ریاست جمهوری
سازمان ملی استاندارد ایران

جزوه دوره کارآموزی

میکروبیولوژی شربت

شماره مدرک : ۶۲۲/۳۱/ج
تاریخ تصویب : ۱۳۹۸

تاریخ تجدید نظر:

شماره تجدید نظر:

این جزوه آموزشی صرفا 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 ا ستاندارد ایران به موجب بند یک مادۀ ۳ قانون ا صلاح قوانین و مقررات مؤ س سۀ ا ستاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفۀ تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین ا ستاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیـ سیون‌های فنی مرکب از کار شنا سان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤ س سات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری اســت که از مشــارکت آگاهانه و منصــفانۀ صــاحبان حق و نفع، شــامل تولیدکنندگان، مصــرف کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخ ص صی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیر دولتی حا صل می شود. پیش‌نویس ا ستانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی¬نفع و اع ضای کمیـ سیون‌های مربوط ار سال می شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتۀ ملی مرتبط با آن ر شته طرح و در صورت تصویب، به عنوان ا ستاندارد ملی (ر سمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس ا ستانداردهایی که مؤ س سات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی¬ صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند درکمیته ملی طرح، بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استانداردملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر ا ساس مقررات ا ستاندارد ملی ایران شمارۀ ۵ تدوین و در کمیتۀ ملی ا ستاندارد 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 تــــوجه 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، حصــول اطمینان از کیفیت محصــولات و ملاحظات زیســت محیطی و اقتصــادی، اجرای بعضــی از ا ستانداردهای ملی ایران را برای مح صولات تولیدی داخل ک شور و/یا اقلام وارداتی، با ت صویب شورای عالی ا ستاندارد، اجباری کند. ســازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصــولات کشــور، اجرای اســتاندارد کالاهای صــادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخ شیدن به ا ستفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤ س سات فعال در زمینۀ م شاوره، آموزش، بازر سی، ممیزی و صدورگواهی سیـ ستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیـ ست‌محیطی، آزمای شگاه‌ها و مراکز وا سنجی (کالیبرا سیون) و سایل سنجش، سازمان ملی ا ستاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤ سسات را بر ا ساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامۀ تأیید صلاحیت به آنها اعطا و بر عملکرد آن¬ها نظارت میکند. ترویج د ستگاه بین المللی یکاها، وا سنجی و سایل سنجش، 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 آموزش‌ها شامل کارآموزی مدیران کنترل کیفیت و کارشناسان آزمایشگاه های همکار سازمان می باشد که برگزاری این دوره ها از طریق استان‌ها، آزمایشگاه های همکار و پژوهشگاه استاندارد انجام می‌شود. برای ایجاد وحدت رویه و هماهنگی در نحوه برگزاری این دوره ها در مراکز مختلف به منظور ارتقاء کیفیت آموزش مخاطبین مورد نظر، دفتر آموزش و ترویج استاندارد با همکاری پژوهشگاه استاندارد، در راستای استاندارد سازی فرآیند کارآموزی، اقدام به تدوین برنامه مدونی برای انجام فرآیند کارآموزی در زمینه محصولات مشمول استاندارد اجباری نموده است.

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

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

محتوای دوره کارآموزی میکروبیولوژی شربت

عنوان دوره کارآموزی:

میکروبیولوژی شربت

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 شربت بر اساس استانداردهای ملی ایران شمارهٔ ۶۲۷۴ می‌باشد و موارد زیر را در برمی‌گیرد:

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

توانایی‌های کارآموزان پس از طی دوره:

۶- روش تهیه و سترون‌سازی محیط کشت های مورد نیاز
۷- روش آماده‌سازی و سترون‌سازی وسایل مورد نیاز
۸- روش آلودگی‌زدایی مواد مصرفی و وسایل
۹- نحوه استفاده صحیح از تجهیزات مورد نیاز در آزمایشگاه
۱۰- روش بکارگیری از استانداردهای مرتبط
۱۱- روش اجرای آزمون طبق استاندارد
۱۲- شناسایی و تعیین هویت باکتری‌ها

پیش نیاز:

ندارد.

رئوس مطالب آموزشی:

ردیف	رئوس مطالب	محتوای آموزشی	مدت آموزش (ساعت)		اجراکننده		منبع / استانداردها
			تئوری	عملی	مدرس	کارآموز	
۱	آشنایی با الزامات فنی آزمایشگاه میکروبیولوژی	آشنایی با وسایل مورد نیاز آشنایی با اصول آزمایشگاهی آشنایی با قسمت های مختلف آزمایشگاه میکروبیولوژی	۰/۵	-	*		جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹
۲	آشنایی با روش تهیه محیط کشت های مورد نیاز و روش سترون‌سازی	روش تهیه محیط کشت مرتبط با شربت	۰/۵	۰/۵	*	*	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹
۳	آماده‌سازی وسایل مورد نیاز و روش سترون‌سازی وسایل	روش آماده‌سازی وسایل مورد نیاز و سترون‌سازی وسایل	۰/۵	۰/۵	*	*	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹
۴	آشنایی با استاندارد روش آزمون	هدف و دامنه کاربرد، مواد و دستگاه‌های مورد نیاز جهت انجام آزمون	۰/۵	۰/۵	*		جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۶۲۷۴
۵	آشنایی با شاخص‌های میکروبی و حدود مجاز آنها در کشت‌های آغازگر	آشنایی با میکرو ارگانیسمهای شربت	۱	۱			جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شمارهٔ۶۲۷۴
۶	روش آماده‌سازی نمونه در آزمایشگاه	نمونه برداری از آزمایه ، توزین نمونه و تهیه سوسپانسیون اولیه و سایر رقت‌ها با استفاده از رقیق‌کننده مناسب	۰/۵	۰/۵	*	*	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شمارهٔ ٦٢٧٤
۷	روش شمارش و جستجوی باکتری‌ها	استفاده از سوسپانسیون اولیه و یا رقت‌های مورد نیاز در پلیت، برای شمارش استفاده از سوسپانسیون اولیه و یا رقت‌های مورد نیاز در لوله‌های حاوی محیط کشت مناسب برای جستجو	۱	۱	*	*	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شمارهٔ۶۲۷۴

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

سایر استانداردها و منابع:

۱-استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۸۱۲، شربت آلبالو-ویژگی‌ها و روش‌های آزمون

۲-استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۶۹۹، شربت سکنجبین

۳-استاندارد ملی ایران شمارهٔ۱۱۱۳۳، شربت سیب –ویژگی‌ها

۴-استاندارد ملی ایران شمارهٔ۱۲۲۸۰، شربت آناناس-ویژگی‌ها

۵-استاندارد ملی ایران شمارهٔ۱۹۳۳۶، پوره ،پالپ، برچه و تکه های میوه و سبزیجات (در آب، شربت یا آب میوه) –ویژگی‌ها و روش‌های آزمون میکروبیولوژی

۶-استاندارد ملی ایران شمارهٔ۱۹۷۱۲، شربت کرن بری-ویژگی‌ها

۷-استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۰۱۲۸، شربت تمشک-ویژگی‌ها و روش‌های آزمون

۸-استاندارد ملی ایران شمارهٔ۲۱۱۰۶، شربت انگور –ویژگی‌ها و روش‌های آزمون

نحوه برگزاری آزمون:

عملی	تئوری
*	*

جزوه دوره کارآموزی میکروبیولوژی شربت

تهیه کننده/ تهیه کنندگان:

شهپر مقدمی

گروه پژوهشی/ آزمایشگاه:

گروه پژوهشی میکروبیولوژی/آزمایشگاه شربت

به سفارش دفتر آموزش و ترویج استاندارد

منابع و مآخذ:

۱-استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۱۹۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-مخمرهای اسموفیلیک-روش شمارش

۲-استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۶۲۷۴، شربت ویژگی‌ها و روش‌های آزمون

۳-استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۶۶۳، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – راهنمای آماده سازی و ساخت محیط های کشت – قسمت اول – اهنمای عمومی تضمین کیفیت برای آماده سازی محیط های کشت در آزمایشگاه

۴-استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۸۹۲۳، میکروبیولوژِی مواد غذایی و خوراک دام -آماده سازی آزمایه-سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی-قسمت اول - مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری

۵-استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴-۸۹۲۳، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-آماده سازی آزمایه ، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون میکروبی- قسمت ۴- مقررات ویژه برای آماده سازی فرآورده ها به جز شیر ، گوشت، ماهی و فرآورده های آنها

۶-استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- راهنمای الزامات کلی برای آزمون

۷-استاندارد ملی ایران شمارهٔ 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 بیشتر از ۰/۹۵

۸-استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲-۱۰۸۹۹ ، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش جامع برای شمارش کپک‌ها و مخمرها – قسمت دوم – روش شمارش کلنی در فرآورده‌های با فعالیت آبی مساوی یا کمتر از۰/۹۵

۹-استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۰۸۳۴، میکروبیولوژی زنجیره مواد غذایی -روش های نمونه برداری برای آزمون‌های میکروب شناسی

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

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

فهرست

عنوان	صفحه
آشنایی با سازمان ملی استاندارد	ب
پیشگفتار	ج
محتوای دوره کار آموزی	د
جزوه دوره کار آموزی	ز
مقدمه	ی
۱ هدف	۱
۲ استانداردهای ملی ایران	۱
۳ اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی	۲
۴ روش‌های آزمون میکروبیولوژی شربت	۲۸
۵ اصول آزمون	۲۸
۶ محیط‌های کشت و رقیق‌کننده‌ها	۲۹
۷ روش اجرای آزمون	۲۷
۸ بیان نتایج	۴۲
پیوست الف- انواع استاندارد	۴۴
پیوست ب – مفاهیم مورد استفاده در کنترل	۴۶
پیوست پ -(اطلاعاتی)	۴۷
پیوست ت - نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌های میکروبیولوژی شربت طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۶۲۷۴	۵۰

مقدمه:

شربت[1]

فرآورده‌ای است، که از مخلوط کردن شکر، نیشکر و /یا سایر شیرین کننده‌های مجاز با آب، آب میوه و/یا کنسانتره میوه‌ها، پوره و پالپ میوه‌ها، رنگ آنتو سیانین، ویتامین، شکلات، استابیلایزر، طعم دهنده‌های طبیعی قهوه، عصاره‌های گیاهی (چای و چای سبز)، اسیدی کننده‌ها، مواد افزوددنی مجاز، کارامل تا رسیدن به غلظت مناسب به دست می‌آید و به روش‌های فیزیکی نگه داری و بسته بندی می‌شود .

۱- Cyurop

جزوه دوره کارآموزی شربت

۱ هدف

هدف از تدوین این جزوه آموزشی کار آموزی آشنایی با روش‌های آزمون میکروبیولوژی شربت، بر اساس استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۶۲۷۴ می‌باشد.

یادآوری۱- توصیه می‌شود کارآموزان این دوره با الزامات آزمایشگاهی میکروبیولوژی و نیز استانداردهای ملی ایران شماره‌های ۱-۸۹۲۳، ۴-۸۹۲۳ و ۹۸۹۹ آشنایی داشته باشند.

