



ریاست جمهوری
سازمان ملی استاندارد ایران



جزوه دوره کارآموزی
میکروبیولوژی آب میوه‌ها و آب سبزیجات تغلیظ شده
(کنسانتره)، پوره، پالپ و تکه‌های میوه و سبزیجات



شماره مدرک : ۶۲۲/۳۵/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

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به 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 منصفانه 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 پیشنهادهای در کمیته 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 شده تهیه می‌کنند در کمیته ملی طرح، بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)^۱، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)^۲ و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)^۳ است و به عنوان تنها رابط^۴ کمیسیون کدکس غذایی (CAC)^۵ در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین 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، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استانداردهای کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) و سایل سنچس، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آنها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، واسنجی و سایل سنچس، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

۱- International Organization for Standardization

۲- International Electrotechnical Commission

۳- International Organization for Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)

۴-Contact point

۵- 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 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 آب میوه و آب سبزی تغلیظ شده (کنسانتره)، پوره، پالپ و تکه‌های میوه و سبزیجات (در آب، شربت یا آب میوه) در بسته بندی اسپتیک و غیر اسپتیک

عنوان دوره کارآموزی:

میکروبیولوژی آب میوه و آب سبزی تغلیظ شده (کنسانتره)، پوره، پالپ و تکه‌های میوه و سبزیجات (در آب، شربت یا آب میوه) در بسته بندی اسپتیک و غیر اسپتیک

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 آب میوه و آب سبزی تغلیظ شده (کنسانتره)، پوره، پالپ و تکه‌های میوه و سبزیجات (در آب، شربت یا آب میوه) در بسته بندی اسپتیک و غیر اسپتیک بر اساس استاندارد های ملی ایران شماره‌های ۶۳۳۲ و ۱۹۳۳۶ می‌باشد و موارد زیر را در برمی‌گیرد:

- ۱- اطلاع رسانی روش‌های بهینه و جدید آزمایشگاهی
- ۲- یکسان‌سازی رویه آزمایشگاه میکروبیولوژی آب میوه و آب سبزی تغلیظ شده (کنسانتره)، پوره، پالپ و تکه‌های میوه و سبزیجات (در آب، شربت یا آب میوه) در بسته بندی اسپتیک و غیر اسپتیک اطمینان از عملکرد صحیح آزمایشگاه‌ها و اعتماد به نتایج حاصله از آزمون در آزمایشگاه‌ها
- ارتقا سطح آگاهی و ایجاد مهارت در زمینه انجام آزمون‌های میکروبیولوژی انواع کنسانتره آب میوه، پوره، پالپ و تکه‌های میوه و سبزیجات (در آب، شربت یا آب میوه) در بسته بندی اسپتیک و غیر اسپتیک
- ۳- آشنایی با الزامات فنی آزمایشگاه میکروبیولوژی بر اساس استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹

توانایی‌های کارآموزان پس از طی دوره:

- روش تهیه و سترون‌سازی محیط کشت های 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

پیش نیاز:

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	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 میکروبیولوژی آب میوه و آب سبزی تغلیظ شده (کنسانتره)، پوره، پالپ و تکه‌های میوه و سبزیجات (در آب، شربت یا آب میوه) در بسته بندی اسپتیک و غیر اسپتیک	آشنایی با روش تهیه محیط کشت های مورد نیاز و روش سترون سازی	۲
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹	*	*	۰/۵	۰/۵	روش آماده سازی وسایل مورد نیاز و سترون سازی وسایل	آماده سازی وسایل مورد نیاز و روش سترون سازی وسایل	۳
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره های: ۶۳۳۲ و ۱۹۳۳۶		*	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 های: ۶۳۳۲ و ۱۹۳۳۶			۱	۰/۵	آشنایی با میکروارگانیسم‌های میکروبیولوژی آب میوه و آب سبزی تغلیظ شده (کنسانتره)، پوره، پالپ و تکه‌های میوه و سبزیجات (در آب، شربت یا آب میوه) در بسته بندی اسپتیک و غیر اسپتیک	آشنایی با شاخص‌های میکروبی و حدود مجاز آنها در کنسانتره آب میوه و پوره، پالپ و تکه‌های میوه و سبزیجات در بسته بندی اسپتیک و غیر اسپتیک	۵

منبع / استانداردها	اجراکننده		مدت آموزش (ساعت)		محتوای آموزشی	رئوس مطالب	ردیف
	کارآموز	مدرس	عملی	تئوری			
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره های: ۶۳۳۲ و ۱۹۳۳۶	*	*	۰/۵	۰/۵	نمونه برداری از آزمایشه، 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 های: ۶۳۳۲ و ۱۹۳۳۶	*	*	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
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره های: ۶۳۳۲ و ۱۹۳۳۶		-	۰/۵	۰/۵	گرمخانه‌گذاری در دما و زمان مناسب بر حسب باکتری‌های مورد نظر	گرمخانه‌گذاری	۸
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره های: ۶۳۳۲ و ۱۹۳۳۶	*	*	۱	۱	بررسی و نحوه شمارش و محاسبه کلنی‌ها پس از گرمخانه‌گذاری - تعیین وجود یا عدم وجود باکتری‌ها	تشخیص، شمارش کلنی‌ها و آزمون تاییدی	۹
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹۱	*	*	۰/۵	۰/۵	نحوه گزارش نتایج بررسی شده	ارائه گزارش آزمون	۱۰
مدت دوره کارآموزی: دو روز							

سایر استانداردها و منابع:

۱- استاندارد ملی ایران شماره ۱۴۳۴۵، آب میوه-ها- نکتارهای میوه و نوشیدنی‌های میوه‌ای گازدار-ویژگی‌ها و روش‌های آزمون

۲- استاندارد ملی ایران شماره ۲۰۸۳۴، میکروبیولوژی زنجیره مواد غذایی - روش های نمونه برداری برای
آزمون های میکروب شناسی

نحوه برگزاری آزمون:

تئوری	عملی
*	*

جزوه دوره کارآموزی

میکروبیولوژی آب میوه و آب سبزی تغلیظ شده (کنسانتره)، پوره، پالپ و تکه‌های میوه و سبزیجات (در آب، شربت یا آب میوه) در بسته‌بندی اسپتیک و غیراسپتیک
تهیه کننده / تهیه کنندگان:

شهپر مقدمی

گروه پژوهشی / آزمایشگاه:

گروه پژوهشی میکروبیولوژی/آزمایشگاه نوشیدنی‌ها
به سفارش دفتر آموزش و ترویج استاندارد

منابع و مآخذ:

- ۱) استاندارد ملی ایران شماره ۶۳۳۲، میکروبیولوژی آب میوه و آب سبزی تغلیظ شده (کنسانتره) - ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- ۲) استاندارد ملی ایران شماره ۸۶۶۳، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - راهنمای آماده سازی و ساخت محیط‌های کشت
- ۳) استاندارد ملی ایران شماره ۱-۸۹۲۳، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - آماده سازی آزمایشه-سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی-قسمت اول -مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری
- ۴) استاندارد ملی ایران شماره ۴-۸۹۲۳، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-آماده سازی آزمایشه ، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون میکروبی- قسمت ۴- مقررات ویژه برای آماده سازی فرآورده‌ها به جز شیر، گوشت، ماهی و فرآورده های آنها
- ۵) استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- راهنمای الزامات کلی برای آزمون
- ۶) استاندارد ملی ایران شماره ۱-۱۰۸۹۹، 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
- ۷) استاندارد ملی ایران شماره ۲-۱۰۸۹۹، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جامع برای شمارش کپک‌ها و مخمرها - قسمت دوم - روش شمارش کلنی در فرآورده های با فعالیت آبی مساوی یا کمتر از ۰/۹۵ "

۸) استاندارد ملی ایران شماره ۱۹۳۳۶، میکروبیولوژی انواع کنسانتره آب میوه، پوره، پالپ و تکه‌های میوه و سبزیجات (در آب، شربت یا آب میوه) در بسته بندی استیک و غیر استیک

۹) استاندارد ملی ایران شماره ۱۴۷۲۳، آب میوه و آب میوه تغلیظ شده و نکتار میوه - آئین کار بهداشتی تولید

۱۰) استاندارد ملی ایران شماره ۱۴۷۲۳، آب میوه و آب میوه تغلیظ شده و نکتار میوه - آئین کار بهداشتی تولید

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

۱۲-Brackett R.E., Splittstoesser D.F, *Fruit and Vegetables in compendium of methods for the microbiological examination of foods*, third edition ., USA : APHA, ۲۰۰۵, p۵۱۵ - ۵۱۸

۱۳) Microbiology of Soft Drinks and Fruit Juices

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
۲	۳ اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی
۲۹	۴ نمونه برداری
	۵ روش‌های آزمون میکروبیولوژی آب میوه و آب سبزی تغلیظ شده (کنسانتره)، پوره، پالپ و
۳۱	تکه‌های میوه و سبزیجات (در آب، شربت یا آب میوه) در بسته‌بندی اسپتیک و غیراسپتیک
۴۶	۶ بیان نتایج
۴۸	پیوست الف- استانداردهای مرتبط با میکروبیولوژی آب میوه و فراورده‌های آن
۵۰	پیوست ب - انواع استاندارد
۵۲	پیوست پ- مفاهیم مورد استفاده در کنترل
۵۳	پیوست پ - (اطلاعاتی)
۵۶	پیوست ث - نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌های میکروبیولوژی آب میوه و آب سبزی تغلیظ شده (کنسانتره)، پوره، پالپ و تکه‌های میوه و سبزیجات (در آب، شربت یا آب میوه) در بسته بندی اسپتیک و غیر اسپتیک طبق استاندارد ملی ایران شماره‌های ۶۳۳۲ و ۱۹۳۳۶

مقدمه:

کنسانتره آب میوه‌ها یا سبزیجات، فرآورده حاصل از خارج کردن آب از آب میوه‌ها یا آب سبزیجات به وسیله حرارت غیرمستقیم، با بخار آب و تحت خلاء می‌باشد، به شرطی که نسبت مواد جامد قابل حل در آب^۱ (بریکس) در محصول نهائی، نسبت به آب میوه طبیعی اولیه، کمتر از دو برابر نباشد. معمولاً بریکس آب میوه‌ها حدود ۱۱٪ الی ۱۲٪ بوده که پس از فرایند تغلیظ، بریکس به ۳۵٪ تا ۷۵٪ می‌رسد. کنسانتره در ساخت آب میوه، آب سبزیجات، بستنی و مربا کاربرد دارد.

• تولید کنسانتره از میوه

پس از حمل مواد اولیه (آلبالو، سیب، انگور، انار و پرتقال) به کارخانه و انتقال آن به وسیله فشار آب به درون کانال‌های مخصوص و شستشوی اولیه، روی نوار نقاله مخصوص، مواد نامرغوب جدا شده و میوه‌های مناسب به خرد کن منتقل شده، خرد و متلاشی می‌شوند. به میوه خرد شده "مش"^۲ گفته می‌شود. مش پس از حرارت دهی مقدماتی و فرمانتاسیون^۳ وارد دستگاه پرس می‌شود تا آب میوه جدا شود. بسته به نوع پرس، (مداوم و غیر مداوم) ترکیب آب میوه متفاوت می‌باشد. آب میوه پس از طی مراحل خاص آروماگیری^۴ و عبور از صافی‌های مخصوص^۵، شفاف^۶ می‌شود.

۱- Brix

۲- به محض متلاشی شدن بافت، قهوه‌ای شدن رنگ میوه شروع می‌گردد. این پدیده که قهوه‌ای شدن آنزیمی نامیده می‌شود توسط آنزیم‌های ارتو-دی فنیل اکسیداز، و پار-دی فنیل اکسیداز، که به طور طبیعی در میوه وجود دارد کاتالیز می‌گردد. ترکیباتی که به عنوان سوبسترا، در واکنش شرکت می‌کنند اکثراً دارای بافت ارتو-دی ئیدروکسی فنولیک می‌باشند. یکی از روش‌های اساسی جلوگیری از این تغییرات نامطلوب، غیر فعال کردن حرارتی آنزیم‌ها می‌باشد بدین منظور مش آلبالو و انگور در درجه حرارت ۸۵°C تا ۹۰°C به مدت زمان ۴min تا ۲min حرارت داده می‌شوند. به طور متداول برای این منظور از مبدل‌های حرارتی لوله‌ای دو جداره استفاده می‌گردد. در این سیستم برای گرم کردن آب میوه از بخار و برای سرد کردن تا دمای ۵۰°C با هدف فرمانتاسیون (آنزیم زنی) از آب سرد استفاده می‌شود. (در مورد سیب، گلابی و غیره عموماً عمل گرم کردن مش انجام نمی‌گیرد).

