ریاست جمهوری
سازمان ملی استاندارد ایران

جزوه دوره کارآموزی

میکروبیولوژی فرآورده‌های لبنی

تخمیری

شماره مدرک : ۶۲۲/۲۹/ج
تاریخ تصویب : ۱۳۹۸

تاریخ تجدید نظر: **شماره تجدید نظر:**

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

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به‌موجب بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفهٔ تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به‌عهده دارد.

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

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند درکمیته ملی طرح، بررسی و درصورت تصویب، به‌عنوان استانداردملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می¬شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به‌تصویب 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 به‌عنوان تنها رابط[۴] کمیسیون کدکس غذایی(CAC)[۵] در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به‌شرایط 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 زیست محیطی 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 به‌منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به‌استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آنها اعطا و بر عملکرد آن¬ها نظارت میکند. ترویج دستگاه بین المللی یکاها، واسنجی وسایل 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 استان ها، آزمایشگاه های همکار و پژوهشگاه استاندارد انجام می شود. برای ایجاد وحدت رویه و هماهنگی در نحوه برگزاری این دوره ها در مراکز مختلف به منظور ارتقاء کیفیت آموزش مخاطبین مورد نظر، دفتر آموزش و ترویج استاندارد با همکاری پژوهشگاه استاندارد، در راستای استاندارد سازی فرآیند کارآموزی، اقدام به تدوین برنامه مدونی برای انجام فرآیند کارآموزی در زمینه محصولات مشمول استاندارد اجباری نموده است.

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

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

محتوای دوره کارآموزی

میکروبیولوژی فرآورده‌های لبنی تخمیری

عنوان دوره کارآموزی:

میکروبیولوژی فرآورده‌های لبنی تخمیری

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 فرآورده‌های لبنی تخمیری بر اساس استانداردهای ملی ایران شمارهای ۳۶۹۰، ۴۴۱۳، ۵۲۳۴، ۳-۶۸۰۶، ۸۶۶۳، ۱-۸۹۲۳، ۵-۸۹۲۳، ۱۱۱۶۶، ۱۰۱۵۴، ۹۸۹۹ می‌باشد و موارد زیر را در برمی‌گیرد:

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

توانایی های کارآموزان پس از طی دوره:

- روش تهیه و سترون‌سازی محیط کشت های مورد نیاز
- روش آماده‌سازی و سترون‌سازی وسایل مورد نیاز
- -روش آلودگی زدایی 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 :

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	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 فرآورده‌های لبنی تخمیری	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	۱	*		جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره‌های: ۳۶۹۰، ۱۸۱۰،، ۵۲۳۴، ۳-۶۸۰۶، ۸۲۸۴، ۸۶۶۳ ، ۱-۸۹۲۳، ۵-۸۹۲۳، ۱۱۱۶۶، ۱۰۱۵۴، ۱-۱۰۸۹۹
۵	آشنایی با شاخص‌های میکروبی و حدود مجاز آنها در فراورد های لبنی تخمیری	آشنایی با میکرو ارگانیسم‌های فرآورده‌های لبنی تخمیری	۱	۱			جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره‌های: ۳۶۹۰، ۱۸۱۰، ۵۲۳۴، ۳-۶۸۰۶، ۸۲۸۴، ۸۶۶۳ ، ۱-۸۹۲۳، ۵-۸۹۲۳، ۱۱۱۶۶، ۱۰۱۵۴، ۱-۱۰۸۹۹

ردیف	رئوس مطالب	محتوای آموزشی	مدت آموزش (ساعت)		اجراکننده		منبع/ استانداردها
			تئوری	عملی	مدرس	کارآموز	
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 شماره‌های: ۳۶۹۰، ۱۸۱۰، ۵۲۳۴، ۳-۶۸۰۶، ۸۲۸۴، ۸۶۶۳ ، ۱-۸۹۲۳، ۵-۸۹۲۳، ۱۱۱۶۶، ۱۰۱۵۴، ۱-۱۰۸۹۹
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 شماره‌های: ۳۶۹۰، ۱۸۱۰، ۵۲۳۴، ۳-۶۸۰۶، ۸۲۸۴، ۸۶۶۳ ، ۱-۸۹۲۳، ۵-۸۹۲۳، ۱۱۱۶۶، ۱۰۱۵۴، ۱-۱۰۸۹۹
۸	گرمخانه‌گذاری	گرمخانه‌گذاری در دما و زمان مناسب بر حسب باکتری‌های مورد نظر	۰/۵		*		جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره‌های: ۳۶۹۰، ۱۸۱۰، ۵۲۳۴، ۳-۶۸۰۶، ۸۲۸۴، ۸۶۶۳ ، ۱-۸۹۲۳، ۵-۸۹۲۳، ۱۱۱۶۶، ۱۰۱۵۴، ۱-۱۰۸۹۹
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 شماره‌های: ۳۶۹۰، ۱۸۱۰، ۵۲۳۴، ۳-۶۸۰۶، ۸۲۸۴، ۸۶۶۳ ، ۱-۸۹۲۳، ۵-۸۹۲۳، ۱۱۱۶۶، ۱۰۱۵۴،۱-۱۰۸۹۹

ردیف	رئوس مطالب	محتوای آموزشی	مدت آموزش (ساعت)		اجراکننده		منبع / استانداردها
			تئوری	عملی	مدرس	کارآموز	
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 :

اســتاندارد ملی ایران شــمارهٔ ۲۰۸۳۴، میکروبیولوژی زنجیره مواد غذایی -روش های نمونه برداری برای آزمون های میکروب شناسی

نحوه برگزاری آزمون:

عملی	تئوری
*	*

جزوه دوره کارآموزی فرآورده‌های لبنی تخمیری

تهیه کننده/ تهیه کنندگان:

شهپر مقدمی

گروه پژوهشی/ آزمایشگاه:

گروه پژوهشی میکروبیولوژی فرآورده‌های لبنی تخمیری
به سفارش دفتر آموزش و ترویج استاندارد

منابع و مآخذ:

۱. استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۸۱۰، میکرو بیولوژی مواد غذایی . خوراک دام – روش جستجوی سالمونلا در مواد غذایی
۲. استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش جستجو و شمارش اشریشیاکلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی
۳. استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵۴۸۴، شیر و فرآورده‌های آن-روش شمارش کلی پرگنه های میکروارگانیسم‌ها در ۳۰ درجه سلسیوس
۴. استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۴۸۶، شیر و فرآورده‌های آن – شمارش کلی فرم ها قسمت اولی- روش شمارش پرگنه‌ها در ۳۰ درجه سلسیوس (بدون تقویت سازی)
۵. استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲ –۵۴۸۶، شیر و فرآورده‌های آن – شمارش کلی فرم ها قسمت دوم – روش شمارش بیشترین تعداد احتمالی ۳۰ درجه سلسیوس
۶. استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳-۶۸۰۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-روش جامع برای شمارش استافیلوکوکوس‌های گوآگولاز مثبت (استافیلوکوکوس وسایر گونه‌ها) قسمت سوم جستجو شناسایی و شمارش به‌شیوه محتمل‌ترین تعداد (MPN) برا ی تعداد کم میکروارگانیسم
۷. استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۸۹۲۳، 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
۸. استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵-۸۹۲۳، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی – قسمت ۵ – مقررات ویژه برای آماده‌سازی شیر و فرآورده‌های آن

۹. استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۴۳۲، میکروبیولوژی موادغذایی و خوراک دام – روش جامع برای شمارش باکتری‌های احیاء کننده سولفیت در شرایط بی هوازی
۱۰. استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۰۱۵۴، شیر و فرآورده‌های آن-شمارش واحدهای تشکیل دهنده کلنی کپک و/یا مخمر –شمارش کلنی در پلیت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس
۱۱. استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -روش جامع برای شناسایی و شمارش کلی‌فرم‌ها
۱۲. استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۰۸۳۴، میکروبیولوژی زنجیره مواد غذایی -روش های نمونه برداری برای آزمون های میکروب شناسی
۱۳. یگانه، مهرداد. استاندارد و استاندارد کردن، چاپ اول، موسسه دانش پارسیان، ۱۳۸۹

۱۵ - D. SAMARŽIJA et al.: Psychrotrophic bacteria and milk quality, *Mljekarstvo* ۶۲(۲), ۷۷-۹۵ (۲۰۱۲)

فهرست

عنوان		صفحه
آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران		ب
پیشگفتار		ج
محتوای دوره کارآموزی		د
جزوه دوره کارآموزی فرآورده‌های لبنی تخمیری		آ
فهرست		ج
مقدمه		د
۱	هدف	۱
۲	استانداردهای ملی ایران	۱
۳	اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی	۲
۴	نمونه برداری	۲۸
۵	روش‌های آزمون میکروبیولوژی فرآورده‌های لبنی تخمیری	۲۹
۵-۱	اصول آزمون	۳۳
۶	محیط‌های کشت و رقیق‌کننده‌ها	۳۳
۷	روش اجرای آزمون	۳۶
۸	بیان نتیجه آزمون	۷۵
	پیوست الف استانداردهای مرتبط با (GMP) فرآورده‌های لبنی	۷۹
	پیوست ب- انواع استاندارد	۸۲
	پیوست پ- مفاهیم مورد استفاده در کنترل کیفیت	۸۴
	پیوست ت-(اطلاعاتی)	۸۵
	پیوست ث- نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌های میکروبیولوژی فرآورده‌های لبنی تخمیری طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۴۰۶	۸۴ ۸۸

مقدمه

شیر امولوسیون پیچیده‌ای از پروتئین، چربی، قند و مواد معدنی است. شیر تقریباً ۸۷ ٪آب، ۳/۵٪ پروتئین، ۳/۵ ٪چربی و ۵٪ لاکتوز دارد محصولات بدست آمده از تخمیر شیر، با طعم‌های متفاوت، و به‌علت داشتن آب کمتر نسبت به‌شیر، مقاومتشان در برابر عوامل فساد غذایی بیشتر است. تخمیر شیر در شرایط دمایی مناسب صورت می‌گیرد و بسته به‌نوع مخمر، نوع شیر و شرایط فرایند محصولات متفاوت تولید می‌شود. یکی از مراحل اساسی فرآیند تولید محصولات لبنی در واحدهای صنعتی، تلقیح شیر با کشت استارترهایی شامل لاکتوبا سیلوس‌ها و استرپتوکوک‌ها است که شیر را به‌ماست و محصولات لبنی فرعی تبدیل می‌کنند. که در آن *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*[۱] و *لاکتوباسیلوس دلبروکی*[۲] *زیرگونه بولگاریکوس* باکتری‌های غالب هستند. *استرپتوکوک*‌های لاکتیک دارای آنتی‌ژن‌های گروه N هستند و از مهمترین آنها *استرپتوکوکوس لاکتیس*، *استرپتوکوکوس کرومووریس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* را می‌توان نام برد.*استرپتوکوکوس لاکتیس* متشکل از یک یا دو زنجیره بلند یا کوتاه با سلول‌های بیضی شکل است. بیشتر گونه‌ها جور تخمیر (هوموفرمانتاتیو) مانند *پدیوکوکوس*[۳]، *لاکتوکوکوس*[۴] و برخی از لاکتو باسیلوس‌ها[۵]جز گروه باکتری‌های همو فرمانتاتیو[۶] می‌باشند. دیگر کوکسی‌های هموفرمنتاتیو مورد استفاده در کشت‌های آغازگر مانند گونه های *استرپتوکوکوس*، *انترو کوکوس*[۷] ، *پدیو کوکوس*[۸] و *آئرو کوکوس*[۹] هستند. هتروفرمانتیوها[۱۰] برای تولید عطر و آرومای و تولید ترکیباتی مانند استیل‌الدئید و دی‌استیل[۱۱] بسیار مهمتر از هموفرمانتاتیو هستند. به‌طوریکه در نتیجه تخمیر قند، ۸۵ تا ۹۸ در صد اسید لاکتیک و مقادیر جزیی محصولات فرعی دیگر ایجاد می‌کنند.

لوکونوستوک مزانترئیدیس زیر گونه کریموریس (کوکسی گرم مثبت) و دیگر گونه *لاکتو باسیل*ها (هترو فرمانتیو اختیاری) که تولید CO_2 و دیگر محصولات فرعی می‌کنند. شامل: لاکتو *باسیلوس پلانتاریوم*[۱۲] ، *لاکتو باسیلوس کازئی*[۱۳] و *لاکتو باسیلوس کیرواتیس* [۱۴] است .

۱-*Streptococcus thermophilus*

۲- *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

۳- *Pediococcus*

۴- *Lactococcus*

۵- *lactobacillus*

۶- *homofermentation*

۷- *Enterococcus*

۸- *Pediococcus*

۹- *Aerococcus*

۱۰- *heterofermentative*

۱۱- diacety

۱۲- *Lb. plantarum*

۱۳- *Lb. casei*

۱۴- *Lb. curvatus*

برخی از *لاکتو باسیل*ها که توانایی تولید گاز، سیترات گلوکونات و آمینواسید و عطر و آروما را بر عهده دارند مانند *لوکونستوک مزانتروئید* ساب گروه *کریموریس*[1] و *لاکتو کوکوس لاکتیس* ساب گروه *لاکتیس* بیووار دی *استیل لاکتیس*[2] اغلب در تولید کره، خامه کاربرد دارند. باکتری‌ها، قند موجود در شیر را تجزیه نموده و اسید لاکتیک تولید می‌کنند. متعاقبا، pH شیر پایین رفته و پروتئین موجود در شیر به‌صورت توده جامدی در می‌آید. گونه‌های *لاکتوباسیلوس*، مهمترین باکتری‌های خانواده *لاکتوباسیلوس* محسوب می‌شوند.

*لاکتوباسیل*ها (میله‌ای شکل، باریک، دراز، گرم مثبت و بدون اسپور) معمولاً به‌صورت رشته‌هایی مرکب از سلول‌های موازی زنجیره‌ای یا تک تک هستند. و در مواد غذایی و فرآورده‌های لبنی به‌وفور یافت می‌شوند. بسیاری از گونه‌های موجود در شیر پاستوریزه مانند *لاکتوباسیلوس برنیس*، *لاکتو باسیلوس لاکتیس* و *لاکتوباسیلوس فرمنتم*، مقاوم به اسید و ترمودیوریک (تحمل کننده گرما) هستند و در تهیه فرآورده‌های لبنی کاربرد دارند. مکانیسم عمل این دو باکتری به‌این ترتیب است که *لاکتوباسیلوس* دارای فعالیت پروتئولیتیک است و باعث جدا شدن اسیدهای آمینه از کازئین می‌گردد که همین اسیدهای آمینه فعال کننده *استرپتوکوک* می‌باشد از جمله آنها می‌توان به‌اسید آمینه والین اشاره کرد. عطر ماست وابسته به‌فعالیت *استرپتوکوک* است. در ابتدا pH جهت فعالیت *استرپتوکوک* مناسب است و شروع تخمیر اسیدی را تضمین می‌کند و عمل تجزیه کازئین محرک رشد استرپتوکوک می‌باشد و سپس شرایط برای ادامه فعالیت نامناسب می شود و *لاکتوباسیلوس*ها جانشین می‌شوند زمانی که اسیدیته به ۶۵ تا ۷۰ درجه درنیک[3] می رسد، انعقاد صورت می‌گیرد.

مزه و طعم ماست از سایر فرآورده‌های اسیدی شده شیر متفاوت بوده و مواد فرار و معطر آن شامل مقدار کمی اسید استیک و استالدئید است.گاهی مصرف ماست نسبت به‌شیر بیشتر توصیه می شود، زیرا سیستم گوارشی بعضی افراد نسبت به‌قند لاکتوز موجود در شیر حساسیت دارد، این فرآورده غذایی به‌دلیل کاهش میزان لاکتوز و غلظت بالای کلسیم ارزش غذایی بالایی دارد.

از نظر تغذیه‌ای، ماست ماده غذایی مفیدی می‌باشد که سرشار از پروتئین و برخی انواع ویتامینB است. املاح موجود در آن زیاد بوده و میزان چربی آن با میزان چربی شیری که ماست از آن تهیه شده برابر می‌باشد. در صورت افزودن انواع میوه‌ها و نکتار آن‌ها، انواع مربا، مارمالاد، ژله میوه‌ها، آب میوه‌ها، شربت میوه‌ها، آب میوه‌های تغلیظ شده به‌ماست یا شیر پاستوریزه مایه زده ماست طعم‌دار تولید می‌شود.

۱- *Leuconostoc mesenteroidessubsp cremoris*

۲- *Lactococcus lactis sub sp lactis biovar diacetylactis*

۳ - یکی از روش‌های متداول برای سنجش اسیدیته شیر، روش درجه دورنیک است که نتیجه آن به‌صورت درجه درنیک (°D) نشان داده می‌شود. مطابق تعریف هر درجه درنیک معادل۰٫۱ g اسید لاکتیک دریک لیتر شیر است. اسیدیته طبیعی شیر گاو ۰٫۱۳٪تا۰٫۱۶٪ بر حسب اسید لاکتیک که معادل°D ۱۳تا °D ۱۶ می‌باشد .

استرپتوکوکوس لاکتیس در دمای ۲۸ °C به‌سرعت در شیر رشد کرده و آن را ترش می‌کند. متوقف شدن فعالیت باکتری‌های گرم مثبت در شیر به‌وجود آنتی بیوتیک قوی به‌نام نیسین (توسط برخی گونه‌های *استرپتوکوکوس لاکتیس* تولید می‌شود) بستگی دارد.

متابولیت‌های حاصل از فعالیت میکروارگانیسم‌ها در محصولات لبنی

تولید اسید/ تولید گاز

بسیاری از باکتری‌ها از جمله: ***Coliforms,clostridum ,bacillus .spp***

با تجزیه لاکتوز شیر و تولید اسید لاکتیک، موجب کاهش pH و انعقاد شیر می‌شود

تجزیه چربی‌ها

بسیاری از باکتری‌ها از جمله: ***Proteus,alcaligenes,micrococcus***

به‌واسطه آنزیم لیپاز چربی را به اسیدهای چرب و گلیسرول تجزیه می‌شود، که عامل تغییردر طعم و رنگ و بوی مواد لبنی است.

ایجاد لخته و یا دلمه شیر

بسیاری از باکتری‌ها از جمله: ***Pseudomonas spp*** ، باعث انعقاد پروتئین کازئین شیر می‌شوند. اما این روند همیشه یک روند آنزیمی نیست، بلکه تغییر در pH هم باعث چنین انعقادی می‌شود.

متابولیت‌های حاصل از فعالیت میکروارگانیسم‌ها در محصولات لبنی

کش دار شدن و چسبندگی شیر

کش‌دار شدن و چسبندگی شیر توسط:
Alcaligenes viscolactis
ایجاد می‌شود. این میکروارگانیسم با تولید مواد لزج، ویسکوزیته را افزایش می‌دهد.

