آگار یا پلیت دارای محیط کشت پلاسمای خرگوش فیبرینوژن کشت خطی دهید تا کلنی های مجزا بدست آید. پلیت ها را وارونه کنید و در دمای ۳۷ °C برای مدت زمان ۲۴ h ± ۲h ساعت گرمخانه گذاری کنید. کلنی های مشخص به صورت کلنی های سیاه خاکستری براق و محدب با هاله شفاف که ممکن است به صورت جزیی کدر شده باشند ، دیده می شوند.



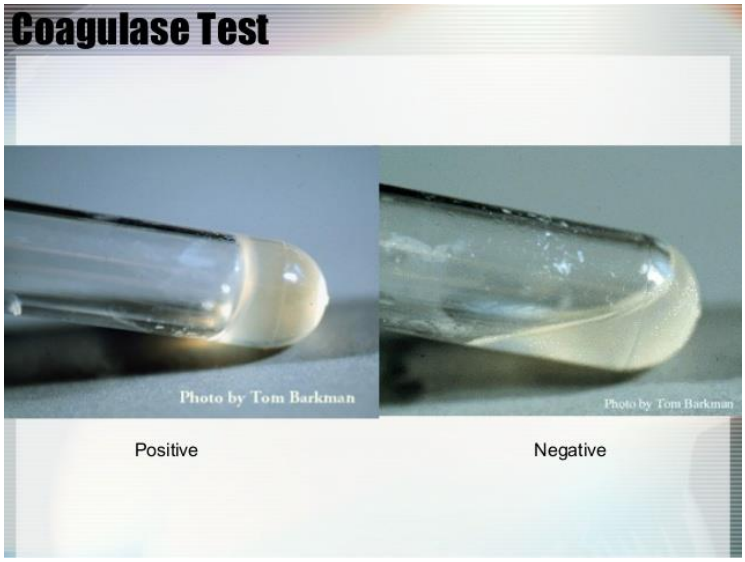
شکل ۳۱ - کلنی های استافیلوکوکوس اورئوس

۱۸-۳ آزمون تاییدی

۱۸-۳-۱ آزمون کواگولاز

با استفاده از حلقه کشت، هر کلنی انتخاب شده را بردارید و به لوله های آزمایش دارای محیط کشت آبگوشت مغز و قلب منتقل کنید. سپس لوله ها را در دمای ۳۷ °C برای مدت زمان ۲۴ h ± ۲h ساعت گرمخانه گذاری

کنید. پس از پایان زمان گرمخانه گذاری، ml ۰/۱ از سوسپانسیون را در لوله آزمایش سترون ریخته و به آن ml ۰/۳ پلاسمای خرگوش اضافه کنید. سپس لوله ها را در دمای ^{o}C ۳۷ برای مدت زمان h ۴ تا h ۶ در دمای اتاق نگهداری کنید. در صورت مثبت بودن آزمون لخته در پلاسما مشاهده می شود. آزمایش درصورتی معتبر است که نشانه ای از لخته در پلاسمای شاهد دیده نشود.