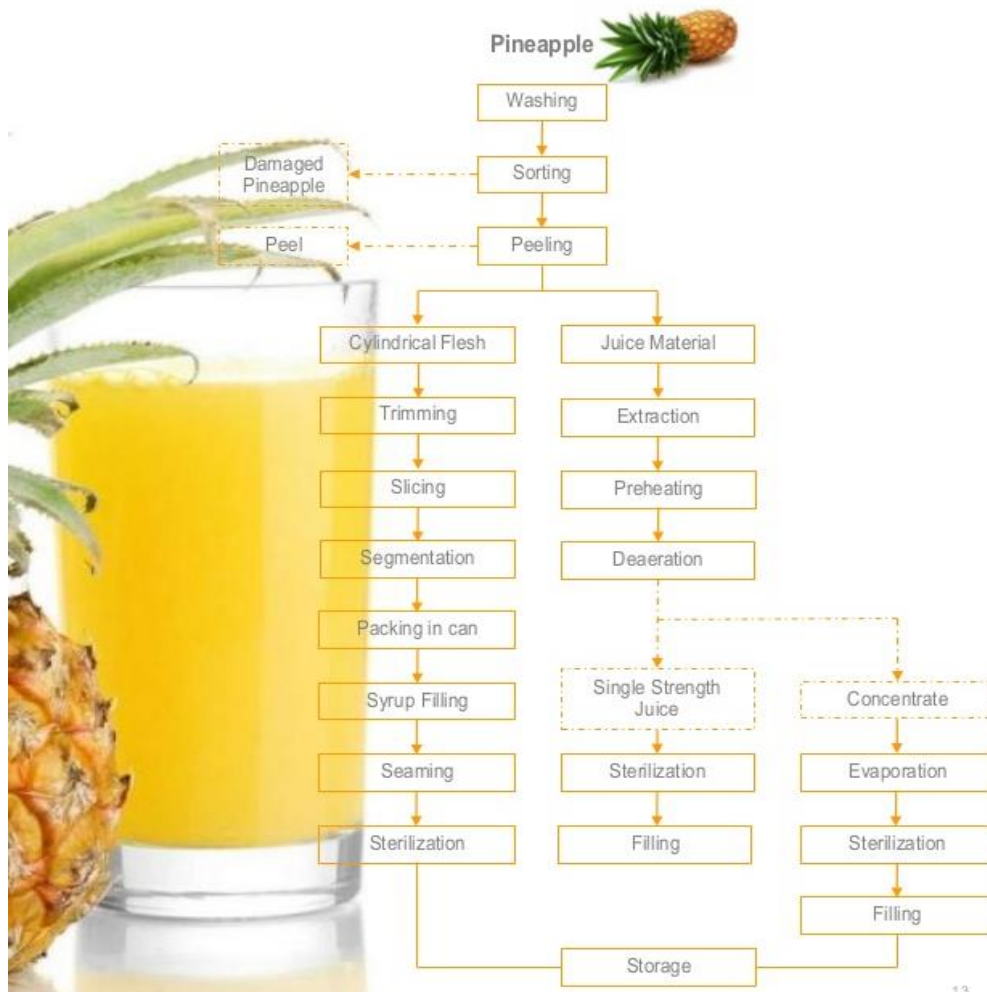
۳- فرمانتاسیون مش در حقیقت عمل آنزیم زنی می‌باشد. بدین منظور، آنزیم‌های مورد استفاده علاوه بر فعالیت پکتولیتیک، دارای فعالیت سلولوتیک، همی سلولوتیک و پروتولیتیک نیز می‌باشند. به این ترتیب، متلاشی شدن دیواره سلول هنگام پرس کردن آسان گشته و راندمان پرس افزایش می‌یابد. مقدار آنزیم مورد نیاز بسته به میزان فعالیت آن، به ازای هر تن مش در مورد آنزیم‌های جامد ۲۰g-۱۰g و در مورد آنزیم‌های مایع ۱۰۰ ml تا ۲۰۰ ml می‌باشد. درجه حرارت مناسب برای این فرآیند بین ۴۵°C تا ۵۰°C و زمان تاثیر آن بسته به نوع آنزیم مصرفی بین ۱h تا ۲h می‌باشد. مقدار بهینه آنزیم مورد نیاز بوسیله "تست چکاندن" تعیین می‌گردد.

۴- عمل آروماگیری یا قبل از شفاف سازی و یا قبل از عمل تغلیظ انجام می‌شود. انجام آروماگیری قبل از شفاف سازی به دلیل تهیه آرومای طبیعی‌تر و بیشتر، مطلوب‌تر می‌باشد. این عمل در سیستمی به نام "آروماگیر" انجام می‌گیرد. که از بخش‌های اوپراتور (تبخیر کننده)، تجزیه جزء به جزء و سرد کن تشکیل شده است. آروما در موقع رقیق کردن کنسانتره به منظور تهیه آب میوه مجدداً به آن اضافه می‌گردد.

۵- بعد از جدا کردن رسوب، عمل صاف کردن انجام می‌گیرد. برای صاف کردن آب میوه از صافی‌های صفحه‌ای و یا پوششی استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر، اجرای فیلتراسیون خلاء نیز رایج شده است.

۶- دمای آب میوه خروجی از آروماگیر ۹۰°C تا ۹۲°C است که توسط مبدل حرارتی به ۴۵°C تا ۴۷°C رسیده و به تانک‌های شفاف‌سازی منتقل می‌شود. ابتدا، به روش آنزیمی، پکتین و در صورت وجود نشاسته تجزیه می‌شود. سپس با افزودن مواد کمکی در همان دما و یا در دمای ۲۰°C تا ۲۵°C فلوکاسیون (لخته) ایجاد می‌گردد. برای جدا کردن لخته آب میوه مدتی در داخل تانک نگهداری می‌شود تا لخته رسوب نماید و یا با اجرای عمل شناورسازی (flotation)، از آب میوه جدا می‌گردد.

تغلیظ آب میوه شفاف معمولا با یکی از روش‌های: تغلیظ حرارتی^۱، تغلیظ کردن به‌روش انجماد^۲، تغلیظ کردن به روش اسمز معکوس^۳ انجام می‌گیرد.



شکل ۱ - مراحل تولید آب میوه و کنسانتره آب میوه

۱ - تغلیظ حرارتی در دستگاهی به نام اواپراتور (Evaporator) انجام گرفته و آب بوسیله عمل تبخیر جدا می‌گردد. برای تغلیظ کردن، انواع متعددی از اواپراتور (لوله‌ای، صفحه‌ای، فیلم تراش و سانتریفیوژی) مورد استفاده قرار می‌گیرد. دستگاه فوق شامل: ۱- پلیت هیتر ۲- پلیت کولر ۳- پمپ جهت سیرکوله محصول ۴- پمپ و کیوم ۵- انواع پمپ: (محصول، آب گرم، دریافت محصول) ۶- بالانس تانک ۹- کندانسور ۷- شیر بخار ۸- چراغ دید ۹- گیج خلا ۱۰- تابلو فرمان ۱۱- لوله ورود و خروج محصول می‌باشد.

۲ - آب میوه ابتدا منجمد شده و قسمت معینی از آب موجود در آن بسته به درجه حرارت انجماد به حالت یخ در می‌آید. سپس کریستال‌های یخ بوسیله سیراتور جدا می‌گردد و مقدار ماده خشک موجود در قسمت منجمد شده افزایش می‌یابد.

۳ - اسمز معکوس، عبارت است، از عبور دادن آب میوه (با فشار) از میان سوراخ‌های بسیار ریز یک غشاء انتخاب کننده. مقدار فشار مورد استفاده باید از مقدار فشار اسموتیک سیستم بیشتر باشد. غشاء، آب و مقدار کمی از ترکیبات دارای مولکول‌های کوچک را می‌تواند از خود عبور دهد.

انبار کردن و نگه داری کنسانتره

درجه حرارت کنسانتره هنگام خروج از اواپراتور^۱ متغیر بوده و معمولاً بین $40-60^{\circ}\text{C}$ می باشد که باید خنک گردد. اگر مقدار ماده خشک محلول (بریکس) بین ۶۸-۷۲ باشد، در تانک های استیل ضد زنگ و یا در بشکه های مناسب در 4°C انبار می گردد. اگر ماده خشک کمتر باشد، باید از روش های مناسبی مانند: منجمد^۲ کردن، پرکنی داغ، پرکنی استریل (اسپتیک^۳) و غیره استفاده گردد.

• تولید پوره

پس از دریافت مواد اولیه (انواع میوه)، کنترل و تایید کیفی از سوی کارشناسان کنترل کیفی در حوضچه استیل مخصوص تخلیه شده و شستشوی اولیه برای حذف مواد خارجی صورت می پذیرد. سپس مواد اولیه روی نوار نقاله ای منتقل می شوند و مواد نامرغوب احتمالی جداسازی می شوند. سپس عمل خرد کردن میوه ها انجام می شود. (میوه های هسته دار پیش از عمل خرد کردن، هسته گیری می شوند) و بلافاصله میوه خرد شده حرارت داده می شود تا از تغییر رنگ پوره، جلوگیری شده و سبب جداسازی آسان آب از گوشت میوه در مرحله بعدی شود. در این مرحله، آب میوه له شده، تحت فشار از گوشت آن جدا می شود سپس آب میوه در سیستم های خاصی که تحت شرایط خلا کار می کنند، تغلیظ شده و آنچه حاصل می شود، پوره نام دارد.



شکل ۲ - پوره میوه

۱ - اواپراتور، متشکل از یک مبدل حرارتی است که به یک محفظه بزرگ متصل شده است. مبدل حرارتی از نوع غیر تماسی است و در نتیجه این امکان را فراهم می کند که حرارت از بخار کم فشار به محصول منتقل شود. محصول درون محفظه تبخیر، تحت خلأ نگه داشته می شود. وجود خلأ، اختلاف دما بین بخار و محصول را افزایش داده و محصول در دمای نسبتاً پایین به جوش می آید، که در نتیجه، صدمه حرارتی به حداقل می رسد. بخارات ایجاد شده از طریق کندانسور به سیستم خلأ منتقل می گردد. بخار درون مبدل حرارتی، شده و به صورت مایع از مبدل خارج می شود.

۲ - فرآورده منجمد فرآورده ای است که با یکی از روش های معمول پاستوریزه شده است به طوری که کلیه میکروب های بیماری زای آن از بین رفته و تعداد میکروب های غیر بیماری زا در آن به حداقل رسیده و کمترین تغییرات در ترکیب آن حاصل شده باشد بسته بندی این فرآورده تحت شرایط کاملاً بهداشتی صورت گرفته و تا تاریخ مصرف در سردخانه با دمای انجماد قابل نگهداری است. [منبع : بر گرفته از استاندارد ملی ایران شماره ۱۹۳۳۶]

۳ - فرآورده اسپتیک فرآورده ای است که تحت مجموعه عملیات حرارتی تولید و بسته بندی می شود به طوری که احتمال نفوذ آلودگی به صفر می رسد این فرآورده در شرایط عادی (بدون کاهش دما و یا سرد کردن فرآورده) قابل نگهداری است. [منبع : بر گرفته از استاندارد ملی ایران شماره ۱۹۳۳۶]

• میکروبیولوژی

میکروارگانسیم‌های مقاوم به حرارت

عامل فساد کنسانتره آب میوه‌ها اغلب کپک‌ها و مخمرهای اسموفیل و مقاوم به حرارت و باکتری‌ها اسیدو فیل هستند:

-کپک‌های مقاوم در برابر گرما، مانند:

Aspergillus ochraceus, A. tamaris, A. flavus, Byssochlamys nivea, B. fulva, Paecilomyces variotii, Neosartorya fischeri, Eupenicillium brefeldianum, Phialophora mustea, Talaromyces flavus, T. trachyspermus, Thermoascus aurantiacus, Penicillium notatum, P. roquefortii and Cladosporium spp.

-مخمرهای مقاوم به حرارت مانند:

Zygosaccharomyces rouxii, Z. bailii, Dekkera anomala, Schizosaccharomyces pombe

Torulaspora delbrueckii, Rhodotorula mucilaginosa, S. cerevisiae.

-باکتری‌ها مانند:

Acetobacter, Alicyclobacillus, Bacillus, Clostridium, Gluconobacter, Lactobacillus, Leuconostoc, Saccharobacter, Zymobacter, Zymomonas, Gluconobacter

باکتری‌های جنس آلیسایکلوباسیلوس^۱ باسیل اسید دوست ترموفیل، گرم مثبت، اسپوردار، مقاوم به حرارت و شرایط اسیدی است. مقاومت در برابر مواد شیمیایی و حرارت بالا، امکان حضور باکتری در طول مراحل پردازش، توانایی جوانه زنی اسپور و رشد باکتری/اسیدوترستریس در آب میوه یکی از نگرانی‌های صنعت نوشیدنی محسوب می‌گردد. فساد ناشی از رشد این باکتری بر خلاف بیشتر باکتری‌های عامل فساد مواد غذایی ایجاد گاز نمی‌کند و موجب تورم بسته بندی نمی‌شود می‌تواند همراه و یا بدون بروز رسوب در آب میوه و همراه با بوی نامطبوع باشد که محققان مختلف از آن با عنوان بوی مواد دارویی، مواد ضد عفونی کننده، گوشت پخته و باقلای پخته یاد کرده‌اند. کنسانتره‌ها معمولاً دارای pH کمتر از ۴/۶ هستند و دمای پاستوریزاسیون ۸۵°C تا ۹۵°C به مدت زمان ۱۰ min موجب تندش اسپور شده و به واسطه فعال شدن میکرو ارگانسیم و بالا رفتن بار میکروبی باعث تجزیه و نهایتاً منجر به فساد به علت تولید گایاکول و تولید طعم و بوی نامطبوع می‌گردد. با توجه به نکات یاد شده وجود یا عدم این عامل فساد در کنسانتره آب میوه یکی از مهمترین فاکتورهای مطرح در صادرات کنسانتره آب میوه می‌باشد. منشا این میکروارگانسیم‌ها در کنسانتره، میوه آلوده به خاک، فاسد و شستشوی ناکافی تجهیزات تولید است تعداد کل میکروارگانسیم‌ها در هر گرم میوه سالم از ۱۰^۳ تا ۱۰^۵ متغیر است این تعداد

۱- Alicyclobacillus spp

در میوه‌های آسیب دیده و کپک زده بسیار بالاتر است شستشوی مناسب میوه باعث کاهش میزان آلودگی اولیه تا حد ۹۰٪ می‌شود. عمده آلودگی کنسانتره‌های آب میوه عبارتند از: عدم رعایت شرایط بهداشتی در حین جمع آوری، انتقال به کارخانه، نقص در کاربرد فرایندهای خاص فرآوری (سورتینگ و شستشو، شفاف سازی، پالایش، سانتریفوژ و پاستوریزه کردن)، نحوه بسته بندی و حمل و نقل نادرست و در مجموع عدم توجه به بهداشت فردی و عدم رعایت شرایط ساخت خوب^۱ است.