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

۲ استانداردهای ملی ایران

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

جدول ۱- فهرست استانداردهای میکروبیولوژی شربت

ردیف	عنوان استاندارد	شمارهٔ استاندارد
۱	میکرو بیولوژی موادغذایی و خوراک دام - مخمرهای اسموفیلیک – روش شمارش	۳۱۹۶
۲	میکروبیولوژی زنجیره غذایی - روش جامع برای شمارش میکروارگانیسم ها- قسمت ۱- شمارش کلنی در ۳۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از روش کشت آمیخته	۵۲۷۲-۱
۳	شربت ها – ویژگی‌ها وروش‌های آزمون میکروبیولوژی	۶۲۷۴
۴	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام و آب- آماد سازی، ساخت، ذخیره سازی و آزمون عملکرد محیط های کشت	۸۶۶۳
۵	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - آماده سازی آزمایه- سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمونهای میکروبیولوژی- قسمت اول- مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری.	۸۹۲۳-۱
۶	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون میکروبیولوژی- قسمت چهارم- مقررات ویژه برای آماده سازی محصولاتی به غیر از شیر، گوشت، ماهی و فرآورده های آن.	۸۹۲۳-۴
۷	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- راهنمای الزامات کلی برای آزمون	۹۸۹۹
۸	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش شمارش کپک‌ها و مخمرها – قسمت اول: روش شمارش کپک‌ها و مخمرها – روش شمارش کلنی در فرآورده‌های با فعالیت آبی (aw) مساوی یا بیشتر از ۰/۹۵	۱۰۸۹۹-۱
۹	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش شمارش کپک‌ها و مخمرها – قسمت دوم: روش شمارش کپک‌ها و مخمرها – روش شمارش کلنی در فرآورده های با فعالیت آبی (aw) مساوی یا کمتراز ۰/۹۵	۱۰۸۹۹-۲

۳ اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

با ورود به آزمای شگاه میکروبیولوژی و آغاز کار در این محیط لازم ا ست یک سری ا صول اولیه مورد توجه قرار گیرد. بخشـــی از این اصـــول و قواعد مربوط به ایمنی فرد آزمایش کننده بوده و برخی نیز به ایمنی محیط و ابزار آزمایشگاه مربوط می‌باشد.

۳-۱ فضای آزمایشگاه

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

۳-۱- ۱ فضای مربوط به نمونه وآزمون

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

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

۳-۱-۲ فضای عمومی

فضاهای جداگانه برای موارد زیر توصیه می‌شود:

- ورودی، راهرو، راه پله و آسانسور؛
- فضای اداری (مانند دبیرخانه، دفترکار و اتاق مستندسازی)؛
- 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 ازصحبت کردن خودداری شود.
- ازخوردن و آشامیدن در آزمایشگاه خودداری شود.
- کشیدن پیپت با دهان ممنوع می‌باشد.

۳-۳ وسایل و تجهیزات

توصیه می شود مطابق با شرایط خوب آزمایشگاهی، کلیهٔ وسایل و تجهیزات تمیز و در محل مناسب نگهداری شوند.

پیش از استفاده بهتراست وسایل از نظرداشتن 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 شمارهٔ ۹۸۹۹ و همچنین وسایل زیر استفاده شود:

جدول ۲- فهرست تجهیزات مورد نیاز برای آزمون میکروبیولوژی

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

ترازوی آزمایشگاهی

دستگاهی است که برای توزین اجسام یا مایعات، با دقت بالا و حساسیت بالا به کار می‌رود آزمایشگاه‌ها با توجه به‌نیازشان از ترازوهایی با دقت ۰/۱ g، ۰/۰۱ g، ۰/۰۰۱ g و ۰/۰۰۰۰۱ g استفاده می‌کنند. ترازوهای آزمایشگاهی دقت ۱ mg و دقت بالاتر آن نیاز به محفظه دارند چون به علت حساسیت بالای آن‌ها در توزین جریان هوا نیز روی توزین این ترازوها تاثیر می‌گذارد. تمام دستگاه‌های توزین باید به طور دوره‌ای کالیبره[1] 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 معمولا بر اساس ظرفیت ترازو دیجیتال انتخاب می‌شود. نحوه کالیبره کردن در تمام ترازوهای دیجیتالی یکسان است و فقط سنگ کالیبره متفاوت است کالیبراسیون باید طبق دستورالعمل سازنده با وزنه‌های استاندارد انجام گیرد با این روش ارزیابی‌های دقیق‌تر و قابل اطمینان هستند و درصد خطا بسیار کم است برای تجهیزات کالیبره شده گواهی کالیبراسیون صادر شده و ضمیمه دستگاه می‌گردد.

شکل ۱- ترازوی آزمایشگاهی

حمام مایع[2] (بن ماری[3])بادمای ثابت

این وسیله برای انجام تست‌های سرولوژیک، آگلوتیناسیون، بیوشیمی، تست‌های دارویی، در دمای تثبیت شده کار برد دارد. حرارت آب دستگاه به‌وسیله 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 ازحد المنت‌ها، به‌علت کم آبی بن ماری، موجب آسیب رساندن به‌دستگاه می‌شود، باید به‌حداقل حجم آب مورد نیاز جهت حفظ کارکرد مطلوب دستگاه توجه گردد.

کاربرد اصلی این دستگاه در آزمایشگاه میکروبیولوژی به‌شرح زیراست:

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؛

---

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

۲-Water bath

۳-Bain marie

ت- آماده‌سازی سوسپانسیون‌های اولیه یا محلول‌ها در یک دمای کنترل شده؛
ث- فرآیند حرارتی سوسپانسیون‌های اولیه در یک دمای کنترل شده (مانند پاستوریزاسیون)؛
همچنین به‌منظور گرم کردن معرف‌ها و ذوب کردن نمونه‌ها نیز استفاده می‌شود.

شکل۲-انواع حمام مایع با دمای ثابت

اتوکلاو[۱]

اتوکلاو برای استریل کردن ابزار پزشکی و آزمایشگاهی در فشار و دمای بالا و با استفاده از بخار آب کار برد دارد این دستگاه قادر است بخار آب اشباع شده با حرارت ۱۲۱°C را ایجاد کند این درجه حرارت در شرایط بخار ایجاد شده می‌تواند موجب تخریب ساختمان میکروب‌ها و اسپور آنها شده و تقریبا باعث نابودی تمام میکروارگانیسم‌های شناخته شده شود. بر اساس استاندارد در دمای ۱۲۱°C ابزارآلات باید حداقل به‌مدت زمان ۱۵ min، تحت فرآیند استریلیزاسیون قرار گیرند کل مدت زمان کار دستگاه اتوکلاو از فشار دادن دکمه (شروع کار)[۲] تا پایان کار سیستم، مجموع سه زمان (زمان اولیه)[۳]، (زمان استریلیزاسیون) [۴] و (زمان خشک شدن)[۵] است. .

شکل۳-اتو کلاو

بررسی دما و زمان اتوکلاو با اندیکاتورهای شیمیایی، فیزیکی و بیولوژی انجام می‌شود.

۱- Autoclave
۲- Start
۳- Preheating Time
۴- Sterilization Time
۵- Drying Time

اندیکاتورهای شیمیایی : به‌صورت نوارهای اتوکلاو (چسب اتو کلاو) TST [1] که سه عامل زمان، بخار و دما را کنترل می‌کند. یا بسته های پزشکی هستند که وقتی به دمای معینی رسیدند تغییر رنگ می‌دهند.
اندیکاتور بیولوژی : شامل اسپور باکتری‌های مقاوم به‌حرارت، مانند *ژئوباسیلوس استئاروترموفیلوس*[2] است.
اندیکاتور فیزیکی : از آلیاژهایی تشکیل شده‌اند که در دمای مورد نظر ذوب می‌شوند.

سیستم فیلتراسیون

برای سترون‌سازی محلول‌هایی که ساختمان شیمیایی آنها به‌حرارت حساس هستند مانند: ویتامین‌ها، آنتی بیوتیک‌ها 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 ۰/۴۵mμ و ۰/۲۲ mμ استفاده می‌شود.

شکل۴- سیستم فیلتراسیون

وسایل و ظروف شیشه‌ای آزمایشگاهی

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

شکل۵- وسایل شیشه‌ای

pH متر[3]

وسیله‌ای الکترونیکی است که جهت سنجش میزانpH (میزان اسیدی یا بازی بودن ماده) به‌کار می‌رود. (اندازه گیری غلظت یون هیدروژنH + را با استفاده از الکترود حساس به‌یونH +) این ابزار دارای الکترودهای خاصی است که با قرار دادن در محلول، عدد pH را روی صفحه نمایشگر

۱- Time, Steam,Tempreture
۲- *Geobacillus stearothermophilus*
۳- pH meter

خود نمایش می‌دهد. این دستگاه متشکل از دو بخش اصلی یعنی میله کاوشگر [1]و اندازه‌گیر [2] است. میله کاوشگر PH محلول را تبدیل به‌سیگنال الکتریکی کرده و اندازه‌گیر آن را تحلیل و میزان pH را نمایش می‌دهد. انتهای کاوشگر از غشاء شیشه‌ای و حباب مانند است که نسبت به‌یون‌ها حساس می‌باشد و رأس الکترود داخلی در داخل آن قراردارد. 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 =۴ نگهداری شده است. در غیر این صورت ممکن است pH متر در تعیین pH محلول مورد مطالعه دچار خطا شود. لذا میله کاوشگر را به‌مدت زمان h ۲ در آب مقطر نگهداری کنید و سپس آن را در محلول نگهدارنده قرار دهید .کاوشگر را به‌وسیله آب مقطر بشویید. برای تنظیم[3] pH متر، الکترود را در محلول۷ pH قرار داده، حداقلsec۳۰ زمان بدهید تا عدد ثابتی را نشان دهد. سپس آن را روی عدد ۷ تنظیم کنید(pH متر عدد ۷ را نشان دهد)دوباره الکترود را با آب مقطر بشویید و آن را در محلول۷ pH قرار دهید .اجازه دهید اندازه گیر عدد ثابتی را نشان دهد. آن را روی عدد ۴ تنظیم کنید(pH متر عدد ۴ را نشان دهد). حالا pH متر شما تنظیم شده و آماده اندازه گیری pH محلول های مورد آزمایش است. قبل از قرار دادن اندازه گیر در محلول مورد آزمایش آن را دوباره با آب مقطر بشویید.

شکل۶ -pH- متر

شمارشگر کلنی[4]

این دستگاه برای شمارش کلنی باکتری‌ها، به‌صورت 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 می‌باشد.

شکل۷-شمارشگرکلنی

۱- probe

۲- meter

۳-calibration

۴- Colony counter

انکوباتور[1](اتو)

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

شکل۸ -انواع انکوباتور

میکروسکوپ [2]

میکروسکوپ یکی از وسایل آزمایشگاهی اصلی در آزمایشگاه زیست شناسی است. از دو واژه یونانی میکرو به‌معنی کوچک و سکوپ، به‌معنی 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 به‌کار رفته در میکروسکوپ مزبور کوتاه‌تر باشد قدرت تفکیک و یا جداکنندگی آن میکروسکوپ بیشتر است. میکروسکوپ‌ها به‌طور کلی به‌دو دسته میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی تقسیم می‌شوند. میکروسکوپ های نوری به‌منظور سنجش و مشاهده سلول‌ها با بزرگنمایی نسبتا 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 :** به‌نسبت اندازه تصویر نمونه، به‌اندازه واقعی آن گفته می‌شود. در همه میکروسکوپ‌ها از عدسی‌ها برای بزرگنمایی تصویر استفاده می‌شود. .
- **قدرت تفکیک :** توانایی تشخیص بین دو شیء نزدیک به‌هم به‌صورت دو شیء متمایز و جدا را قدرت تفکیک می‌گویند.قدرت تفکیک به‌کیفیت عدسی‌ها و طول موج نور تابیده شده بستگی دارد. با کاهش طول موج، قدرت تفکیک افزایش می‌یابد.
- **کنتراست :** به‌تفاوت بین بخش‌های مختلف یک نمونه می‌گویند. مثلا یک اندامک تیره‌تر از اندامک دیگر دیده شود.

۱- Incubator

۲- Microscopes

انواع مختلفی از میکروسکوپ‌ها شامل: استریو میکروسکوپ[1]، میکروسکوپ اینورت[2]، میکروسکوپ فلورسنت[3]، میکروسکوپ دوچشمی[4] می‌باشند.

شکل ۹- میکروسکوپ نوری

فور[5] یا آون

فور یا آون دستگاهی است که قابلیت تنظیم در دما ۳۰۰°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 °C(۱۰ ±۱۷۰) (از زمان رسیدن به‌دمای ۱۷۰°C) به‌وسیلهٔ حرارت خشک به‌مدت زمان حداقل۱h 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 تمیزکرده، سپس در آون قرار دهید. پس از سترون‌سازی، به‌منظور پیشگیری از شکستن وسایل شیشه‌ای بهتراست پیش ازخارج کردن از آون، آن‌ها را خنک کنید. 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) به‌کار 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.
- به‌دلیل عایق بودن دستگاه، چند ساعت طول می‌کشد تا اشیاء داخل دستگاه آون خنک شود، مگر آن که مجهز به‌فن باشد. پس از سترون‌سازی، به‌منظور پیشگیری از شکستن وسایل شیشه‌ای درب آون

---

۱ -دارای بزرگنمایی ۵۰ برابر و قابلیت نصب دوربین می‌باشد و در بررسی اجزا و موجوداتی که دارای بعد و حجم می‌باشند.