تغییر رنگ شیر

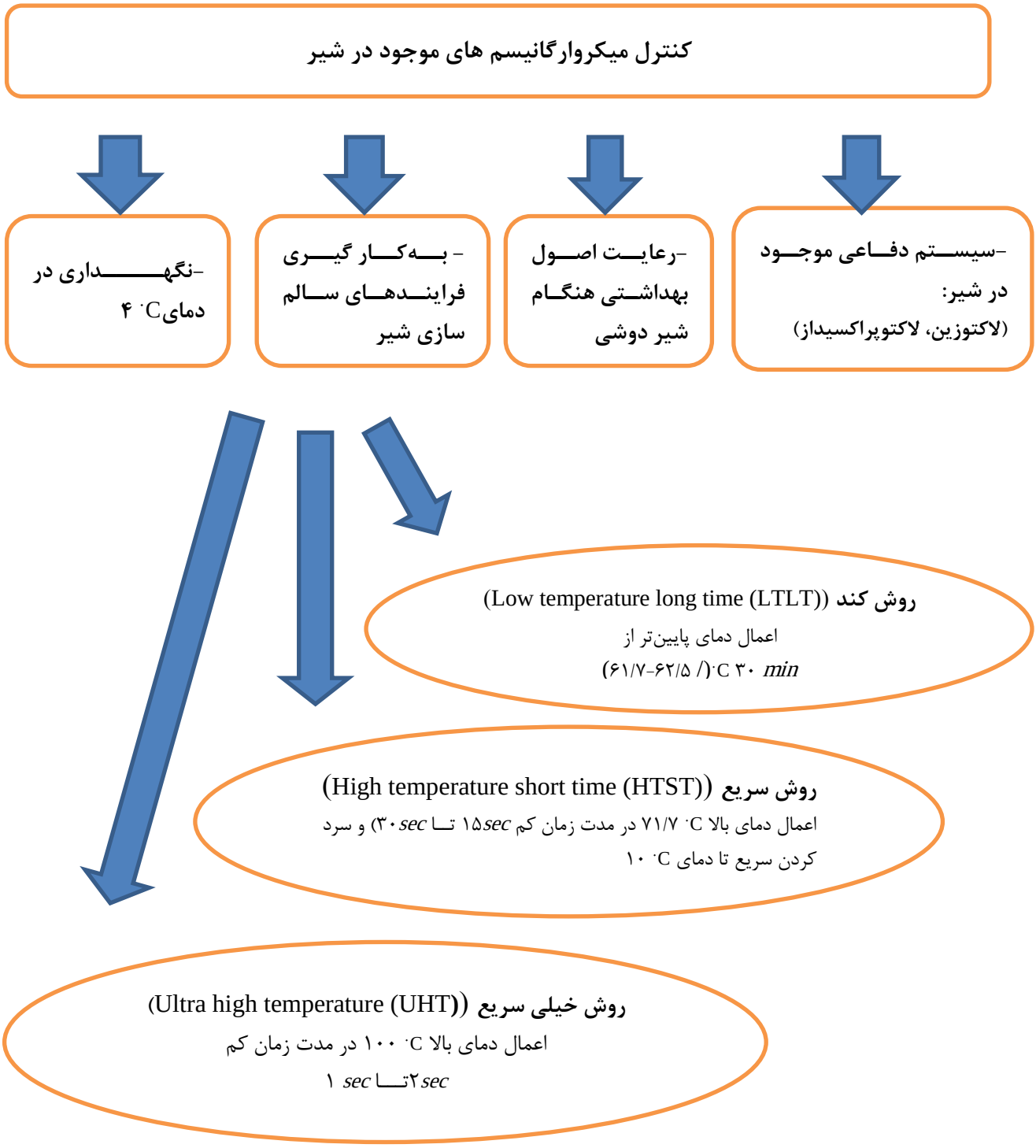
ایجاد رنگ آبی توسط: ***Pseudomonas synciani***

ایجاد رنگ زرد توسط: ***Pseudomonas synxantha***

ایجاد رنگ سبز توسط: ***Pseudomonas aurogenosa***

ایجاد رنگ قهوه‌ای توسط: ***Pseudomonas putrificians***

یجاد رنگ قرمز توسط:
Sarcinia marcens, Brubibacterium, Erythrognes


کنترل میکروارگانیسم های موجود در شیر
-سیستم دفاعی موجود در شیر:
(لاکتوزین، لاکتوپراکسیداز)
-رعایت اصول بهداشتی هنگام شیر دوشی
- به‌کار گیری فرایندهای سالم سازی شیر
-نگهداری در دمای ۴ C°
روش کند (Low temperature long time (LTLT))
اعمال دمای پایین‌تر از
(۶۱/۷-۶۲/۵ /) C° ۳۰ min
روش سریع (High temperature short time (HTST))
اعمال دمای بالا ۷۱/۷ C° در مدت زمان کم ۱۵sec تا ۳۰sec) و سرد
کردن سریع تا دمای ۱۰ C°
روش خیلی سریع (Ultra high temperature (UHT))
اعمال دمای بالا ۱۰۰ C° در مدت زمان کم
۱ sec تا ۲sec

محصولات لبنی تخمیر[1]ی

محصولات لبنی تخمیری، محصولاتی هستند که در تولید آنها حداقل در یک مرحله از میکروارگانیسم‌ها جهت انجام واکنش‌هایی که برای تولید محصول به‌آنها نیازمندیم استفاده می‌شود.

- **ماست**

یکی از انواع لبنیات است که از تخمیر قند شیر (لاکتوز) به‌اسید لاکتیک، توسط باکتری‌های لاکتیکی[2] گرما دوست (*لاکتوباسیلوس*)تولید می‌شود. اسید لاکتیک باعث افتpH شیر شده و در pH(۴/۶ -۴/۷) پروتئین‌های شیر منعقد شده و شیر به‌ماست تبدیل می‌شود. به‌دلیل وجود اسید لاکتیک، ماست مزه تند و ترشی پیدا می‌کند. معمولاً برای تهیه ماست از ترکیب باکتری‌های *استرپتوکوکوس سالیواریوس*، *لاکتوباسیلوس بلگاریکوس*، *بتاکوکوس سیتروووس* و *استرپتوکوکوس دی‌استیل لاکتیک* استفاده می‌شود. در واقع با رشد باکتری‌هایی که به‌صورت انتخابی به‌شیر اضافه شده‌اند پروتئین منعقد شده و در کنار تولید اسید، مواد عطری با طعم خاص که همان عطر و طعم ماست است را بوجود می‌آورند. از نظر تغذیه‌ای، ماست ماده غذایی مفیدی، سرشار از پروتئین و برخی انواع ویتامین B است. املاح موجود در آن زیاد بوده و میزان چربی آن با میزان چربی شیری که ماست از آن تهیه شده برابر می‌باشد. ماست نیز مانند بقیه هم گروه‌های خود منبع بسیار خوب کلسیم، فسفر، اسید پانتوتنیک و روی است. شیر و محصولات لبنی از جمله خامه، کره و پنیر منبعی غنی شده از پروتئین و قند و املاح و ویتامین‌ها است. ماست برای افرادی که دارای مشکل عدم تحمل لاکتوز هستند، می‌تواند مناسب باشد. و به‌علت ترکیبات شیمیایی مناسب همواره در معرض هجوم میکروب‌ها است.

شکل۱- ماست

فساد ماست

فساد ماست می‌تواند به‌دلایل زیر باشد.

۱-عدم رشد استارتر، حضور آنتی بیوتیک در شیر، استفاده از استارتر ضعیف، حرارت دادن ناکافی شیر (در شرایط ویسکوزیته بالای شیر)،

۲-هوادهی زیاد در طی فرایند گرمخانه‌گذاری (مقادیر زیاد اکسیژن مانع رشد باکتری *لاکتوباسیلوس* ((میکروآئروفیل)) می‌شود.)،

۱- Fermentation

۲- Lactic acid bacteria (LAB)

۳-تولید بیش از حد اسید (ترش شدن ماست) که به‌دلیل فعالیت زیاد *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* است. عمل طولانی گرمخانه‌گذاری و یا آهسته خشک کردن ماست منجر به‌ادامه‌ی فعالیت این باکتری و تولید اسید به‌مقدار زیاد می‌شود.
۴- رشد و تکثیر مخمر(به‌دلیل آلودگی ثانویه یا آلوده بودن مواد افزودنی در ماست‌های طعم‌دار است) و تولید گاز (به‌دلیل رشد مخمر یا باکتری‌های تولید کننده گاز در ماست یا شیر مورد استفاده)،
۵-عدم تولید عطر و طعم مطلوب در ماست (می تواند به‌دلیل نامناسب بودن نسبت استارترها و یا استفاده از درجه حرارت نامناسب در گرمخانه گذاری یا سردخانه گذاری باشد.)
۶-آب انداختن ماست (می‌تواند به‌دلیل تولید بیش از حد اسید در نتیجه فعالیت زیاد استارتر باشد). عوامل دیگری مانند تحریک کردن و تکان دادن ماست در طی گرمخانه‌گذاری و یا استفاده از شیر غیر طبیعی نیز می‌تواند باعث آب انداختن ماست شود).

- **دوغ**

دوغ فرآورده‌ای حاصل از شیر است که از اختلاط ماست و آب با نسبت‌های مختلف و افزودن نمک تهیه می‌شود. و حاوی کلسیم و سایر مواد معدنی، پروتئین، چربی و ویتامین‌های موجود در ماست است. از نظر میکروبیولوژیک می‌توان گفت که دوغ دارای همان میکروارگانیسم‌هایی مانند *استرپتوکوکوس ترموفیلوس، لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس بوولگاریس* است که در ماست وجود دارد.

شکل۲- دوغ

با توجه به‌نحوه تولید این فرآورده، می‌توان آن را به‌انواع دوغ، دوغ گازدار، دوغ حرارت دیده بدون گاز، دوغ حرارت دیده گازدار تقسیم کرد.

فساد دوغ

عمده‌ترین عوامل فساد دوغ کپک‌ها و مخمرها هستند مخمرها گاز ایجاد می‌کنند. رشد کپک‌ها در دوغ با تغییر رنگ و طعم همراه است. عمده‌ترین عوامل فساد دوغ کپک‌ها و مخمرها می‌باشند.
می‌توان گفت که مخمرها بهتر می‌توانند در دوغ رشد کرده و در آن گاز ایجاد کنند و طعم آن را تغییر دهند. به‌هر حال، مخمرها تاثیر نامطلوبی بر مصرف کننده نمی‌گذارند اما برخلاف آنها، کپک‌ها به‌ندرت دوغ را آلوده می‌کنند و رشد آنها با تغییر طعم دوغ و سپس تغییر رنگ آن مشخص می‌شود.

- **پنیر**

شیر متشکل از انواع چربی و پروتئین است و متعاقب ترش کردن شیر (بریدن شیر) و فرآیند جداسازی مواد جامد شیر، از مواد مایع آن، توده سفید جامدی به‌دست می‌آید که بعداً به‌پنیر تبدیل می شود. مایع سبز رنگ باقی مانده هم آب پنیر می‌باشد. فرآیند تولید پنیر، یک روند آنزیمی است رنین باعث انعقاد شیر و لخته شدن شیر می‌شود در حقیقت انعقاد کازئین باعث محبوس شدن قسمت عمده چربی و مقداری از لاکتوز، آب و مواد معدنی می‌شود. مایع سبز رنگ باقی مانده حاصل از آب‌گیری هم آب پنیر است. آب پنیر عمدتا لاکتوز، پروتئین منعقد نشده (سرم) و مواد معدنی است. پنیر برحسب رطوبت آن، به‌انواع سخت، نیمه سخت، نرم و..... تقسیم می‌شود. پنیرهای سخت و نیمه سخت قابلیت نگهداری بیشتری دارند. کنترل از دست دادن آب، مهمترین قسمت در فرآیند پنیرسازی است. مقدار آبی که از دست داده می‌شود به‌عوامل حرارت، pH و روشی که شیر لخته شده، بریده می‌شود، بستگی دارد. کاهش مقدار آب بسیار مهم است، زیرا سفتی و کیفیت (قابلیت) نگهداری پنیر را تعیین می‌کند. از طرفی پنیر حامل مناسب پروبیوتیک‌ها است. برای کاهش pH، تغییر بافت و ایجاد طعم بهتر، به‌پنیر باکتری اضافه می کنند. انواع و طعم های مختلف پنیر به‌نوع باکتری به‌کار رفته، ماده اولیه مورد مصرف میزان چربی شیر، میزان آب، تنوع در مدت زمان، و بر اساس نوع فرآیند پنیر بستگی دارد. از انواع پنیر می‌توان به‌پنیرتازه مانند: پنیر لاکتیکی و پنیر پروسس مانند: پارمسان، کاچیوتا، گودا، بوترکیزه، چدار، پرذوولون، کولومبرز، آدام، سامسو، امنتال، سوئیسی، موزارلا، محلی و پنیرخامه‌ای اشاره کرد.

پنیرتازه[1]

پنیری است، که پس از ساخت و فرآوری بدون زمان رسیدن و یا با دوره رسیدن بسیار کوتاه، آماده مصرف باشد.

شکل۳- انواع پنیر

نقش میکروارگانیزم‌ها در مراحل رسیدن پنیر

پنیر فرآورده‌ای است که در نتیجه انعقاد بدست می‌آید. شیر با یکی از روش‌های متداول پاستوریزه می‌شود و به‌کمک مایه پنیر و با استفاده از باکتری‌های آغازگر مجاز، منعقد می‌شود. پس از جدا نمودن آب پنیر[2]، لخته در آب نمک نگهداری می‌شود و بعد از طی مراحل رسیدن آماده مصرف می‌گردد. رسیدن پنیر به‌مفهوم تبدیل بیوشیمیایی ترکیبات لخته به‌وسیله آنزیم است. رسیدن پنیر یکی از پیچیده‌ترین پدیده‌های بیوشیمیایی است که با هضم آنزیمی ترکیبات بنیادی لخته

۱-Fresh Cheese

۲- whey

همراه است. میکروارگانیسم‌های عمده‌ای که شیر را به‌محصولات لبنی فرعی تبدیل می‌کنند، شامل لاکتوبا سیلوس‌ها و ... سوبستراهای اصلی عبارتند از: کازئین، ماده چرب و بیش از همه جابه‌جایی ترکیبات محلول فلورهای میکروبی لخته (که به‌مقدار قابل توجهی وجود دارند) به‌طور مرتب در طول زمان تغییر می‌کنند و موجب تغییر خصوصیات بیوشیمیایی می‌شوند. این تغییرها به‌لخته مشخصات جدیدی می‌بخشند و آنرا از حالت سفت و بدون طعم و مزه به‌لخته‌ای با عطر، طعم، بافت و رنگ مشخص تبدیل می‌کنند. میکروارگانیزم‌ها در رسیدن پنیر نقش عمده‌ای دارند. بنابر این، شناخت عوامل موثر در فعالیت آنها حائز اهمیت است. عوامل زیر در رسیدن پنیر نقش عمده‌ای را ایفا می‌کنند:

الف) تهویه:

تهویه امکان تامین اکسیژن مورد نیاز میکروارگانیسم‌های سطحی را فراهم می‌کند.

ب) تاثیر آب یا رطوبت لخته:

میکروارگانیسم‌ها در محیط مرطوب بهتر رشد می‌کنند. دلمه‌های مرطوب سریعتر و دلمه‌های خشک دیرتر مراحل رسیدن را طی می‌کنند. در اینجا، منظور از آب، مقدار آب آزاد در دسترس میکروارگانیسم‌ها است. فرایند رسیدن پنیر با وجود رطوبت بیشتر تسهیل می‌گردد.

ج) دما:

دمای محیط عاملی است که رشد میکروارگانیسم‌ها و نیز سرعت واکنش‌های شیمیایی لخته را تنظیم می‌کند. میزان پیشرفت واکنش‌های شیمیایی در دمای کم کاهش می‌یابد. پنیری که در دمای$^{\circ}$C ۴ به‌آهستگی می‌رسد همان عطر و طعم پنیر رسیده در دمای $^{\circ}$C ۱۵ را ندارد. از طرف دیگر، در مقادیر دمایی زیاد طعم نامطلوب بیشتر دیده می‌شود. در برخی موارد، به منظور دستیابی به‌کیفیت مطلوب، شرایط دمایی دوران رسیدن را تغییر می‌دهند. به‌عنوان مثال، برای رشد باکتری‌های لاکتیک و بروز بعضی از واکنش‌های حدواسط در لخته در مرحله اول، پنیر در دمای کم نگهداری می‌شود. در مرحله بعد، به‌منظور رشد باکتری‌های پروپیونیک و ایجاد طعم مطلوب و پیدایش سوراخ‌های چشمی در لخته، میزان دما را افزایش می‌یابد. همچنین در این روند اسید سوکسینیک، اسید لاکتیک همراه با اسید پروپیونیک تولید شده و به‌پیدایش طعم مطلوب در پنیر کمک می‌کنند.نگهداری مداوم پنیر در دمای کم باعث ایجاد طعم نامطلوب در آن خواهد شد.

د) pH

pH محیط عامل موثری در تکثیر و فعالیت بیوشیمیایی میکروارگانیسم‌ها است. pH در پنیرهای اسیدی از(۹-۴/۷) و در پنیر کپکی از(۷- ۴/۹) تغییر می‌کند.

پنیر تازه تهیه شده به‌روش افزایش ماده خشک [۱]

فرآورده‌هایی هستند که ماده خشک آنها با استفاده از پروتئین‌های شیر و چربی شیر همراه با افزودن اسیدهای خوراکی و نمک‌های امولسیفایر و یا رنت، افزایش یافته باشد و بر اساس روش تولید طبقه‌بندی می‌شوند.

الف- پنیر تازه تهیه شده به‌روش اولترافیلتراسیون

ب- پنیر تازه تهیه شده به‌روش افزایش ماده خشک

پ- پنیر تازه تهیه شده به‌روش اولترافیلتراسیون/ افزایش ماده خشک

فساد پنیر

کشت‌های آغازگر (استارتر) آلوده، هوای سالن تولید، ظروف و وسایل آلوده از جمله مهمترین عواملی هستند که باعث بروز آلودگی ثانویه می شوند پنیر تو سط باکتری‌ها، کپک، و مخمرها مورد حمله قرار گرفته و فا سد می‌شود . رایج‌ترین نوع فساد باکتریایی حالتی تحت عنوان لزجی دلمه است. گونه‌های سودو موناس به‌عنوان موثرترین میکروارگانیسم‌های عامل این نوع فساد معرفی شده‌اند. *پنی سیلیوم*[۲]، *موکور*[۳]، *آلترناریا*[۴] همگی بخوبی در سطح پنیر رشد کرده منجر به‌ایجاد بو و طعم کهنگی، ماندگی، کپک‌زدگی و تخمیر می‌شود . فساد نا شی از فعالیت این میکروارگانیسم‌ها در حضور رطوبت نسبی کافی، تعجب آور نخواهد بود. *با سیلوس پلی میکسا*[۵] و انواع *کلستریدیوم*[۶] خصوصاً *پاستوریانوم*[۷]، *بوتریریکوم*[۸] و *اسپوروژنز*[۹] با تولید گاز در قالب‌های پنیر موجب فساد و صدمه زدن به‌بافت محصول می شوند. تمامی آنها اسید لاکتیک را مورد استفاده قرار داده، با تولید گاز CO_2، سبب پاره شدن قالب‌های پنیر می‌شوند .

پنیر را می‌توان پیش از رسیدن، یا در طول عمل رسیدن یا زمانی‌که رسیدن به‌پایان رسیده است با ترکیبات و مواد مختلف پوشاند. پوشاندن پنیر در هریک از مرحل فرایند، دارای اهداف خاصی است.

۱-Cheeses prepared by dry matter increasing

۲- Penicillium

۳- Mucor

۴- Alternaria

۵- Bacillus.polymexa

۶- Closterium

۷- C.pastorano

۸- C.butyricum

۹- C.sporogenes

۱- پوشـــاندن پنیر در طول عمل رســـیدن، موجب تنظیم رطوبت پنیر و حفاظت آن در مقابل میکرو ارگانیسم‌ها می‌باشد.
۲- پوشاندن پنیر بعد از اینکه رسیدن به‌پایان یافته به‌منظور حفاظت آن، در مقابل میکرو ارگانیسم‌ها و سایر آلاینده‌ها، حفاظت از تخریب‌های فیزیکی در طول حمل و نقل، توزیع و یا دادن یک وضـــعیت ظاهری خاص (رنگ شده) به‌پنیر می‌باشد.

پنیر اغلب از لایه نازکی از پلی وینیل استات (PVC) همچنین از سایر مواد مصنوعی که با مواد طبیعی ترکیب شده اند پوشش داده می‌شود. بطور مثال: لایه‌های (*Ripening Film*)، موم، پارافین با درجه خوراکی به‌تنظیم رطوبت پنیر در طول رسیدگی و حفاظت آن در مقابل میکروارگانیسم‌ها کمک می‌کند.

آب پنیر[۱]

آب پنیر مایع متمایل به‌رنگ زرد است که در هنگام تولید محصولات لبنی، خصوصا پنیر تولید می شود. هنگامی که حلالیت کازئین (پروتئین حساس به‌اسید) کم می‌شود و منعقد می‌گردد، آب خارج می‌شود. آب پنیر بطور عمده از آب تشکیل شده است و مقدار کمی لاکتوز و مواد معدنی و پروتئین‌های غیرحساس به اسید می‌باشد و به‌لحاظ قند، پروتئین و میزان اکسیژن بالا محیط مناسب برای رشد و تکثیر باکتری‌ها است.

- **کشک**

کشک یکی از فرآورده‌های فرعی شیر است که به‌روش سنتی از جوشاندن، تغلیظ و یا خشک کردن دوغی که پس از کره گیری باقی می‌ماند و یا از ماست بدون چربی تهیه می شود. کشک از مواد اولیه مانند: شیر میش، بز، گاو و یا مخلوطی از آنها تشکیل شده است. و دارای تمامی خواص شیر می‌باشد و حاوی کلسیم، چربی، نمک، پروتئین، ویتامین و نیاسین است کشک به‌دو شکل صنعتی و سنتی تولید می‌شود.