۱- Good Manufacturing Practice (GMP).

جزوه دوره کارآموزی

میکروبیولوژی آب میوه و آب سبزی تغلیظ شده (کنسانتره)، پوره، پالپ و تکه‌های میوه و سبزیجات (در آب، شربت یا آب میوه)

۱ هدف

هدف از تدوین این جزوه آموزشی آشنایی با روش‌های آزمون میکروبیولوژی میکروبیولوژی آب میوه و آب سبزی تغلیظ شده (کنسانتره)، پوره، پالپ و تکه‌های میوه و سبزیجات (در آب، شربت یا آب میوه) در بسته بندی اسپتیک و غیر اسپتیک ، بر اساس استانداردهای ملی ایران شماره‌های ۶۳۳۲ و ۱۹۳۳۶ می‌باشد.

یادآوری ۱- توصیه می‌شود کارآموزان این دوره با الزامات آزمایشگاهی میکروبیولوژی و نیز استانداردهای ملی ایران شماره‌های ۶۳۳۲ ، ۱۹۳۳۶ 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 در ارتباط با آزمون میکروبیولوژی آب میوه و آب سبزی تغلیظ شده (کنسانتره)، پوره، پالپ و تکه‌های میوه و سبزیجات (در آب، شربت یا آب میوه) در بسته بندی اسپتیک و غیر اسپتیک به شرح جدول ۱ می‌باشند:

جدول ۱- فهرست استانداردهای آب میوه و آب سبزی تغلیظ شده (کنسانتره)، پوره، پالپ و تکه‌های میوه و سبزیجات (در آب، شربت یا آب میوه) در بسته بندی اسپتیک و غیر اسپتیک

ردیف	عنوان استاندارد	شماره استاندارد
۱	ویژگی‌های آب میوه و آب سبزی تغلیظ شده (کنسانتره) - ویژگی‌ها و روش‌های آزمون	۶۳۳۲
۲	میکروبیولوژی زنجیره غذایی - روش جامع برای شمارش میکروارگانیسم‌ها - قسمت ۱- شمارش کلنی در ۳۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از روش کشت آمیخته	۵۲۷۲-۱
۳	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام و آب- آماد سازی، ساخت، ذخیره سازی و آزمون عملکرد محیط‌های کشت	۸۶۶۳
۴	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.	۸۹۲۳-۱

جدول ۱- ادامه فهرست استانداردهای کنسانتره انواع آب میوه، پوره و پالپ برچه و تکه های میوه و سبزیجات در بسته بندی اسپتیک و غیر اسپتیک

ردیف	عنوان استاندارد	شماره استاندارد
۵	میکروبیولوژی زنجیره غذایی - روش جامع برای شمارش میکروارگانیسم ها- قسمت ۲- شمارش کلنی در ۳۰ درجه سلسیوس با استفاده از روش کشت سطحی	۵۲۷۲-۲
۶	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - آماده سازی آزمایشه، 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
۷	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- راهنمای الزامات کلی برای آزمون	۹۸۹۹
۸	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش شمارش کپک ها و مخمرها - قسمت اول: روش شمارش کپک ها و مخمرها - روش شمارش کلنی در فرآورده های با فعالیت آبی (a_w) مساوی یا بیشتر از ۰/۹۵	۱۰۸۹۹-۱
۹	میکروبیولوژی پوره، پالپ، برچه و تکه های میوه و سبزیجات (در آب، شربت یا آب میوه) - ویژگی ها و روش های آزمون	۱۹۳۳۶
۱۰	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش شمارش کپک ها و مخمرها - قسمت دوم: روش شمارش کپک ها و مخمرها - روش شمارش کلنی در فرآورده های با فعالیت آبی (a_w) مساوی یا کمتر از ۰/۹۵	۱۰۸۹۹-۲

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 می باشد.

۳-۱ فضای آزمایشگاه

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

۳-۱-۱ فضای مربوط به نمونه و آزمون

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

- دریافت و انبارش نمونه ها
- آماده سازی نمونه ها خصوصاً برای مواد خام (مانند: فرآورده های پودری حاوی تعداد زیاد میکروارگانیسم ها)

- آزمون نمونه‌ها (از سوسپانسیون اولیه) شامل گرمخانه‌گذاری میکروارگانیزم‌ها
- آزمون میکروارگانیزم‌های بیماری‌زای احتمالی؛
- نگهداری سوبه مرجع و سایر سوبه‌ها؛
- آماده‌سازی و سترون‌سازی محیط‌های کشت و وسایل؛
- انبارش محیط‌های کشت و واکنشگرها؛
- آزمون سترونی مواد غذایی؛
- آلودگی‌زدایی؛
- شستشو و تمیز کردن وسایل شیشه‌ای و سایر تجهیزات؛
- انبارش مواد شیمیایی مخاطره‌آمیز، 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 پپت 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 بهتر است وسایل از نظر داشتن شرایط لازم برای کار تصدیق شوند و در صورت لزوم در طی استفاده، عملکرد آن پایش شود.

از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ و همچنین وسایل نوشته شده در جدول ۲ استفاده شود:

جدول ۲- فهرست تجهیزات مورد نیاز برای آزمون میکروبیولوژی

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

وسایل و ظروف شیشه‌ای آزمایشگاهی

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



شکل ۳- وسایل شیشه‌ای

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 $g, 0.1$ ، $g, 0.01$ ، $g, 0.001$ و $g, 0.0001$ استفاده می‌کنند. ترازوهای آزمایشگاهی دقت 1 ml/g 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 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، ارزیابی‌ها دقیق‌تر و قابل اطمینان هستند و درصد خطا بسیار کم است برای تجهیزات کالیبره شده گواهی کالیبراسیون صادر شده و ضمیمه دستگاه می‌گردد.



شکل ۴- ترازوی آزمایشگاهی

میکروسکوپ^۲

میکروسکوپ یکی از وسایل آزمایشگاهی اصلی در آزمایشگاه زیست‌شناسی 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 می‌باشد که هرچقدر طول موج نور به کار رفته در میکروسکوپ مزبور کوتاه‌تر باشد قدرت تفکیک و یا جداکنندگی آن میکروسکوپ بیشتر است. میکروسکوپ‌ها به طور کلی به دو دسته میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی تقسیم می‌شوند. میکروسکوپ‌های نوری به منظور سنجش و مشاهده سلول‌ها با بزرگنمایی نسبتاً کم و میکروسکوپ‌های الکترونی برای مشاهده سلول‌ها و ساختارهای سلولی با بزرگنمایی بسیار زیاد مورد استفاده قرار می‌گیرند. سه تعریف مهم در کاربرد میکروسکوپ وجود دارد.

- **بزرگنمایی:** به نسبت اندازه تصویر نمونه، به اندازه واقعی آن گفته می‌شود. در همه میکروسکوپ‌ها از عدسی‌ها برای بزرگنمایی تصویر استفاده می‌شود.
- **قدرت تفکیک:** توانایی تشخیص بین دو شیء نزدیک به هم به صورت دو شیء متمایز و جدا را قدرت تفکیک می‌گویند. قدرت تفکیک به کیفیت عدسی‌ها و طول موج نور تابیده شده بستگی دارد. با کاهش طول موج، قدرت تفکیک افزایش می‌یابد.

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

- **کنتراست** : به-تفاوت بین بخش‌های مختلف یک نمونه می‌گویند. مثلاً یک اندامک تیره‌تر از اندامک دیگر دیده شود .

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



شکل ۵- میکروسکوپ نوری

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 ۶- سیستم فیلتراسیون

- 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 فازکنتراست 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 اندامک‌هایی از سلول و میکروارگانیسم‌هایی که با رنگ فلورسنت رنگ آمیزی شده باشند، استفاده می‌گردد. این دستگاه دارای قابلیت عکس‌برداری از نمونه‌ها و ثبت اطلاعات نیز می‌باشد.
- ۴- این دستگاه میکروسکوپ دوچشمی نوری است دارای عدسی‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۱۰۰ و قابلیت فازکنتراست و نصب دوربین عکس‌برداری می‌باشد که برای مشاهده معمولی و نمونه‌هایی که رنگ-آمیزی نشده‌اند مورد استفاده قرار می‌گیرد.

حمام مایع^۱ (بن ماری^۲) با دمای 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.



شکل ۷- انواع حمام مایع با دمای ثابت

اتوکلاو^۳

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 می‌تواند موجب تخریب ساختمان میکروبه‌ها و اسپور آنها شده و تقریباً باعث نابودی تمام میکروارگانیسم‌های شناخته شده شود. بر اساس استاندارد در دمای 121°C ابزارآلات باید حداقل به مدت زمان 15 min، تحت فرآیند استریلیزاسیون قرار گیرند.

۱- Water bath

۲- Bain marie

۳- Autoclave

کل مدت زمان کار دستگاه اتوکلاو از فشار دادن دکمه (شروع کار)^۱ تا پایان کار سیستم، مجموع سه زمان (زمان اولیه)^۲، (زمان استریلیزاسیون)^۳ و (زمان خشک شدن)^۴ است. بررسی دما و زمان اتوکلاو با اندیکاتورهای شیمیایی، فیزیکی و بیولوژی انجام می شود. اندیکاتورهای شیمیایی : به صورت نوارهای اتوکلاو (چسب اتو کلاو) TST^۵ 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^۶ است. اندیکاتور فیزیکی : از آلیاژهایی تشکیل شده اند که در دمای مورد نظر ذوب می شوند.



شکل ۸- اتوکلاو

شمارشگر کلنی^۷

این دستگاه برای شمارش کلنی باکتری ها، به صورت دیجیتال کاربرد دارد. معمولا دارای صفحه مدرج برای سهولت در شمارش، عدسی با قدرت بزرگنمایی ۸ برابر و ثبت در حافظه در هنگام قطع برق می باشد.

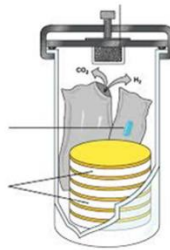


شکل ۹- شمارش کلنی

-
- ۱- Start
 - ۲- Preheating Time
 - ۳- Sterilization Time
 - ۴- Drying Time
 - ۵- Time, Steam, Temperature
 - ۶- *Geobacillus stearothermophilus*
 - ۷- Colony counter

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 بی هوازی) در طی مدت گرمخانه‌گذاری 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 ۱۰- تجهیزات کشت در شرایط اتمسفری تغییر یافته

انکوباتور^۱ (اتو)

انکوباتور شامل اتاقک عایق بندی 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. در انواع انکوباتورهای آزمایشگاهی (معمولی، شیکردار، یخچالدار، و مجهز به سیستم تزریق CO₂) در آزمایشگاه‌های میکرو بیولوژی و بیولوژی سلولی کاربرد اساسی دارد.



شکل ۱۱- انکوباتور

فور^۲ یا آون

۱- Incubator

۲- Oven

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 میحط‌های آزمایشگاهی کاربرد دارند. عمل استریل و خشک کردن وسایل فلزی تمیز شده. بر اساس استاندارد در دمای $(10 \pm 170)^{\circ}\text{C}$ (از زمان رسیدن به دمای 70°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.
- 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 به‌طور هفتگی توصیه می‌شود.



شکل ۱۲- فور یا آون

۱- *Bacillus subtilis*

۲- *Bacillus atrophaeus*

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 KCl و HCl یک دهم مولار (محلول رفرانس) است. قبل از شروع کار با pH متر ابتدا باید مطمئن شوید که میله کاوشگر در محلول نگهدارنده یا محلول با $pH = 4$ 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 زمان $2h$ در آب مقطر نگهداری کنید و سپس آن را در محلول نگهدارنده قرار دهید. کاوشگر را به وسیله آب مقطر بشویید. برای تنظیم^۴ pH متر، الکتروود را در محلول $pH = 7$ قرار داده، حداقل 30 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 $pH = 7$ قرار دهید. اجازه دهید اندازه‌گیر 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 اندازه‌گیری pH محلول‌های مورد آزمایش است قبل از قرار دادن اندازه‌گیر در محلول مورد آزمایش آن را دوباره با آب مقطر بشویید.



شکل ۱۳- pH متر

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- pH meter
 - ۲- Probe
 - ۳- Meter
 - ۴- Calibration

- ✓ **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. نمونه‌هایی از این مواد مغذی عبارتند از: شیر بدون چربی، خون گوسفند، زرده تخم مرغ و .

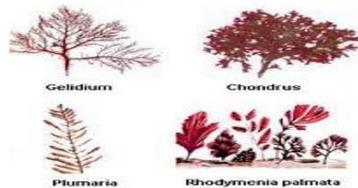
۳-۵-۱ اجزای تشکیل دهنده محیط کشت

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

۱- *Bacillus subtilis*

۲- *Bacillus. Stearothermophilus*

در 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 ۱۴- گونه‌های از جلبک دریایی
جلبک دریایی جنس جیلیدیوم

آگار برای میکروارگانیسم‌ها ارزش غذایی ندارد و هیچ میکروارگانیسمی نمی‌تواند آنرا هضم کند. نقطه ذوب آن 95°C و با رسیدن دمای آن به حدود 43°C شبکه‌ای ایجاد می‌کند که سبب جامد شدن محیط می‌شود. محیط‌های کشت جامد معمولاً دارای 15g/L تا 13g/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 به روش 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 به دلیل خالص بودن پایین‌تر از آب‌های طبیعی بوده و خاصیت خورندگی 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.
- 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

۱- Algae

۲- Gracilari

۳- Gelidium

میکروارگانسیم‌های آزمون باشند. برای بهبود تکثیرپذیری توصیه می‌شود محیط کشت‌های تجارتهی مورد استفاده قرار گیرد. چنانچه محیط‌های کشت به صورت 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 به استاندارد 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

۳-۵-۴-۲-۱ محیط کشت جامد^۱

محیط‌های جامد به علت دارا بودن آگار در ترکیب خود به صورت جامد بوده و متناسب با میکروارگانسیم‌ها 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 ۱۵- محیط کشت آگار دار

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

الف کشت‌های عمقی^۲

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

ب کشت شیب دار^۳

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

۱- Solid media

۲- Stab Cultures

۳- Slant media



شکل ۱۶- محیط کشت شیبدار

پ کشت در داخل محیط جامد^۱

به لوله‌های 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.