۲ - این دستگاه دارای قابلیت فاز کنتراست و نصب دوربین عکاسی و فیلمبرداری می‌باشد و در بررسی نحوه حرکت، تولید مثل، شناسایی، شمارش زئو و فیتو پلانکتون‌ها و سایر میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌گردد.

۳ - جهت بررسی و مشاهده اجزا و اندامک‌هایی از سلول و میکروارگانیسم‌هایی که با رنگ فلورسنت رنگ آمیزی شده باشند، استفاده می‌گردد. این دستگاه دارای قابلیت عکس برداری از نمونه‌ها و ثبت اطلاعات نیز می‌باشد.

۴ - این دستگاه میکروسکوپ دوچشمی نوری است دارای عدسی‌های۵، ۱۰، ۲۰،۴۰ و ۱۰۰ و قابلیت فاز کنتراست و نصب دوربین عکسبرداری می‌باشد که برای مشاهده معمولی و نمونه‌هایی که رنگ آمیزی نشده‌اند مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۵- Oven

را باز نکنید تا اتاقک، ظروف و مواد داخل آن تا دمای حدود°C ۶۰ 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 به‌سبز. 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.

شکل۱۰- فور یا آون

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 به‌ایجاد و حفظ شرایط اتمسفری تغییر یافته (مانند: شرایط بی هوازی) در طی مدت گرمخانه گذاری محیط کشت، باشد .

ترکیب اتمسفر مورد نیاز می‌تواند به‌وسیله افزودن مخلوطی از گاز پس از تخلیه هوای جار به-وسیله جایگزینی اتمسفر مورد نظر در یک اتاقک یا به‌وسیله هر روش مناسب دیگر مانند: (گاز پک‌های قابل دسترسی از بازار) انجام شود.

شکل۱۱ – تجهیزات کشت در شرایط اتمسفری تغییر یافته

۱- *Bacillus subtilis*

۲ -*Bacillus atrophaeus*

۳-۴ استریلیزاسیون

استریلیزاسیون یا سترون‌سازی به‌معنای 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:

- ✓ **روش حرارتی** : در آزمایشگاه میکروبیولوژی برای استریلیزاسیون محیط‌های کشت و وسایل مورد نیاز روش حرارتی به‌دو 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 به‌صور مختلف نواری، ویال یا آمپول کوچک موجود هستند. عملکرد سترون سازی را می‌توان با استفاده از اندیکاتورهای شیمیایی و اندیکاتورهای بیولوژیک ارزیابی کرد. در پایش بیولوژیک، از اسپورهای *باسیلوس سوبتیلیس*[۱] و *باسیلوس استئاروترموفیلوس*[۲] استفاده می‌شود.
- ✓ **روش شیمیایی** : به‌وسیله مواد ضدعفونی کننده مانند: آب اکسیژنه و انجام واکنش‌های شیمیایی (مانند: رادیکال‌های آزاد) برای سترون کردن استفاده می‌شود.
- ✓ **روش پرتودهی** : به‌وسیله 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** : معمولا 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، موادآلی و معدنیpH مناسب، حضور یا عدم حضور اکسیژن می‌باشد.

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

۱- *Bacillus subtilis*

۲- *Bacillus. Stearothermophilus*

۳-۵-۱ اجزای تشکیل دهنده محیط کشت

محیط کشت فرمولاسیونی است از مواد، به‌صورت مایع، نیمه جامد یا جامد، که دارای اجزای تشکیل دهنده خاص بوده و به‌منظور تکثیر میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. آگار به‌عنوان عامل سفت کننده در محیط کشت‌های جامد و نیمه جامد کار برد دارد. آگار ترکیبی است پلی ساکاریدی که از دیواره سلولی برخی از گونه های جلبک[۱] قرمز (از جنس گراسیلار یا [۲]و جیلیدیوم[۳]) استخراج می‌شود. آگار برای میکروارگانیسم‌ها ارزش غذایی ندارد و هیچ میکروارگانیسمی نمی‌تواند آن‌را هضم کند .نقطه ذوب آن°C ۹۵ و با رسیدن دمای آن به‌حدود°C ۴۳ شبکه ای ایجاد می‌کند که سبب جامد شدن محیط می شود. محیط‌های کشت جامد معمولاً دارای g/L(۱۵تا۱۳) آگار هستند.

شکل۱۲ -گونه‌های از جلبک دریایی جنس جیلیدیوم

۳-۵-۲ آب

آب قابل استفاده برای آماده‌سازی محیط‌های کشت باید آب مقطر و عاری از مواد تاثیر گذار بر رشد میکروارگانیسم‌ها، در شرایط آزمون مانند: اثر کلراید، اثر آمونیاک و اثر یون‌های فلزات، باشد. آب مقطر به‌روش جوشاندن و تقطیر کردن، عبور آب از روی رزین و تصفیه بوسیله فیلترهای اسمز معکوس و نانو فیلتر تولید می‌شود. آب مقطر دارای pH خنثی و در حدود ۷ می‌باشد .دمای جوش آن به‌دلیل خالص بودن پایین‌تر از آب‌های طبیعی بوده و خاصیت خورندگی ندارد.

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 کاملا تمیز و عاری از مواد خارجی باشند
- آب مقطر مورد استفاده باید صحیح تهیه شود .

۱-Algae

۲-Gracilari

۳-*Gelidium*

- درجه حرارت استریل کردن محیط کشت، باید متناسب با نوع مواد مغذی محیط کشت در نظر گرفته شود. درجه‌های بالا باعث از بین رفتن برخی از مواد شیمیایی موجود در محیط کشت می‌شوند.

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

۳-۵-۴ طبقه بندی محیط کشت

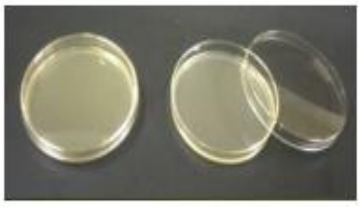
محیط کشت را از جنبه‌های مختلف طبقه بندی می‌کنند:

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]

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



شکل۱۳ -محیط کشت آگار دار

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

الف کشت در داخل محیط جامد[۲]

به‌لوله‌های آزمایش محتوی محیط کشت جامد پس از ذوب شدن که تا $45\ ^{\circ}C$ 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.

۱-Solid media

۲-Shake Cultures

ب کشت‌های عمقی[1]

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

پ کشت شیب دار[2]

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

شکل۱۴-محیط کشت شیبدار

۳-۵-۴-۲-۲ محیط کشت مایع یا آبگوشتی [3]

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

یادآوری۱- در بعضی موارد ذرات جامد به‌محیط کشت مایع اضافه می‌شود، مانند محیط کشت "کوکد میت"

یادآوری۲- محیط کشت مایع در لوله‌ها، ارلن‌ها، یا بطری‌ها به‌طور معمول "براث" نامیده می‌شوند.

۳-۵-۴-۲-۳ محیط کشت نیمه جامد [4]

محیط‌های نیمه جامد نیز وجود دارد.که میزان آگار آن نسبت به‌محیط‌های جامد کمتر است (۰/۲- ۰/۵در صد). مانند:" SIM"این نوع محیط‌های کشت برای مشاهده حرکت باکتری‌ها استفاده می‌شود. به‌محیط 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 به‌آن "بات" گفته می‌شود.

۱- Stab Cultures

۲- Slant media

۳-Liquid or broth media

۴- Semi Solid media

شکل۱۵-محیط کشت نیمه جامد

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

۳-۵-۴-۳-۱ محیط کشت انتقالی[۱]

محیط کشتی است که به‌منظور نگهداری و حفظ قابلیت زیستی میکروارگانیسم‌ها در ضمن به‌حداقل 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] "

۳-۵-۴-۳-۲ محیط کشت نگه‌داری کننده [۳]

محیط کشتی است که به‌منظور 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 به‌وجود آید محافظت کرده و پس از این مدت، به‌آنها قدرت بازیابی دهد.

مانند: "محیط کشت دورستاگ[۴]"، اسلوپ‌های" نوترینت آگار [۵]"

۳-۵-۴-۳-۳ محیط کشت بازیابی [۶]

محیط کشتی است که به‌میکروارگانیسم‌های آسیب دیده و تحت تنش امکان ترمیم و بازیابی می‌دهد تا رشد طبیعی را بدست آورند، ولی لزوما باعث تکثیر آنها نمی‌شوند.

مانند" آب پپتونه بافری[۷]"

یادآوری- محیط کشت بازیابی می‌تواند به‌عنوان یک محیط پیش غنی کننده نیز به‌کار رود برای مثال" آب پپتونه بافری"

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

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- enrichmen medium

۹-Enrichmen medium

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

۳-۵-۴-۳-۴-۱ محیط کشت غنی کننده انتخابی[۱]

محیط کشت غنی کننده‌ای است که به‌میکروارگانیسم‌های خاص امکان رشد می‌دهد و به‌وا سطه یک ماده مهار کننده، رشد تمام میکروارگانیسم‌ها بجز میکروارگانیسم مورد نظر را کاملاً یا تا حدودی مهار می‌کنند. مانند: محیط کشت "پپتون سوی راپاپورت- واسیلادیس[۲] "

۳-۵-۴-۳-۴-۲ محیط کشت غنی کننده غیر انتخابی[۳]

این محیط به‌طیف وسیعی از میکرو ارگانیسم‌ها امکان رشد می‌دهد .مانند:"برین هارت اینفیوژن براث"

۳-۵-۴-۳-۴-۳ محیط کشت جداکننده[۴]

محیط کشت جامد یا نیمه جامدی است که به‌میکرو ارگانیسم‌ها امکان رشد می‌دهد.

۳-۵-۴-۳-۴-۴ محیط کشت جداکننده انتخابی [۵]

محیط کشتی که به‌میکرو ارگانیسم خاص و هدف امکان رشد می‌دهد و از رشد سایر میکروارگانیسم‌ها به‌طور کامل یا قسمتی جلوگیری می‌کند .مانند:"XLD آگار"

۳-۵-۴-۳-۴-۵ محیط کشت جداکننده غیر انتخابی [۶]

محیط کشتی که در آن میکرو ارگانیسم به‌صورت انتخابی، مهار نمی‌شوند.مانند:"نوترینت آگار"

۳-۵-۴-۳-۴-۶ محیط کشت انتخابی کروموژنیک [۷]/ فلوروژنیک [۸]

محیط کشت کروموژنیک / فلوروژنیک دارای ترکیبات انتخابی است که همه یا بخشی از فلور همراه با میکرو ارگانیسم های هدف در نمونه را مهار می‌کند و منجر به‌تقویت رد یابی دقیق می‌شود مانند: "TBX آگار"،"MUG/EC"

۳-۵-۴-۳-۴-۷ محیط کشت افتراقی[۹]

محیط کشتی است که مشخصات و خصوصیت فیزیولوژیک یا بیو شیمیایی میکروارگانیسم‌ها را به‌منظور شناسایی فراهم می‌کند. مانند: "ترجیتول[۷]"و" TTC، TBX"

۳-۵-۴-۳-۴-۸ محیط کشت شناسایی [۱۰]

۱-Selective enrichment medium

۲-Rappaport-Vassiliadis (RV)

۳-Non- selective enrichment medium

۴-Selective isolation medium

۵-Selective enrichment medium

۶- Non-selective isolation medium

۷- Chromogenic selective culture medium

۸- Fluorogenic selective culture medium

۹- Differential medium

۱۰- Identification medum

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[1] "

۳-۵-۴-۳-۴-۹ محیط کشت شمارش [2]

محیط کشت انتخابی یا غیر انتخابی که برای شمارش میکروارگانیسم‌ها به‌کار می‌رود. مانند:"برد پارکر[3] "ایبست اکسترکت آگار [4]"

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

۳-۵-۴-۳-۴-۱۰ محیط کشت تاییدی [5]

محیط کشتی است که برای شناسایی یا تعیین هویت مشخصات میکروارگانیسم‌ها پس از یک مرحله بازیابی مقدماتی و/یا غنی سازی و/یا جداسازی، به‌کار گرفته می‌شود مانند :"کلینگر آیرون آگار[6]"

۳-۵-۴-۳-۴-۱۱ محیط کشت دارای ترکیبات خنثی کننده [7]

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 میکروب‌کش به‌کار می‌رود .