- **کفیر**[۲]

نوشـابه کفیر یک توده دلمه‌ای یکنواخت به‌رنگ کرمی، با قوام، الکل‌دار و با یک مزه ترش و گازدار اســت که حاصـل تخمیر شـیر اسـت و منبع کامل پروتئین بوده و دارای تعداد زیادی اسـیدهای آمینه ضـروری مانند: تریپتوفان است. و موجب جذب و ذخیره کلسیم و منیزیم می شود. کفیر با استفاده از استارترهای لیوفیلیزه تغلیظ شـده دانه‌های کفیر و باکتری‌های دیگر، تولید می‌شـود. از این اسـتارترهای لیوفیلیزه به‌عنوان بالک استارتر و حتی استارتر مستقیم[۳] برای تلقیح مستقیم به‌شیر استفاده می‌گردد.

۱- whey
۲- Kefir grains
۳- DVS

دانه‌های کفیر خو شه‌هایی از میکروارگانیسم‌ها هستند که به‌وسیله یک شبکه پلی ساکاریدی کنار هم قرار می‌گیرند. شبکه دانه‌های کفیر از یک کمپلکس٪ ۱۳ پروتئین،٪ ۲۴ پلی‌ساکارید و همچنین سلول‌های متفرقه تشکیل شده است. عمده پلی‌ساکارید آن محلول در آب است که به‌آن کفیران می‌گویند.

مخمر اصلی کفیر *ساکارومایسس کفیر* نام دارد و نیز همراه آن باکتری‌هایی مانند *استرپتوکوکوس کوموریس*، *استرپتوکوکوس لاکتیس* و برخی لاکتوباسیلوس‌ها مانند *کازئی و برویس* و استرپتوکوک‌ها به 10^8- 10^9 cfu لاکتوکوکسی، استوباکتر و مخمرها به‌تعداد تقریبی 10^8 cfu وجود دارد. که در یک رابطه همزیستی با هم وجود دارند.

معمولاً لاکتوبا سیل‌های هموفرمنتیتیو و هتروفرمنتیتیو، مزوفیل یا ترفومیل ٪ ۶۵ جمعیت میکروبی مذکور را تشکیل می‌دهند و٪ ۲۰ را استرپتوکوک‌های ترش کننده و معطر کننده و دیگر گونه‌های تخمیر کننده لاکتوز و مخمرهای غیر تخمیر کننده لاکتوز، بقیه درصد را شامل می‌شوند این فرآورده دارای اسیدلاکتیک بخصوص از فرم لاکتوز مثبت و اندکی اسیدفرمیک و سوکسینیک و پروپیونیک‌اسید می‌باشد دی استیل به‌عنوان اصلی‌ترین عامل عطر کفیر است که با مصرف سیترات توسط باکتری‌ها تولید می‌شود.

کومیس[1] یک فرآورده‌های تخمیری، از نزدیک‌ترین فرآورده‌های لبنی به‌کفیر می‌باشد و از شیر مادیان تهیه می‌شود کومیس محصولی به‌رنگ سفید شیری با قشری متمایل به‌خاکستری و دارای شکل یکنواخت می‌با شد. با تخمیر شیر مادیان، تو سط باکتری لاکتوبا سیلوس و مخمری بنام تورولا تولید می‌گردد. فرآورده نهایی دارای اسید لاکتیک و اتانول و گاز کربنیک می‌باشد. مهمترین وجه مشخصه کومیس رایحه ترش مخصوص آن است.

شکل۴- دانه‌های کفیر

۱- Kumis

جزوه کارآموزی فرآورده‌های لبنی تخمیری

۱ هدف

هدف از تدوین این جزوه آموزشی آشنایی با روش‌های میکروبیولوژی انواع فرآورده‌های لبنی تخمیری بر اساس استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۴۰۶ می‌باشد.

یادآوری۱- توصیه می‌شود کارآموزان این دوره با الزامات آزمایشگاهی میکروبیولوژی و نیز استانداردهای ملی ایران شماره‌های۵۴۸۴، ۵-۸۹۲۳، ۱-۸۹۲۳، ۳۲۶، ۱-۵۰۲۸، ۱-۵۴۸۶، ۲-۲۴۶۱، ۱-۲۴۶۱، ۵۲۳۴، ۱۰۱۵۴، ۶۸۰۶-۳۱۹۶، ۱۹۱، ۱۸۱۰، ۲۶۲۹، ۹۴۳۲، ۸۲۴۸ ، ۱۶۰۳۳، ۲۴۰۶ و ۹۸۹۹آشنایی داشته باشند.

یادآوری ۲- به‌منظور 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 در ارتباط با آزمون میکروبیولوژی فرآورده‌های لبنی تخمیری به‌شرح جدول ۱ می باشند:

جدول ۱- فهرست استانداردهای فرآورده‌های لبنی تخمیری

ردیف	عنوان استاندارد	شمارهٔ استاندارد
۱	فرآورده های کشاورزی - نمونه برداری از فرآورده های بسته بندی شده که مصرف غذایی دارند.	۳۶۹۰
۲	میکرو بیولوژی مواد غذایی . خوراک دام – روش جستجوی سالمونلا در مواد غذایی	۱۸۱۰
۳	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش ج ستجو و شمارش ا شریـ شیاکلی با ا ستفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی	۲۹۴۶
۴	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-روش جامع برای شمارش استافیلوکوکوس‌های گوآگولاز مثبت (ا ستافیلوکوکوس و سایر گونه ها) ق سمت سوم ج ستجو شنا سایی و شمارش به شیوه محتمل‌ترین تعداد (MPN) برای تعداد کم میکروارگانیسم	۸۶۰۶-۳
۵	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام و آب- آماده سازی، ساخت، ذخیره سازی و آزمون عملکرد محیط‌های کشت	۸۶۶۳
۶	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
۷	میکروبیولوژی مواد غذایی وخوراک دام -آماده سازی آزمایه، سوپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی – قسمت ۵ – مقررات ویژه برای آماده سازی شیر و فرآورده‌های آن	۸۹۲۳-۵

ادامه جدول ۱- ادامه لیست استانداردهای فرآورده‌های لبنی تخمیری

ردیف	عنوان استاندارد	شمارهٔ استاندارد
۸	میکروبیولوژی موادغذایی وخوراک دام – روش جامع برای شمارش باکتری های احیاء کننده سولفیت درشرایط بی‌هوازی	۹۴۳۲
۹	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -راهنمای الزامات کلی برای آزمون	۹۸۹۹
۱۰	شیر و فرآورده‌های آن- شمارش واحدهای تشکیل دهنده کلنی کپک و/یا مخمر –شمارش کلنی در پلیت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس	۱۰۱۵۴
۱۱	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -روش جامع برای شناسایی و شمارش کلی‌فرم‌ها	۱۱۱۶۶

۳ اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

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

۳-۱ فضای آزمایشگاه

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

۳-۱-۱ فضای مربوط به‌نمونه وآزمون

باتوجه به‌شرایط 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؛

۲-۱-۳ 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.

۲-۳ بهداشت کارکنان

به‌منظور 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 ترجیحا کوتاه نگهداشتن؛
- هنگام کار در آزمایشگاه ازصحبت کردن خودداری شود.
- ازخوردن و آشامیدن درآزمایشگاه خودداری شود.
- کشیدن پیپت با دهان ممنوع می‌باشد.

۳-۳ وسایل و تجهیزات

توصیه می‌شود مطابق باشرایط خوب آزمایشگاهی، کلیهٔ وسایل و تجهیزات تمیز و در محل مناسب نگهداری شوند.

پیش از استفاده بهتر است وسایل از نظر داشتن شرایط لازم برای کارتصدیق 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	وسایل و ظروف شیشه‌ای آزمایشگاهی
۲	pH متر
۳	شمارشگر کلنی
۵	اتوکلاو
۶	فور

ادامه جدول ۲- فهرست تجهیزات مورد نیاز برای آزمون میکروبیولوژی

ردیف	نام تجهیزات
۷	ترازوی آزمایشگاهی
۸	سیستم فیلتراسیون
۹	حمام مایع بادمای ثابت (بن ماری)
۱۰	تجهیزات کشت در شرایط اتمسفری تغییر یافته

وسایل و ظروف شیشه‌ای آزمایشگاهی

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

شکل۵- وسایل شیشه‌ای

pH متر[۱]

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 خود نمایش می‌دهد. این دستگاه متشکل از دو بخش اصلی یعنی میله کاوشگر [۲]و اندازه‌گیر[۳] 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 ۴ pH 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 مدت۲h در آب مقطر نگهداری کنید و سپس آن را در محلول نگهدارنده قرار دهید .کاوشگر را به‌وسیله آب مقطر بشویید. برای تنظیم[۴] pH متر، الکترود را در محلول۷ pH

۱- pH meter

۲- probe

۳- meter

۴- Clibration

قرار داده، حداقل۳۰ sec اجازه 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 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.

شکل۶ -pH متر

شمارشگر کلنی[1]

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

انکوباتور[2](اتو)

انکوباتور یک ابزار آزمایشگاهی است که در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی و بیولوژی برای کشت و رشد دادن نمونه‌های زنده مانند سلول‌ها یا میکروب‌ها به کار می‌رود. این وسیله با کنترل رطوبت، دما، میزان اکسیژن و دی اکسیدکربن شرایطی مناسب برای رشد ارگانیسم‌های زنده فراهم می‌کند. انکوباتور یکی از ابزارهای مهم در آزمایش‌های میکروبیولوژی، زیست‌شناسی سلولی و... به حساب می‌آید. هنگام کار با انکوباتور لازم است به نکات زیر توجه شود.

- ✓ انکوباتور در نزدیک درهای اصلی یا جریانات هوائی و هواکش‌ها قرار نگیرند.
- ✓ انکوباتور بر روی سطحی صاف و در حالت تعادل قرار گیرد.
- ✓ از گذاشتن مواد فرار یا قابل اشتعال (اتر، بنزین، الکل، پروپان) در انکوباتور خودداری شود.

۱- Colony counter

۲- Incubator

- ✓ تعویض به موقع ظرف آب داخل دستگاه، در انکوباتورهای کشت سلولی بسیار ضروری می‌باشد.
- ✓ برای جلوگیری از آلودگی در انکوباتورها؛ قفسه‌ها و دیواره دستگاه همواره باید خشک باشد.

شکل۸- انکوباتور

فور[1] 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 ۱۷۰°C± ۱۰°C (از زمان رسیدن به دمای ۱۷۰°C) به وسیلهٔ حرارت خشک به مدت 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، به منظور 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 قراردادن 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 حدود۶۰°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.

۱- Oven

- **آزمون بیولوژیک**: استفاده از نوار کاغذی دارای اسپور باسیلوس *سوبتیلیس*[1] ، واریته نایجر ATCC ۹۳۷۲ و یا اسپور باسیلوس آتروفئوس[2]به طور هفتگی توصیه می‌شود.

شکل۹- **فور یا آون**

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.

شکل۱۰- سیستم فیلتراسیون

اتوکلاو[3]

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 min

۱- *Bacillus subtilis*

۲ -*Bacillus atrophaeus*

۳- Autoclave

۱۵، تحت فرآیند استریلیزاسیون قرار گیرند 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 می‌شود.

اندیکاتورهای شیمیایی: به صورت نوارهای اتوکلاو (چسب اتو کلاو) TST [۵] 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 به حرارت، مانند *ژئوباسیلوس استئاروترموفیلوس*[۶] است.

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

شکل۱۱-اتوکلاو

ترازوی آزمایشگاهی

دستگاهی است که برای توزین اجسام یا مایعات، با دقت بالا و حساسیت بالا به‌کار می‌رود آزمایشگاه‌ها با توجه به‌نیازشان از ترازوهایی با دقت ۰/۱ g، ۰/۰۱ g، ۰/۰۰۱ g، ۰/۰۰۰۱ g و ۰/۰۰۰۰۱ g استفاده می‌کنند. ترازوهای آزمایشگاهی دقت ۱ mg و دقت بالاتر آن نیاز به‌محفظه دارند چون به‌علت حساسیت بالای آن‌ها در توزین جریان هوا نیز روی توزین این ترازوها تاثیر می‌گذارد. تمام دستگاه‌های توزین باید به‌طور دوره‌ای کالیبره[۷] شوند. کالیبره کردن باید در مدت زمان های 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 به‌یک سنگ کالیبره استاندارد نیاز است 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

۱- Start

۲- Preheating Time

۳- Sterilization Time

۴- Drying Time

۵- Time, Steam,Tempreture

۶- *Geobacillus stearothermophilus*

۷ - کالیبره کردن یعنی تنظیم درست ترازو با جسمی تا به‌درست‌ترین شکل کار کند.

اطمینـان هسـتند و درصـد خطـا بسـیار کـم اسـت بـرای تجهیـزات کـالیبره شـده گـواهی کالیبراسـیون صادر شده و ضمیمه دستگاه می‌گردد.

شکل ۱۲- ترازو

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.

شکل ۱۳-سیستم فیلتراسیون

حمام مایع[۱] (بن ماری[۲])بادمای ثابت

این وسیله برای انجام تست‌های سرولوژیک، آگلوتیناسیون، بیوشیمی، تست‌های دارویی، در دمای تثبیت شده کار برد دارد. حرارت آب دستگاه 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 بن‌ماری، 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:

- ✓ گرمخانه‌گذاری محیط کشت تلقیح شده در یک دمای ثابت؛

۱- Water bath

۲- Bain marie

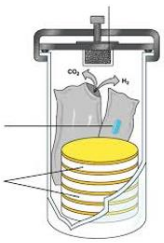
- ✓ نگهداری محیط کشت جامد سترون ذوب شده در طی آماده‌سازی محیط کشت؛
- ✓ تعدیل دمای محیط کشت جامد ذوب شده سترون برای استفاده در روش‌های خاص؛
- ✓ آماده‌سازی سوسپانسیون‌های اولیه یا محلول‌ها در یک دمای کنترل شده؛
- ✓ فرآیند حرارتی سوسپانسیون‌های اولیه در یک دمای کنترل شده (مانند پاستوریزاسیون)؛

همچنین به‌منظور گرم کردن معرف‌ها و ذوب کردن نمونه‌ها نیز استفاده می‌شود.

شکل ۱۴- حمام مایع (بن ماری)بادمای ثابت

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



شکل ۱۵- تجهیزات کشت در شرایط اتمسفری تغییر یافته

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*[1] و *باسیلوس استئاروترموفیلوس*[2] 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 کات‌گوت و لوازم یک‌بار مصرف استفاده کرد.
- ✓ **روش فیلتراسیون** : معمولا برای سترون‌سازی 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 در پلیت مصرف می‌شوند، محیط‌های کشت عمومی هستند که برای تهیه مواد غذایی لازم جهت رشد میکروارگانیسم ساخته شده‌اند. محیط‌های کشت عمومی را با اضافه کردن اجزای مغذی که موجب افزایش سریع رشد ارگانیسم-های سخت رشد می شوند، غنی می‌کنند. این مواد مغذی بطور سترون، به‌محیط اصلی استریل شده اضافه می‌شوند. نمونه هایی از این مواد مغذی عبارتند از: شیر بدون چربی، خون گوسفند، زرده تخم مرغ و ....

۳-۵-۱ اجزای تشکیل دهنده محیط کشت

محیط کشت فرمولاسیونی است از مواد، به‌صورت مایع، نیمه جامد یا جامد، که دارای اجزای تشکیل دهنده خاص بوده و به‌منظور تکثیر (همراه با بازدارندگی میکروارگانیسم‌های معین یا بدون باز دارندگی)، شناسایی یا حفظ قابلیت‌زیستی میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. آگار به‌عنوان عامل سفت کننده در محیط کشت‌های جامد و نیمه جامد کار برد دارد. آگار ترکیبی است پلی‌ساکاریدی که از دیواره سلولی برخی

۱- *Bacillus subtilis*

۲- *Bacillus. Stearothermophilus*

از گونه‌های جلبک[1] قرمز (از جنس گراسیلاریا [2]و جیلیدیوم[3]) استخراج می شود. 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 شبکه‌ای ایجاد می‌کند که سبب جامد شدن محیط می شود. محیط‌های کشت جامد معمولاً دارای ۱۳ g/Lتا۱۵g/L آگار هستند.

۳-۵-۱-۱ 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 و آب مقطر باید در ظروف دردار و ساخته شده از مواد بی‌اثر مانند: شیشه خنثی، پلی‌اتیلن و غیره نگهداری شود. و همچنین توصیه می‌شود، آب مقطر تولید شده هر چه زودتر استفاده شود.

۳-۵-۲ 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 .
- ✓ 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.

۱- Algae

۲- Gracilari

۳- Gelidium

۳-۵-۳ طبقه بندی محیط کشت

محیط کشت را از جنبه‌های مختلف طبقه بندی می‌کنند:

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

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

۳-۵-۳-۲-۱ محیط کشت جامد[۱]

محیط‌های جامد به‌علت دارا بودن آگار در ترکیب خود به‌صورت جامد بوده و متناسب با میکروارگانیسم‌ها و آزمایش‌های مورد نظر می‌توان آنها را در لوله، ظروف‌پتری (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 ۱۶- محیط کشت آگاردار

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

الف کشت شیب دار[۲]

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

شکل ۱۷- محیط کشت شیبدار

ب کشت‌های عمقی[۳]

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

۱- Solid media

۲- Slant media

۳- Stab Cultures

پ کشت در داخل محیط جامد[1]

به‌لوله‌های آزمایش محتوی محیط کشت جامد پس از ذوب شدن که تا ۴۵ °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.

۳-۵-۳-۲-۲ محیط کشت نیمه جامد[2]

محیط‌های نیمه جامد نیز وجود دارد.که میزان آگار آن نسبت به‌محیط‌های جامد کمتر است ٪۰/۲تا٪ ۰/۵. 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، به‌حالت شیبدار نگهداری می‌شوند "اسلنت" گفته می‌شود چنانچه محیط کشت در ته ظروف ریخته شود به‌آن "بات" گفته می‌شود.

شکل ۱۸- محیط کشت نیمه جامد

۳-۵-۳-۲-۳ 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.

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

۳-۵-۳-۳-۱ محیط کشت انتقالی[4]

۱- Shake Cultures

۲- Semi Solid media

۳- Liquid or broth media

۴- Transport medium

محیط کشتی است که به‌منظور نگهداری و حفظ قابلیت زیستی میکروارگانیسم‌ها در ضمن به‌حداقل رساندن تغییر در شمارش در دوره زمانی بین جمع‌آوری نمونه و کار آزمایشگاهی بر روی آن، طراحی شده است. مانند: "محیط کشت استوارت یا آمیس[۱] "

۳-۵-۳-۳-۲ محیط کشت نگه‌داری کننده [۲]

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[۳]"، اسلوپ‌های"نوترینت آگار[۴]"

۳-۵-۳-۳-۳ محیط کشت بازیابی [۵]

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[۶]"

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

۳-۵-۳-۳-۴ محیط کشت پیش غنی کننده[۷] و غنی کننده [۸]

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"

۳-۵-۳-۳-۵ محیط کشت غنی کننده انتخابی[۹]

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[۱۰] "

۳-۵-۳-۳-۶ محیط محیط کشت غنی کننده غیر انتخابی[۱۱]

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

۳-۵-۳-۳-۷ محیط کشت جداکننده[۱۲]

۱- Stuart or amies transport medium

۲- Preservation medium

۳- Dorset agar medium

۴- Nutrient medium

۵- Resuscitation medium

۶- Buffered peptone water

۷- Pre- enrichmen medium

۸- Enrichmen medium

۹- Selective enrichment medium

۱۰- Rappaport-Vassiliadis (RV)

۱۱- Non- selective enrichment medium

۱۲- Selective isolation medium

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

۳-۵-۳-۳-۷-۱ محیط کشت جداکننده انتخابی [۱]

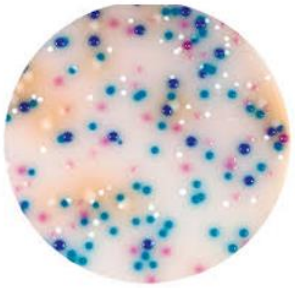
محیط کشتی که به‌میکروارگانیسم خاص و هدف امکان رشد می‌دهد و از رشد سایر میکروارگانیسم‌ها به‌طور کامل یا قسمتی جلوگیری می‌کند. مانند:"XLD آگار"

۳-۵-۳-۳-۷-۲ محیط کشت جداکننده غیر انتخابی [۲]

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

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

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 و رد یابی دقیق می‌شود مانند: "TBX آگار"،"MUG/EC"



شکل ۱۹- محیط کشت انتخابی کروموژنیک / فلوروژنیک

۳-۵-۳-۳-۸ محیط کشت افتراقی[۵]

محیط کشتی است که مشخصات و خصوصیت فیزیولوژیک یا بیو شیمیایی میکروارگانیسم‌ها را به‌منظور شناسایی فراهم می‌کند. مانند: "ترجیتول۷"و" TTC، TBX"

۳-۵-۳-۳-۹ محیط کشت شناسایی [۶]

محیط کشت با قدرت تشخیصی بالا برای ایجاد یک واکنش تشخیصی خاص که نیاز به‌استفاده از محیط کشت‌های تاییدی ندارد. مانند "بایل اسکولین آزاید[۷] "

۱- Selective enrichment medium

۲- Non-selective isolation medium

۳- Chromogenic selective culture medium

۴- Fluorogenic selective culture medium

۵- Differential medium

۶- Identification medum

۷- Bile Esculin Azide Agar (Enterococcus Selective Agar)

۳-۵-۳-۳-۱۰ محیط کشت شمارش [۱]

محیط کشت انتخابی یا غیر انتخابی که برای شمارش میکروارگانیسم‌ها به‌کار می‌رود. مانند:"برد پارکر[۲] "یست اکسترکت آگار [۳]"

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

۳-۵-۳-۳-۱۱ محیط کشت تاییدی [۴]

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[۵]"

۳-۵-۳-۳-۱۲ محیط محیط کشت دارای ترکیبات خنثی کننده [۶]

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.