۳-۵-۴-۲- محیط کشت مایع یا آبگوشتی^۲

محیط‌های مایع به علت 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.

۳-۵-۴-۳- محیط کشت نیمه جامد^۳

محیط‌های نیمه جامد نیز وجود دارد. که میزان آگار آن نسبت به محیط‌های جامد کمتر است ($0.5 - 0.2$ در صد). مانند: "SIM" این نوع محیط‌های کشت برای مشاهده حرکت باکتری‌ها استفاده می‌شود. به محیط کشت جامد ریخته شده در لوله یا بطری کوچک، که هنگام جامد شدن، به حالت شیبدار نگهداری می‌شوند "اسلنت" گفته می‌شود چنانچه محیط کشت در ته ظروف ریخته شود به آن "بات" گفته می‌شود.



شکل ۱۷- محیط کشت نیمه جامد

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

-
- ۱- Shake Cultures
 - ۲- Liquid or broth media
 - ۳- Semi Solid media

۳-۵-۴-۳-۱ 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

۳-۵-۴-۲ 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

۳-۵-۴-۳ 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 پیتونه بافری"^۷

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

۳-۵-۴-۴ محیط کشت پیش غنی کننده^۸ و غنی کننده^۹

بطور کلی محیط کشت مایع به دلیل ترکیبات تشکیل دهنده آن، شرایط مطلوب خاصی برای رشد و تکثیر میکروارگانیسم را فراهم می‌کند. مانند: "تریپتون سوی براث"

۳-۵-۴-۱ محیط کشت غنی کننده انتخابی^{۱۰}

محیط کشت غنی کننده‌ای است که به میکروارگانیسم‌های خاص امکان رشد می‌دهد و به واسطه یک ماده مهار کننده، رشد تمام میکروارگانیسم‌ها بجز میکروارگانیسم مورد نظر را کاملاً یا تا حدودی مهار می‌کند. مانند: محیط کشت "پیتون سوی راپاپورت-واسیلادیس"^{۱۱}

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

۸- Pre- enrichment medium

۹- Enrichment medium

۱۰- Selective enrichment medium

۱۱- Rappaport-Vassiliadis (RV)

۳-۵-۴-۳-۴-۲ محیط کشت غنی کننده غیر انتخابی^۱

این محیط به طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها امکان رشد می‌دهد. مانند: "برین هارت اینفیوژن برات"

۳-۵-۴-۳-۴-۳ محیط کشت جداکننده^۲

محیط کشت جامد یا نیمه جامدی است که به میکروارگانیسم‌ها امکان رشد می‌دهد.

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

محیط کشتی که به میکروارگانیسم خاص و هدف امکان رشد می‌دهد و از رشد سایر میکروارگانیسم‌ها بطور

کامل یا قسمتی جلوگیری می‌کند. مانند: "XLD آگار"

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

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

۳-۵-۴-۳-۴-۶ محیط کشت انتخابی کروموژنیک^۵ / فلوروژنیک^۶

محیط کشت کروموژنیک / فلوروژنیک دارای ترکیبات انتخابی است که همه یا بخشی از فلور همراه با میکرو

ارگانیسم‌های هدف در نمونه را مهار می‌کند و منجر به تقویت رد یابی دقیق می‌شود مانند:

"MUG/EC"، "TBX آگار"

۳-۵-۴-۳-۴-۷ محیط کشت افتراقی^۷

محیط کشتی است که مشخصات و خصوصیت فیزیولوژیک یا بیوشیمیایی میکروارگانیسم‌ها را به منظور

شناسایی فراهم می‌کند. مانند: "ترجیتول^۷" و "TTC، TBX"

۳-۵-۴-۳-۴-۸ محیط کشت شناسایی^۸

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"^۹

۳-۵-۴-۳-۴-۹ محیط کشت شمارش^{۱۰}

محیط کشت انتخابی یا غیر انتخابی که برای شمارش میکروارگانیسم‌ها به کار می‌رود. مانند: "برد پارکر"^{۱۱}

"ایست اکسترکت آگار"^{۱۲}

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

۱- Non- selective enrichment medium

۲- Selective isolation medium

۳- Selective enrichment medium

۴- Non-selective isolation medium

۵- Chromogenic selective culture medium

۶- Fluorogenic selective culture medium

۷- Differential medium

۸- Identification medium

۹- Bile Esculin Azide Agar (Enterococcus Selective Agar)

۱۰- Enumeration medium

۱۱- Baird-Parker Agar

۱۲- Yeast Extract Agar

۳-۵-۴-۳-۴-۱۰ محیط کشت تاییدی^۱

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 آیرون آگار"^۲

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

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

محیط کشتی است که در دسته بندی‌های متعدد قرار می‌گیرد. مانند: "بلاد آگار"^۴ که یک محیط بازیابی است، می‌تواند به عنوان محیط کشت جداکننده و همچنین محیط کشت افتراقی برای رد یابی همولیز بکار رود. و یا "بافر پپتون واتر" که یک رقیق کننده است می‌تواند یک محیط کشت پیش‌غنی کننده نیز باشد.

۳-۵-۴-۳-۱۳ محیط کشت مرجع

محیط کشت غیر انتخابی مانند: "تریپتون سوی آگار"^۵ که برای ارزیابی مقایسه‌ای کنترل عملکرد محیط کشت بکار می‌رود.

۳-۵-۴-۴-۱ طبقه بندی محیط کشت بر اساس آماده سازی

۳-۵-۴-۴-۱-۱ محیط کشت آماده مصرف

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

۳-۵-۴-۴-۲ محیط کشت کامل شده

محیط کشتی است که برای تلقیح آماده باشد.

۳-۵-۴-۴-۳ 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 به کار می‌رود.

۳-۵-۴-۴-۴ 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 "تریپتوز سولفیت سیکلو سرین (TSC) آگار"، "برد پارکر آگار" یا "رابیت پلاسما فیبرینوزن (RFP) آگار"

۱- Confirmation medium

۲- Kligler Iron Agar (KIA)

۳- Medium containing neutralisers

۴- Blood agar

۵- Tryptic Soy Agar(TSA)

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

محیط کشتی است که به صورت خشک موجود است، و لازم است قبل از مصرف، به آن آب افزوده شده و فرآوری گردد.

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

محیط کشتی است که به وسیله آزمایشگاه میکروبیولوژی کاملاً از ترکیبات مجزای خود تهیه می شود.

۳-۶-۳ آماده سازی و استریلیزاسیون محیط های کشت در آزمایشگاه

۳-۶-۳-۱ 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/ml 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.

۳-۶-۳ pH

pH محیط کشت را با استفاده از pH متر اندازه گیری کنید در صورت لزوم، قبل از سترون سازی 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 بطوری که مطمئن شوید فضای کافی مناسب برای جلوگیری از سر رفتن محیط در طی فرآیند سترون سازی وجود ندارد.

۳-۶-۴ سترون سازی

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.

محیط‌های کشت تهیه شده را در روز آماده سازی سترون کنید. سترون سازی 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 حاوی 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 تولیدکننده 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 نشده یا شرایط دیگری در استاندارد خاصی مشخص نشده باشد، در یخچال در دمای $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 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 به وسیله 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 به حرارت هستند، باید بعد از اینکه دمای محیط به کمتر از 50°C رسید، به محیط 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. مکمل‌ها را در محیط کشت به آرامی و کامل مخلوط کرده و به سرعت 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 پلیت دیش‌ها بریزید تا حداقل ضخامت آن 3 mm گردد. برای مثال: در ظروف با قطر 20 mm ، معمولاً 18 mL تا 20 mL 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 72 h به طول می‌انجامد، یا دمای گرمخانه‌گذاری بیش از 40°C است، محیط کشت بیشتری ممکن است در پلیت‌ها ریخته شود. پلیت‌ها را به صورت 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 به محیط کشت و پلیت‌های آگاردار آماده شده تجارتي بهتر است طبق دستورالعمل تولیدکننده باشد.

۷-۳ آماده سازی نمونه

برای دستیابی توزیع یکنواخت میکروارگانیزمها، پیش از انجام آزمون، نمونه ها را با تکان دادن شدید کاملاً مخلوط کنید. و بسته به ماهیت نمونه و میزان آلودگی مورد انتظار، رقت های لازم را تهیه کنید. برای آزمون شمارش، رقت های دهدهی را با رعایت شرایط اسپتیک تهیه کنید.

یادآوری ۱- برای تهیه سوسپانسیون فرآورده های اسیدی، pH را نزدیک خنثی و برابر با 7.0 ± 0.5 تنظیم کنید. از آب پپتونه بافری و برای بیشتر فرآورده های با pH بیشتر یا برابر ۴/۵ استفاده کنید. برای فرآورده های اسیدی-تر (بیشتر یا برابر ۳/۵) می توان pH را با استفاده از آب پپتونه بافری با غلظت دو برابر تنظیم کرد، چنانچه این فرآورده ها برای اولین با آزمون می شوند بهتر است pH آنها بررسی شود تا اطمینان حاصل شود که به دامنه مورد نظر رسیده اند.

یادآوری ۲- برای اطلاعات بیشتر در باره تهیه فرآورده های اسیدی قبل از آزمون برای گروه های خاص میکروارگانیزم هایی مانند اسید دوست ها، به استاندارد ملی ایران ۴-۸۹۲۳ مراجعه کنید.

برای رقت های ۱۰ برابر، ۹ mL یا ۹۰ mL از محلول های رقیق کننده را به ارلن یا لوله های سترون اضافه کنید با انتقال یک حجم نمونه به ۹ حجم محلول رقیق کننده، رقت های ۱۰ برابر را تهیه کنید. سوسپانسیون اولیه را کاملاً مخلوط کنید.

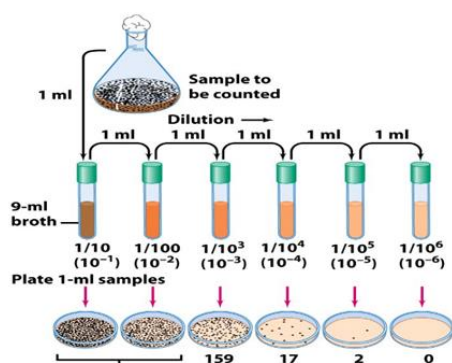
یادآوری ۱- توصیه می شود، دمای محلول رقیق کننده ها تقریباً برابر با دمای محیط آزمایشگاه باشد.

سوسپانسیون اولیه را کاملاً مخلوط کنید. (۱۰ بار با حرکت دست به شعاع ۳۰۰ mm به مدت زمان حدود ۷ sec بچرخانید) رقت بدست آمده 10^{-1} می باشد.

یادآوری ۲- برای شمارش اسپورها، بلافاصله پس از تهیه سوسپانسیون اولیه باید شوک حرارتی دهید، سپس به سرعت خنک کنید.

برای تهیه رقت های دهدهی بعدی، ۱ mL از سوسپانسیون اولیه را، با استفاده از پی پت سترون به ۹ mL محلول رقیق کننده 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} می باشد.

در صورت لزوم، به همین ترتیب و رقت های بعدی (10^{-3} ، ...) را تهیه کنید تا حدی که برای شمارش میکروارگانیزم ها مناسب باشند. مراقب باشید، پی پت را بیش از ۱ cm داخل سوسپانسیون اولیه فرو نکنید و از تماس پی پت حاوی سوسپانسیون اولیه با محلول رقیق کننده سترون جلوگیری کنید. هنگام آماده سازی رقیق کننده سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری بعدی، زمان بین پایان آماده سازی تا لحظه تماس ماده تلقیحی با محیط کشت یا آبگوشت غنی کننده نباید بیش از ۴۵ min باشد.



شکل ۱۸- سوسپانسیون اولیه و رقت ها اعشاری بعدی

۳-۷-۱ روش های کشت در میکروبیولوژی

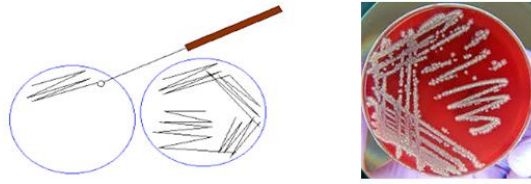
کشت در پلیت به سه روش قابل انجام است.

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

۳-۷-۱-۱ کشت خطی

در این روش از محیط پیش ریخته استفاده می شود. به این ترتیب که ابتدا به وسیله یک حلقه کشت سترون شده مقداری از کلنی باکتری را برداشته و آن را روی سطح محیط پیش ریخته بصورت خط های موازی و در چند جهت کشیده می شود. در کشت های خطی برای بدست آوردن کلنی های تک، پلیت را به ۴ قسمت تقسیم می شود و با نوک حلقه کشت که محتوی کلنی باکتری است، به صورت خط های 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 می شود. خصوصیت این روش این است که وقتی خطوط موازی را روی سطح محیط می کشید به ترتیب از تراکم باکتری ها کاسته می شود و در انتهای خط، تراکم باکتری بسیار کمتر خواهد بود تا جایی که در منطقه چهارم دسترسی به کلنی های تک وجود خواهد داشت. که کلنی خالص نامیده می شود. در مورد محیط های کشت باکتریایی که بصورت مایع می باشند برای انجام کشت خطی روی محیط پیش ریخته فقط یکبار حلقه کشت از سو سپانسیون میکروبی برداشته، روی محیط کشت از پیش ریخته قرار داده و بصورت خطوط موازی در چند جهت کشیده می شود.