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

محیط کشتی است که در دسته‌بندی‌های متعدد قرار می‌گیرد. مانند: "بلاد آگار[8]"که یک محیط بازیابی است، می‌تواند به‌عنوان محیط کشت جداکننده و همچنین محیط کشت افتراقی برای ردیابی همولیز به‌کار رود. و یا "بافر پپتون واتر" که یک رقیق کننده است می‌تواند یک محیط کشت پیش غنی کننده نیز باشد.

۳-۵-۴-۳-۴-۱۳ محیط کشت مرجع

محیط کشت غیر انتخابی مانند:"تریپتون سوی آگار[9]"که برای ارزیابی مقایسه‌ای کنترل عملکرد محیط کشت بکار می‌رود.

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

۳-۵-۴-۴-۱ محیط کشت آماده مصرف

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

۳-۵-۴-۴-۲ محیط کشت کامل شده

محیط کشتی است که برای تلقیح آماده باشد.

۱- Bile Esculin Azide Agar (Enterococcus Selective Agar)

۲- Enumeration medium

۳- Baird-Parker Agar

۴- Yeast Extract Agar

۵- Confirmation medium

۶- Kligler Iron Agar (KIA)

۷- Medium containing nutralisers

۸- Blood agar

۹- Tryptic Soy Agar(TSA)

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 فیبرینوژن (RFP)آگار"

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

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

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

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

۳-۶ آماده سازی و استریلیزاسیون محیط‌های کشت در آزمایشگاه

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

با رعایت دستور العمل تولید کننده، و با توجه به‌نشانه گذاری آن، مقدار لازم از محیط کشت (پودر خشک) با دقت توزین می‌شود. 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 به‌حجم برسانید.

آلودگی میکروبی آب از 10^2 *cfu* در هر میلی لیتر بیشتر نباشد و طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵۲۷۱ پایش شود.

هدایت الکتریکی[1] آب استفاده شده برای تهیه محیط کشت نباید بیشتر از ۲۵ میکروزیمنس[2] باشد و طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۰۹۷ پایش شود.

۳-۶-۲ pH

pH محیط کشت را با استفاده از pH متر اندازه گیری کنید در صورت لزوم، قبل از سترون‌سازی تنظیم شود، به‌این ترتیب که pH محیط کشت پس از سترون‌سازی و رسیدن دما به ۲۵°C، باید در محدوده مورد نظر ±۰/۲ واحد اندازه گیری باشد، مگر اینکه مقادیر دیگری توصیه شده باشد. pH معمولاً با استفاده از محلول سدیم هیدروکسید با غلظت تقریبی: ۴۰g/l یا هیدروکلریک اسید

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

۲- میکروزیمنس بر سانتیمتر واحد هدایت الکتریکی ویژه آب می‌باشد که در سیستم SI با µSiemens/cm نشان داده می‌شود.

انجام می‌شود. اگر تنظیم pH پس از سترن‌سازی انجام شود، باید از محلول‌های سترون استفاده شود.

۳-۶-۳ توزیع

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

۳-۶-۴ سترون سازی

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 فیلترا سیون انجام می شود. بعضی از محیط‌های کشت به‌سترون‌سازی 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 به‌حرارت 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 نشوده یا شرایط دیگری در استاندارد خاصی مشخص نشده باشد، در یخچال در دمای ۵ (۳± °C) نگهداری کنید.

اگر محیط‌های کشت در یخچال نگهداری شود معمولاً توصیه می‌شود مدت زمان نگهداری برای پلیت‌ها از دو تا چهار هفته و برای بطری‌های بسته شده و لوله‌ها سه تا شش ماه بیشتر نشود.

برای ذوب مجدد، محیط‌های کشت را به‌وسیله قرار دادن آن در حمام آب جوش و یا هر فرآیند دیگری که همان نتیجه را دهد، ذوب کنید (مانند: قرار دادن در بخار اتوکلاو) محیط کشت ذوب شده، در حمام آب گرم با دمای تنظیم شده، با دمای(۴۷ تا۵۰)°C، خنک کنید.

۳-۶-۵ افزودن مکمل‌ها

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

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

محیط کشت آگاردار ذوب شده را در پلیت دیش‌ها بریزید تا حداقل ضخامت آن mm ۳ گردد. برای مثال: در ظروف با قطر ۲۰mm، معمولا mL(۱۸تا۲۰) محیط کشت آگاردار کافی است یا مقداری که در استانداردهای

مربوطه بیان شـــده اســـت.اگر پلیت‌ها باید نگهداری شـــوند، یا زمان گرمخانه‌گذاری آنها بیش ۷۲ h به‌طول می‌انجامد، یا دمای گرمخانه‌گذاری بیش از ۴۰°C ا ست، محیط ک شت بی شتری ممکن ا ست در پتری‌دیش‌ها ریخته شود. تری‌دیش‌ها را به صورت در ب سته 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

شـــرایط نگه‌داری، تاریخ انقضـــاء و توصـــیه‌های دیگر مربوط به‌محیط کشـــت و پلیت‌های آگاردار آماده شـــده تجارتی بهتر است طبق دستورالعمل تولیدکننده باشد.

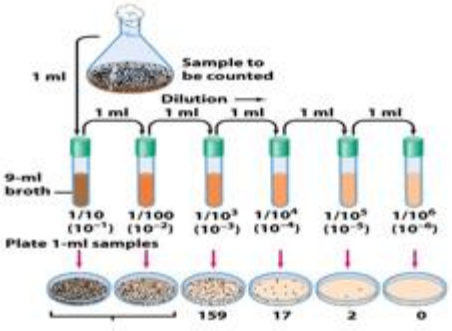
۳-۷ آماده سازی نمونه

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

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

یادآوری- برای تهیه سوسپانسیون فرآورده‌های اسیدی، pH را نزدیک خنثی و برابر با ۷/۰±۰/۵ تنظیم کنید. از آب پپتونه بافری و برای بیشتر فرآورده‌های با pH بیشتر یا برابر ۴/۵ استفاده کنید.

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



شکل۱۶- سوسپانسیون اولیه و رقت ها اعشاری بعدی

برای رقت‌های۱۰ برابر، ۹mL یا ۹۰mL از محلول‌های رقیق کننده را به‌ارلن یا لوله‌های سترون اضافه کنید با انتقال یک حجم نمونه به ۹ حجم محلول رقیق کننده، رقت‌های ۱۰ برابر را تهیه کنید. سوسپانسیون اولیه را کاملا مخلوط کنید. برای تهیه رقت‌های دهدهی بعدی، ۱mL از سوسپانسیون اولیه را، با استفاده از پی‌پت سترون به ۹mL محلول رقیق کننده سترون که دمای مناسبی دارند، منتقل کنید. و با استفاده از یک همزن مکانیکی به‌مدت زمان۵ sec تا ۳sec مخلوط کنید. رقت به‌دست آمده$۱۰^{-۲}$ می‌باشد. در صورت لزوم، به‌همین ترتیب و رقت‌های بعدی ($۱۰^{-۳}$ ، ...) را تهیه کنید تا حدی که برای شمارش میکروارگانیسم‌ها مناسب باشند. مراقب باشید، پی‌پت را بیش از۱cm داخل سوسپانسیون اولیه فرو نکنید و از تماس پی‌پت حاوی سوسپانسیون

اولیه با محلول رقیق کنندهٔ سترون جلوگیری کنید. هنگام آماده سازی رقیق کننده سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری بعدی، زمان بین پایان آماده سازی تا لحظه تماس ماده تلقیحی با محیط کشت یا آبگوشت غنی کننده نباید بیش از min ۴۵ باشد.

۳-۷-۱ روش‌های کشت در میکروبیولوژی

کشت در پلیت به‌سه روش قابل انجام است.

- کشت خطی[۱]
- کشت سطحی[۲]
- کشت آمیخته یا پور پلیت[۳]

۳-۷-۱-۱ کشت خطی

در این روش از محیط پیش ریخته استفاده می شود. به‌این ترتیب که ابتدا به‌وسیله یک حلقه کشت سترون شده مقداری از کلنی باکتری را برداشته و آن را روی سطح محیط پیش ریخته بصورت خط‌های موازی و در چند جهت‌کشیده می‌شود. در کشت‌های خطی برای بدست آوردن کلنی‌های تک، پلیت را به ۴ قسمت تقسیم می شود و با نوک حلقه کشت که محتوی کلنی باکتری است، بصورت خط‌های موازی کشیده و بعد خطوط را در منطقه دوم از انتهای خط انتهایی منطقه اول در جهت دیگر ادامه داده و در منطقه سوم و چهارم هم به‌همین صورت عمل می‌شود. خصوصیت این روش این است که وقتی خطوط موازی را روی سطح محیط می‌کشید به‌ترتیب از تراکم باکتری‌ها کاسته می‌شود و در انتهای خط، تراکم باکتری بسیار کمتر خواهد بود تا جایی که در منطقه چهارم دسترسی به‌کلنی‌های تک وجود خواهد داشت. که کلنی خالص نامیده می‌شود.

شکل۱۷ - کشت خطی

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

۳-۷-۱-۲ کشت سطحی

۱- Streak plate

۲- Surface plate

۳- Pour plate

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 به‌گرما[1] هستند و احتمال دارد قسمت معنی داری از فلور کل را تشکیل دهند (مانند: ارگانیسم‌های سرماگرا [2])کار برد دارد.
همچنین در غذاهای خشک شده، غذاهای یخزده و منجمد، که ممکن است دارای میکروارگانیسم‌های حساس به‌گرما باشند یا فرآورده‌هایی که دارای باکتری‌های هوازی اجباری هستند که احتمال دارد قست معنی داری از فلور کل را تشکیل دهند (مانند: گونه‌های سودو موناس[3]) و فرآوردهایی 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 می شود، 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، به‌کار برده می‌شود. در این نوع کشت، از محیط پیش ریخته استفاده می‌شود. در روش سطحی، برای پلیت‌هائی با قطر ۹۰mm تا ۱۰۰mm، حجم آزمونه و یا رقتی از آن باید بین ۰/۱ mL تا ۰/۵ mL 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.

شکل۱۸ -کشت سطحی

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

پلیت‌های دارای حدود ۱۵mL محیط کشت را آماده و نشانه گذاری کنید و در صورت لزوم سطح محیط کشت پیش از استفاده خشک می‌شود. معمولا ۰/۱mL از آزمایه (فرآورده‌های مایع) و یا۰/۱ mL از سوسپانسیون 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 گرمخانه‌گذاری می‌شود

یادآوری-توجه داشته باشید که هنگام انجام کشت سطحی باید سطح محیط خشک باشد.

۱- Heat-sensitive organisms

۲- Psychrotrophic

۳- Pseudomonas spp.

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

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

ب- در مورد باکتری‌هایی که کلنی آنها به‌سرعت روی محیط کشت پخش نمی‌شود و سطح محیط کشت در پلیت‌ها خشک به‌نظر 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 به‌گونه‌ای 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 به‌میزان بخار آب سطح محیط کشت درون پلیت‌ها بستگی دارد.

ت- چنانچه برای خشک شدن کردن پلیت‌ها از اتاقک با جریان هوای لایه‌ای[1] 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 ^{o}C ۲۵ تا^{o}C ۵۰ به‌گونه‌ای که سطح آگار پلیت‌ها به طرف پایین باشد و در پلیت نیمه باز باشد، خشک می‌شود.