۳-۵-۳-۳-۱۳ محیط کشت با موارد استفاده متعدد

محیط کشتی است که در دسته‌بندی‌های متعدد قرار می‌گیرد. مانند: "بلاد آگار[۷]"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.

۳-۵-۳-۳-۱۴ محیط کشت مرجع

محیط کشت غیر انتخابی مانند:"تریپتون سوی آگار[۸]"که برای ارزیابی مقایسه‌ای کنترل عملکرد محیط کشت به‌کار می‌رود.

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

۳-۵-۳-۴-۱ 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.

۱- Enumeration medium

۲- Baird-Parker Agar

۳- Yeast Extract Agar

۴- Confirmation medium

۵- Kligler Iron Agar (KIA)

۶- Medium containing nutralisers

۷- Blood agar

۸- Tryptic Soy Agar(TSA)

۳-۵-۳-۴-۲ محیط کشت کامل شده

محیط کشتی است که برای تلقیح آماده باشد.

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

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

۳-۵-۳-۴-۴ 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 سیکلوسرین (TSC)آگار" ، "برد پارکر آگار" یا "رابیت پلاسما فیبرینوژن (RFP)آگار"

۳-۵-۳-۴-۵ 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.

۳-۵-۳-۴-۶ 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 یون‌زدایی 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 از10^2 cfu در هر mL 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 $25\ ^{\circ}C$، 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 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

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 $۵^{\circ}C \pm ۳^{\circ}C$ 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 $۴۷^{\circ}C$ تا $۵۰^{\circ}C$، خنک کنید.

۳-۶-۵ افزودن مکمل‌ها

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

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

محیط کشت آگاردار ذوب شده را در پتری دیش‌ها بریزید تا حداقل ضخامت آن mm ۳ گردد. برای مثال: در ظروف با قطر ۲۰mm، معمولا ۱۸mLتا۲۰mL 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 h ۷۲ به طول می‌انجامد، یا دمای گرمخانه‌گذاری بیش از ۴۰°C است، محیط کشت بیشتری ممکن است در پتری‌دیش‌ها ریخته شود. پلیت‌ها را به‌صورت در بسته روی یک سطح افقی و خنک قرار دهید تا آگار سرد شده و ببندد.

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

شرایط نگه‌داری، تاریخ انقضاء و توصیه‌های دیگر مربوط به‌محیط کشت و پلیت‌های آگاردار آماده شده 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. سپس با توجه به‌ماهیت نمونه و میزان آلودگی مورد انتظار، رقت‌های لازم را تهیه کنید.

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

یادآوری۱- 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.

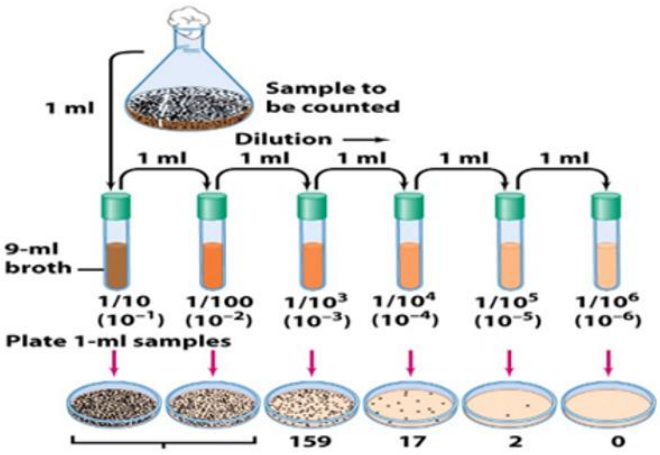
یاد آوری۲- برای اطلاعات بیشتر در باره تهیه فرآورده‌های اسیدی قبل از آزمون برای گروه‌های خاص میکروارگانیسم‌هایی مانند اسید دوست‌ها، به‌استاندارد ملی ایران ۴-۸۹۲۳ مراجعه کنید.

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.

یادآوری۳-توصیه می‌شود، دمای محلول رقیق کننده‌ها تقریبا برابر با دمای محیط آزمایشگاه باشد.

سوسپانسیون اولیه را کاملا مخلوط کنید.(۱۰ بار با حرکت دست به‌شعاع mm ۳۰۰ به‌مدت زمان حدود sec ۷چرخانید) رقت بدست آمده 10^{-1} می‌باشد.

یادآوری۴-برای شمارش اسپورها، بلافاصله پس از تهیه سوسپانسیون اولیه باید شوک حرارتی دهید، سپس به سرعت خنک کنید.



شکل ۲۰- سوسپانسیون اولیه و رقت اعشاری بعدی

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 زمان ۵sec تا ۳sec مخلوط کنید. رقت بدست آمده$^{-۲}$۱۰ می‌باشد. در صورت لزوم، به‌همین ترتیب و رقت‌های بعدی ($^{-۳}$۱۰ ،$^{-۴}$۱۰) 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 پی پت 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 ۴۵ min باشد.

۳-۷-۱ روش‌های کشت در میکروبیولوژی

کشت در پلیت به‌سه روش قابل انجام است.

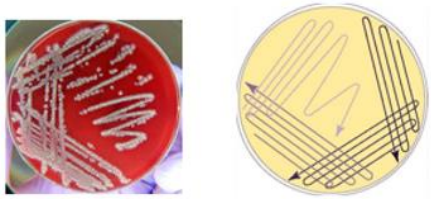
- کشت خطی[۱]
- کشت آمیخته یا پور پلیت [۲]
- کشت سطحی[۳]

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

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

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.



شکل ۲۱- کشت خطی

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

۳-۷-۱-۲ کشت آمیخته یا پورپلیت

در روش کشت آمیخته، حجم آزمونه و یا رقتی از نمونه بسته به‌اندازه پلیت و حجم محیط کشت مورد استفاده بین ۰/۱ mL تا۵ mL 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 کلنی‌های تیپیک و غیر تیپیک روی پلیت باید کمتر از ۳۰۰ کلنی باشد.

یادآوری۱ – 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 حرارت دادن زیاد محیط کشت خودداری کنید و آن را به‌محض ذوب شدن از 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.

یادآوری۲- محیط‌های کشت را برای مدت زمان بیشتر از ۴ h به‌صورت ذوب شده نگه داری نکنید

یادآوری ۳- محیط‌های کشت آگاردار را بیشتر از یک‌بار ذوب نکنید.

شکل۲۲ – کشت پور پلیت

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 ۱mm تا ۲mm آزمونه مقدارmm ۱۵تا۲۰mm محیط کشت سترون که حرارت آن به‌حدودC° ۴۵رسیده، استفاده می‌شود. برای حجم‌های بیشتر آزمونه، مقدار محیط کشت را بر همین اساس تنظیم کنید. سپس با حرکات دورانی به‌صورت[۸] 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.

۳-۷-۱-۲-۱ 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.

۳-۷-۱-۳ 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 به‌گرما[۱] هستند و احتمال دارد قسمت معنی‌داری از فلور کل را تشکیل . (مانند: ارگانیسم‌های سرماگرا [۲])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 معنی‌داری از فلور کل را تشکیل دهند (مانند: گونه‌های پسودو موناس[۳]) 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،

۱-Heat-sensitive organisms

۲-Psychrotrophic

۳-Pseudomonas spp.

به‌کار 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 ۰/۱ 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.

پلیت‌های دارای حدود ۱۵ mlمحیط کشت را آماده و نشانه گذاری کنید و در صورت لزوم سطح محیط کشت پیش از ا ستفاده خ شک می شود. معمولا ۰/۱ ml از آزمایه (فرآورده‌های مایع) و یا ۰/۱mL از سو سپان‌سیون 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.

شکل ۲۳- کشت سطحی

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

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

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

الف– میزان رطوبت مهم است زیرا رشد بهینه باکتری‌ها 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.

۱-Laminsr-flow safety cabinet

ث- در عمل پلیت‌ها را با قرار دادن در دمای تا ۲۵ °C تا ۵۰ °C به‌طوری 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 ۳۰ min تا ۶۰ min، یا به‌مدت یک شب به‌صورت 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.

۳-۸ 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 به‌روی سطح گسترش میکروبی روی لام بریزید و به‌مدت زمان ۱min، صبر کنید تا رنگ در دیواره سلولی میکروب‌ها نفوذ کند.

۳-۸-۱-۳ مرحله شستشو:

پس از سپری شدن مدت زمان ۱min، 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[1] روی گسترش را پوشانیده و به‌مدت ۱min صبر کنید.

۳-۸-۱-۵ مرحله شستشو:

پس از سپری شدن مدت زمان ۱min، 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 بی‌رنگ‌سازی بیش از اندازه نباشد. بعد از آن لام را به‌سرعت بشوئید. این عمل، بی‌رنگ شدن را متوقف خواهد کرد.

۳-۸-۱-۷ مرحله رنگ آمیزی با محلول سافرانین:

۱- Iodine

در ایـن مرحلـه سـطح لام را بـا محلـول سـافرانین را بـا رنـگ ثانویـه یعنـی سـافرانین، بـه‌مـدت زمـان sec ۱۰بپوشانید سپس رنگ اضافی را خالی کرده و با آب مقطر لام را شستشو دهید.

۳-۸-۱-۸ مرحله 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

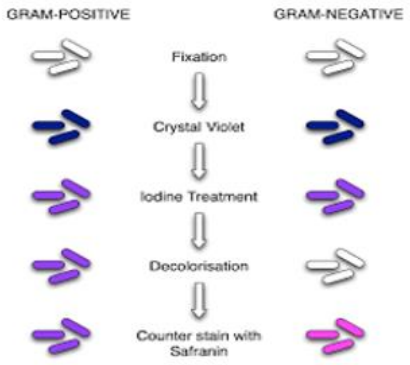
در مشاهده لام زیـر میکروسـکوپ دارای عدسـی روغنـی بـا بزرگنمـایی بـالا، ظـاهر بـاکتری‌هـا در ۵ گـروه تقسیم بندی می‌شوند:

۱-میلـه ای (باسـیل) گـرم مثبـت ۲- میلـه ای گـرم منفـی ۳- کوکـوس (گـرد) گـرم مثبـت ۴- کوکـوس گرم منفی ۵- باکتری‌های بدون واکنش به‌رنگ آمیزی گرم.

یادآوری نکات مهم:

حرارت بیش از اندازه هنگام تثبیت گسترش باعث پاره شدن دیواره سلولی باکتری شده بنابراین باکتری گرم مثبت رنگ اولیه (کریسـتال ویوله) را هنگام رنگ‌بری از دسـت می‌دهد و رنگ ثانویه را جذب می‌کند و در نتیجه باکتری گرم مثبت، بصورت گرم منفی دیده می‌شود.

- اگر گسـترش ضـخیم باشـد هنگـام مرحلـه بـی رنـگ شـدن، ممکـن اسـت ماننـد یـک گسـترش معمولی رنگ نشود و این مسـئله باعـث خطـا در تشـخیص شـما در گـرم منفـی یـا مثبـت بـودن باکتری خواهد شد.
- غلظت درست و تازه بودن رنگ‌ها هم در رنگ‌آمیزی موثر است .
- رنگ‌بری بـیش از حـد ممکـن اسـت باعـث پـاره شـدن جـدار بـاکتری‌هـای گـرم مثبـت شـده در نتیجـه ایـن بـاکتری‌هـا رنـگ کریسـتال ویولـه خـود را از دسـت داده و رنـگ ثانویـه را جـذب می‌کنند و به‌صورت گرم منفی دیده می‌شود.
- دقـت شـود هنگـام تهیـه گسـترش روی لام از محـیط کشـت، سـن کشـت بـاکتری بایـدh ۲۴ یـا کمتـر باشـد. بنـابر ایـن در محـیط کشـت‌هـایی کـه از عمـر آنهـا گذشـته و کهنـه شـده‌انـد، در قابلیت نفوذ دیواره سلولی باکتری‌هـا تغییراتـی حاصـل مـی‌شـود کـه خاصـیت گـرم مثبـت بـودن را از دست می‌دهد.



شکل ۲۴- مراحل 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 روئیت خواهند بود. در این روش برای نفوذ رنگ اولیه (مالاشیت گرین) به‌داخل پوشش اسپور از حرارت استفاده می‌شود . همان خصوصیاتی که رنگ آمیزی اسپور را مشکل می‌کند، رنگ را پس از نفوذ آن به‌داخل اسپور بخوبی حفظ می‌کند. مالاشیت گرین به‌آسانی از باکتری‌های مولد شسته می‌شود. زیرا دیواره سلولی باکتری‌های بدون اسپور 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 به‌شدن کرد شعله را کنار ببرید همین که تبخیر متوقف شد دو بار کار را تکرار کنید و نگذارید رنگ بجوشد. مدت ۳minتا ۵min به‌ترتیب ذکر شده عمل کنید و اگر مالاشیت گرین کاملا از روی لام تبخیر شد دوباره مقداری رنگ به‌آن‌اضافه 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:

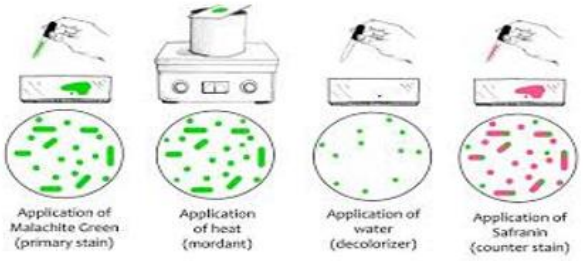
رنگ اضافی روی لام را خالی کرده در حالی که لام را به‌صورت مایل نگهداشته‌اید با استفاده از آب مقطر به‌آرامی به‌مدت۳۰ sec سطح روی گسترش را شستشو دهید.

۳-۸-۲-۴ رنگ آمیزی با سافرانین:

سطح گسترش میکروبی را با رنگ سافرانین به‌مدت زمان ۱minبپوشانید.

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.

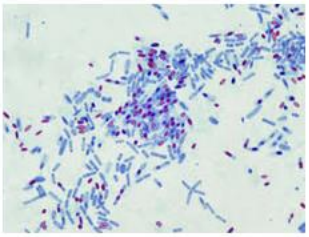


شکل ۲۵- رنگ آمیزی اسپور

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 اسپور پوشش مقاومی است که در برابر نفوذ رنگ مقاومت می‌کند بنابر این در رنگ‌آمیزی 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.



شکل ۲۶- اسپور

۴ نمونه برداری

نمونه‌هایی که به‌آزمایشگاه ار سال می شود، باید نماینده واقعی کل کالا بوده و در طی حمل، جابه‌جائی و نگه داری آن صدمه ندیده و یا تغییرات فیزیکی و شیمیایی در آن ایجاد نشده باشد. نمونه‌ها باید در شرایطی نگه داری شوند که امکان ر شد میکروارگانیسم‌ها در آن وجود ندا شته با شد. همچنین، در صورت عدم مطابقت نمونه با مندرجات نامه، نقص در بسته بندی، کافی نبودن مقدار نمونه، مشاهده آثار ظاهری ر شد 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

می‌شـــود. برای کســـب آگاهی‌های بیش‌تر از شـــرایط کلی نمونه‌برداری و نگه‌داری نمونه، به‌منظور انجام آزمون‌های میکروبیولوژی، به‌استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۰۸۳۴، مراجعه کنید.

یاد آوری- اصول نمونه‌برداری، حمل و نقل و آماده‌سازی نمونه آزمایشگاهی فرآورده‌های خام، دو کلاسه و سه کلاسه می‌باشد.

۴-۱ نمونه برداری دو کلاسه:

در ایـن روش نمونـه‌بـرداری از سـه فـاکتورn، c، m اسـتفاده مـی‌شـود. در ایـن روش معیـار میکروبیولـوژی، m مـی‌باشـد در صورتی که هر ویژگـی میکروبـی ارزشـی کمتـر از m داشـته باشـد و تعـداد واحـدهای معیـوب کمتـر از c باشـد، قابـل قبـول است.

۴-۲ نمونه برداری سه کلاسه:

در ایـن روش نمونـه‌بـرداری، عـلاوه بـر از سـه فـاکتورn، c، m از فـاکتورM نیز.اسـتفاده مـی‌شـود. اسـاس ایـن روش بـر شمارش ما بـین m و M اسـت و ارزش‌هـای مـا بـین m و M در صـورتی کـه c صـفر نباشـد قبـول اسـت و بـالاتر از M غیـر قابل قبول است.

n -عبارت است از تعداد واحد نمونه‌هایی که مورد آزمایش قرار می‌گیرد.

c -بیشترین واحدهای معیـوب (نقـص‌دار) قابـل اغمـاض مـی‌باشـد در مـورد میکروارگانیسـم‌هـایی کـه وجـود آنهـا در مـاده غذایی یا فرآورده، خطر آفرین است c برابـر صـفر مـی‌باشـد (ایـن فـاکتور بسـته بـه‌تعـداد کـل نمونـه‌هـا، نـوع عیـب و سـطح کیفیت قابل پذیرش تعیین می‌گردد).

m -معیار میکروبیولـوژی اسـت کـه هـر ویژگـی بـا ارزش برابـر یـاکمتر از آن قابـل قبـول اسـت. در مـورد میکروارگانیسـم-های بیماری‌زا m برابر صفر است.

M -معیار میکروبیولوژی اسـت کـه حـداکثر آسـتانه پـذیرش هـر ویژگـی میکروبـی را نشـان مـی‌دهـد و هـر ارزش برابـر یـا بالاتر از M غیر قابـل قبـول اسـت. ایـن معیـار در مـورد میکروارگانیسـم‌هـایی کـه وجـود تعـداد کمـی از آنهـا در مـواد غـذا بـرای سـلامتی مخـاطره آمیـز نمـی‌باشـد بـه‌کـار مـی‌رود و بـرای ایـن میکروارگانیسـم‌هـا ارزش‌هـای مـا بـین M و m قابـل قبول می‌باشد.