۱- Pour plate
۲- Surface plate
۳- Streak plate



شکل ۱۹- کشت خطی

۳-۷-۱-۲ 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 ۰/۱ mL تا ۵ mL است. رقت را باید به گونه‌ای انتخاب کرد که تعداد مورد انتظار کلنی‌های تیپیک تشکیل شده روی پلیت‌هایی با قطر ۹۰ mm تا ۱۰۰ mm بین ۱۰ تا ۱۵۰ کلنی باشد. تعداد کل کلنی‌های تیپیک و غیر تیپیک روی پلیت باید کمتر از ۳۰۰ کلنی باشد.

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

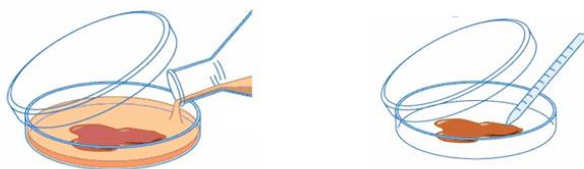
محیط کشت مورد استفاده را در حمام آب جوش ذوب کنید از سایر فرآیندهای مناسب مانند: قرار دادن در جریان بخار آزاد اتوکلاو و یا ماکروویو و سایر فرآیندهای مناسب که ترکیب دما و زمان آن برای آماده سازی محیط کشت، صحه گذاری شده است نیز می‌توانید استفاده کنید از حرارت دادن زیاد محیط کشت خودداری کنید و آن را به محض ذوب شدن از حمام خارج کنید و محیط کشت ذوب شده را در حمام آب با دمای ۴۵°C قرار داده تا دمای آن به ۴۵°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 ۴ 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 به گونه‌ای بیافزایید که ایجاد شوک حرارتی به حداقل برسد.

به طور کلی برای یک ۱ mm تا ۲ mm آزمون مقدار ۱۵ mm تا ۲۰ mm محیط کشت سترون که حرارت آن به حدود ۴۵°C رسیده، استفاده می‌شود. برای حجم‌های بیشتر آزمون، مقدار محیط کشت را بر همین اساس تنظیم کنید. سپس با حرکات دورانی به صورت ۸ 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 ۲۰- کشت پورپلیت

۳-۷-۱-۲-۱ کشت های 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.

۳-۷-۱-۳ 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 سودوموناس^۳) و فرآورده‌هایی که داری ذرات کوچکی هستند که تشخیص آنها از کلنی‌های تشکیل شده در کشت آمیخته به‌سختی 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 به‌عنوان 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 ۰/۱mL تا ۰/۵mL باشد. رقت را باید به‌گونه‌ای انتخاب کرد که در آن تعداد مورد انتظار کلنی‌های تشکیل شده بین ۱۰ تا ۱۵۰ کلنی تیپیک باشد. تعداد کل کلنی‌های تیپیک و غیر تیپیک روی پلیت باید کمتر از ۲۰۰ کلنی باشد.

یاد آوری ۱- تعداد کل کلنی‌های قابل شمارش، به‌اندازه کلنی‌ها بستگی دارد و برای کلنی‌های بزرگتر تعداد کلنی‌ها ممکن است کاهش یابد.

یاد آوری ۲- توجه داشته باشید که هنگام انجام کشت سطحی باید سطح محیط خشک باشد.

۱-Heat-sensitive organisms

۲-Psychrotrophic

۳-Pseudomonas spp.

پلیت‌های دارای حدود ۱۵mL محیط کشت را آماده و نشانه گذاری کنید و در صورت لزوم سطح محیط کشت پیش از استفاده خشک می‌شود. معمولا ۰/۱mL از آزمایش (فرآورده‌های مایع) و یا ۰/۱mL از سو سپازسیون 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. هنگام تهیه محیط کشت به صورت پیش ریخته، ممکن است بخار آب روی درب پلیت و سطح محیط جمع شود.



شکل ۲۱- کشت سطحی

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 بی‌مورد 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.

ث- در عمل پلیت‌ها را با قرار دادن در دمای تا ۲۵°C تا ۵۰°C به گونه‌ای 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 زمان ۳۰ min تا ۶۰ 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.

۱- Laminsr-flow safety cabinet

۳-۸ رنگ آمیزی

۳-۸-۱ رنگ آمیزی گرم

۳-۸-۱-۱ تهیه گسترش روی لام:

ابتدا از نمونه باکتری یک گسترش روی لام تهیه شود.

۳-۸-۱-۲ رنگ آمیزی با کریستال ویوله:

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

۳-۸-۱-۳ 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 به آرامی به مدت چند ثانیه سطح روی گسترش را شستشو شود.

۳-۸-۱-۴ مرحله اضافه کردن محلول ید:

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

۳-۸-۱-۵ مرحله شستشو:

پس از سپری شدن مدت زمان ۱ min ، در حالیکه لام را به صورت مایل نگهداشته‌اید با استفاده از آب مقطر به آرامی به مدت چند ثانیه سطح روی گسترش را شستشو دهید.

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

در حالیکه لام را با زاویه ۴۵ درجه نگهدارید بعد با استفاده از محلول رنگ بر الکل - استن با سرعت آن را بی رنگ کنید. دقت کنید مرحله بی رنگ سازی بیش از اندازه نباشد. بعد از آن لام را با سرعت بشوئید. این عمل، بی رنگ 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 ۱۰ sec 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- Iodine

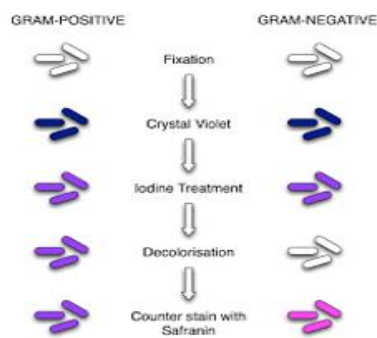
۱- میله ای (باسیل) گرم مثبت ۲- میله ای گرم منفی ۳- کوکوس (گرد) گرم مثبت ۴- کوکوس گرم منفی ۵- باکتری‌های بدون واکنش به رنگ آمیزی گرم.



شکل ۲۲- مراحل روش رنگ آمیزی

یادآوری نکات مهم:

- حرارت بیش از اندازه هنگام تثبیت گسترش باعث پاره شدن دیواره سلولی باکتری شده بنابراین 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، بصورت گرم منفی دیده می‌شود.
- اگر گسترش ضخیم باشد هنگام مرحله بی رنگ 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 رنگ‌آمیزی 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 d 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.



شکل ۲۲ - مراحل روش رنگ آمیزی

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 رویت 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 به روی 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 به بخار شدن کرد شعله را کنار ببرید همین که تبخیر متوقف شد دوبار کار را تکرار کنید و نگذارید رنگ بجوشد. مدت زمان ۳ min تا ۵ min به ترتیب 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. به‌موازات سرد شدن لام به‌اضافه کردن رنگ ادامه دهید زیرا رنگ هنوز در حال تبخیر است.

۳-۸-۲-۳ مرحله شستشو:

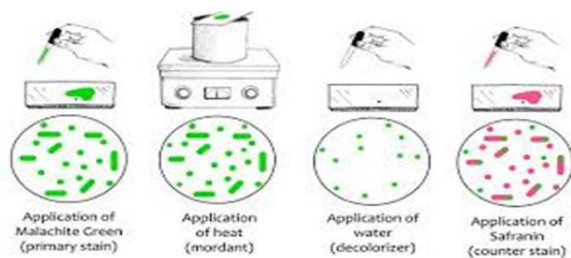
رنگ اضافی روی لام را خالی کرده در حالیکه لام را به صورت مایل نگهداشته‌اید با استفاده از آب مقطر به آرامی به مدت ۳۰ sec سطح روی گسترش را شستشو دهید.

۳-۸-۲-۴ رنگ آمیزی با سافرانین:

سطح گسترش میکروبی را با رنگ سافرانین به مدت زمان ۱ min بیوشانید.

۳-۸-۲-۵ مرحله شستشو:

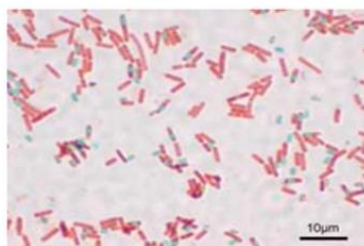
رنگ اضافی روی لام را خالی کرده و در حالیکه مایل نگهداشته‌اید با استفاده از آب مقطر به‌آرامی به مدت زمان ۳۰ sec سطح روی گسترش را شستشو دهید.



شکل ۲۴- مراحل روش رنگ آمیزی

۳-۸-۲-۶ مشاهده و تفسیر:

در مشاهده میکروسکوپی لام رنگ آمیزی شده، اسپورها گرد بیضی به رنگ سبز مشاهده می-شوند. و سلول های رویشی، قرمز دیده می-شوند. چون هاگ پوشش مقاومی است که در برابر نفوذ رنگ مقاومت می-کند بنابراین در رنگ آمیزی معمولی می-توان 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 ۲۵-اسپور

۴ نمونه برداری

نمونه هایی که به آزمایشگاه ارسال می-شود، 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، نمونه ها باید در شرایطی نگه داری شوند که امکان رشد میکروارگانیسم ها در آن وجود نداشته باشد. برای کسب آگاهی های بیش تر از شرایط کلی نمونه برداری و نگه داری نمونه، به منظور انجام آزمون های میکروبیولوژی، به استاندارد ملی ایران شماره ۲۰۸۳۴، مراجعه کنید.

یادآوری ۱- 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 نمونه ها، سپری شدن تاریخ مصرف، عدم وجود استاندارد میکروبی، قابلیت انجام آزمون میکروبیولوژی را دارا نبوده و به ارسال کننده عودت داده می-شود.

یادآوری ۲- اصول نمونه برداری، حمل و نقل و آماده سازی نمونه آزمایشگاهی فرآورده های خام، دو کلاسه و سه کلاسه می-باشد.

۴-۱ نمونه برداری دو کلاسه:

در این روش نمونه برداری از سه فاکتور n ، c ، m استفاده می شود. در این روش معیار میکروبیولوژی، m می باشد در صورتی که هر ویژگی میکروبی ارزشی کمتر از m داشته باشد و تعداد واحدهای معیوب کمتر از c باشد، قابل قبول است.

۴-۲ نمونه برداری سه کلاسه:

در این روش نمونه برداری، علاوه بر از سه فاکتور n ، c ، m از فاکتور M نیز استفاده می شود. اساس این روش بر شمارش ما بین m و M است و ارزش های مابین m و M در صورتی که c صفر نباشد قبول است و بالاتر از M غیر قابل قبول است.

n - عبارت است از تعداد واحد نمونه هایی که مورد آزمایش قرار می گیرد.

c - بیشترین واحدهای معیوب (نقص دار) قابل اغماض می باشد در مورد میکروارگانیسم هایی که وجود آنها در ماده غذایی یا فرآورده، خطر آفرین است c برابر صفر می باشد (این فاکتور بسته به تعداد کل نمونه ها، نوع عیب و سطح کیفیت قابل پذیرش تعیین می گردد).

m - معیار میکروبیولوژی است که هر ویژگی با ارزش برابر یا کمتر از آن قابل قبول است. در مورد میکروارگانیسم های بیماری زا m برابر صفر است.

M - معیار میکروبیولوژی است که حداکثر آستانه پذیرش هر ویژگی میکروبی را نشان می دهد و هر ارزش برابر یا بالاتر از M غیر قابل قبول است. این معیار در مورد میکروارگانیسم هایی که وجود تعداد کمی از آنها در مواد غذا برای سلامتی مخاطره آمیز نمی باشد به کار می رود و برای این میکروارگانیسم ها ارزش های ما بین m و M قابل قبول می باشد.

۵ روش‌های آزمون میکروبیولوژی کنسانتره، پوره، پالپ و تکه‌های میوه و سبزیجات

روش‌های میکروبیولوژی انواع آب میوه و آب سبزی تغلیظ شده (کنسانتره) و پوره، پالپ و تکه های میوه و سبزیجات، برچه در بسته بندی اسپتیک و غیر اسپتیک در جدول‌های ذیل آورده شده است:

جدول ۳- ویژگی‌های میکروبیولوژیک انواع آب میوه و آب سبزی تغلیظ شده (کنسانتره)

ردیف	نوع میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	باکتری‌های هوازی	استاندارد ملی ایران شماره ۱- ۵۲۷۲
۲	باکتری‌های مقاوم به اسید	استاندارد ملی ایران شماره ۳۸۴۵
۳	کپک و مخمر	استاندارد ملی ایران شماره ۱- ۱۰۸۹۹ و ۲- ۱۰۸۹۹

جدول ۴- ویژگی‌های میکروبیولوژیک انواع پوره، پالپ و تکه های میوه و سبزیجات، در بسته بندی اسپتیک و غیر اسپتیک

ردیف	نوع میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	باکتری‌های هوازی	استاندارد ملی ایران شماره ۱- ۵۲۷۲
۲	باکتری‌های مقاوم به اسید	استاندارد ملی ایران شماره ۳۸۴۵
۳	کپک و مخمر	استاندارد ملی ایران شماره ۱- ۱۰۸۹۹ و ۲- 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.