خشک کردن پلیت را تا زمان ناپدید شدن قطرات در سطح آگار یا روی در پلیت ادامه دهید بیش از آن خشک کردن را ادامه ندهید همچنین می‌توانید پلیت‌ها را در اتاقک ایمنی با جریان هوای لایه‌ای در دمای محیط برای مدت min ۳۰تا min ۶۰، یا به‌مدت یک شب به صورت در بسته در درجه حرارت محیط خشک کنید. همچنین می‌توانید پس از ریختن محیط کشت در پلیت در صورت تجمع حباب هوا، آنها را با شعله دادن سطح محیط حذف کنید. اینکار باعث سترون شدن سطح محیط کشت هم می‌شود.

۳-۷-۱-۳ کشت آمیخته یا پورپلیت

در روش کشت آمیخته، حجم آزمونه و یا رقتی از نمونه بسته به‌اندازه پلیت و حجم محیط کشت مورد استفاده بین mL ۰/۱ تا mL ۵ است. رقت را باید به‌گونه‌ای انتخاب کرد که تعداد مورد انتظار کلنی‌های تیپیک تشکیل شده روی پلیت‌هایی با قطر ۹۰mm تا ۱۰۰mm بین ۱۰ تا ۱۵۰ کلنی باشد. تعداد کل کلنی های تیپیک و غیر تیپیک روی پلیت باید کمتر از ۳۰۰ کلنی باشد.

یادآوری – تعداد کل کلنی‌های قابل شمارش، به‌اندازه 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

۱- Laminsr-flow safety cabinet

حرارت دادن زیاد محیط کشت خودداری کنید و آن را به‌محض ذوب شدن ار حمام خارج کنید و محیط کشت ذوب شده را درحمام آب با دمای ۴۵°C قرار داده تا دمای آن به ۴۵°C برسد پس از تهیه و آماده سازی پلیت‌ها و دقت‌های لازم، آزمونه را کاملا مخلوط و در پلیت‌ها تقسیم کنید.

یادآوری۱-محیط‌های کشت را برای مدت زمان بیشتر از h ۴ به‌صورت 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 به‌پلیت‌ها به‌گونه‌ای بیافزایید که ایجاد شوک حرارتی به‌حداقل برسد.

به‌طور کلی برای mL ۱تاmL ۲آزمونه مقدارmL ۱۵تاmL ۲۰ محیط کشت سترون که حرارت آن به‌حدود°C ۴۵رسیده، استفاده می‌شود. برای حجم‌های بیشتر آزمونه، مقدار محیط کشت را بر همین اساس تنظیم کنید. سپس با حرکات دورانی به‌صورت۸ کاملا مخلوط می‌شود. و تا سرد شدن، روی سطح افقی قرار گرفته و محیط جامد می‌شود. پس از جامد شدن آگار، پلیت‌ها بدون تاخیر در گرمخانه قرار می‌گیرد .

شکل ۱۹- کشت پور پلیت

۳-۷-۳-۱ کشت‌های دو لایه

در کشت دو لایه، پس از تلقیح و کشت آمیخته یا پور پلیت در صورت لزوم سطح محیط کشت با باکتری، مجددا با یک لایه نازکی از همان محیط کشت پوشانده می‌شود در این حالت به‌آن 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 درسطح محیط جلوگیری گردد.

۳-۸ رنگ آمیزی

۳-۸-۱ رنگ آمیزی گرم

۳-۹-۱-۱ 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 به‌روی سطح گسترش میکروبی روی لام بریزید و به‌مدت زمان min ۱، صبر کنید تا رنگ در دیواره سلولی میکروب‌ها نفوذ کند.

۳-۸-۱-۳ مرحله شستشو:

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

۳-۸-۱-۴ مرحله اضافه کردن محلول ید:

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

۳-۸-۱-۵ مرحله شستشو:

پس از سپری شدن مدت زمان min ۱، در حالی‌که لام را به‌صورت مایل نگهداشته‌اید با استفاده از آب مقطر به‌آرامی به‌مدت 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 به‌سرعت آن را بی‌رنگ کنید. دقت کنید مرحله بی‌رنگ بیش از اندازه نباشد. بعد از آن لام را بسرعت 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، به‌مدت sec ۱۰ بپوشانید سپس رنگ اضافی را خالی کرده و با آب مقطر لام را شستشو دهید.

۳-۸-۱-۸ خشک کردن لام:

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

۳-۸-۱-۹ مشاهده و تفسیر

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

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

شکل۲۰ -مراحل روش رنگ آمیزی

یادآوری نکات مهم:

۱- Iodine

- حرارت بیش از اندازه هنگام تثبیت گسترش باعث پاره شدن دیواره سلولی باکتری شده بنا بر این باکتری گرم مثبت رنگ اولیه (کریستال ویوله) را هنگام رنگ بری از دست می‌دهد و رنگ ثانویه را جذب می‌کند و در نتیجه باکتری گرم مثبت، به‌صورت گرم منفی دیده می‌شود.
- اگر گسترش ضخیم باشد هنگام مرحله بی‌رنگ شدن، ممکن است مانند یک گسترش معمولی رنگ نشود و این مسئله باعث خطا در تشخیص شما در گرم منفی یا مثبت بودن باکتری خواهد شد.
- غلظت درست و تازه بودن رنگ‌ها هم در رنگ آمیزی موثر است .
- رنگ‌بری 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 می-کنند و به‌صورت گرم منفی دیده می‌شود.
- دقت شود هنگام تهیه گسترش روی لام از محیط کشت، سن کشت باکتری بایدh ۲۴ یا کمتر باشد. بنابر این در محیط کشت‌هایی که از عمر آنها گذشته و کهنه شده‌اند، در قابلیت نفوذ دیواره سلولی باکتری‌ها تغییراتی حاصل می‌شود که خاصیت گرم مثبت بودن را از دست می‌دهد.

۳-۸-۲ رنگ آمیزی شفر- بولتون

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

۳-۸-۲-۱ تهیه گسترش روی لام:

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

۳-۸-۲-۲ رنگ آمیزی با مالاشیت گرین

مقداری از رنگ مالاشیت گرین را با قطره چکان به‌روی سطح گسترش میکروبی روی لام بریزید.

لام آغشته به‌رنگ را حرارت دهید تا رنگ بخار شود. این عمل را با وارونه کردن شعله گاز بر روی لاک و عبور شعله به‌تناوب از روی رنگ انجام دهید. وقتی که رنگ شروع به‌بخار شدن کرد شعله را کنار ببرید همین که تبخیر متوقف شد دو بار کار را تکرار کنید و نگذارید رنگ بجوشد . مدت min ۳ تا min ۵ به‌ترتیب ذکر شده عمل کنید و اگر مالاشیت گرین کاملا از روی لام تبخیر شد

دوباره مقداری رنگ به‌لام اضافه کنید. بگذارید لام سرد شود تا از شکستن آن جلوگیری شود. به موازات سرد شدن لام به‌اضافه کردن رنگ ادامه دهید زیرا رنگ هنوز در حال تبخیر است.

۳-۸-۲-۳ مرحله شستشو:

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

۳-۸-۲-۴ رنگ آمیزی با سافرانین:

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

۳-۸-۲-۵ مرحله شستشو:

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

۳-۸-۲-۶ مشاهده و تفسیر:

در مشاهده میکروسکوپی لام رنگ آمیزی شده، اسپورها گرد بیضی به‌رنگ سبز مشاهده می‌شوند. و سلول‌های رویشی، قرمز دیده می‌شوند.

چون هاگ پوشش مقاومی است که در برابر نفوذ رنگ مقاومت می کند بنابر این در رنگ آمیزی معمولی می‌توان اسپورها را به‌صورت 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 به‌صورت پراکنده باشند، اغلب توسط رنگ آمیزی ساده و یا گرم قابل مشاهده نخواهند بود.

شکل۲۱- اسپور

۴ نمونه برداری

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

یادآوری-نمونه ارسالی به آزمایشگاه در صورت عدم مطابقت نمونه با مندرجات نامه، نقص در بسته بندی، کافی نبودن مقدارنمونه، مشاهده آثار ظاهری رشد میکروبی، شرایط نامناسب حمل به‌آزمایشگاه، نامناسب بودن درجه

حرارت نمونه ، سپری شدن تاریخ مصرف، عدم وجود استاندارد میکروبی، قابلیت انجام آزمون میکروبیولوژی را دارا نبوده و به‌ارسال کننده عودت داده می‌شود.

۵ روش‌های آزمون میکروبیولوژی شربت

روش‌های آزمون میکروبیولوژی شربت در جدول ۳ آورده شده است:

جدول۳- روش‌های میکروبیولوژی آزمون شربت

ردیف	نوع میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱- ۵۲۷۱
۲	باکتری‌های مقاوم به‌اسید	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۸۴۵
۳	مخمرهای اسموفیلیک	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۱۹۶
۴	کپک	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۱۰۸۹۹

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

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 به‌همان اندازه حائز اهمیت است که باعث ضرورت شمارش میکروارگانیسم‌ها می‌شود. شمارش میکروارگانیسم‌ها به‌روش‌های 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 می کند.

ب-۱ اساس روش جستجو

برای تسهیل در احیاء میکروارگانیسم‌های تحت تنش قرار گرفته در فرآورده، مراحل زیر انجام می‌گردد:

ب-۱-۱ اولین مرحله: نمونه‌ها معمولا در یک محیط آبگوشت غنی‌کننده منتقل می‌شوند. به‌این ترتیب، تعداد میکروارگانیسم‌ها، بدون خطر ممانعت از رشد و تکثیر بوسیلهٔ ترکیبات انتخابی موجود در محیط کشت انتخابی/ افتراقی افزایش می‌یابد.

ب-۱-۲ دومین مرحله : برای جداسازی روی محیط کشت جامد انتخابی/ افتراقی کشت داده می‌شود. از کلنی‌های به‌دست 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 ۱-۸۹۲۳، ۴-۸۹۲۳ و ۹۸۹۹ تعیین شده است.

جدول ۴ –رقیق‌کننده‌ها و محیط‌های کشت

ردیف	نام مواد
۱	Plate Count Agar (PCA)
۲	Orange Serum Agar (OSA)
۳	Potato Dextrose agar ۲% Glucose ۶۰٪ Sucrose (PDA-G-S) Osmophilic Agar (MY۴۰G)
۴	Dichloran-rose Bengal-Chloramphenicol-Agar (DRBC)
۵	Peotone salt solation & Ringer

۷ روش اجرای آزمون

۷-۱ آماده سازی آزمایه

برای جلوگیری از آلودگی میکروبی نمونه‌ها با منابع خارجی، تمام مراحل آماده سازی و دست کاری نمونه باید رعایت شرایط اسپتیک و تجهیزات سترون انجام شود.

برای آماده سازی این فرآورده‌ها به‌بند ۳-۷ این جزوه آموزشی مراجعه کنید .

- برای باز کردن در ظروفی که دارای در آسان باز شو[۱] هستند، از قسمت دیگر آن (غیر از قسمت آسان باز شو) استفاده کنید.

۱- Easy open

- برای تهیه آزمونه حداقل از دو بسته نمونه استفاده کنید.
- از عبور دادن ظروف باد کرده از روی شعله خودداری کنید.
- محتویات بطری در بسته را به‌وسیله 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.

برای اطلاعات بیشتر در باره فرآورده‌های اسیدی، قبل از آزمون گروه‌های خاص میکرو ارگانیسم‌هایی مانند اسید دوست‌ها، به‌استاندارد ملی ایران ۴-۸۹۲۳ مراجعه کنید.