۵ روش‌های آزمون میکروبیولوژی در فرآورده‌های لبنی تخمیری

تخمیر، یک فرآیند متابولیک است که قندها را به‌اسیدها، گازها یا الکل تبدیل می‌کند. تخمیر زمانی اتفاق می‌افتد که زنجیره انتقال الکترون غیر قابل استفاده باشد. (اغلب به‌دلیل عدم وجود یک گیرنده نهایی الکترون، مثل اکسیژن) به‌بیان دیگر تجزیه ناقص بعضی از متابولیت‌ها (ترکیبات آلی) به‌ترکیبات ساده‌تر همراه با انرژی توسط عامل تخمیری است. از واژه تخمیر برای اشاره به رشد میکروارگانیسم‌ها بر روی یک محیط کشت، اغلب با هدف تولید یک محصول خاص استفاده می شود. در عمل تخمیرشیر، قند شیر (لاکتوز) به‌اسید لاکتیک تبدیل می‌شود و pH شیر به (۴تا۴/۶) کاهش می‌یابد و به‌این ترتیب مانع رشد گروهی از میکرو ارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌گردد. فرآورده‌های تخمیری شیر مانند دوغ کره، خامه ترش، شیر *اسیدوفیلوس*، ماست، کفیر و برخی پنیرها مانند: پنیر رگه آبی یا روکفورتی و پنیر سویسی با تخمیر باکتریایی تولید می‌شوند. معمولاً، برای تولید هریک از فرآورده های تخمیری براساس طعم و بافت مورد نظر، از باکتری، مخمر یا کپک خاصی استفاده می‌شود. به‌طور کلی، ویژگی‌های انواع فرآورده‌های لبنی تخمیری حاصل فرآیند یک کشت افزوده شده به‌شیر می‌باشد. روش‌های آزمون میکروبیولوژی انواع فرآورده‌های لبنی تخمیری در جدول‌های ۳ تا۱۲ آورده شده است:

جدول۳- روش آزمون میکروبیولوژی پنیر اولیه، پنیر تازه / پنیر رسیده درآب نمک / خامه‌ای و سایر انواع پنیر

ردیف	نوع میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	کلی‌فرم‌ها [الف]	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶و۹۲۶۳
۲	اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶
۳	استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳- ۶۸۰۶
۴	کپک و مخمر	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۰۱۵۴
۵	سالمونلا	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۸۱۰

-انواع پنیر شامل انواع پنیر رژیمی و غنی شده نیز می‌باشد.
-از انواع پنیر تازه می‌توان به ویژگی‌های پنیرلاکتیکی اشاره کرد.
-در پنیرهای رسیده کپکی که فرایند تولید با استفاده از کپک انجام می‌شود، آزمون شمارش کپک انجام نمی‌شود.
-انواع پنیر مانند پارمسان، کاچیوتا، گودا و بوترکیزه ،کاچیوتا، چدار، پرذوولون، کولومبرز، ادام، سامسو، امنتال می‌باشد.
-انواع پنیر طعم‌دار صرف‌نظر از ماده اولیه مورد مصرف و بر اساس نوع فرآیند (پنیر تازه رسیده یا پروسس) تقسیم‌بندی می‌شوند.
الف-در این استاندارد استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶روش مرجع می‌باشد.
یادآوری – این استانداردشامل ویژگی های پنیر پیتزای پروسس نمی‌شود . ویژگی‌های این فرآورده مطابق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۳۵۲۶ می‌باشد.

جدول۴-روش آزمون میکروبیولوژی کازئینات سدیم و کلسیم، پودر پس آ ب کره، پودرپروتئین تغلیظ شده شیر[1]

ردیف	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲
۲	کلی‌فرم‌ها [الف]	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶و۹۲۶۳
۳	اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶
۴	استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳- ۶۸۰۶
۵	کپک و مخمر	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۰۱۵۴

۱- Milk protein concentrated (MPC)

الف- در این استاندارد، استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶روش مرجع می‌باشد.

جدول۵- روش آزمون میکروبیولوژی انواع خامه ترش، انواع ماست، انواع دوغ، کفیر و انواع کشک مایع صنعتی

ردیف	نوع میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	کلی‌فرم‌ها [الف]	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۲۶۳و۱۱۱۶۶
۲	اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶
۳	استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز مثبت	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳-۶۸۰۶
۴	کپک و مخمر	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ۱۰۱۵۴

-درمورد دوغ‌های گازدار تخمیری گرما ندیده و کفیر که از مخمر به عنوان آغازگر لبنی استفاده می‌شود شمارش مخمر نباید انجام شود.

-این ویژگی‌ها شامل کفیر پروبیوتیک نیز می‌شود.

-انواع کشک مایع صنعتی مطابق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۶۱۲۷ می‌باشد.

-انواع ماست مطابق تقسیم‌بندی ماست در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴۰۴۶ و ۶۹۵ می‌باشد.

-انواع دوغ مطابق تقسیم بندی شده در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۴۵۳ می‌باشد.

الف- در این استاندارد، استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶روش مرجع می‌باشد.

جدول۶-روش آزمون میکروبیولوژی کنسانتره پروتئین آب پنیر

ردیف	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲
۲	کلی‌فرم [الف]	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶و۹۲۶۳
۳	اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶
٤	کپک و مخمر	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۰۱۵۴
۵	استافیلوکوکوس کواگولاز مثبت	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳-۶۸۰۶

الف- در این استاندارد، استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶روش مرجع می‌باشد.

جدول ۷- روش آزمون میکروبیولوژی خامه ترش /خامه تخمیر شده

ردیف	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	کلی‌فرم‌ها [الف]	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶و۹۲۶۳
۲	اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶
۳	استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز مثبت	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳-۶۸۰۶
۴	کپک و مخمر	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۰۱۵۴
الف- در این استاندارد استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶روش مرجع می‌باشد.		

جدول۸- روش آزمون میکروبیولوژی انواع خامه ترش، انواع ماست، انواع دوغ، کفیر و انواع کشک مایع صنعتی

ردیف	نوع میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	کلی‌فرم‌ها [الف]	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۲۶۳و۱۱۱۶۶
۲	اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶
۳	استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز مثبت	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳-۶۸۰۶
۴	کپک و مخمر	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ۱۰۱۵۴
-درمورد دوغ‌های گازدار تخمیری گرما ندیده و کفیر که از مخمر به عنوان آغازگر لبنی استفاده می‌شود شمارش مخمر نباید انجام شود. -این ویژگی‌ها شامل کفیر پروبیوتیک نیز می‌شود. -انواع کشک مایع صنعتی مطابق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۶۱۲۷ می‌باشد. -انواع ماست مطابق تقسیم‌بندی ماست در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴۰۴۶ و ۶۹۵ می‌باشد. -انواع دوغ مطابق تقسیم بندی شده در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۴۵۳ می‌باشد. الف- در این استاندارد، استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶روش مرجع می‌باشد.		

جدول۹-روش آزمون میکروبیولوژی انواع پنیر پروسس[۱]

ردیف	نوع میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها[۱]	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲
۲	کلی‌فرم‌ها[الف]	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶و۹۲۶۳
۳	اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶
۴	استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳- ۶۸۰۶
۵	کپک و مخمر	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۰۱۵۴
۶	سالمونلا	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۸۱۰
-درپنیر پروسس تحت فرایند حرارتی با دمای بالاتراز $^{\circ}C$ ۱۳۵ حد مجاز شمارش کلی میکروارگانیسم ها$Cfu/g^{۲}$ ۱۰ می‌باشد. **الف** – در این استاندارد، استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶روش مرجع می‌باشد.		

جدول۱۰- روش آزمون میکروبیولوژی انواع پودر پنیر و پودر آب پنیر، پودر پرمیت

ردیف	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲
۲	کلی‌فرم‌ها [الف]	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶و۹۲۶۳
۳	اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶
۴	استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳-۶۸۰۶
۵	کپک و مخمر	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۰۱۵۴

-منظور از انواع پودر پنیر و آب پنیر، فرآورده‌های مندرج در استانداردهای ملی ایران به شماره‌های ۵۸۷۷ و ۶۹۵۹ می‌باشد.
-استاندارد ملی ویژگی‌های پرمیت در دست تدوین می باشد.
الف- در این استاندارد، استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶روش مرجع می باشد.
یادآوری -برای ویژگی‌های پودر بستنی به استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۹۲۵۷ مراجعه شود.

جدول۱۱- روش آزمون میکروبیولوژی انواع کشک مایع

ردیف	نوع میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	کلی‌فرم‌ها [الف]	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۲۶۳و۱۱۱۶۶
۲	اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶
۳	استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز مثبت	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳-۶۸۰۶
۴	کپک و مخمر	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۰۱۵۴
۵	کلستریدیوم‌های احیا کننده سولفیت	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۴۳۲

-انواع کشک مایع مطابق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۴۵۲ می‌باشد.
الف- در این استاندارد استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶روش مرجع می‌باشد.

جدول ۱۲-روش آزمــون میکروبیولوژی خامه اسیدی شده

ردیف	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲
۲	کلی‌فرم‌ها [الف]	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶و۹۲۶۳
۳	اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶
۴	استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز مثبت	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳-۶۸۰۶
۵	کپک و مخمر	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۰۱۵۴

الف- در این استاندارد استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶روش مرجع می‌باشد.

۵-۱ اصول آزمون

الف- شمارش

برای ارزیابی کیفیت میکروبی و/ یا ایمنی فرآورده تنها شـــناخت میکروارگانیســـم‌های موجود در آنها کافی نیســت و در بیشــتر موارد، کمیت میکروارگانیســم‌ها هم به‌همان اندازه حائز اهمیت اســت که باعث ضــرورت شمارش میکروارگانیسم‌ها می شود. شمارش میکروارگانیسم‌ها به‌روش‌های مختلف انجام می شود. اگر چه در این فرآورده‌ها فقط روش شمارش با استفاده از محیط آگار غیرانتخابی و با استفاده از روش کشت آمیخته یا پورپلیت انجام می شود. 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)

ایــن روش وجــود یــا عــدم وجــود میکروارگانیســم‌هــای خــاص را در مقــدار معــین از فــرآورده تعیــین می‌کند.

ب-۱ اساس روش جستجو

بــرای تســهیل در احیــاء میکروارگانیســم‌هــای تحــت تــنش قــرار گرفتــه در فــرآورده، مراحــل زیــر انجــام می‌گردد:

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

ب-۱-۲ دومین مرحله : برای جداســازی روی محیط کشــت جامد انتخابی/ افتراقی کشــت داده می‌شــود. از کلنی‌های به‌دست آمده روی سطح محیط کشت جامد برای انجام آزمون‌های تاییدی مناسب برای شناسایی استفاده می‌شوند.

۶ محیط‌های کشت و رقیق‌کننده‌ها

دســتورالعمل‌هــای کلــی بــرای تهیــه محلــول‌هــای رقیــق‌کننــده و محــیط‌هــای کشــت در اســتاندارد ملــی ایران شماره‌های۱-۸۹۲۳، ۲-۸۹۲۳، ۳-۸۹۲۳، ۴-۸۹۲۳، ۵- ۸۹۲۳ و ۹۸۹۹ تعیین شده است.

جدول ۱۳–لیست رقیق‌کننده‌ها

ردیف	نام مواد
۱	Saline peptone diluents Ringer's_solution Peptone solution Phosphate-buffered saline (PBS):KH_2PO_4 Buffered Peptone Water [۱] Sodium citrate buffer [۲] Dipotassium hydrogen phosphate [۳]: HK_2O_4P Dipotassium hydrogen phosphate +Antifoam[۴] (polyethylene glycol) Sodium tri polyphosphate[۵] Saline peptone diluents+α-amylase[۶] Ringer's_solution+α-amylase[۶] Peptone solution+α-amylase[۶] Phosphate-buffered saline+α-amylase[۶] Buffered Peptone Water + Bromo Cresol Purple[۷] Modified Newman-Lampert stain solution Ethidium bromide Potasium hydrogen phethalate peptone water ۰/۱٪
	۱-(Listeria including L. monocytogenes, Salmonella) ۲ – **محلول سیترات سدیم** برای پنیر و شیر خشک تولید شده به‌روش غلتکی و برخی از کازئینات استفاده می‌شود. ۳ – **محلول هیدروژن دی پتاسیم فسفات** (این محلول برای پنیر، شیر خشک تولید شده به‌روش غلتکی، شیر تخمیر شده و برخی از کازئینات‌ها و پودر آب پنیر اسیدی و خامه ترش استفاده می‌شود. ۴ – **محلول هیدرژن دی پتاسیم فسفات همراه با عامل ضد کف** (پلی اتیلن گلیکول) (این محلول برای کازئین اسیدی، کازئین لاکتیکی و کازئین رنتی) استفاده می‌شود. ۵ - **محلول تری پلی فسفات** رقیق کننده جایگزین برای کازئین‌های آنزیمی که به‌سختی حل می‌شوند. ۶ - **رقیق کننده‌های عمومی دارای محلول آلفا آمیلاز** برای غذای کودک دارای نشاسته زیاد ۷ - **آب پپتونه بافری با برموکرزول ارغوانی** (برای آزمون فرآورده‌های اسیدی معین) **یاد آوری**– فرآورده‌های تخمیری دارای میکروارگانیسم‌های زنده • بالا بردن pH با NaOH نرمال • استفاده از ماده ضد قارچ (سیکلوهگزیماید یا نیستاتین۵۰mg/ kg یا آمفوتریسین) برای ممانعت از رشد فلور پایه برای جستجو و شمارش تعداد کم میکروارگانیسم در فرآورده‌هایی که دارای حد مجاز پایین هستند، می‌توان از حجم کمتری از محلول رقیق کننده استفاده کرد (۱ به ۲، ۱ به ۵) ((مشکل بازدارندگی رشد میکروبی))

جدول ۱۴- لیست محیط‌های کشت

ردیف	نام مواد
۱	Lampert stain solution Modified Newman Ethidium bromide Potasium hydrogen phethalate
۲	Plate Count Agar (PCA)
۳	Crystal violet neutral red bile lactose agar (VRBG) Nutrient agare Glucose agar Oxidas Reagent
۴	Lauryl Sulphate tryptose Broth Brilliant green lactose bile broth
۵	Lauryl Sulphate Broth Escherichia Coli Broth(EC) Lndole(Kovac,s Reagent)
۶	Yeast Extract Glucose Chloramphenicol agar(YGC)
۷	Potato Dextrose agar ۲٪ Glucose ۶۰٪ Sucrose (PDA-G-S) Osmophilic agar(MY۴۰G)
۸	Modified Giolitti and Cantoni broth Baird Parker agar Brain heart infusion broth Rabbit plasma
۹	Rappaport Vassiliadis Salmonella Enrichment BrothRappaport- Vassiliadis- Soya (RVS) Muller-Kauffmann tetrathionate/novobiocin broth (MKTTn broth) Xylose lysine desoxycholate agar(XLD) Bismuth sulfite agar(BS) Brilliant Green agar(BG) Nutrient agar Triple sugar/iron agar (TSI agar) Urea agar (Christensen) L-Lysine decarboxylation medium O.N.P.G

۷ روش اجرای آزمون

۷-۱ آماده سازی آزمایه

به‌طورکلی روش آماده سازی آزمایه بر اساس استانداردهای ملی ایران به‌شماره‌های ۱- ۸۹۲۳، ۲- ۸۹۲۳، ۳- ۸۹۲۳، ۴- ۸۹۲۳ و ۵ -۸۹۲۳ می‌باشد.

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 آماده‌سازی این فرآورده‌ها به‌بند ۳-۷ این جزوه آموزشی مراجعه کنید .

یادآوری۱- برای اطلاعات بیشتر در باره تهیه فرآورده‌های اسیدی قبل از آزمون برای گروه‌های خاص میکروارگانیسم‌هایی مانند اسید دوست‌ها، به‌استاندارد ملی ایران ۴-۸۹۲۳ مراجعه کنید.

یادآوری۲- برای باز کردن در ظروفی که دارای در آسان باز شو[1] هستند، از قسمت دیگر آن (غیر از قسمت آسان باز شو) استفاده کنید.

یادآوری۳- برای تهیه آزمونه حداقل از دو بسته نمونه استفاده کنید.

یادآوری۴- از عبور دادن ظروف باد کرده از روی شعله خودداری کنید.

یادآوری۵- محتویات بطری در بسته را به‌وسیله تکان دادن و وارونه کردن آن به‌طور کامل مخلوط کنید.

۷-۱-۱ کشت میکروبی

تلقیح و کشت میکروبی را مطابق بند ۳-۷-۱ این جزوه آموزشی انجام دهید.

۷-۱-۲ گرمخانه‌گذاری

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.

یادآوری۶- نمونه‌هایی که در طول مدت گرمخانه‌گذاری در محیط کشت‌های (از پیش) غنی شده غیر انتخابی اسیدی می‌شوند، برای مثال ماست‌های «لایو» و فرآورده‌های کشت داده شده مشابه، ممکن است pH محیط کشت را در حین گرمخانه گذاری کاهش دهند و بهتر است بررسی شود که pH بالای ۴/۵ باقی مانده است یا افزایش یافته است می‌توان غلظت بافر را افزایش داد اما (پیش) غنی سازی تغییر یافته چنین فرآورده‌هایی باید تصدیق شود تا اطمینان حاصل شود که شرایط برای رشد میکروارگانیسم‌های مورد نظر، مساعد است. برای اطلاعات بیشتر در باره تهیه فرآورده‌های اسیدی قبل از آزمون برای گروه‌های خاص میکروارگانیسم‌هایی مانند اسید دوست‌ها، به‌استاندارد ملی ایران ۴-۸۹۲۳ مراجعه کنید.

۱-Easy open

۲-۷ شمارش باکتری‌های بی‌هوازی احیا کننده سولفیت[۱]

۱-۲-۷ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۴۳۲، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش جامع برای شمارش باکتری‌های بی‌هوازی احیا کننده سولفیت

باکتری‌های احیا کننده سولفات گروهی ناهمگون از نظر تاکسونومی هستند به‌این معنا که انواع اشکال و اندازه‌ها در بین اعضای این گروه دیده می‌شوند. برخی از این باکتری‌ها کوکسی شکل و برخی باسیل‌اند. برخی توانایی تولید اندوسپور دارند درحالی که بسیاری چنین توانایی را ندارند. در واقع هر باکتری که بتواند فرآیند احیای گوگرد اکسید شده به‌انواع احیا شده را انجام دهد بدون در نظر گرفتن قرابت تاکسونومیکی (یعنی اینکه به‌چه خانواده یا جنس باکتریایی تعلق دارد) در این گروه بررسی می‌شود. تمامی اعضای این گروه تنها در شرایط بی‌هوازی می‌توانند زندگی و فعالیت کنند بنابر این جزو باکتری‌های بی‌هوازی اجباری یا بی‌هوازی مطلق هستند. این باکتری‌ها برای رشد خود علاوه بر شرایط بی‌هوازی کامل نیاز به‌وجود سولفات یا سایر اشکال اکسید شده گوگرد و مواد آلی نیز هستند. کلستریدیوم‌ها باسیل‌های گرم مثبت، بی هوازی و اسپوردار هستند. می‌توانند سولفیت را در شرایط بی‌هوازی احیا کنند. بعضی ساکارولیتیک‌اند و از قندها، اسید و گاز تولید می‌کنند و بسیاری از آنها هم پروتئولیتیک هستند. این گروه باکتری‌ها فاقد آنزیم‌های سیتوکروم و سیتوکروم اکسیداز بوده و در نتیجه کاتالاز منفی می‌باشند. اغلب متحرک، فاقد کپسول و به‌اکسیژن حساس می‌باشند. علت حساسیت آن‌ها به‌اکسیژن، مربوط به‌خود فلاو-پروتئین‌ها است که اکسیژن را احیاء کرده و تبدیل به‌مواد سمی برای باکتری می‌نمایند و از طرفی فاقد سوپراکسید دستموتاز و کاتالاز هستند و نمی‌توانند اثر سمی این ترکیبات را خنثی کنند.