ب-۱ اساس روش جستجو

برای تسهیل در احیاء میکروارگانیزم‌های تحت تنش قرار گرفته در فرآورده، نمونه‌ها معمولاً در یک محیط آبگوشت غنی کننده منتقل می‌شوند. به این ترتیب، تعداد میکروارگانیزم‌ها، بدون خطر ممانعت از رشد و تکثیر بوسیله ترکیبات انتخابی موجود در محیط کشت انتخابی / افتراقی افزایش می‌یابد.

ب-۱-۱ برای جدا سازی روی محیط کشت جامد انتخابی / افتراقی کشت داده می‌شود. از کلنی‌های به دست آمده روی سطح محیط کشت جامد برای انجام آزمون‌های تاییدی مناسب برای شناسایی استفاده می‌شوند.

۶ محیط‌های کشت و رقیق‌کننده‌ها

دستورالعمل‌های کلی برای تهیه محلول‌های رقیق‌کننده و محیط‌های کشت در استاندارد ملی ایران شماره‌های ۱۰۳۴۱۴-۱، ۸۹۲۳-۴، ۸۹۲۳-۴ و ۹۸۹۹ تعیین شده است.

جدول ۵ - فهرست رقیق‌کننده‌ها و محیط‌های کشت

ردیف	نام مواد
۱	Plate Count Agar (PCA)
۲	Orange Serum Agar (OSA)
۳	Rogosa and Sharpe (MRS)
۴	Dichloran-rose Bengal-Chloramphenicol-Agar (DRBC)
۵	Dichloran ۱۸% mass fraction glycerol Chloramphenicol agar (DG۱۸)
۶	Peotone salt solution & Bromocresol purple (PSS _{BCP})

۷ روش اجرای آزمون

۷-۱-۱ 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 اطلاعات بیشتر در باره تهیه فرآورده‌های اسیدی قبل از آزمون برای گروه‌های خاص میکروارگانیزم‌هایی مانند اسید دوست‌ها، به استاندارد ملی ایران ۴-۸۹۲۳ مراجعه کنید.

- برای تهیه آزمون حد اقل از دو بسته نمونه استفاده کنید.

- محتویات درون بسته را به وسیله تکان دادن و وارونه کردن آن به‌طور کامل مخلوط کنید.
یادآوری - برای شمارش اسپورها، بلافاصله پس از تهیه سوسپانسیون اولیه باید شوک حرارتی دهید، سپس به‌سرعت خنک کنید.

۲-۱-۷ کشت میکروبی

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

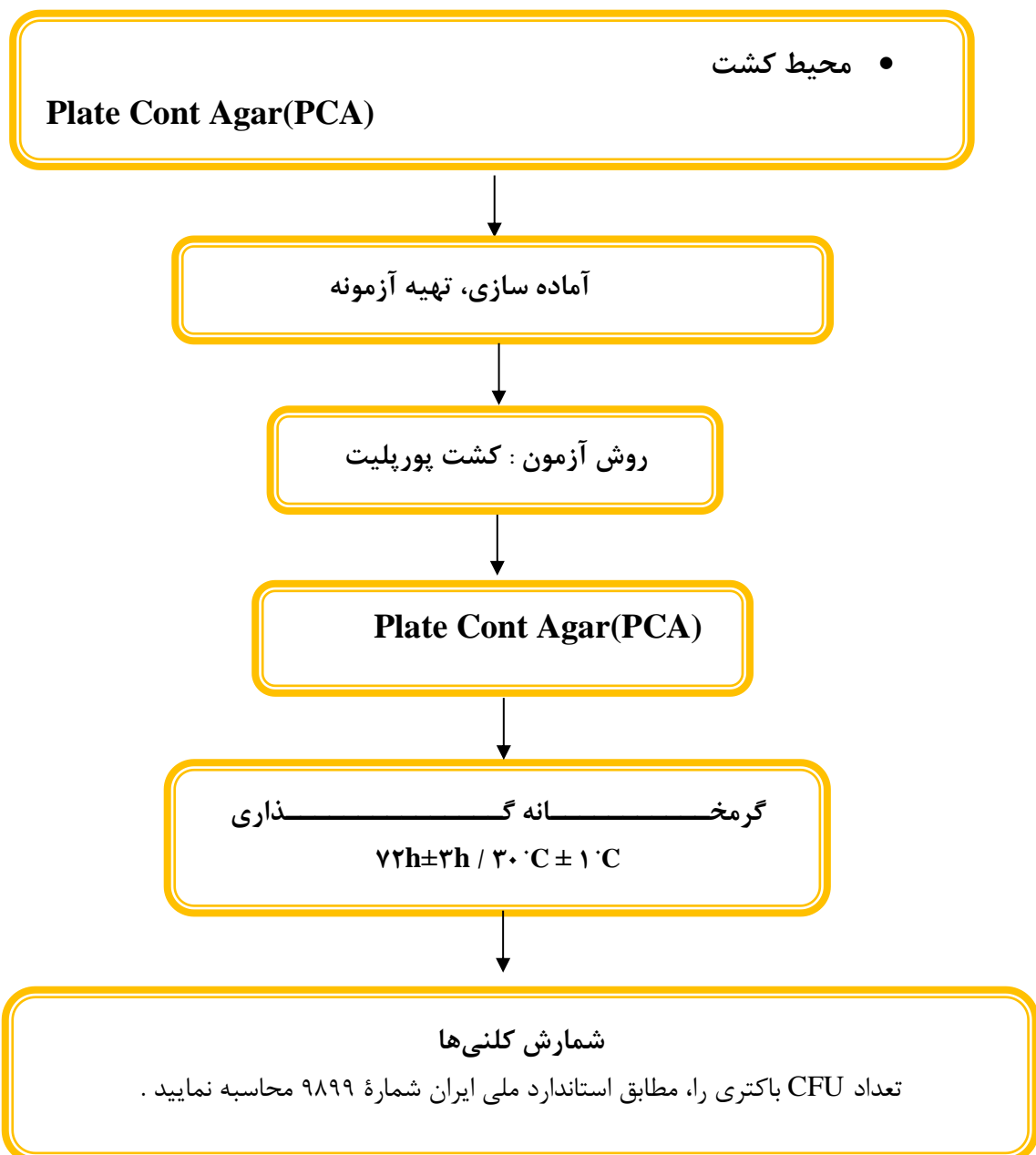
۳-۱-۷ گرمخانه گذاری

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

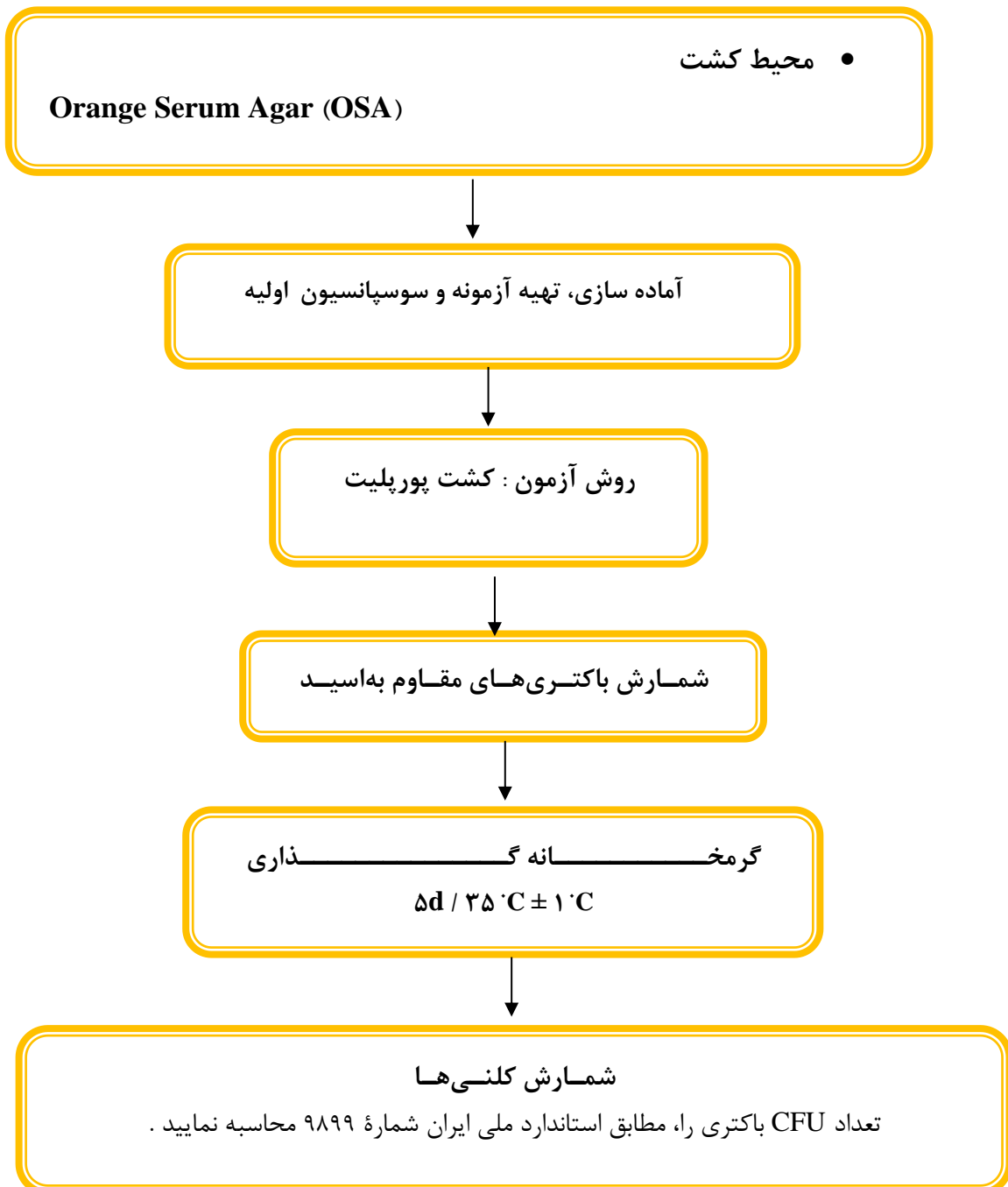
۲-۷ میکروارگانسیم‌های هوازی

۱-۲-۷ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۵۲۷۲، میکروبیولوژی زنجیره غذایی - روش جامع برای شمارش میکروارگانسیم‌ها - قسمت ۱ - شمارش کلنی در ۳۰ درجه سلسیوس با استفاده از روش کشت آمیخته

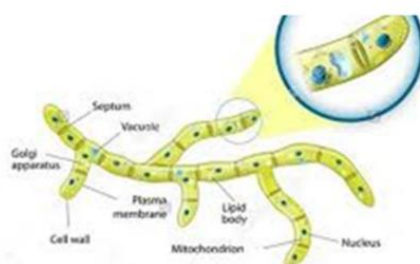
اولترین روش جهت نشان دادن کیفیت میکروبی محصول، شمارش تمامی باکتری‌هایی که بعد از گرمخانه گذاری در شرایط هوازی در دمای 30°C ، قابلیت رشد و تشکیل کلنی در محیط کشت جامد را دارند، است و مبنای قضاوت بهداشتی یک محصول تولید شده می‌باشد ولی ارزش تشخیصی آن محدود است. این روش در تعیین شرایط بهداشتی و کنترل تولید، شرایط حمل و نقل و نگهداری محصول، تعیین میزان آلودگی ماده اولیه یا تشخیص احتمالی آلودگی در ضمن تولید حائز اهمیت است.



۷-۳-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۳۸۴۵، ویژگی‌ها و روش‌های آزمون میکروبیولوژی نوشابه‌های گازدار تمامی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، هوازی و کم هوازی که در محیط کشت با pH=۲ تا pH=۵، بعد از گرمخانه گذاری در دمای ۳۰ °C، قابلیت رشد و تکثیر داشته و در محیط کشت جامد مانند orange serum agar تشکیل کلنی می‌دهند.



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،^۱ 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 آسپرژیلوس^۵ می‌باشند. گروهی از کپک‌ها دارای اگزوتوکسین^۶ هستند ترشح اگزوتوکسین کپک‌ها غالباً در حرارت بالاتر از ۱۰°C صورت می‌گیرد.



شکل ۲۶- هیف و میسیلیوم

۷-۴-۲ مخمرها^۷

میکروارگانسیم‌های هوازی مزوفیل و یکی از گروه‌های قارچ‌های فاقد رشته و تک سلولی هستند و بوسیله جوانه زدن تکثیر پیدا می‌کنند مخمرها در کارخانجات تخمیر صنعتی، نانواپی، کارخانجات تقطیر به کار می‌روند این میکروارگانسیم 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 بصورت تقسیم دوتائی می‌باشد. بیشتر گونه‌های آن تخمیرکننده و غیر بیماری‌زا هستند.

۱-Penicillium

۲-Mucor

۳-Rhizopus

۴-Fusarium

۵-Aspergillus

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

۷-Yeast

۳-۴-۷ شمارش کپک و مخمر

۱-۳-۴-۷ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۱۰۸۹۹، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جامع برای شمارش کپک‌ها و مخمرها - قسمت اول: روش شمارش کلنی در فرآورده‌های با فعالیت آبی (a_w)^۱ بیشتر از ۰/۹۵

محیط کشت

- **Dichloran-rose Bengal-Chloramphenicol-Agar(DRBC)**

تهیه محیط کشت:

- **دی کلران رز بنگال کلرام فنیکل آگار**

محیط کشت دی کلران رز بنگال کلرام فنیکل آگار را طبق دستورالعمل سازنده آماده کنید. pH محیط را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون شدن، برابر $5/6 \pm 0/2$ شود. ۱۰ mL از محلول ۱٪ کلرامفنیکل در اتانول را به محیط پایه اضافه کنید و مخلوط کنید. محیط کشت را در اتوکلاو با دمای $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ به مدت ۱۵ min سترون نمایید. و در مقادیر ۱۵ mL در پتری دیش توزیع کنید. به منظور پیشگیری از رشد بیش از حد کپک‌های خانواده موکوراسه روی سطح پلیت‌ها، افزودن ترجیتول به مقدار ۱ mL به ازاء هر ۱ L محیط کشت توصیه می‌شود.