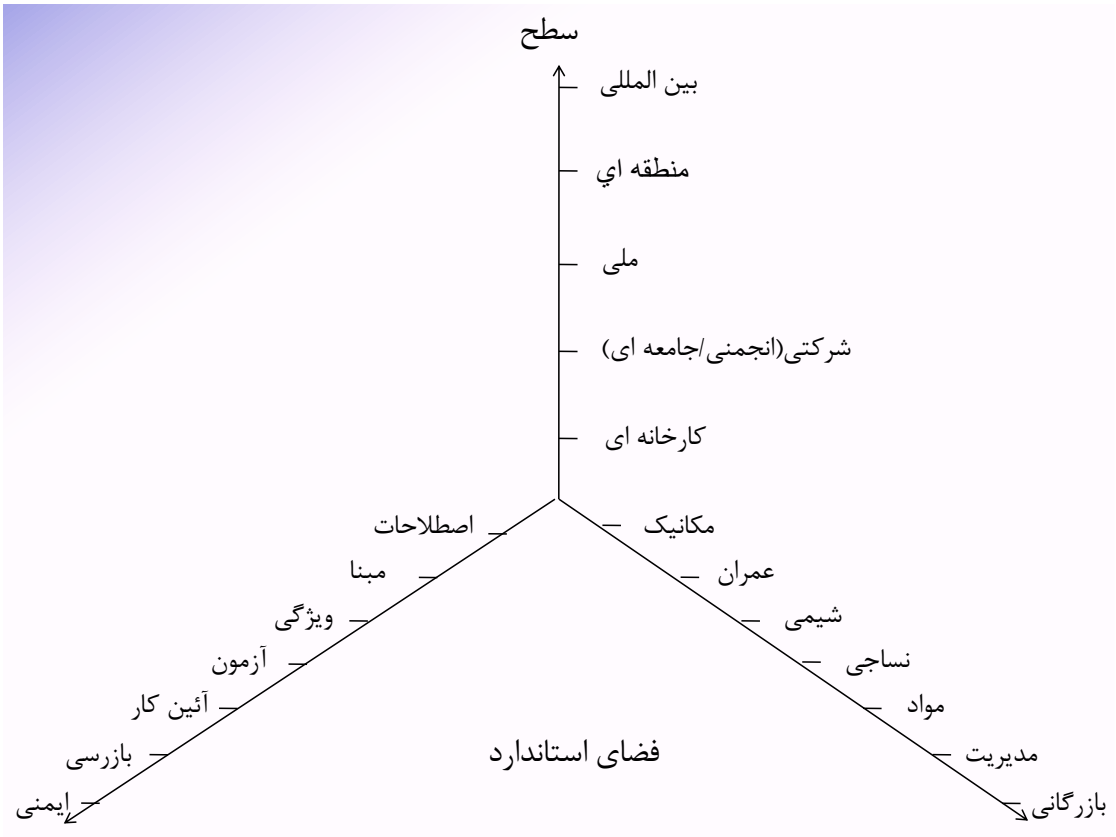


شکل ۳۲ – آزمون کواگولاز

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. در برخی مواقع کارخانجات، شرکت‌ها یا تشکیلاتی که در یک زمینه خاص فعالیت می‌کنند از طریق یک جامعه یا انجمن استانداردهای موسوم به استانداردهای شرکتی یا جامعه‌ای را تدوین می‌کنند تا در امور مربوط مورد استفاده 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.

الف-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 ...)

الف-۴- اجرای استاندارد

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

الف- استاندارد های 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- استاندارد های 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 می‌باشد.

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

مدیرکنترل 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.

مدیرکنترل 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 درکلیه 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 دایم 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 ۱۱۹/۵۰/د)، نواقص موجود در کالاهای تولید شده به سه دسته به شرح زیر تقسیم می گردند:

پ-۲-۱-۱ 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 فقدانی 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 ، هریک 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 استانداردبرای 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	اخطارکتبی 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 می‌دهد.

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 علائم 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.

یادآور ی 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 ۱۱۹/۵۰/د)

پیوست ت

نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌های انواع سوپ نیمه آماده خشک طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۹۶

ردیف	شرح آزمون	درجه اهمیت
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم ها	عمده
۲	اشریشیاکلی	بحرانی
۳	کلستریدیوم پرفرژنس	عمده
۴	سالمونلا	بحرانی
۵	باسیلوس سرئوس*	عمده
۶	کپک	عمده
۷	استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت	بحرانی
۸	آنتروکوکوس های روده ای	بحرانی

نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌های انواع سوپ های فوری خشک طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۹۶

ردیف	نوع میکروارگانیسم‌ها	روش مرجع
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم ها	عمده
۲	کلی فرم	بحرانی
۳	اشریشیاکلی	بحرانی
۴	کلستریدیوم پرفرژنس	عمده
۵	سالمونلا	بحرانی
۶	باسیلوس سرئوس*	عمده
۷	کپک	عمده
۸	استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت	بحرانی
۹	آنتروکوکوس های روده ای	بحرانی