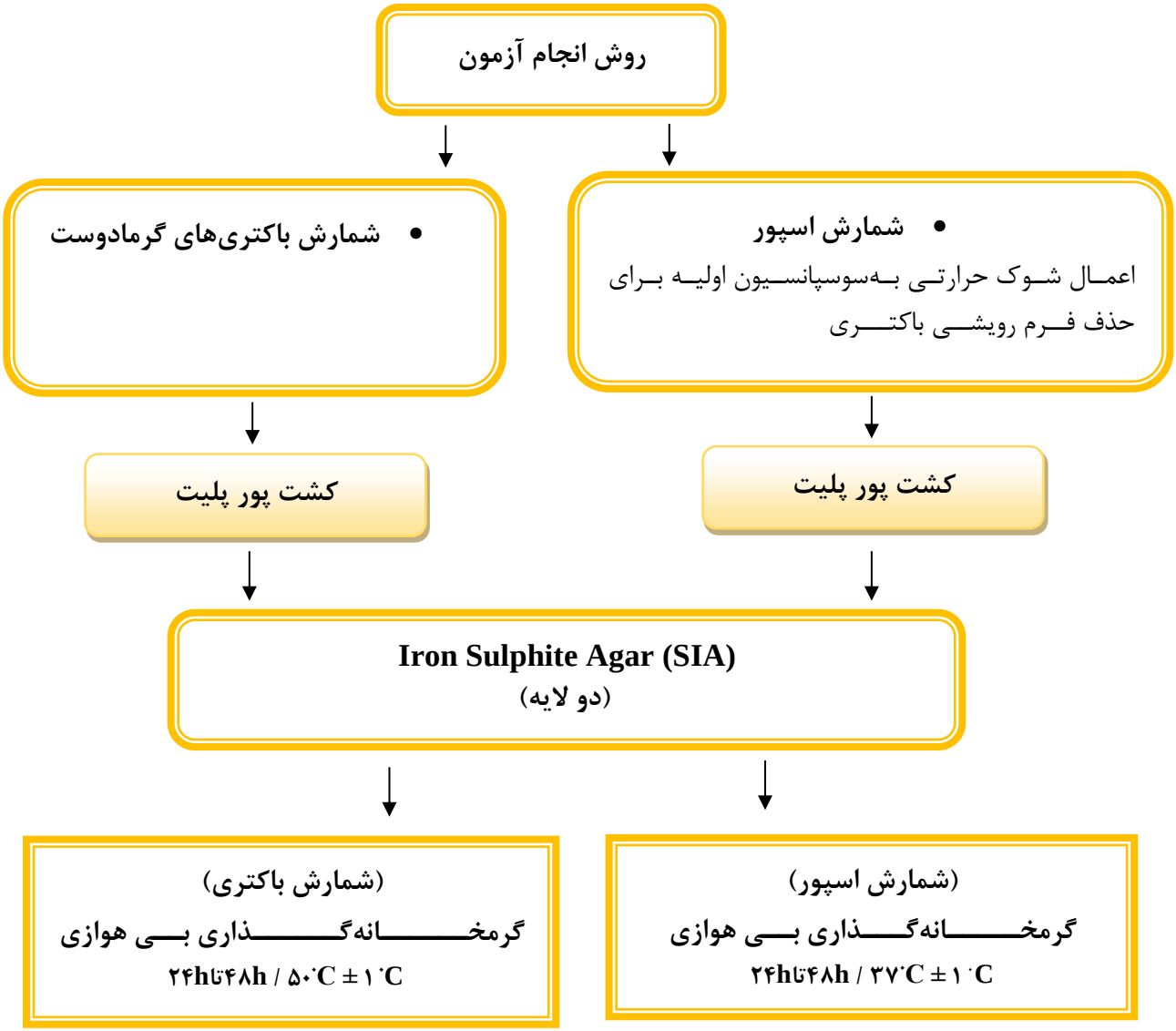
محیط کشت و رقیق کننده

- **Iron Sulphite Agar (ISA)**
- **Saline peptone solation**

↓

آماده سازی، تهیه آزمونه و سوسپانسیون اولیه و رقت

۱-Sulfate Reducing Bacteria (SRB)



کلنی‌های سیاه در محیط کشت که احتمالا دارای هاله سیاه در محیط کشت هستند و نشان دهنده حضور باکتری‌های بی‌هوازی احیاء کننده سولفیت می‌باشند، را شمارش کنید .

سیاه شدن غیر اختصاصی و منتشر شدن در محیط کشت مخصوصا هنگامی که به‌جای پلیت از لوله‌های کشت استفاده می‌شود، ممکن است اتفاق بیافتد این حالت بر اثر رشد باکتری‌های بی هوازی که فقط هیدرژن تولید می‌کنند و قادر به‌تولید هیدرژن سولفید نمی‌باشند اتفاق می‌افتد که می‌تواند سبب احیا سولفیت و در نتیجه سیاه شدن کل محیط کشت گردند.

شمارش کلنی‌ها

تعدادکلنی در همه پلیت‌های دارای کمتر از ۳۰۰ کلنی، در نظر گرفته شود و از بین آنها پلیت‌هایی که کمتر از ۱۵۰ کلنی می‌باشند، شمارش شود و مطابق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹ محاسبه شود.

چنانچه از این روش استاندارد برای شمارش کلستریدیوم[1]ها استفاده می‌شود لازم است بعد از به دست آوردن کلنی‌های شاخص، تعداد ۵ کلنی شاخص از هر پلیت را انتخاب و آزمون‌های تاییدی جنس کلستریدیوم انجام گیرد.

- **خصوصیات کلنی:**

کلنی‌های سیاه دارای هاله سیاه

باکتری‌های بی‌هوازی احیا کننده سولفیت در شرایط بی‌هوازی به‌علت تشکیل سولفید آهن دو ظرفیتی کلنی‌های با هاله سیاه رنگ، تولید می‌کنند.

- **مشاهده میکروسکوپی:**

اشکال میله‌ای با اندو اسپور انتهایی

۷-۳ شناسایی و شمارش کلی‌فرم‌ها

۷-۳-۱ ا ستاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش جامع برای شناسایی و شمارش کلی‌فرم‌ها – روش بیشترین تعداد احتمالی([2] MPN)

کلی‌فرم‌ها گروهی از باکتری‌های خانوادهٔ آنتروباکتریاسه هستند گرم منفی، باسیل، متحرک، هوازی، بی‌هوازی اختیاری که در دمای ۳۰°C یا ۳۷° C قادر به‌تخمیر لاکتوز و تولید گاز در شرایط تعیین شده، در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶ می‌باشند.

این روش ارائه شده بسیار دقیق‌تر از سایر روش‌های ارائه شده برای شمارش کلی‌فرم‌ها است و در مواردی که تعداد کلی‌فرم‌ها در نمونه زیاد است ارجح داده می‌شود. با کار برد این روش حدود ۹۰٪ از سویه‌های خاص سیتروباکتر، آنتروباکتر و کلبسیلا قابل افتراق است.

یادآوری۱- شمارش (MPN) بعد از گرمخانه‌گذاری، در یک محیط کشت مایع در ۳۰°C ±۱°C یا ۳۷° C ±۱°C انجام می‌شود.

یادآوری۲-دما موضوعی است قرار دادی، که با در نظر گرفتن شرایط، در مورد شیر و فرآورده‌های شیری، دمای ۳۰°C در نظر گرفته می‌شود .

یادآوری۳-کار برد این استاندارد به‌متغیرهای زیادی بستگی دارد

۱- Clostridium

۲ -از آنجایی که این روش شمارش روشی آماری است که از قوانین احتمالات با توجه به‌نحوه توزیع نمونه در لوله‌های محیط کشت تبعیت می‌کند به‌آن روش MPN می‌گویند. این اصطلاح از حرف اول سه کلمه‌های Most Probable Number به معنای حداکثر تعداد احتمالی گرفته شده است.

نحوه محاسبه تعداد میکرو ارگانیسم‌ها در هر ml ۱۰۰ نمونه مورد آزمایش به‌این صورت است که تعداد لوله‌های مثبت مرحله تأییدی و در صورتی‌که مرحله احتمالی انجام شود تعداد پلیت‌های مثبت مرحله تکمیلی ثبت می‌شود. سپس تعداد میکرو ارگانیسم‌ها را با پیدا کردن این عدد (کد) در جدولی موسوم به‌جدول MPN (و یا در برخی موارد با استفاده از فرمول‌هایی خاص که درمورد برخی روش‌های MPN در دسترس است) به‌دست می‌آورند. و واحد آن به‌صورت MPN Index/۱۰۰mL نوشته می‌شود.

محیط کشت

- **Lauryl Sulphate Tryptose Broth**
- **Brilliant green lactose bile broth**

↓

روش انجام آزمون (شناسایی)

آماده سازی، تهیه آزمونه و سوسپانسیون اولیه و رقت

-بسته به‌حد جستجوی مورد نیاز، مقدار X ml از آزمایه را در مورد فرآورده‌های مایع، یا مقدار ml X از سوسپانسیون اولیه را در مورد سایر فرآورده‌ها، به‌داخل یک لوله دارای ۱۰ml از محیط کشت غنی کننده انتخابی منتقل کنید.

-اگر ۱ml <x < ۱۰ml باشد از محیط کشت غنی کننده انتخابی با غلظت دو برابر استفاده کنید.

-اگر ۱ml ≤x باشد از محیط کشت غنی کننده انتخابی با غلظت معمولی استفاده کنید.

- **روش جستجو و شناسایی**

روش انجام آزمون جستجو و شناسایی

↓

غنـــــی ســـــازی

↓

انتقـــال

۱ml از آزمونه به ۱۰ml Lauryl Sulfate tryptose broth با غلظت معمولی

یـا

۱۰ml از آزمونه به ۱۰ml Lauryl Sulfate tryptose broth با غلظت مضاعف

↓

گرمخـــــــــــانه‌گـــــذاری لولـــــــه‌ها

۳۰ °C / ۲۴h ± ۲ h یـــا ۳۷ °C / ۲۴h ± ۲ h

آزمون‌های تاییدی

↓

انتقال یک حلقه کشت به‌محیط
Brillian green lactose bile broth

↓

گرمخانه‌گذاری لوله‌ها
۳۰ °C / ۲۴h ± ۲ h یا ۳۷°C / ۲۴h ± ۲ h

↓

مشاهده گاز در لوله دورهام

در صورت عدم مشاهده گاز یا کدورت، گرمخانه‌گذاری را در دمای ۳۷ °C به‌مدت زمان ۲۴h ± ۲h دیگر در دمای ۳۷ °C ادامه دهید.

شکل۲۷- گاز در لوله دورهام

- **تفسیر نتایج مثبت :**

نمونه از نظر وجود کلی فرم، مثبت است.

- **مشاهده میکروسکوپی:**

کلی‌فرم‌ها، گرم منفی و به‌اشکال میله‌ای شکل دیده می‌شود.

- **روش شمارش (Probable Number method) MPN:**

روش انجام آزمون شمارش

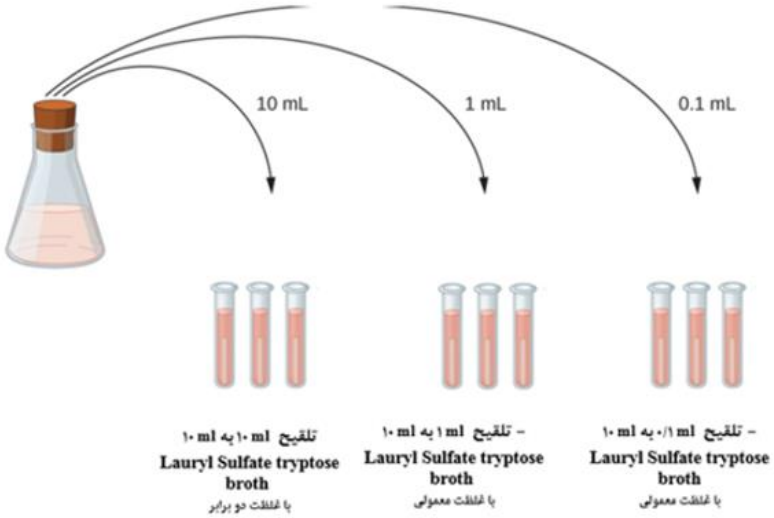
این روش شمارش وقتی مناسب است، که تعداد مورد انتظار بین باکتری ۱۰ CFU /ml تـا۱۰۰ CFU /ml یا ۱۰ CFU /g تـا۱۰۰ CFU /g از نمونه باشد.

آماده سازی، تهیه آزمونه و سوسپانسیون اولیه و رقت

شکل ۲۸-غنـــی ســـازی انتخـــابـــی

- سـه لولـه آزمـایش بـزرگ دارای ۱۰ml محـیط کشـت غنـی کننـده انتخـابی بـا غلظـت دو برابـر را انتخاب کنید به‌هریک به‌وسـیله پـی‌پـت سـترون ۱۰ml از نمونـه مـورد آزمـایش چنانچـه مـایع باشـد و یا ۱۰ml از سوسپانسیون اولیه را در مورد سـایر فـرآورده‌هـا اضـافه کنیـد. ایـن آزمونـه برابـر بـا یـک گرم نمونه در هر لوله می‌باشد.

- سـه لولـه آزمـایش دیگـر دارای ml ۱۰ محـیط کشـت غنـی کننـده انتخـابی بـا غلظـت معمـولی را انتخاب کنید به‌هریک بـه‌وسـیله پـی پـت سـترون ۱ml از نمونـه مـورد آزمـایش چنانچـه مـایع باشـد و یا ۱ml از سوسپانسیون اولیه را در مورد سایر فرآورده‌ها اضافه کنید.
- سه لوله آزمایش دیگـر دارای ml ۱۰ محـیط کشـت غنـی کننـده بـا غلظـت معمـولی را انتخـاب کنیـد به‌هریـک بـه‌وسـیله پـی‌پـت سـترون ۱ml از رقـت‌هـای بعـدی بدسـت آمـده ماننـد: ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ را اضافه کنید.
  - ✓ برای تهیه رقت‌های دهدهی، هر بار از یک پی پت سترون جدید استفاده کنید.
  - ✓ به‌کمک مخلوط کن مناسب ماده کشت داده شده را با محیط به‌خوبی مخلوط کنید.



شکل ۲۹- تلقیح از سوسپانسیون اولیه

گرمخـــــــانه‌گـــــــــذاری لولـــــــه ها

۲۴h±۲h / ۳۷°C ±۱ °C

در صورت عدم مشاهده گاز یا کدورت، گرمخانه‌گذاری را در دمای ۳۷ °C به‌مـدت زمـان۲۴h±۲h دیگـر در ادامـه دهید. چنانچه فرآورده در ته‌لوله محیط کشت چسبیده باشد و پس از ۴۸ h دوره گرمخانه‌گذاری، کدورت بـدون گاز ایجاد شود، از آن به‌محیط EC تلقیح کنید .

- ✓ در صورت عدم مشاهده گاز یا کدورت، گرمخانه گذاری را در دمای ۳۷ °C به‌مدت زمان ۲۴h±۲h دیگر ادامه دهید.

آزمـــون تاییـــدی کلـی فرم‌هـــا

انتقال یک حلقه کشت از لوله‌های دارای کدورت یا گاز به لوله‌های دارای محیط Brillian green lactose bile broth

شکل ۳۰- Brillian green lactose bile broth

گرمخـــــــــانه‌گـــــــــذاری

۲۴h±۲h / ۳۰± ۱°C یـــا ۲۴h±۲h / ۳۷± ۱°C

✓ در صورت عدم مشاهده گاز یا کدورت، گرمخانه‌گذاری را در دمای ۳۷°C به‌مدت زمان ۲۴h±۲h دیگر ادامه دهید.

مشاهده گاز در لوله دورهام

(مثبت)

- **تفسیر نتایج**

با توجه به‌معیار تشخیص نتایج مثبت، تعداد نتایج مثبت به‌دست آمده از لوله‌ها را شمارش و ثبت کنید.

- **تعیین مقادیر MPN:**

مقادیر MPN کلی‌فرم‌ها، مطابق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - الزامات کلی و راهنما برای آزمون‌های میکروبیولوژی تعیین می‌شود.

یادآوری- با استفاده از روش MPN مقادیر متفاوتی از نتایج ممکن است حاصل شود نتایج این روش، باید با احتیاط استفاده شود.

۴-۷ شمـــــارش کلـــی‌فـــــرم‌هـــا

۷-۴-۱ ا ستاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۲۶۳، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش جامع برای شمارش کلی‌فرم‌ها – روش شمارش کلنی

این روش در مواردی که انتظار می‌رود تعداد کلنی‌های مورد شمارش بیش۱۰۰ Cfu/ml یـا ۱۰۰ Cfu/g از آزمایه باشد، توصیه می‌شود. کلی‌فرم‌ها گروهی از باکتری‌های خانوادهٔ آنتروباکتریاسه هستند گرم منفی، باسیل، متحرک، هوازی، بی‌هوازی اختیاری که در دمای°C ۳۰ یـا°C ۳۷ روی محیط کشت کریستال ویوله دارای قرمز خنثی، نمک های صفراوی، لاکتوز و (VRBL)، کلنی‌های مشخص تشکیل می‌دهند و در آزمون تاییدی با تخمیر لاکتوز تولید گاز می‌کنند. این روش ارائه شده بسیار دقیق‌تر از سایر روش‌های ارائه شده برای شمارش کلی‌فرم‌ها است و در مواردی که تعداد کلی‌فرم‌ها در نمونه زیاد است ارجح داده می‌شود. با کار برد این روش حدود ۹۰٪ از سویه‌های خاص *سیترو باکتر*، *انترو باکتر* و *کلبسیلا* قابل جدا سازی است.

محیط کشت

- **Crystal Violet neutral Red Bile Lactose Agar (VRBL)**
- **Brillian green lactose bile broth**

روش انجام آزمون (شمارش)

آماده سازی، تهیه آزمونه و سوسپانسیون اولیه و رقت

برای هریک از فرآورده‌های مایع و / یا رقت انتخاب شده، دو پلیت آماده کنید. با استفاده از پی‌پت سترون مقدار ۱ml از فرآورده مایع یا رقت مناسب را در مرکز هر پلیت بریزید.

- برای هر رقت از پیپت جداگانه استفاده کنید.

کشت پورپلیت

- کنترل سترونی محیط کشت را با یک پلیت شاهد که فقط دارای ۱۵ml محیط کشت است، تهیه کنید.

- مدت زمان بین تهیه سوسپانسیون اولیه تا هنگام ریختن محیط کشت در پلیت‌ها نباید از ۱۵min بیشتر شود.

- پس از بسته شدن کامل محیط کشت مجددا حدود ۴ml از محیط کشت VRBL با دمای ۴۴°C تا ۴۷ °C را روی آن بریزید . سپس پلیت‌ها را روی سطح افقی و خنک قرار دهید تا بندد.

Crystal Violet neutral Red Bile Lactose Agar (VRBL)

↓

گرمخانه‌گذاری هوازی

۳۰ °C تا ۳۷ °C /۲۴±۲h

↓

انتخاب کلنی و شمارش کلنی

- **خصوصیات کلنی کلی‌فرم‌های شاخص**
  - قرمز ارغوانی با قطر حداقل ۰/۵ml گاهی با هاله مایل به‌قرمز ناشی از رسوب صفرا
- **خصوصیات کلنی کلی‌فرم‌های غیر شاخص**
  - اندازه کوچکتر

- کلنی‌های شاخص نیاز به‌آزمون تاییدی ندارند و شمارش شوند.
- کلنی‌های غیر شاخص (برای مثال با اندازه کوچکتر) و همه کلنی‌های به‌دست آمده از فرآورده‌های شیری دارای قند غیر از لاکتوز باید آزمون‌های تاییدی را طی کنند .
- تخمیر سایر قندها به‌غیر از قند لاکتوز ممکن است باعث ایجاد کلنی‌های با ظاهر مشابه کلی‌فرم‌های شاخص شود.

پیدایش هاله مایل به‌قرمز ناشی از رسوب صفرا در اطراف کلنی به‌نوع کلی فرم و کیفیت محیط کشت بستگی دارد.

آزمون تاییدی

↓

انتقال ۵ کلنی غیر شاخص به ۵ لوله محیط کشت
Brillian green lactose bile broth

شکل۳۱- Brillian green lactose bile broth

گرمخانه‌گذاری لوله‌ها
۳۰ °C / ۲۴± ۲ h تا ۳۷ °C / ۲۴± ۲ h

↓

مشاهده حباب‌های گاز در لوله دورهام
Brillian green lactose bile broth

↓

شمارش کلنی‌ها

تعداد کلنی در پلیت‌های دارای بیش از ۱۰ کلنی و کمتر از ۱۵۰ کلنی، شمارش شود.

همچنین کلنی‌های تایید شده نیز در شمارش منظور شوند.