- افزودن اختیاری عناصر کمیاب:

کپک‌ها برای نمایش خصوصیات کامل ریخت شناسی به ویژه رنگدانه‌های خود نیاز به عناصر کمیاب دارند که ممکن است در محیط DRBC موجود نباشد برای شناسایی کپک‌ها و مخمرها در این محیط کشت، محلول $\text{SO}_4\text{Zn}, 7\text{H}_2\text{O}$ ۱٪ و $\text{SO}_4\text{Cu}, 5\text{H}_2\text{O}$ ۰/۵٪ را به مقدار یک mL به ازاء هر ۱ L محیط کشت، پیش از سترون کردن به آن بیفزایید.

- افزودن اختیاری ترجیتول:

به منظور پیشگیری از رشد بیش از حد کپک‌های خانواده موکوراسه روی سطح پلیت‌ها، افزودن ترجیتول به مقدار ۱ mL به ازاء هر ۱ L محیط کشت توصیه می‌شود.

^۱-(Water activity a_w) فعالیت آبی معیاری است از آب قابل استفاده برای رشد میکرو ارگانیسم‌های درون مواد غذایی و عبارت است از نسبت فشار بخار آب غذا به فشار بخار آب خالص در شرایط مساوی از نظر فشار و دما

- تهیه ترکیبات اختیاری محیط کشت دی کلران رز بنگال کلرام فنیکل آگار :

- افزودن اختیاری کلرو سیکلین هیدرو کلراید

برای جلوگیری از رشد بیش از حد باکتری‌ها، افزودن کلرامفنیکل و کلرو تتراسیکلین توصیه می‌شود. محیط پایه را با ۵۰ mg/l تهیه کنید و در حجم‌های ۱۰۰ mL توزیع و سترون کنید. محلول ۰/۱٪ کلرو تتراسیکلین هیدرو کلراید در آب مقطر را به صورت تازه تهیه کنید و توسط صافی غشایی سترون کنید. بلافاصله پیش از استفاده، ۵ mL از این محلول را در شرایط سترون به ۱۰۰ mL محیط کشت پایه اضافه کنید و در پتری‌دیش‌ها توزیع کنید. استفاده از جنتامایسین توصیه نمی‌شود زیرا ممکن است که سبب ممانعت از رشد برخی از مخمرها شود. (۱ mL به ازاء هر ۱ L محیط کشت توصیه می‌شود.)

آزمون عملکرد برای تضمین کیفیت محیط کشت

DRBC یک محیط کشت جامد است قابلیت رشد و انتخابی بودن آن باید طبق استاندارد

آماده سازی، تهیه نمونه و سوسپانسیون اولیه و رقت

- ✓ 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 بهم بزنید.
- ✓ روش کشت سطحی به دلیل برقراری حداکثر تماس سلول‌ها با اکسیژن هوا و نیز پیشگیری از هر گونه مخاطره ناشی از غیر فعال شدن پروپاگول‌های قارچی در اثر تماس با محیط کشت گرم، نتایج دقیق‌تری را ارائه می‌کند. نتایج حاصل می‌تواند بر حسب نوع قارچ‌ها، متغیر باشد.

روش آزمون کشت سطحی

تلقیح از رقت‌های مناسب روی سطح پلیت‌های از پیش ریخته

برای سهولت در شمارش جمعیت اندک کپک‌ها و مخمرها، می‌توان مقدار ۱ mL از آزمایشه یا رقت اولیه (فرآورده مایع) یا رقت اولیه (سایر فرآورده‌ها) را به سه پلیت دارای محیط کشت از پیش ریخته DRBC مجزا هر کدام به مقدار تقریبی ۰/۳۳ mL انتقال داد. برای پخش کردن روی محیط کشت، می‌توان از یک پخش کننده برای پلیتهای تلقیح شده با رقت‌های متوالی استفاده نمود، به شرطی که پخش کردن از رقت‌های بالاتر شروع شود.

با استفاده از پی پت سترون مقدار ۰/۱ mL از آزمایشه (فرآورده مایع) یا ۰/۱ mL از سوسپانسیون اولیه (سایر فرآورده‌ها) را به یک پلیت دارای محیط کشت از پیش ریخته DRBC انتقال دهید در صورت لزوم با یک پی پت سترون دیگر مقدار ۰/۱ mL از اولین رقت اعشاری (فرآورده مایع)، یا ۰/۱ mL از رقت ۱۰^{-۲} (سایر فرآورده‌ها) را به یک پلیت دیگر دارای محیط کشت DRBC تلقیح کنید.

Dichloran-rose Bengal-Chloramphenicol-Agar(DRBC)

- پلیتهای را به صورت هوازی، با درپوش بالا و ایستاده در انکوباتور قرار دهید.
- در صورت لزوم، پلیتهای را برای مدت زمان ۱ d تا ۲ d معرض نور غیر مستقیم روز قرار دهید .
- اگر احتمال حضور *Zygomycetes* وجود داشته باشد، پلیتهای را به مدت زمان ۱۰ d گرمخانه گذاری کنید.
- توصیه می‌شود که پلیتهای، در یک کیسه پلاستیکی در باز قرار داده شوند تا از انتشار کپک‌ها از داخل پلیت ها سبب آلودگی انکو باتور نشود.

گرمخانه گذاری

۲۵ °C / d (۵ تا ۷)

-اسپوره‌های کپک‌ها به راحتی در هوا پخش می‌شوند لذا، پلیتهای را با احتیاط جابجا کنید تا از پیدایش کلنی های اقماری جلوگیری شود در غیر این صورت شمارش، غیر واقعی و بالا خواهد بود.

۱-Xeromyces bisporus

- کلنی‌های مخمرها و کلنی‌ها یا پروپاگول‌های کپک‌ها را در صورت نیاز، جداگانه شمارش کنید.

شمارش کلنی‌ها

تعداد CFU قارچها را، مطابق استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ محاسبه نمایید.

برای شمارش کپک‌ها و مخمرها، می‌توان از روش پور پلیت (آمیخته) نیز استفاده کرد.

روش آزمون

آماده سازی، تهیه آزمون و سوسپانسیون اولیه، رقت و کشت پور پلیت

Dichloran-rose Bengal-Chloramphenicol-Agar (DRBC)

گرمخانه گذاری

$25^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C} / (5\text{ تا }7)\text{d}$

✓ به منظور افزایش رطوبت داخل انکوباتور، یک بشر آب مقطر داخل آن قرار دهید. گرمخانه گذاری بیشتر از ۵ d بستگی به دما و میزان رشد دارد.

✓ در صورتی که انتظار دارید تعداد زیادی میکروارگانیسم مورد شمارش قرار گیرند، برای دستیابی به شمارش کلنی‌ها، رقت‌های بیشتری را کشت دهید.

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 را، مطابق استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ محاسبه کنید.

۷-۴-۵ کپک‌ها و مخمرها در فرآورده‌های با فعالیت آبی (aw) کمتر از ۰/۹۵
 ۷-۴-۵-۱ میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جامع برای شمارش کپک‌ها و مخمرها - قسمت دوم: روش شمارش کلنی در فرآورده‌های با فعالیت آبی (aw) کمتر از ۰/۹۵
 اغلب کپک‌های خشکی دوست و مخمرهای غلظت دوست^۳ در فرآورده‌های دارای فعالیت آبی مساوی یا کمتر از ۰/۹۵ مانند میوه‌های خشک، کیک، مربا، گوشت خشک شده، ماهی شور، غلات و فرآورده‌های آنها، انواع آرد، مغزهای خوراکی، ادویه و چاشنی، عامل فساد می‌باشند. تقریباً تمام انواع میکروارگانیسم‌های غلظت دوست شناخته شده، از گونه‌های ساکارومایسس می‌باشند فعالیت آبی مناسب برای میکروارگانیسم‌های اسموفیل که معمولاً در صنایع غذایی اهمیت دارند، در جدول ۱۰ نوشته شده است.

جدول ۶- میکروارگانیسم‌های با کمترین فعالیت آبی

میکروارگانیسم	کمترین فعالیت آبی (aw)
<i>Saccharomyces rouxii</i>	۰/۶۲
<i>ZygoSaccharomyces bailii</i>	۰/۸۰
<i>Debaryomyces</i>	۰/۸۳
<i>Wallemia sebi</i>	۰/۸۷
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	۰/۹۰

• محیط کشت

Dichloran ۱۸% mass fraction glycerol Chloramphenicol agar (DG۱۸)

تهیه محیط کشت:

• دی کلران ۱۸٪ گلیسرول آگار (DG۱۸)

محیط کشت دی کلران ۱۸٪ گلیسرول آگار را طبق دستورالعمل سازنده آماده کنید. pH محیط را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون شدن، برابر $۵/۶ \pm ۰/۲$ شود. ۱۰mL از محلول ۱٪ کلرامفنیکل در اتانل را به محیط پایه اضافه کنید و مخلوط کنید. محیط کشت را در اتوکلاو با دمای $۱۲۱^{\circ}\text{C} \pm ۱^{\circ}\text{C}$ به مدت ۱۵ min سترون نمایید و در مقادیر ۱۵mL در پلیت توزیع کنید

۱- Water activity (aw)

۲ - قارچ‌هایی که قادرند در فعالیت آبی مساوی یا کمتر از ۰/۹۵ رشد کنند .

۳- Osmophilic organisms

• افزودن ترکیبات اختیاری محیط کشت دی کلران ۱۸٪ گلیسرول آگار (DG۱۸)

- افزودن اختیاری کلرو سیکلین هیدرو کلراید

برای جلوگیری از رشد بیش از حد باکتری‌ها، افزودن کلرامفنیکل به مقدار ۵۰ mg/L و کلروتتراسیکلین به مقدار ۵۰ mg/L توصیه می‌شود.

محیط پایه را به مقدار ۵۰ mg/L تهیه کنید و در حجم‌های ۱۰۰ mL توزیع و سترون کنید. محلول ۰/۱٪ کلرو تتراسیکلین هیدرو کلراید در آب مقطر را به‌تازه تهیه کنید و توسط صافی غشایی سترون کنید. بلافاصله پیش از استفاده، ۵ mL از این محلول را در شرایط سترون به ۱۰۰ mL محیط کشت پایه اضافه کنید و در پلیت‌ها توزیع کنید. استفاده از جنتامایسین توصیه نمی‌شود زیرا ممکن است که سبب ممانعت از رشد برخی از مخمرها شود.

- افزودن اختیاری عناصر کمیاب به محیط کشت دی کلران ۱۸٪ گلیسرول آگار (DG۱۸):

کپک‌ها برای نمایش خصوصیات کامل ریخت‌شناسی به‌ویژه رنگدانه‌های خود نیاز به عناصر کمیاب دارند که ممکن است در محیط DG۱۸ موجود نباشد برای شناسایی کپک‌ها و مخمرها در این محیط کشت، محلول $SO_4Zn \cdot 7H_2O$ ۱٪ و $SO_4Cu \cdot 5H_2O$ ۰/۵٪ را به مقدار ۱ mL به ازاء هر ۱ L محیط کشت، پیش از سترون کردن به آن بیفزایید.

- آزمون عملکرد برای تضمین کیفیت محیط کشت

DG۱۸ یک محیط کشت جامد است قابلیت رشد و انتخابی بودن آن باید طبق استاندارد ملی شماره ۸۶۶۳ انجام گیرد



آماده سازی، تهیه آزمون و سوسپانسیون اولیه و رقت

✓ 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 میکروارگانسیم، سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها را به هم بزنید.

✓ روش کشت سطحی به دلیل برقراری حداکثر تماس سلول‌ها با اکسیژن هوا و نیز پیشگیری از هر گونه مخاطره ناشی از غیر فعال شدن پرو پیاگول‌های قارچی در اثر تماس با محیط کشت گرم، نتایج دقیق‌تری را ارائه می‌کند. نتایج حاصل می‌تواند بر حسب نوع قارچ‌ها، متغیر باشد.

روش آزمون کشت سطحی

تلقیح از رقت‌های مناسب روی سطح پلیت‌های از پیش ریخته

برای سهولت در شمارش جمعیت اندک کپک‌ها و مخمرها، می‌توان مقدار ۱ mL از آزمایشه یا رقت اولیه (فرآورده‌مایع) یا رقت اولیه (سایر فرآورده‌ها) را به سه پلیت مجزا هر کدام به حجم تقریبی ۰/۳۳ mL دارای محیط کشت از پیش ریخته DG۱۸ انتقال داد. برای پخش کردن روی محیط کشت، می‌توان از یک پخش کننده برای پلیت‌های تلقیح شده با رقت‌های متوالی استفاده نمود، به شرطی که پخش کردن از رقت‌های بالاتر شروع شود.

با استفاده از پی پت سترون مقدار ۰/۱ mL از آزمایشه (فرآورده مایع) یا ۰/۱ mL از سوسپانسیون اولیه (سایر فرآورده‌ها) را به یک پلیت دارای محیط کشت از پیش ریخته DG۱۸ انتقال دهید در صورت لزوم با یک پی پت سترون دیگر مقدار ۰/۱ mL از اولین رقت اعشاری (فرآورده مایع)، یا ۰/۱ mL از رقت ۱۰^{-۲} (سایر فرآورده‌ها) را به یک پلیت دیگر دارای محیط کشت DG۱۸ تلقیح کنید.