۷-۲ کشت میکروبی

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

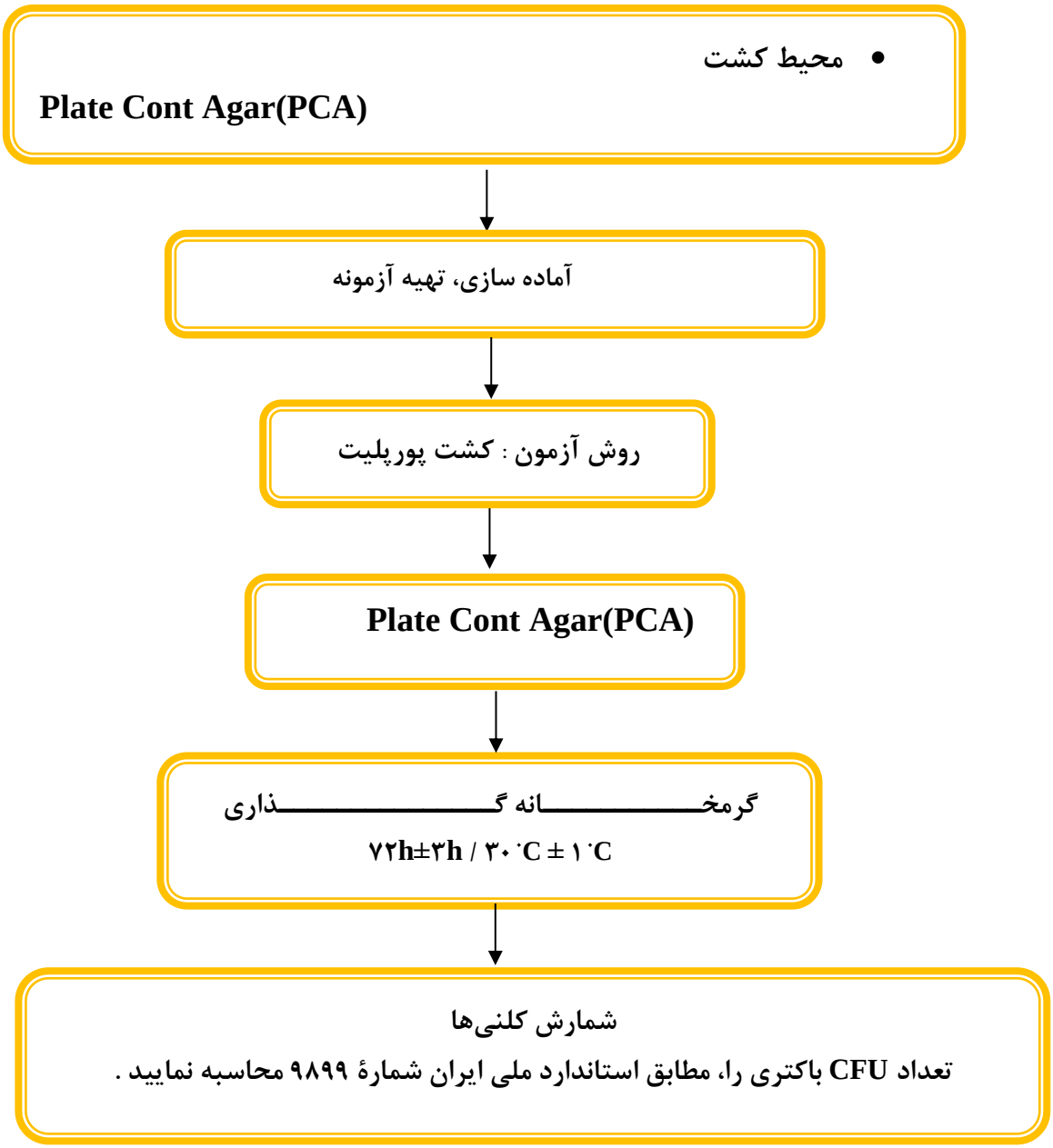
۷-۲-۱ گرمخانه گذاری

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

۷-۳ باکتری‌های هوازی

۷-۳-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲ ، میکروبیولوژی زنجیره غذایی -روش جامع برای شمارش میکروارگانیسم‌ها-قسمت ۱- شمارش کلنی در ۳۰درجه سلسیوس با استفاده از روش کشت آمیخته

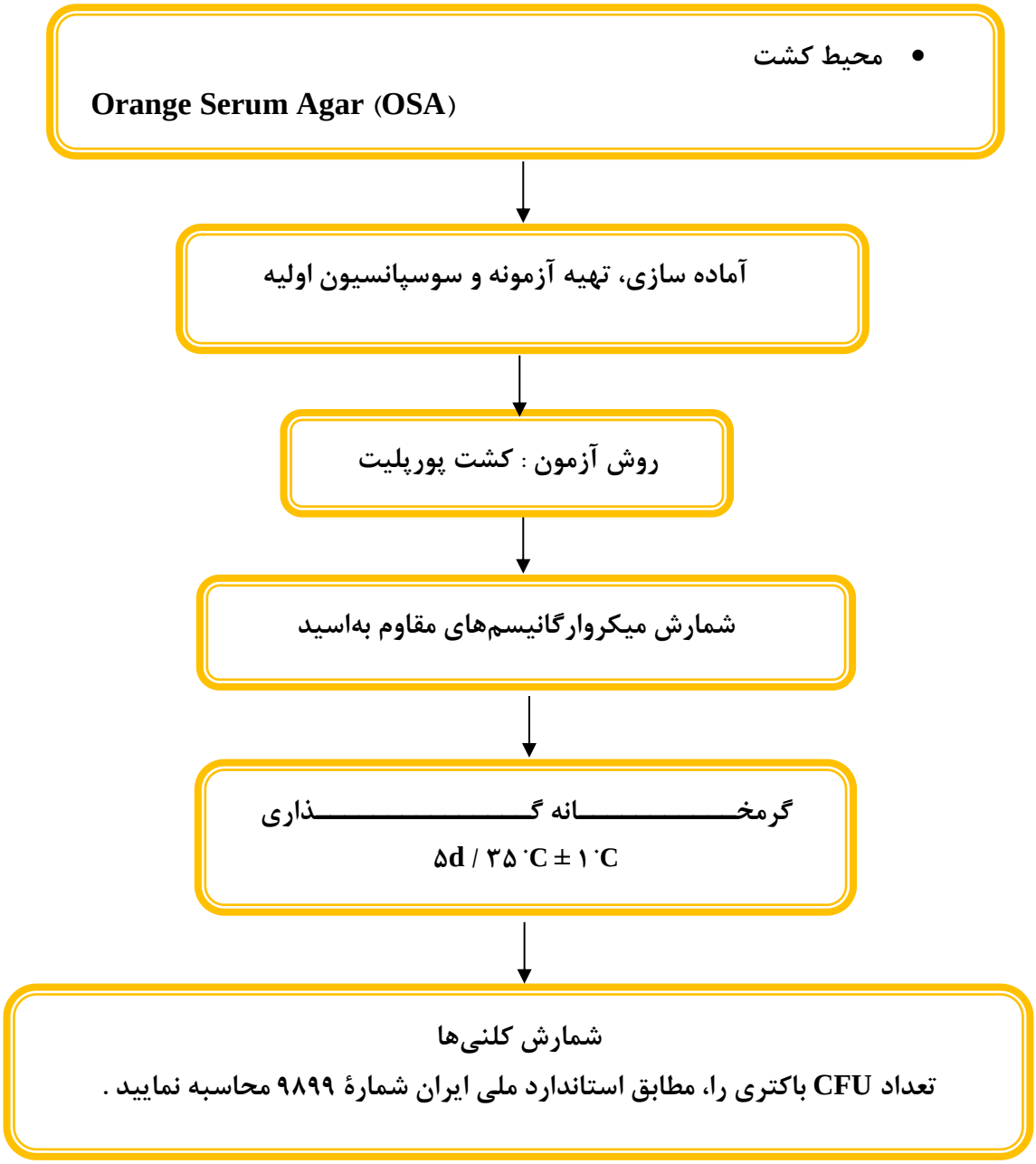
متداولترین روش جهت نشان دادن کیفیت میکروبی محصول، شمارش تمامی باکتری‌هایی که بعد از گرمخانه گذاری در شرایط هوازی در دمای $30\ ^{o}C$، قابلیت رشد و تشکیل کلنی در محیط کشت جامد را دارند، است و مبنای قضاوت بهداشتی یک محصول تولید شده می‌باشد ولی ارزش تشخیصی آن محدود است.این روش در تعیین شرایط بهداشتی و کنترل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



۴-۷ شمارش باکتری های مقاوم به‌اسید

۱-۴-۷ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۶۲۷۴، شربت - ویژگی‌ها و روش‌های آزمون میکروبیولوژی

تمامی باکتری‌هـای گـرم مثبـت و گـرم منفـی، هـوازی و کـم هـوازی کـه در محـیط کشـت بـا pH=۲ تـا pH=۵ ، بعـد از گرمخانـه گـذاری در دمـای ^{o}C ۳۰، قابلیـت رشـد و تکثیـر داشـته و در محـیط کشـت جامد مانند orange serum agar تشکیل کلنی می‌دهند.



۵-۷ قارچ‌ها[۱]

قارچ‌ها یوکاریوت، هتروتروف، غیر فتوسنتتیک بوده و برای رشد و تکثیر به‌ترکیبات آلی و کربن نیاز دارند قارچها هوازی و یا بی‌هوازی اختیاری هستند. تولید مثل آنها به‌صورت جنسی یا غیر جنسی با تشکیل اسپور، جوانه زدن و تقسیم سلولی می‌باشد قارچها توانایی رشد در رطوبت کم و دمای پایین را دارند pH مناسب برای بیشتر گونه‌ها ۵/۶ و محدوده pH برای آنها بین ۲ تا ۹ است

۱- Fungi

ساختار اغلب قارچها از رشته‌ها و یا ریسه‌های نخی شکل به‌نام هیف تشکیل شده است. در قارچ-های پست، ریسه ها یا هیف‌ها فاقد دیواره عرضی هستند. انشعابات هیف‌ها یا ریسه‌ها شبکه‌ای به نام میسیلیوم را به‌وجود می آورند. شبکه میسیلیوم را می‌توان به‌صورت کپک بر روی مواد آلی مختلف مشاهده کرد. آنزیم‌هایی که توسط قارچ‌های مختلف به‌وجود می‌آیند می‌توانند انواع مواد آلی را تجزیه کرده و به‌مواد ساده‌تری تبدیل کنند. قارچ‌ها از لحاظ ساختار یاخته‌ای جزء یوکاریوت‌ها هستند، در اطراف هسته و دیگر اجزای یاخته غشای دو لایه وجود دارد. در اطراف یاخته، دیواره‌های یاخته ای حاوی کیتین قرار می‌گیرند. قارچ‌ها به‌کپک‌ها، مخمرها تقسیم می-شوند. میزان رشد قارچ[۱]، سطح کلنی[۲]، رنگ کلنی[۳]، وجود رنگدانه، مشاهده میکروسکوپی[۴]دارای ارزش تشخیصی است.

۷-۵-۱ کپک‌ها[۵]

میکروارگانیسم‌های رشته‌ای، هوازی مزوفیل هستند آنها غیر فتوسنتتیک، چند سلولی، هتروتروف، هستند. کپک‌ها تولید واحدهای میکروسکوپی بنام تال [۶] می‌کنند که با تجمع آنها، جرم رشته‌ای تشکیل می‌گردد که به‌آن میسیلیوم گفته می‌شود. معمولا به‌صورت کلنی ،پروپاگول[۷] یا جوانه[۸] صاف یا کرکدار، اغلب با ساختار اسپورزایی یا تولید مثل رنگی در سطح محیط‌های کشت قارچی رشد می‌کنند. بهترین رشد کپک‌ها در محیط اسیدی با غلظت بالای قند می‌باشد. کلنی‌های ایجاد شده توسط کپک‌ها، به‌رنگ‌های مختلف سفید، آبی، سبز، خاکستری، و بنفش می‌باشد کلنی ممکن است بصورت برجسته یا فرورفته، چین دار یا مسطح، خامه‌ای با قوام بسیار محکم باشند در پاره‌ای از موارد کلنی‌ها به‌صورت کرکی شکل یا پنبه‌ای شکل می‌باشند کپک ها علاوه بر سطح در عمق محیط کشت نیز می‌توانند کلنی‌های گرد عدسی شکل ایجاد کنند.طبقه بندی کپک‌ها بر اساس شکل ظاهری (مورفولوژی) و تشکیل یا عدم تشکیل اسپور جنسی استوار است. وقتی شرایط برای فعالیت آن‌ها نامساعد شود فوراً ایجاد اسپور می‌کنند، اسپورها در برابر خشکی و سرما

---

۱ - مسطح، برجسته، منظم یا غیر منظم

۲ - صورت پودری باشد و یا به‌صورت شبه مخمری، دانه‌ای، پنبه‌های، پشمی، پرزی و مویی باشد.