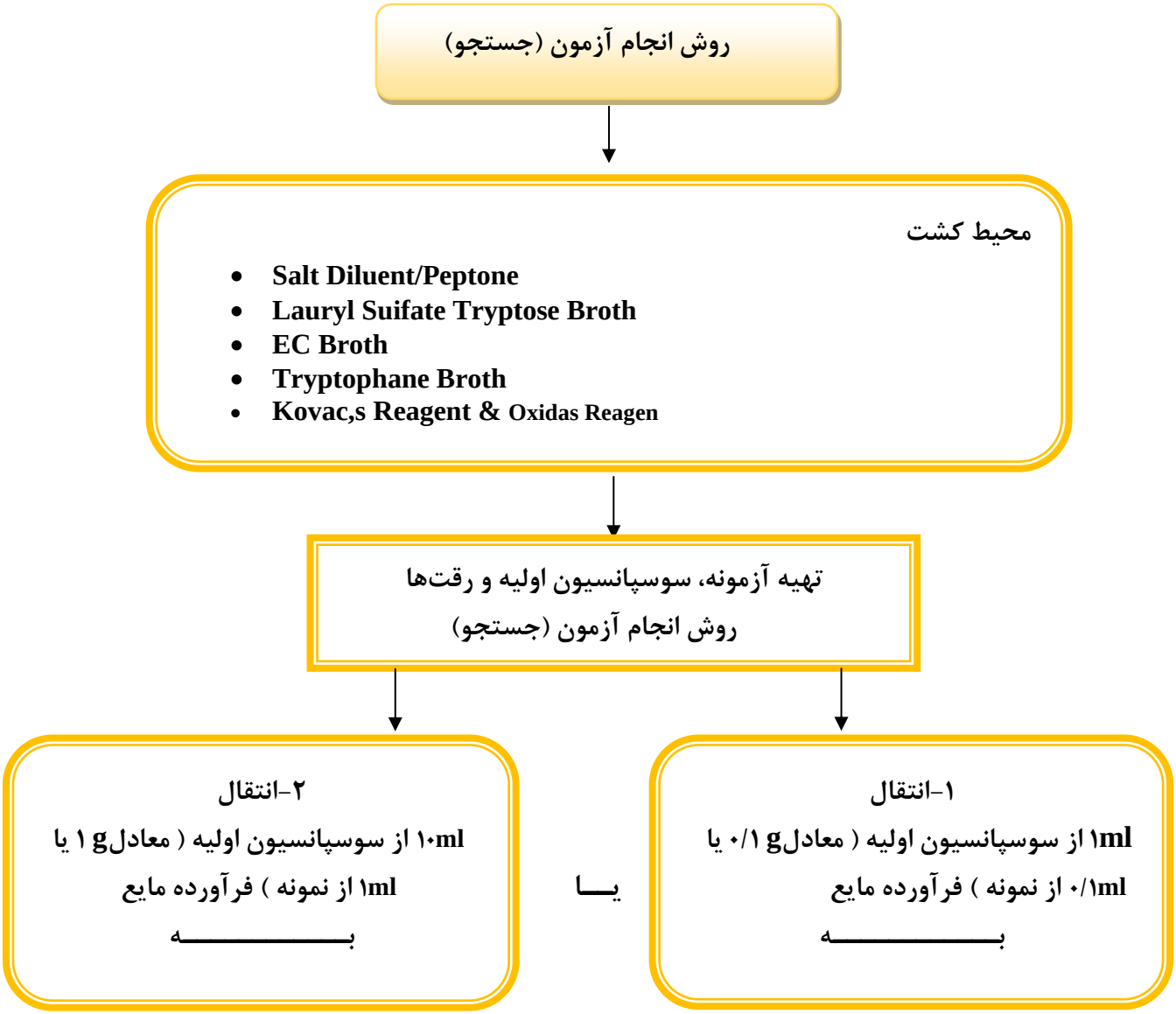
تعداد CFU باکتری‌ها در هرگرم و میلی لیتر، مطابق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹ محاسبه نمایید .

۷-۵ اشـــریشیـــا کلـــی

۷-۵-۱ اســـتاندارد ملـــی ایـــران شـــمارهٔ ۲۹۴۶، میکروبیولـــوژی مـــواد غـــذایی و خـــوراک دام- روش جســـتجو و شـــمارش اشریشـــیاکلی بـــا اســـتفاده از روش بیشـــترین تعـــداد احتمالی

اشریشـــیاکلی گروهـــی از بـــاکتری‌هـــای خـــانوادهٔ آنتروباکتریاســـه هســـتند کـــه طبـــق روش توصـــیه شـــده در اســـتاندارد ملـــی ایـــران شـــمارهٔ ۲۹۴۶، در دمـــای ۴۴ °C تخمیـــر لاکتـــوز ایجـــاد گـــاز کـــرده و از تریپتوفـــان انـــدول تولیـــد مـــی‌کننـــد. و در محـــیط کشـــت انتخـــابی دارای نمـــک-های صفراوی کلنی‌های اختصاصی تولید می‌کنند.

۱-روش آزمون جستجـــو



۱۰ ml آبگوشت غنی کننده(LS)
با غلظت معمـــولـــــی

۱۰ml آبگوشت غنی کننده(LS)
با غلظت مضـــــاعف

گرمخـــــــــــــــانه‌گـــــــــــــــــذاری
۳۷ °C / ۲۴h± ۲h

در صورت لزوم و عدم مشاهده کدورت گرمخانه‌گذاری را تا ۲۴h± ۲h دیگر در دمای ۳۷°C ادامه دهید.

انتقـــــــــــال
یک حلقه کشـــت از لـــولـــه‌هـــــای حـــاوی گـــاز بـــه
EC brath

شکل ۳۲ - محیط EC

گرمخـــــــــــــــانه‌گـــــــــــــــــذاری
۴۴ °C/۲۴h± ۲ h

بررسی در آب تریپتونه

انتقـــــــــــال
یک حلقه کشـــت از لـــولـــه‌هـــــای حـــاوی گـــاز
بـــــــــــــــه

۱۰ mL آب تریپتونه (بدون اندول)
Tryptophane Broth

چنانچه در این مرحله هیچ گازی در محیط کشت EC ایجاد نشد، گرمخانه‌گذاری را تا مدت زمان ۴۸h± ۲h ادامه دهید. از لوله‌های گرم‌خانه گذاری شده که تشکیل گاز داده اند به‌وسیله حلقه کشت، در آب تریپتونه‌ای که قبلا در حمام آب گرم تا ۴۴ °C گرم شده است، کشت دهید سپس ماده کشت داده شده را مخلوط کنید در هنگام مخلوط کردن هوا وارد لوله دورهام نشود.

گرمخانه‌گذاری لوله‌ها

۴۴ °C/۴۸h± ۲ h

در صورت لزوم و عدم مشاهده کدورت گرمخانه‌گذاری را تا ۲۴h± ۲h دیگر در دمای ۳۷ °C ادامه دهید.

آزمایش تولید اندول

تریپتونه غنی از اسیدآمینه تریپتوفان است و توسط بعضی از میکروارگانیسم‌های معین به‌عنوان منبع کربن و نیتروژن و انرژی مورد استفاده قرار می‌گیرد. و اندول تولید می‌شود. همه باکتری‌ها و حتی همه باکتری‌های روده‌ای گرم منفی قادر به‌مصرف تریپتوفان و تولید اندول با این روش نیستند. بنا بر این تولید اندول می‌تواند یک روش تشخیصی است .

انتقال

۰/۵ ml معرف اندول به لوله‌های حاوی آب تریپتونه

↓

ظهور رنگ قرمز در فاز الکلی نشانگر وجود اندول است.

↓

شمارش لوله‌های مثبت برای هر رقت

تفسیر نتایج

لوله‌هایی که تشکیل گاز داده‌اند و اندول مثبت هستند، از نظر وجود *اشریشیا کلی* احتمالی مثبت هستند.

۲-روش آزمون شمارش MPN(Most probable number method)

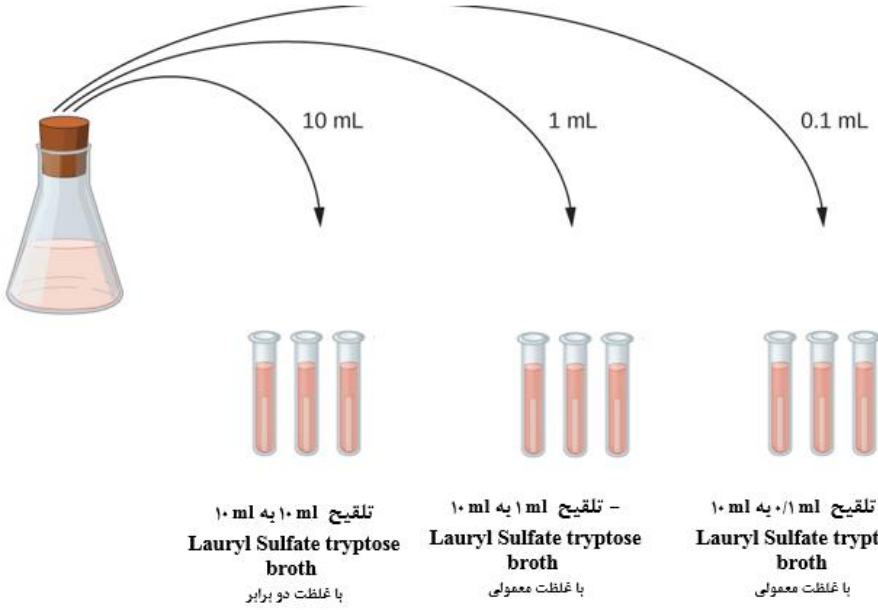
روش MPN وقتی مناسب است، که تعداد مورد انتظار بین باکتری CFU /mL ۱۰تا CFU /mL ۱۰۰یا CFU /g ۱۰تا CFU /g ۱۰۰ از نمونه باشد.

آماده سازی، تهیه آزمونه و سوسپانسیون اولیه و رقت و غنی ساز انتخابی

- سه لوله آزمایش بزرگ دارای۱۰mL محیط کشت غنی کننده انتخابی با غلظت دو برابر را انتخاب کنید به هریک به‌وسیله پی پت سترونmL ۱۰ از نمونه مورد آزمایش چنانچه مایع باشد و یا ۱۰mL از سوسپانسیون اولیه را در مورد سایر فرآورده‌ها اضافه کنید. این آزمونه برابر با یک گرم نمونه در هر لوله می‌باشد.

- سه لوله آزمایش دیگر دارای۱۰mL محیط کشت غنی کننده انتخابی با غلظت معمولی را انتخاب کنید به هریک به‌وسیله پی پت سترونmL ۱ از نمونه مورد آزمایش چنانچه مایع باشد و یاmL ۱ از سوسپانسیون اولیه را در مورد سایر فرآورده‌ها اضافه کنید.

- سه لوله آزمایش دیگر دارای۱۰mL محیط کشت غنی کننده با غلظت معمولی را انتخاب کنید به‌هریک به وسیله پی پت سترونmL ۱ از رقت‌های بعدی بدست آمده مانند: ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ را اضافه کنید.

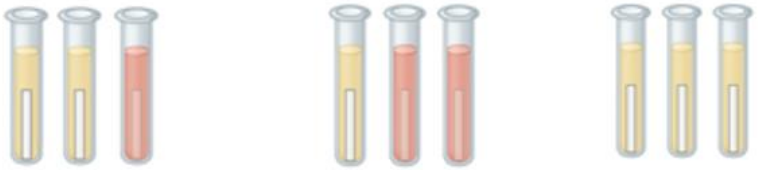


شکل ۳۳- تلقیح ازسوسپانسیون اولیه به محیط کشت Lauryl Sulfate tryptose broth

گرمخـــــــانه گـــــــــذاری لولـــــــه ها

۲۴h± ۲h / ۳۷°C ±۱ °C

در صورت عدم مشاهده گاز یا کدورت، گرمخانه‌گذاری را در دمای ۳۷ °C به‌مدت ۲۴h± ۲h دیگر ادامه دهید.
چنانچه فرآورده در ته لوله محیط کشت چسبیده باشد و پس از ۴۸h دوره گرمخانه‌گذاری، لوله‌ها را بررسی کنید چنانچه کدورت بدون گاز ایجاد شود، از آن به‌محیط EC تلقیح کنید.



شکل ۳۴- بررسی محیط کشت بعد از گرمخانه گذاری

آزمون تاییدی:

بررسی در دومین محیط انتخابی

از لوله‌های گرم خانه گذاری شـده دارای گاز به‌وسـیله حلقه کشـت، در EC brath دومین محیط انتخابی که قبلا در حمام آب گرم تا °C ۴۴ گرم شده است، کشت دهید سپس ماده کشت داده شده را مخلوط کنید در هنگام مخلوط کردن هوا وارد لوله دورهام نشود.

انتقـــــــــــال

یک حلقه کشـــت از لـــولـــه‌هـــــای حـــاوی گـــاز بـــه

↓

EC brath

شکل ۳۵- محیط EC

گرمخـــانه گـــــذاری لولـــــــه
۴۴ ° C/۲۴h± ۲ h

چنانچه در این مرحله هیچ گازی در محیط کشت EC ایجاد نشد، گرمخانه‌گذاری را تا مدت زمان۲h ± ۴۸h ادامه دهید.

آزمون تاییدی:
بررسی در دومین محیط انتخابی

از لولـه‌هـای گـرم خانـه گـذاری شـده کـه تشـکیل گـاز داده‌انـد بـه‌وسـیله حلقـه کشـت، در آب پپتونـه/ تریپتونه‌ای که قبلا در حمـام آب گـرم تـا ۴۴ °C گـرم شـده اسـت، کشـت دهیـد سـپس مـاده کشـت داده شده را مخلوط کنید در هنگام مخلوط کردن هوا وارد لوله دورهام نشود.

انتقـــــــــال
یک حلقه کشـــت از لـــولـــه‌هـــــای حـــاوی گـــاز

↓

آب پپتونه / تریپتونه

شکل ۳۶- محیط TW

گرمخـــانه گـــــذاری لولـــــــه‌ها
۴۴ ° C/۴۸h± ۲ h

↓

بررسی تولید انـــــدول
انتقـــال ml ۰/۵ معـرف انـدول به لولـه‌های حـاوی آب پپتونه/ تریپتونه

ظهور رنگ قرمز در فاز الکلی نشانگر وجود اندول است.

شکل ۳۷- واکنش اندول

شمـارش تعـداد لولـه‌های مثبـت

تفسیر نتایج

لوله‌هایی که تشکیل گاز داده‌اند و اندول مثبت هستند، از نظر وجود *شریشیا کلی* احتمالی مثبت هستند.

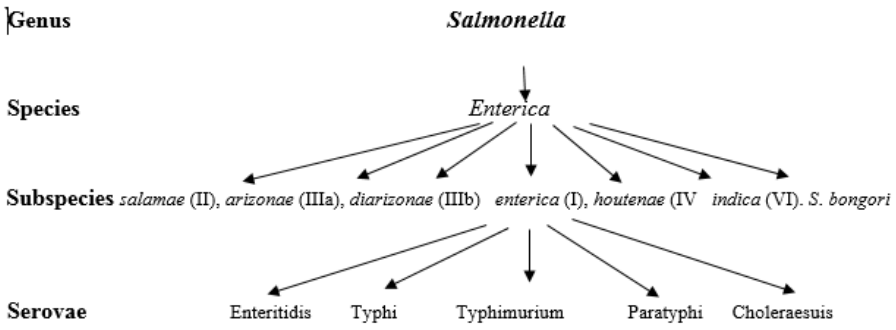
تعیین مقادیر MPN:

مقادیر MPN/*شریشیا کلی*، مطابق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶ تعیین می‌شود.

۷-۶ آزمون جستجـوی سالمـونـلا

۷-۶-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴۴۱۳، شیر و فرآورده‌های آن – جستجو و شناسایی *سالمونلا*

سالمونلاها باسیل‌های گرم منفی بدون اسپور، هوازی و بی‌هوازی اختیاری، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی هستند.



شکل ۳۸- طبقه بندی سالمونلا

به‌منظورجستجو گونه‌های سالمونلا احتمالی موجود در کشت‌های اسیدلاکتیک و بیفیدوباکتریوم‌ها اغلب لازم است ترکیب آبگوشت پیش غنی کننده اصلاح گردد تا اطمینان حاصل شود که اسید آلی تولید شده به وسیله باکتری‌های آغازگر است و آلوده کننده pH را به‌اندازه‌ای پائین نمی‌آورد

کـه گونـه‌هـای *سـالمونلا* را نـابود کنـد بـرای انـواع مـواد غـذایی تـا مقـادیر ۱۰^۸ CFU/g بـاکتری‌هـای اسـیدلاکتیک یـا بیفیـدوباکتریوم‌هـا، آب پپتونـه بـافری بـا وانکومایسـین[۱] (۱۰ g/l) بـه‌کـار برید. امـا ایـن روش برای باکتری‌های اسیدلاکتیک مقاوم به‌وانکومایسین و بیفیدوباکتریوم‌ها مناسب نیست.

برای مواد غذایی مختلف که حاوی مقادیر تا ۱۰^۱۱ cfu/g باکتری‌های اسـیدلاکتیک یا بیفیدوباکتریوم‌ها هستند:

- آب پپتونـه بـافری بـا غلظـت مضـاعف بـا وانکومایسـین (۱۰mg/L)، مالاشـیت گـرین (۴۰ mg/L) و شیر (۱۰ mg/L) به‌کار می‌رود.
- بـه جـای اسـتفاده ازآب پپتونـه بـافری بـا غلظـت مضـاعف، مـی‌تـوان از آب پپتونـه بـافری کـه فقـط غلظت بافر فسفات مضاعف شده استفاده کرد.
- برای مواد غذایی حاوی بیش از۱۰^۱۱ cfu/g، آب پپتونه بافری مضـاعف شـده همراه با وانکومایسـین (۱۰ mg/L)، مالاشیت گرین (۴۰ mg/L) و شیر (۱۰ mg/L) به‌کار ببرید. (به‌یادآوری توجه کنید.)
- جهت تضـمین این که حداکثر سـطح باکتری‌های اسـیدلاکتیک و *بیفیدوباکتریوم‌ها* در آب پپتونه فورا پس از افزودن نمونه به‌آب پپتونه، از ۱۰^۱۰ cfu/g تجاوز نمی‌کند، یک رقت بالاتر به‌کار برید.

یاد آوری - افزودن شیر تنها برای ترکیباتی که فاقد آن هستند ضروری است و به‌منظور کاهش خواص سمی مالاشیت گرین در برابر *سالمونلا* است.

محیط کشت‌ها، واکنشگرها و معرف‌ها

- **Buffered Peptone Water (BPW)**
- **Rappaport-Vassiliadis- Soya (RVS)**
- **Muller-Kauffmann tetrathionate/novobiocin broth (MKTTn)**
- **Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar**
- **Bismuth sulfite agar(BS)**
- **Brilliant Green agar (BG)**
- **Nutrient agar**
- **Triple sugar/iron agar (TSI)**
- **Urea agar (Christensen)**
- **L-Lysine decarboxylation medium**
- **β-galactosidase**
- **Voges-Proskauer**
- **Mono Valnt or Polyvalent Anti-O-Sera**
- **Catalase , Oxidas Reagen & Kovac,s Reagent**

سـالمونلا ممکـن اسـت بـه‌تعـداد کـم و اغلـب همـراه بـا تعـداد قابـل ملاحظـه‌ای از سـایر میکروارگانیسـم‌هـای خـانواده آنتروباکتریاسـه یـا خـانواده‌هـای دیگـر، موجـود مـی‌باشـد، لـذا، انجـام مرحلـه پـیش غنـی سـازی بـرای جسـتجوی سـالمونلاهـای آسـیب دیـده و تعـداد کـم

ضـــروری اســـت. بـــرای آمـــاده‌ســـازی سوسپانســـیون اولیـــه فـــراورده‌هـــای اســـیدی بایـــد اطمینـــان داشـــته باشـــید کـــه، میـــزان pH در طـــی پـــیش غنـــی ســـازی پـــایین تـــر از ۴/۵ نباشـــد. pH مـــواد غـــذایی اســـیدی، در صـــورت اســـتفاده از پپتـــون بـــافره بـــا غلظـــت دو برابـــر حالـــت پایـــداری بیشـــتری خواهـــد داشـــت. بـــرای پخـــش شـــدن کامـــل فـــرآورده‌هـــای تخمیـــری ماننـــد شـــیر تخمیـــری، ماســـت، کاســـتارد و دســـر، گلولـــه هـــای کوچـــک شیشـــه اســـتریل را بـــه‌ارلـــن مـــایر حاوی آزمونه منتقل کنید و تا پخش شدن کامل آن را تکان دهید .

روش آزمون

↓

آماده سازی، تهیه آزمونه و سوسپانسیون اولیه و رقت

↓

پیش غنی سازی غیر انتخـــابی

(Buffered peptone water) محیط ۲۲۵mL + نمونه ۲۵ mL

شکل ۳۹- آماده سازی، تهیه آزمونه

گرمخـــانه گـــذاری

۳۷ °C ± ۱ °C / ۱۸h± ۲ h

↓

غنی سازی انتخابی

↓

تلقیح

۱ mL از سوسپانسیون پیش غنی کننده

به

MKTT n broth محیط ۱۰ mL

تلقیح

۰/۱ mL از سوسپانسیون پیش غنی کننده

به

RVS broth محیط ۱۰ mL

شکل ۴۰- محیط کشت MKTT n[2]broth

شکل ۴۱- محیط کشت RVS[1]

گرمخانه گذاری
۳۷ °C ± ۱ °C / ۲۴h± ۳ h

گرمخانه گذاری
۴۱/۵ °C ± ۱ °C / ۲۴h± ۳ h

✓ هرگز محلول‌ها را با پیپت از راه دهان نکشید .