(Dichloran ۱۸% mass fraction glycerol chloramphenicol) agar

- پلیت‌ها را به صورت هوازی، با درپوش بالا و ایستاده در انکوباتور قرار دهید.
- اگر احتمال حضور زیرومایسیزیسپوروس^۱ وجود داشته باشد، پلیت‌ها را به مدت زمان ۱۰ d گرمخانه‌گذاری کنید.

۱- Xeromyces bisporus

گرمخانه گزاری

$(25 \pm 0.5)^\circ\text{C} / (5 \pm 7)\text{d}$

- اسپورهای کپکها به راحتی در هوا پخش می شوند لذا، پلیت‌ها را با احتیاط جابجا کنید تا از پیدایش کلنی های اقماری جلوگیری شود در غیر این صورت شمارش، غیر واقعی و بالا خواهد بود.

- کلنی های مخمرها و کلنی ها یا پروپاگول های کپکها را در صورت نیاز، جدا گانه شمارش کنید.

شمارش کلنی ها

تعداد CFU قارچها را در هر گرم نمونه را طبق مقدار میانگین ریاضی وزن داده شده، مطابق استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ محاسبه نمایید .

برای شمارش کپکها و مخمرها، می توان از روش پور پلیت (آمیخته) استفاده کرد .

آماده سازی، تهیه آزمون و سوسپانسیون اولیه و رقت

روش آزمون کشت پور پلیت

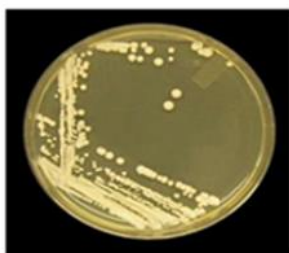
Dichloran ۱۸% mass fraction glycerol chloramphenicol agar

گرمخانه گزاری هوازی

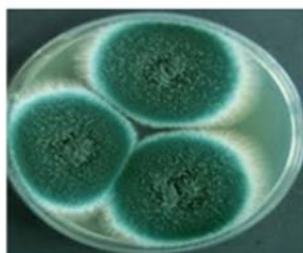
$25^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C} / (5 \pm 7)\text{d}$

به منظور افزایش رطوبت داخل انکوباتور، یک بشر آب مقطر داخل آن قرار دهید. گرمخانه گذاری بیشتر از ۵ d بستگی به دما و میزان رشد دارد.

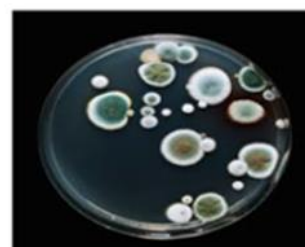
در صورتی که انتظار دارید تعداد زیادی باکتری مورد شمارش قرار گیرند می‌توانید رقت‌های لازم برای دستیابی به شمارش کلنی‌ها را کشت دهید.



شکل ۲۸- کلنی‌های مخمرها



شکل ۲۷- کلنی‌های کپک‌ها



خصوصیات کلنی مخمر

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

شمارش کلنی‌ها

تعداد CFU کپک و مخمر را در هر گرم نمونه را طبق مقدار میانگین ریاضی وزن داده شده، مطابق استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ محاسبه نمایید.

۸ بیان نتیجه آزمون

۸-۱ شمارش

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

m میانگین حسابی^۱ به‌دست آمده از دو پلیت در فرمول ۱ است،

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

\bar{x}_c میانگین ارزیابی شده^۲ شمارش به‌دست آمده از دو رقت متوالی در فرمول ۳ است،

مطابق فرمول‌های ۱، ۲ و ۳ تعداد میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه را محاسبه کنید:

$$N = \frac{m}{(V \times d)} \quad (1)$$

۱- Arithmetic mean

۲-Weighted mean

$$N = \frac{c}{(V \times d)} \quad (2)$$

$$N = \frac{\bar{x}_c}{(V \times d)} \quad (3)$$

که در این فرمول ها،

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 کلنی های شمارش شده روی یک پلیت ،

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

می شود :

$$\bar{x}_c = \frac{\sum c}{n_1 + 0.1n_2} \quad (4)$$

که در آن :

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

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

n_2 تعداد پلیت های شمارش شده برای رقت ۱ به ۱۰ از سوسپانسیون اولیه (یا دومین رقت شمارش شده)

می باشد.

نتیجه را تا دو رقم معنی دار گرد کنید.

۸-۲ صحه گذاری

۸-۲-۱ صحه گذاری شمارش

در صورتی که شمارش پلیت صحه گذاری حداقل ۵۰٪ شمارش پلیت شاهد باشد، محلول رقیق کننده و روش

مورد استفاده (کشت آمیخته یا کشت سطحی یا صافی غشایی) صحه گذاری شده است.

پیوست الف

استانداردهای مرتبط با میکروبیولوژی آب میوه و فرآورده‌های آنها

الف ۱ - استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹- راهنمای کلی برای آزمون‌های میکروبیولوژی

این استاندارد به‌حصول اطمینان از یکسان بودن روش‌های کلی برای انجام آزمون‌های میکروبیولوژی در آزمایشگاه‌هایی که استانداردها را پذیرفته‌اند کمک می‌کند. کاربرد این استاندارد، دستیابی به‌نتایج هماهنگ در آزمایشگاه‌های مختلف را تسهیل کرده و با پیشگیری از خطر عفونت، باعث حفظ سلامت کارکنان آزمایشگاه می‌شود. هنگام انجام آزمون‌های میکروبیولوژی مواد غذایی توجه به نکات زیر حائز اهمیت است:

- فقط میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه جداسازی یا شمارش شوند؛
- میکروارگانیسم‌های فوق‌آلودگی محیط نشوند.

به‌منظور دستیابی به‌موارد فوق‌باید تا حد امکان به‌بهداشت فردی توجه شود و روش‌هایی که از آلودگی‌های خارجی پیشگیری می‌کند به‌کار رود. در این استاندارد برای اقدامات احتیاطی در طول آزمون، مثال‌های کمی ارائه می‌شود. بنابر این داشتن اطلاعات کلی در زمینه روش‌های میکروبیولوژی و میکروارگانیسم‌ها ضروری است. همچنین انجام آزمون‌ها و شمارش میکروارگانیسم‌ها به روش صحیح داری اهمیت است.

از آن جایی که دستکاری نمونه‌ها هنگام آزمون، ممکن است به‌طور ناخواسته سبب آلودگی متقاطع شود، آزمون‌کننده باید صحت نتایج روش‌های خود را تصدیق کند. انجام اقدامات احتیاطی خاص نه‌تنها به‌دلایل بهداشتی بلکه برای حصول اطمینان از تجدیدی‌پذیری خوب نتایج ضروری است. تعیین اقدامات احتیاطی در همه شرایط امکان‌پذیر نیست، ولی این استاندارد حداقل اقدامات اصلی را که باید هنگام آماده‌سازی، سترون‌سازی و انبارش محیط‌های کشت و تجهیزات در نظر گرفته شود، تعیین می‌کند.

الف ۲ - استاندارد ملی ایران شماره ۸۶۰۰، نو شیدنی‌ها - کاهش و پیشگیری از آلودگی پاتولین در آب سیب و فرآورده‌های آن - آئین کار

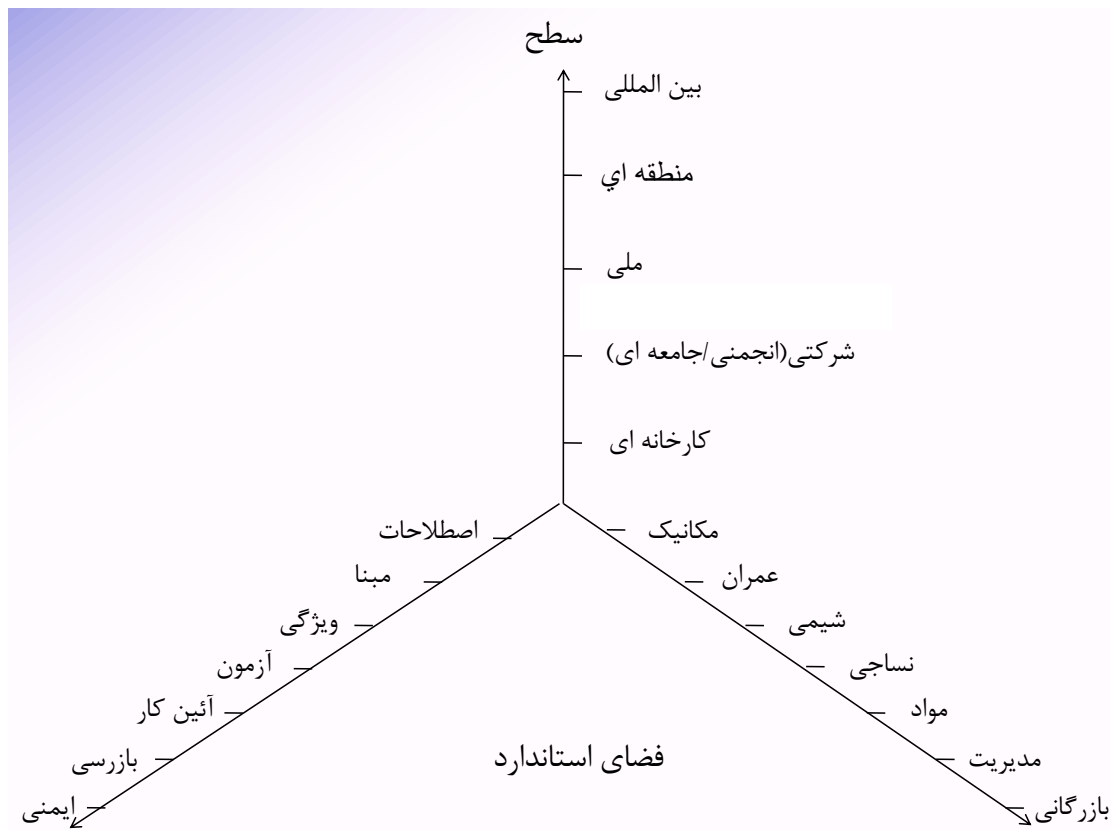
این استاندارد راهنمایی است که با در نظر گرفتن نیازهای خاص صنعت تولید آب سیب تهیه شده و رهنمودهای مربوط به‌راهکارهای خوب ساخت (GMP) را برای این فراورده ارائه می‌دهد. این راهنما توصیه‌های سازمانی و عملی در زمینه کشاورزی و عوامل تاثیرگذار بر کیفیت فراورده را ارائه می‌دهد

الف ۳ - استاندارد ملی ایران شماره ۱۴۷۲۳، آب میوه و آب میوه تغلیظ شده و نکتار میوه-آئین کار بهداشتی تولید

این استاندارد با در نظر گرفتن نیازهای خاص صنعت آب میوه و آب میوه تغلیظ شده و نکتار میوه‌ها تهیه شده و رهنمودهای مربوط به راهکارهای خوب ساخت (GMP) را برای فرآورده‌های فوق را می‌دهد. این راهنما توصیه‌های سازمانی و عملی در زمینه مدیریت عوامل فنی، اجرایی و کارکنان تاثیرگذار بر کیفیت فرآورده را ارائه می‌دهد و پیگیری فرآورده را از دریافت تا بارگیری و حمل، امکان پذیر می‌سازد. همچنین در استاندارد فوق راهکارهای تولید، کنترل، نگهداری، بارگیری و حمل فرآورده آب میوه و آب میوه تغلیظ شده و نکتار نوشته شده است و دستیابی به فرآورده‌ای منطبق با ویژگی‌های خاص را امکان پذیر می‌سازد.

پیوست ب انواع استاندارد

ب-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.



ب-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 مشترکاً 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- استانداردهای ویژگی

ب- استانداردهای 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 پ

مفاهیم مورد استفاده در کنترل کیفیت

- پ-۱- نمونه (Sample)
- یک یا چندین قلم، قطعه یا واحد که از یک جامعه یا مجموعه یا محموله انتخاب می شوند را نمونه گویند.
- پ-۲- حجم نمونه (Sample Size)
- مقدار مواد یا تعداد اقلام یا واحدهای تشکیل دهنده یک نمونه را، حجم نمونه گویند.
- پ-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.
- پ-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.
- پ-۵- درستی (Accuracy)
- نزدیکی نتیجه اندازه گیری یک کمیت با مقدار واقعی آن کمیت است.
- پ-۶- دقت (Precision)
- نزدیکی بین جواب های تکراری حاصل از چند آزمایش بر روی یک نمونه است.
- پ-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.
- پ-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.
- پ-۹- رواداری (Tolerance)
- حداکثر میزان انحراف قابل قبول برای یک کالا از اندازه خود (حداکثر خطای قابل قبول در یک اندازه گیری)

پیوست ت (اطلاعاتی)

ت-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.

ت-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

ت-۱-۲ 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:

ت-۲-۱-۱-۱-۱ 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.

ت-۲-۱-۲-۱-۲ 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.

ت-۲-۱-۳-۱-۳ 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 کارایی آن کالا را چندان کاهش نمی دهد. نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌ها به پیوست می باشد.

ت-۳-۱-۳ 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 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

ت-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.

ت-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.

ت-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 ث

نقایص بحرانی ، عمده و جزئی آزمون‌های میکروبیولوژی آب میوه‌ها و آب سبزیجات تغلیظ شده (کنسانتره) ،

پوره، پالپ و تکه‌های میوه و سبزیجات در بسته بندی های آسپتیک و غیر آسپتیک

طبق استاندارد ملی ایران شماره‌های ۶۳۳۲ و ۱۹۳۳۶

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