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

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

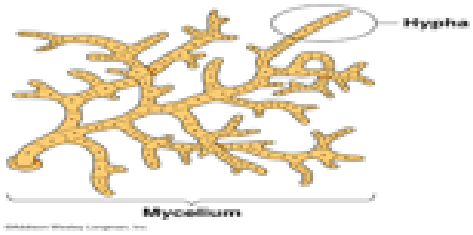
۵- Mold

۶- Hypha(Tall)

۷- به‌موجودات زنده مانند سلول رویشی، گروه سلول‌ها، اسپور، خوشه‌های اسپوریا قطعه‌ای از یک میسیلیوم قارچی گفته می‌شود که قادر به‌رشد در محیط کشت مغذی می‌باشد .

۸- Germ

مقاوم می باشند و در فضا پراکنده می‌شوند و با مساعد شدن شرایط به‌سرعت تبدیل به‌شکل 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 غالبا در حرارت بالاتر از ^{o}C ۱۰ صورت می‌گیرد.



شکل۲۲- هیف و میسیلیوم در مخمر

۲-۵-۷ مخمرها[۷]

میکروارگانیسم‌های هوازی مزوفیل و یکی از گروه‌های قارچ‌های فاقد رشته و تک سلولی هستند و به‌وسیله جوانه زدن تکثیر پیدا می‌کنند .مخمرها پروتئولیتیک نیستند و در کارخانجات تخمیر صنعتی، نانوایی، کارخانجات تقطیر بکار می‌روند این ارگانیزم تحت شرایط بی‌هوازی، قند را متابولیزه می‌کند و تولید الکل و به‌میزان 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 میسلیوم‌های کاذب می‌کنند.تولید مثل غیرجنسی آن‌ها اغلب به صورت جوانه زدن و در برخی به صورت تقسیم دوتائی می‌باشد. بیشتر گونه‌های آن تخمیرکننده و غیر بیماری‌زا هستند.

۱-Penicillium
۲-Mucor
۳-Rhizopus
۴-Fusarium
۵-Aspergillus
۶ -*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

۷-۵-۳ شمارش کپک ومخمر

۷-۵-۳-۱ شمارش کپک و مخمر بر اساس استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲- ۱۰۸۹۹، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش جامع برای شمارش کپک‌ها و مخمرها – قسمت دوّم: روش شمارش کلنی در فرآورده‌های با فعالیت آبی(aw)[۱] کمتر از۰/۹۵

اغلب کپک‌های خشکی دوست [۲]و مخمرهای غلظت دوست[۳] در فرآورده‌های دارای فعالیت آبی مساوی یا کمتراز 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 میزان فعالیت آبی مناسب برای میکروارگانیسم‌های اسموفیل که معمولاً در صنایع غذایی اهمیت دارند، در جدول ۵ نوشته شده است.

جدول ۵- میکرو ارگانیسم‌های با کمترین فعالیت آبی

میکرو ارگانیسم	کمترین فعالیت آبی (aw)
Saccharomyces rouxii	۰/۶۲
ZygoSaccharomyces bailii	۰/۸۰
Debaryomyces	۰/۸۳
Wallemia sebi	۰/۸۷
Saccharomyces cerevisiae	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، برابر۰/۲± ۵/۶ شود. ۱۰mL از محلول ۱٪ کلرامفنیکل در اتانل را به‌محیط پایه اضافه کنید و مخلوط کنید . محیط کشت را در اتوکلاو با دمای ۱°C± ۱۲۱°C به مدت۱۵ min سترون نمایید و در مقادیر ۱۵mL در پلیت توزیع کنید.

۱-Water activity(aw)

۲ - قارچهایی که قادرند درفعالیت 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 به‌مقدار ۵۰ mL/L و کلرو تتراسیکلین به‌مقدار۵۰ mg/L توصیه می‌شود.

محیط پایه را به‌مقدار ۵۰mg/L تهیه کنید و در حجم های۱۰۰ mL توزیع و سترون کنید. محلول ۰/۱٪ کلرو تترا سیکلین هیدرو کلراید در آب مقطر را به‌صورت تازه تهیه کنید و توسط صافی غشایی سترون کنید . بلافاصله پیش از استفاده، ۵mL از این محلول را در شرایط سترون به ۱۰۰mL محیط کشت پایه اضافه کنید و در پلیت ها توزیع کنید. استفاده از جنتامایسین توصیه نمی‌شود زیرا ممکن است که سبب ممانعت از رشد برخی از مخمرها شود.

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

کپک‌ها برای نمایش خصوصیات کامل ریخت شناسی به‌ویژه رنگدانه‌های خود نیاز به عناصر کمیاب دارند که ممکن است در محیط DG۱۸ موجود نباشد برای شناسایی کپک-ها و مخمرها در این محیط کشت، محلول $SO_4Zn,7H_2O$ ۱٪ و $SO_4Cu,5H_2O$، ۰/۵ ٪را به مقدار ۱mL به‌ازاء هر ۱L محیط کشت، پیش از سترون کردن به‌آن بیفزایید.

-آزمون عملکرد برای تضمین کیفیت محیط کشت

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

↓

آماده سازی، تهیه آزمونه و سوسپانسیون اولیه و رقت

- ✓ به‌دلیل رسوب سریع اسپورها در پی‌پت، پس از پر کردن پی‌پت‌ها با سوسپانسیون اولیه یا رقت‌ها ،آن را به‌صورت افقی نگه دارید . برای جلوگیری از رسوب ذرات دارای میکروارگانیسم، سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها را به‌هم بزنید.
- ✓ روش کشت سطحی به‌دلیل بر قراری حداکثر تماس سلول‌ها با اکسیژن هوا و نیز پیشگیری از هر گونه مخاطره ناشی از غیر فعال شدن پرو 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

با استفاده از پی پت سترون مقدار ۰/۱ mL از آزمایه (فرآورده مایع) یا ۰/۱ mL از سوسپانسیون اولیه (سایر فرآورده‌ها) را به‌یک پلیت دارای محیط کشت از پیش ریخته DG۱۸ انتقال دهید در صورت لزوم با یک پی پت سترون دیگرمقدار ۰/۱ mL از اولین رقت اعشاری (فرآورده مایع)، یا ۰/۱ mL از رقت 10^{-2} (سایر فرآورده‌ها) را به‌یک پلیت دیگر دارای محیط کشت DG۱۸ تلقیح کنید.

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

(Dichloran ۱۸٪ mass fraction glycerol chloramphenicol) agar

- ✓ روش کشت سطحی به‌دلیل قراری 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 .
- ✓ پلیت‌ها را به‌صورت هوازی، با درپوش بالا و ایستاده در انکوباتور قرار دهید.

✓ اگر احتمال حضور *زیروماسیزبیسپوروس*[1] وجود داشته باشد، پلیت‌ها را به‌مدت زمان ۱۰ d گرمخانه کنید.

گرمخانه گذاری

(۳ تا ۵)d / (۲۵±۰/۵) ˚C

✓ اسپورهای کپک‌ها به‌راحتی در هوا پخش می‌شوند لذا، پلیت‌ها را با احتیاط جابه‌جا کنید تا از پیدایش کلنی های اقماری جلو گیری شود در غیر این صورت شمارش، غیر واقعی و بالا خواهد بود. کلنی‌های مخمرها و کلنی‌ها یا پروپاگول‌های کپک‌ها را در صورت نیاز، جدا گانه شمارش کنید.

شمارش کلنی‌ها

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

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

آماده سازی، تهیه آزمونه و سوسپانسیون اولیه و رقت

↓

روش آزمون کشت پور پلیت

↓

Dichloran ۱۸٪ mass fraction glycerol chloramphenicol agar

↓

گرمخانه گذاری هوازی

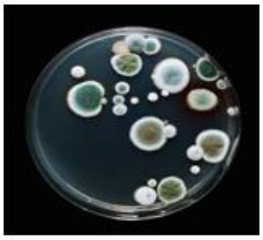
(۳ تا ۵)d / ۲۵˚C ±۰/۵ ˚C

۱- Xeromyces bisporus

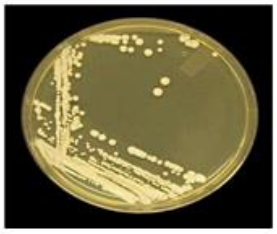
- ✓ به‌منظور افزایش رطوبت داخل انکوباتور، یک بشر آب مقطر داخل آن قرار دهید. گرمخانه‌گذاری بیشتر از مدت d ۵ بستگی به‌دما و میزان رشد دارد.
- ✓ در صورتی که انتظار دارید تعداد زیادی باکتری مورد شمارش قرار گیرند می‌توانید رقت-های لازم برای دستیابی به‌شمارش کلنی‌ها را کشت دهید.

خصوصیات کلنی مخمر

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



شکل ۲۳- کلنی‌های کپک‌ها



شکل ۲۴- کلنی‌های مخمرها

شمارش کلنی‌ها

تعداد CFU کلنی را، مطابق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹محاسبه نمایید .

۷-۵-۳-۲ مخمرهای اسموفیلیک

۷-۵-۳-۲-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۱۹۶، میکرو بیولوژی موادغذایی و خوراک دام - مخمرهای اسموفیلیک - روش شمارش

مخمرهای ا سموفیلیک میکروارگانیسم‌های هستند که قادر به‌ر شد در غلظت‌های زیاد قند (با درجه بریکس ۶۷ تا ۷۰) می‌باشند. بیشترین مخمرهای اسموفیلیک به‌گونه‌های *زیگوساکارومیسس* تعلق دارد و اغلب به عنوان عامل فساد عسل، آبنبات‌های شکلاتی با مغز نرم، مرباها، ملاس، شربت ذرت، آب میوه تغلیظ شده و فرآورده‌های مشابه می‌باشد. این میکروارگانیسم‌ها در محیط انتخابی، پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۵°C ± ۰/۵ °C به‌مدت زمان ۳ d تا ۵ d در شرایط هوازی سلول‌های مخمری دارای جوانه به‌رنگ کرم و مات به ا شکال نامنظم و دارای ابعاد مختلف تولید کنند. برای شنا سایی دقیق مخمرها خ صو صیات مورفولوژی[۱]، میکروموفولوژی[۲]، قابلیت تولید آنزیم اوره، قابلیت رشد مخمر در محدوده دمایی ۴°C تا ۵۰°C، قابلیت رشد در

۱ - در بررسی مورفولوژیک ویژگی‌هایی چون رنگ و شکل کلنی، بافت، حاشیه و تغییرات طیف رنگی آن در واحد زمانی مشخص ثبت و گزارش می‌گردد

۲ - در بررسی میکرومورفولوژی اندازه و شکل سلول، تولید جوانه و آرایش آن ثبت و گزارش می‌گردد.

pHهای مختلف، قابلیت تولید ترکیبات آمیلوئید خارج سلولی، قابلیت رشد در شرایط دمایی متفاوت، قابلیت رشد در حضور تراکم‌های متفاوت نمک کلرید سدیم (۱٪ تا ۱۶٪)، قابلیت تحمل فشار اسمزی بالا در حضور تراکم‌های ۵۰٪و ۶۰٪ گلوکز و مقاومت در برابر تراکم‌های٪ ۰/۱ و٪ ۰/۰۱ سیکلوهگزامید مورد بررسی قرار می گیرد.

محیط کشت

Potato Dextrose agar ۲٪ Glucose ۶۰٪ Sucrose (PDA-G-S)

Osmophilic Agar (MY۴۰G)

تهیه محیط کشت:

- **Potato Dextrose agar ۲٪ Glucose ۶۰٪ Sucrose (PDA-G-S)**

مقدار g ۳۹ آگار دارای دکستروز – سیب زمینی را در mL ۴۰۰ آب مقطر حل کنید در حالی که هنوز گرم است، g ۲۰ گلوکز g ۶۰۰ ساکاروز را به‌آن بیافزایید تا کاملاً حل شود سپس حجم مخلوط را با آب مقطر به‌حجم۱L برسانید. a_w این محیط کشت پس از سترون شدن، برابر۰/۹۲ است.

تهیه محیط کشت:

- **Osmophilic Agar (MY۴۰Gs)**

مقدار g ۱۲پودر عصاره مالت،g ۳ عصاره مخمر و ۱۲g آگار را در mL ۵۵۰ آب مقطر حل کنید سپس با آب مقطر به‌حجم برسانید در حالیکه هنوز گرم است،g۴۰۰ گلوکز را یکباره به‌آن افزوده و تکان دهید تا از تشکیل لخته ممانعت شود محیط را به مدت min ۳۰در حمام بخار با دمای$^{\circ}C$ ۱۰۰ قراردهید. این محیط به‌دلیل پایین بودن a_w نیاز به‌اتو کلاو کردن ندارد a_w نهایی این محیط پس از سترون شدن، حدود ۵/۵ در دمای$^{\circ}C$ ۲۵ است. محیط کشت را در مقادیر mL ۱۵ در پتری دیش توزیع کنید. این محیط کشت به‌مدت ۲ هفته در دمای ۵°C± ۳°C قابل نگهداری است.

برای شمارش مخمرهای اسموفیلیک رقیق کننده‌هایی با فعالیت آبی کم مورد نیاز است در صورت استفاده از رقیق کننده هیپوتونیک[۱]، مخمرهای اسموفیلیک از بین خواهند رفت. برای کاهش

۱- Hypotonic

فعالیت آبی محلول رقیق کننده عموماً از ٪ ۴۰ تا ٪ ۵۰ (وزنی/ وزنی) قندهای شش کربنه مانند: گلوکز و یا / قند اینورت باید استفاده کرد. توصیه می‌شود از محلول رقیق کننده فسفات بافری استفاده کنید .

تهیه محلول رقیق کننده فسفات بافری:

مقدار ۴۲/۵g فسفات دی هیدرژن پتاسیم (KH_2PO_4) را در mL ۱۰۰۰ آب مقطر حل کنید. pH را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی برابر ۰/۲ ±۷/۲ در دمای °C ۲۵ باشد. پس از تقسیم در حجم‌های مناسب، به‌مدت زمان min ۱۵در دمای °C ۱۲۱ سترون کنید .

روش انجام آزمون

آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها

کشت پور پلیت

Potato Dextrose agar ۲٪ Glucose ۶۰٪ Sucrose (PDA-G-S)

Osmophilic *Agar* (MY۴۰G)

یا

گرمخانه گذاری هوازی

۳۰°C± ۰/۵ °C / ۵ d تا ۷d

به‌منظور افزایش رطوبت داخل انکوباتور، یک بشر آب مقطر داخل آن قرار دهید.
گرمخانه‌گذاری بیشتر از d ۵ بستگی به‌دما و میزان رشد دارد.

شمارش کلنی‌ها

تعداد CFU مخمرهای اسموفیل را در هر میلی لیتر نمونه را، مطابق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹محاسبه نمایید.

۸ بیان نتیجه آزمون

۸-۱ شمارش

تعداد N میکروارگانیسم های موجود در نمونهٔ S را با استفاده از پارامتر های زیر محاسبه کنید:

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

c تعداد کلنی های 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 فرمول های ۱ ، ۲ و ۳ تعداد میکروارگانیسم های موجود در نمونه را محاسبه کنید:

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

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

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

که در این فرمول ها،

m میانگین حسابی به‌دست آمده از دو پلیت ،

V حجم ماده تلقیحی به هر پلیت، به‌میلی لیتر ،

۱- Arithmetic mean

۲- Weighted mean

d ضریب رقت مربوط به‌رقت 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 شدهٔ شمارش کلنی ها، از دو رقت متوالی می‌باشد و با استفاده از فرمول (۴) محاسبه می شود :

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

که در آن :

$\sum c$ مجموع کلنی‌های شمارش شده از تمام پلیت‌های حاصل از دو رقت متوالی می‌باشد،

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

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

نتیجه را تا دو رقم معنی‌دار گرد کنید.

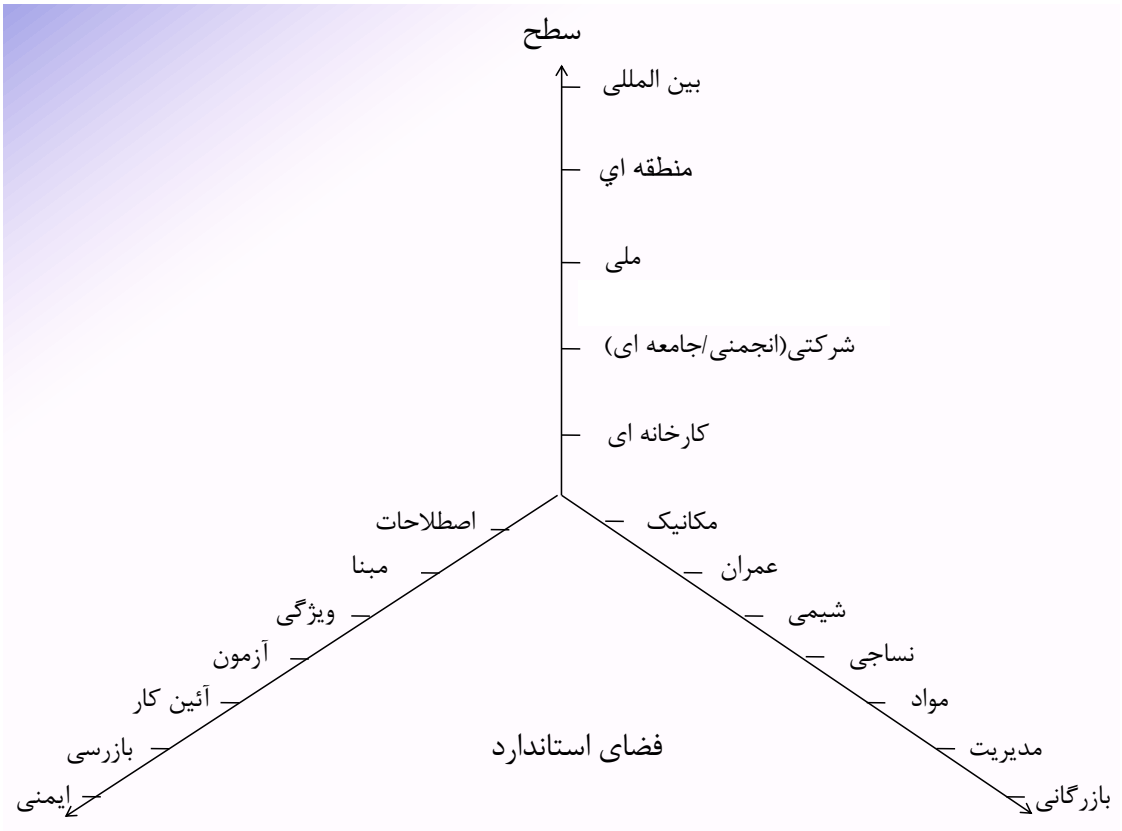
۸-۳ صحه‌گذاری

۸-۳-۱ صحه‌گذاری شمارش

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

پیوست الف
انواع استاندارد

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



الف-۲ سطح استاندارد

استانداردها دارای سه سطح کلی می‌باشند که می‌توان آن ها را به‌صورت زیر تقسیم بندی کرد:

الف- استانداردهای کارخانه ای، این گونه استانداردها توسط کارخانجات و به‌منظور 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 به‌وسیله سازمان استاندارد در یک کشور که به‌عنوان 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.

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

پ- 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 به‌استاندارد های ملی با توجه به‌نیاز و موقعیت زمانی کشورها از نظر توسعه فنی و صنعتی می باشد.

الف-۳- جنبه استاندارد

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

الف- استاندارد های ویژگی

ب- استاندارد های روش آزمون

پ- استاندارد های آیین کار

ت- استاندارد های ایمنی

ث- واژه نامه

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

الف-۴- اجرای استاندارد

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

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

ب- استاندارد های تشویقی، شامل استانداردهایی است که تولید کننده با توجه به‌توان بالای تولید و هم چنین علاقمندی و موافقت خود، داوطلبانه تمایل به‌اجرای آن دارد.

متن کامل استانداردهای ملی ایران از طریق سایت سازمان ملی استاندارد ایران به‌آدرس زیر و لینک «استانداردهای ملی» در دسترس می‌باشد.

www.isiri.gov.ir

پیوست ب

مفاهیم مورد استفاده در کنترل کیفیت

ب-۱- نمونه (Sample)

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

ب-۲-حجم نمونه (Sample Size)

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

ب-۳- نمونه برداری (Sampling)

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

ب-۴- بازرسی (Inspection)

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

ب-۵-درستی (Accuracy)

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

ب-۶- دقت (Precision)

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

ب-۷- تجدید پذیری (Reproducibility)

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

ب-۸- تکرار پذیری (Repeatability)

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

ب-۹- رواداری (Tolerance)

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

پیوست پ
(اطلاعاتی)

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

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

مدیرکنترل کیفیت واحد تولیدی طبق آیین نامه مذکور،علاوه بر انجام وظایف خود از جمله حضور تمام وقت در یک نوبت کاری و بازرسی ،کنترل و نظارت کامل بر مواد اولیه، شرایط فرآورده حین ساخت ، محصول نهایی و شرایط نگهداری درکلیه مراحل تولید و یا خدمت و سایر وظایف و موارد ذکر شده، موظف است نتایج آزمون نمونه های تولید شده در کارخانه را روزانه ثبت نموده و به‌صورت کتبی ماهیانه (حداکثر تا پایان هفته اول ماه بعد) به‌اداره 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 به‌اعمال تنبیهاتی به‌ترتیب شامل: تذکر شفاهی به‌عنوان کمترین و **ابطال دایم پروانه** به‌عنوان 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 به‌معرفی فرد جایگزین اقدام و اداره کل نیز موظف است نسبت به‌احراز شرایط فرد معرفی شده و تأیید صلاحیت وی اقدام نماید.

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

پ-۲ خلاصه ای از دستورالعمل نحوه تذکر، اخطار، تعلیق و ابطال پروانه کاربرد علامت استاندارد ایران به‌علت عدم تداوم انطباق فرآورده با استاندارد مربوطه

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

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

پ-۲-۱-۱ نقص بحرانی:

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

پ-۲-۱-۲ نقص عمده:

نقصی است متفاوت با نقص بحرانی که فقدانی را به‌وجود آورده یا به‌نحو قابل ملاحظه ای امکان استفاده از کالای مورد نظر را برای منظور خاص، کاهش می دهد.

پ-۲-۱-۳ نقص جزئی:

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

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

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

جدول ۱- امتیازات منفی نواقص موجود در فرآورده

نوع نقص	امتیاز منفی
بحرانی	۳۰
عمده	۱۵
جزئی	۵

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

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

پ-۳-۱ در صورتیکه جمع امتیاز منفی یک گزارش نتیجه آزمون یا جمع امتیازات منفی نتایج چند آزمون به ۶۰ رسید، اداره کل استاندارد استان مربوط به‌واحد 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 به‌کار بستن علایم آنها ارجاع می دهد.

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

پ-۳-۳ در مورد کالاهای مشمول استاندارد اجباری، در صورتیکه امتیاز منفی یک گزارش نتیجه آزمون و یا جمع امتیازات منفی نتایج چند آزمون به ۱۲۰ رسید، اداره کل استاندارد استان مربوط، علاوه بر اخطار کتبی، برای جمع آوری کالای مغایر با استاندارد ملی با شماره سری ساخت مربوط موضوع را به‌کمیسیون 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 به‌واسطه نقایص عمده و بحرانی باشد، نسبت به‌تشکیل کمیته علایم برای ابطال پروانه کاربرد علامت استاندارد اجباری اقدام نموده و در صورت ابطال پروانه، موضوع را از طریق روابط عمومی به‌عموم می رساند.

یادآوری۱- 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 به‌حد نصاب امتیاز منفی ذکر شده در بندهای مذکور است.

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

پیوست ت

نقایص بحرانی ، عمده و جزئی آزمون ها ی میکروبیولوژی شربت ها

طبق استاندارد ملی ایران شماره ۶۲۷۴

ردیف	شرح آزمون	درجه اهمیت
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	عمده
۲	باکتری های مقاوم به‌اسید	عمده
۳	مخمرهای اسموفیلیک	عمده
۴	کپک	عمده