کشت روی محیط جامد انتخابی

پس از گرمخانه‌گذاری به‌مدت زمان ۲۴h± ۳h، یک حلقه از کشت به‌دست آمده از RVS مایع را بر روی سطح محیط کشت‌های جامد از پیش ریخته انتخابی (XLD agar) که سطح آنها خشک شده است به گونه‌ای کشت دهید که کلنی‌های مجزا در سطح آگار تشکیل شود. همچنین یک حلقه از کشت به‌دست آمده از RVS مایع را بر روی سطح یکی از محیط کشت‌های جامد از پیش ریخته انتخابی (انتخاب به‌عهده آزمایشگاه است) که سطح آنها خشک شده است به‌گونه‌ای کشت دهید که کلنی‌های مجزا در سطح آگار تشکیل شود.

محیط جامد انتخابی از پیش ریخته

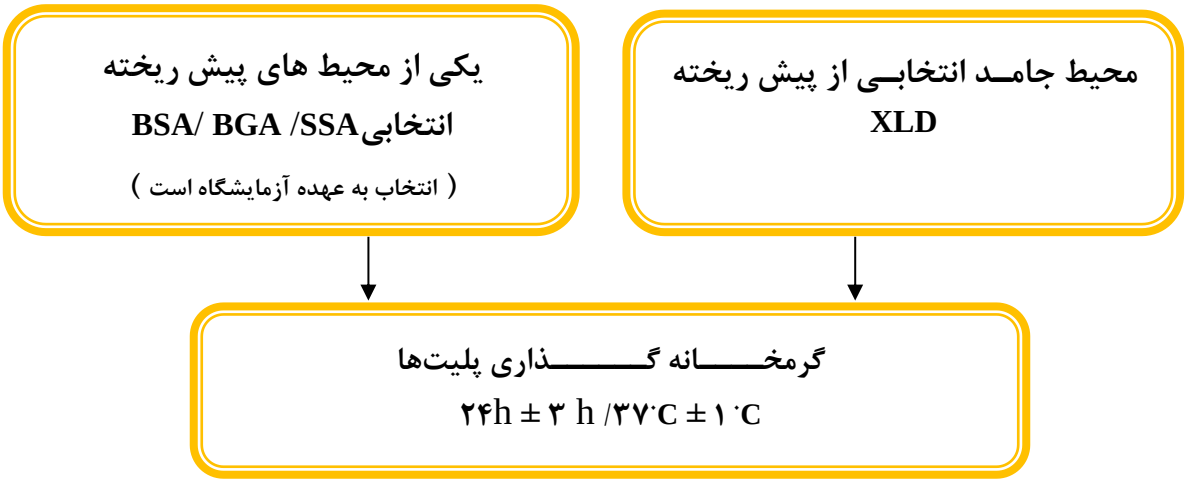
XLD[6]

یکی از محیط های پیش ریخته
انتخابی[5] SSA/ BGA[4] BSA[3]
(انتخاب به عهده آزمایشگاه است)

گرمخانه گذاری پلیت‌ها
۲۴h ± ۳h /۳۷°C ± ۱ °C

۱- Rappaport-Vassiliadis modified magnesium chloride/malachite green medium
۲- MKTTn (M uler-Kauffman Tetrathionate Novobiocin)
۳- Bismuth Sulfite Agar
۴- Brilliant Green Agar

پس از گرمخانه‌گذاری به‌مدت زمان ۲۴h± ۳h، یک حلقه از کشت به‌دست آمده از MKTTn مایع را بر روی سطح محیط کشت‌های جامد از پیش ریخته انتخابی (XLD agar) که سطح آنها خشک شده است به گونه‌ای کشت دهید که کلنی‌های مجزا در سطح آگار تشکیل شود. همچنین یک حلقه از کشت به‌دست آمده از MKTTn[1] مایع را بر روی سطح یکی از محیط کشت‌های جامد از پیش ریخته انتخابی (انتخاب به‌عهده آزمایشگاه است) که سطح آنها خشک شده است به گونه‌ای کشت دهید که کلنی‌های مجزا در سطح آگار تشکیل شود.



یادآوری - هرگز محلول‌ها را با پیپت از راه دهان نکشید .

شکل ۴۲- محیط کشت BGA

شکل ۴۳- محیط کشت XLD

- **خصوصیات کلنی سالمونلا در محیط** XLD

کلنی‌های با مرکز سیاه و ناحیه شفاف مایل به‌قرمز که به‌وسیله اندیکاتور تغییر رنگ می‌دهد.

- **خصوصیات کلنی سالمونلا در محیط** BGA

کلنی‌های صورتی با هاله قرمز روشن

۱- Xylose Lysine Deoxycholate Agar

- **خصوصیات کلنی سالمونلا در دومین محیط کشت انتخابی**

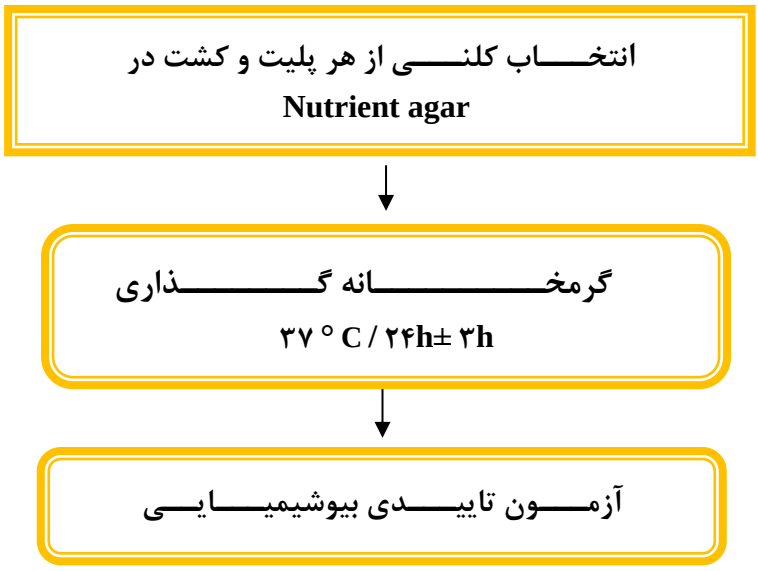
کلنی‌هایی که خصوصیات سالمونلا احتمالی را نشان می‌دهد را بررسی کنید.

یادآوری ۱- گونه‌های H_2S منفی سالمونلا (*سالمونلا پاراتیفی*) بر روی محیط کشت XLD آگار، کلنی‌های صورتی با مرکز صورتی پررنگ ایجاد می‌کنند. سالمونلاهای لاکتوز مثبت برروی محیط کشت XLD آگار کلنی‌های زرد رنگ و بدون مرکز سیاه ایجاد می‌کنند.

یادآوری ۲- کلنی‌های زرد- سبزکه توسط هاله‌ای سبز-زرد احاطه شده است. (باکتری‌های لاکتوز یا ساکارز مثبت مثل *پروتئوس، سیتروباکتر، کلبسیلا*)

یادآوری ۳- کلنی‌های زرد، توسط هاله‌های زرد احاطه شده، شفاف با مرکز سیاه (*پروتئوس*)

برای تایید کلنی‌های مشخص از هر یک از پتری‌های دارای محیط کشت انتخابی کشت داده شده، حداقل یک کلنی مشخص یا مشکوک انتخاب کنید.



-محیط آگار دار سه قندی دارای آهن[1](TSI)

تلقیح باکتری در محیط(TSI) به‌صورت تلقیح نیزه‌ای[2] در عمق و کشت خطی در سطح شیب‌دار گرمخانه‌گذاری در دمای C° ۳۷ به‌مدت زمان h ۱۸

واکنش مثبت :

عمق : -زرد {گلوکز مثبت}

-قرمز {گلوکز منفی}

-سیاه {سولفید هیدرژن مثبت (H_2S)}

-حباب یا ترک {تولید گاز از گلوکز}

۱- Triple sugar/iron agar (TSI)

۲- Stab inoculate

سطح شیبدار: -زرد {لاکتوز یا ساکارز مثبت (استفاده از لاکتوز یا ساکارز)}
-قرمز یا بدون تغییر {لاکتوز و ساکارز منفی (عدم استفاده از لاکتوز یا ساکارز)}

شکل ۴۴- واکنش در محیط (TSI)

-L - لیزین - دکربوکسیلاز[1]:

کشت زیر سطح مایع **L** - لیزین - دکربوکسیلاز و گرمخانه‌گذاری در دمای°C ۱± °C ۳۷ مدت زمان۲۴ h.

واکنش مثبت: {مشاهده کدورت و رنگ ارغوانی}

بیشتر *سالمونلا*ها از نظر این واکنش مثبت هستند.

شکل ۴۵ - واکنش لیزین - دکربوکسیلاز

-اوره آگار (کریستنسن)[2]

کشت خطی روی سطح شیب‌دار آگار وگرمخانه‌گذاری در دمای°C ۱± °C ۳۷ به‌مدت زمان ۳h ±۲۴h.

واکنش مثبت: {تغییر رنگ معرف از قرمز فنل به‌صورتی قرمز و در نهایت قرمز روشن حاصل از تجزیه اوره}

بیشتر سالمونلاها از نظر این واکنش منفی هستند.

۱- L-Lystine decarboxylation medium

۲- Urea agar (Christensen)

شکل ۴۶- واکنش اوره آگار (کریستنسن)

-واکنش بتا- گالاکتوزیداز[1](ONPG)

تلقیح یک حلقه کامل در لوله حاوی ۰/۲ mL محلول سرم فیزیولوژی و یک قطره تولوئن و گرمخانه‌گذاری در دمای۱± ۳۷ C° سپس افزودن ۲۵mL /۰معرف شناسایی بتا–گالاکتوزیداز و گرمخانه‌گذاری در دمای۱± ۳۷ C° به‌مدت زمان ۳h ±۲۴h .

واکنش مثبت: {مشاهده رنگ زرد بعد از ۲۰ min }

بیشتر سالمونلاها از نظر این واکنش منفی هستند.

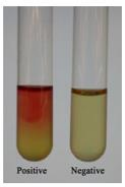
شکل ۴۷- واکنش بتا - گالاکتوزیداز

-واکنش وژس پرسکوئر[2]

یک حلقه کامل از کلنی مشکوک را به‌لوله حاوی ۳mL محلول vp، تلقیح کرده و در دمای ۱± ۳۷ C° به مدت زمان ۳h±۲۴h گرمخانه‌گذاری کنید. سپس دو قطره محلول کراتین و سه قطره محلول اتانوئیک ۱- نفتول و دو قطره محلول پتاسیم هیدروکسید را بیافزایید.

واکنش مثبت {مشاهده رنگ صورتی روشن بعد از ۱۵ min }

بیشتر سالمونلاها از نظر این واکنش منفی هستند.



شکل ۴۸- واکنش وژس پرسکوئر

-واکنش اندول[3]

۱-β-galactosidase

۲-Voges-Proskauer (VP)

۳- Eundol

یک حلقه کامل از کلنی مشکوک تلقیح در لوله حاوی ۰/۲mL محلول تریپتون – تریپتوفان تلقیح کرده و در دمای ۳۷ ·C ±۱·C به‌مدت زمان ۲۴h ±۳h گرمخانه‌گذاری کنید سپس ۱mL از معرف کواکس به‌آن بیافزایید.

واکنش مثبت: {مشاهده حلقه قرمز رنگ آلبالویی}

بیشتر سالمونلاها از نظر این واکنش منفی هستند.

شکل ۴۹- واکنش اندول

جدول۱۶- واکنش‌های بیوشیمیایی سالمونلا

واکنش‌های بیوشیمیایی										
TSI			H_2S	Citrate	LAI	Eundol	Urea	MIO (Motility,Ornithine)	VP	ONPG
S	L	G	+	P	P	N	N	P	N	N
-	–	+								

آزمون تایید (سرولوژیکی و سروتایپی)سالمونلا

تشخیص وجود آنتی‌ژن های -O، VI - H سالمونلا، با مشاهده آگلوتیناسیون[1] بر روی لام هنگامی که از کلنی‌های خالص و آنتی‌سرم‌های مناسب استفاده شود. این آزمون پس از حذف سویه‌های خود آگلوتینه شونده صورت، می‌گیرد. در واکنش آگلوتینه شدن آنتی ژن‌ها (میکروارگانیسم‌ها) و بعضی از کلاس‌های آنتی بادی ایجاد شده علیه آنها به‌هم می‌چسبند. به‌این آنتی بادی‌ها «آگلوتینین» و به‌این خاصیت «آگلوتیناسیون» گفته می‌شود.

آنتی سرم‌ها

چندین نوع آنتی سرم (شامل آنتی‌بادی برای یک یا چند آنتی ژن O[2])، که هنگام آزمون مثبت، انعقاد ایجاد می‌کنند و به‌صورت تجارتی در دسترس می‌باشد برای مثال: آنتی‌سرم حاوی یک یا چند تپ از گروه "O" (آنتی‌سرم یک ظرفیتی یا چند ظرفیتی O) هم چنین آنتی‌سرم Vi و آنتی سرم (شامل آنتی‌بادی برای یک یا چندین فاکتورH[3])، (آنتی‌سرم یک ظرفیتی یا چند ظرفیتیH)

حذف سویه های خود آگلوتینه شونده:

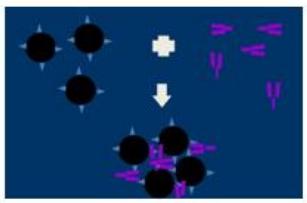
۱- Agglutination

۲- Mono Valnt or Polyvalent Anti –O- Sera

۳- Mono Valnt or Polyvalent Anti –H- Sera

یک قطره از محلول سرم فیزیولوژی بر روی لام تمیز قرار دهید و کلنی مورد آزمون را در این قطره حل کنید تا سوسپانسیون یکنواخت شود.

شکل ۵۰-واکنش منفی واکنش مثبت



شکل ۵۱- کمپلکس آنتی ژن- آنتی‌بادی

مشاهـــده باکتری به‌صورت توده‌های کم و بیش مجزا آگلوتینه شونده:

نشان دهنده سویه خود آگلوتینه شونده است و شناسایی آنتی ژن مقدور نیست. نباید در ادامه آزمون مورد استفاده قرار گیرد.

عـدم مشاهـــده باکتری به‌صورت توده‌های کم و بیش مجزا غیر خود آگلوتینه شونده:

نشان دهنده سویه غیر خود آگلوتینه شونده است و شناسایی آنتی ژن مقدور است. باید در ادامه آزمون تاییدی سرولوژیکی مورد استفاده قرار گیرد و شناسایی انجام گیرد.

در صورت عـدم مشاهـده باکتری به‌صورت توده‌های کم و بیش مجزا غیر خود آگلوتینه شونده آزمون تاییدی سرولوژیکی ردیابی و شناسایی انجام می‌گیرد.

ادامه آزمون تاییدی سرو لوژیکی

سویه غیـــر خود آگلوتینـــه شونـــده

آزمـــون آنتـی ژن O

تهیـــه سوسپانســـیون کلنـــی خـالص بـا یـک قطـره آنتـی-سرم **O**

واکـــنش ســـرواوژیکی: مثبت

تفسیر : آگلوتینه شدن

آزمـــون آنتـی ژن VI

تهیـــه سوسپانســـیون کلنـــی خـالص بـا یـک قطـره آنتـی-سرم VI

واکـــنش ســـرولوژیکی: مثبـــت **تفســـیر**: آگلوتینـــه شدن

آزمـــون آنتـی ژن H

کشـت از کلنـی خـالص غیـر خـود آگلوتینـه شـونده در لولـه محتـوی نوتریـنـت آگـار نیمـه جامـد و گرمخانـه گـذاری در دمـای **۳۷°C** به مدت زمان ۲۴ ساعت

استفاده از آنتی سرم‌هـای یک ظرفیتی و چند ظرفیتی یکی پس از دیگری

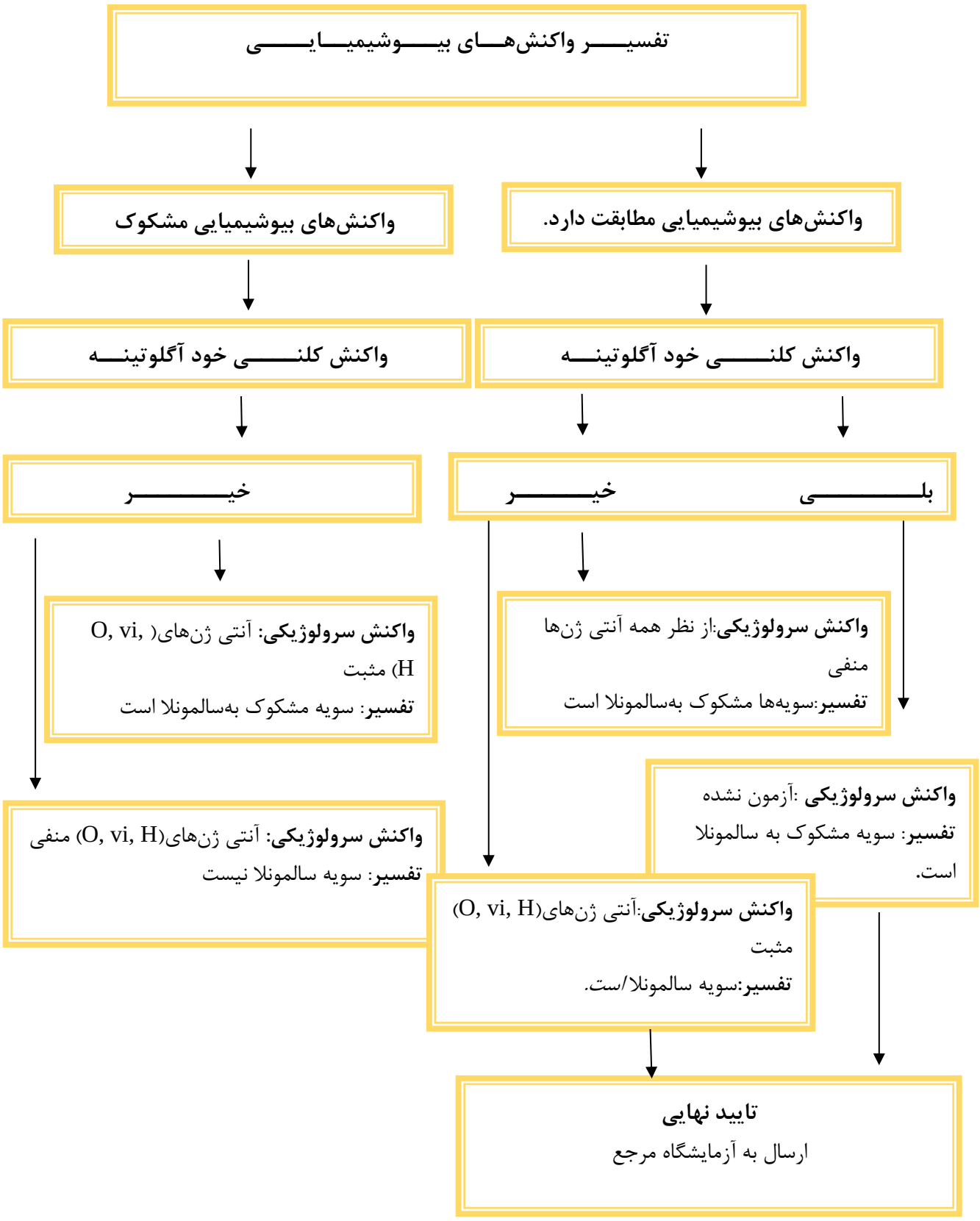
ادامه آزمـــون آنتـی ژن H

تهیـه سوسپانسـیون از کلنـی‌هـای لولـه نوتریـنـت آگـار نیمـه جامـد بـا یـک قطره آنتی ژن H

واکنش ســـرولوژیکی: مثبت

تفسیر : آگلوتینه شدن

تفسیـــــــر واکنش‌های بیـــــــوشیمیـــــایی و ســـــرو لـــوژیـــــکـی



۷-۷ *استافیلوکوکوس‌های* کواگولاز مثبت

۷-۷-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳-۶۸۰۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-روش جامع برای شمارش *استافیلوکوکوس‌های* کواگولاز مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و سایر گونه‌ها) قسمت سوم- برای تعداد کم میکروارگانیسم (MPN)جستجو،شناسایی و شمارش به‌شیوه محتمل‌ترین تعداد

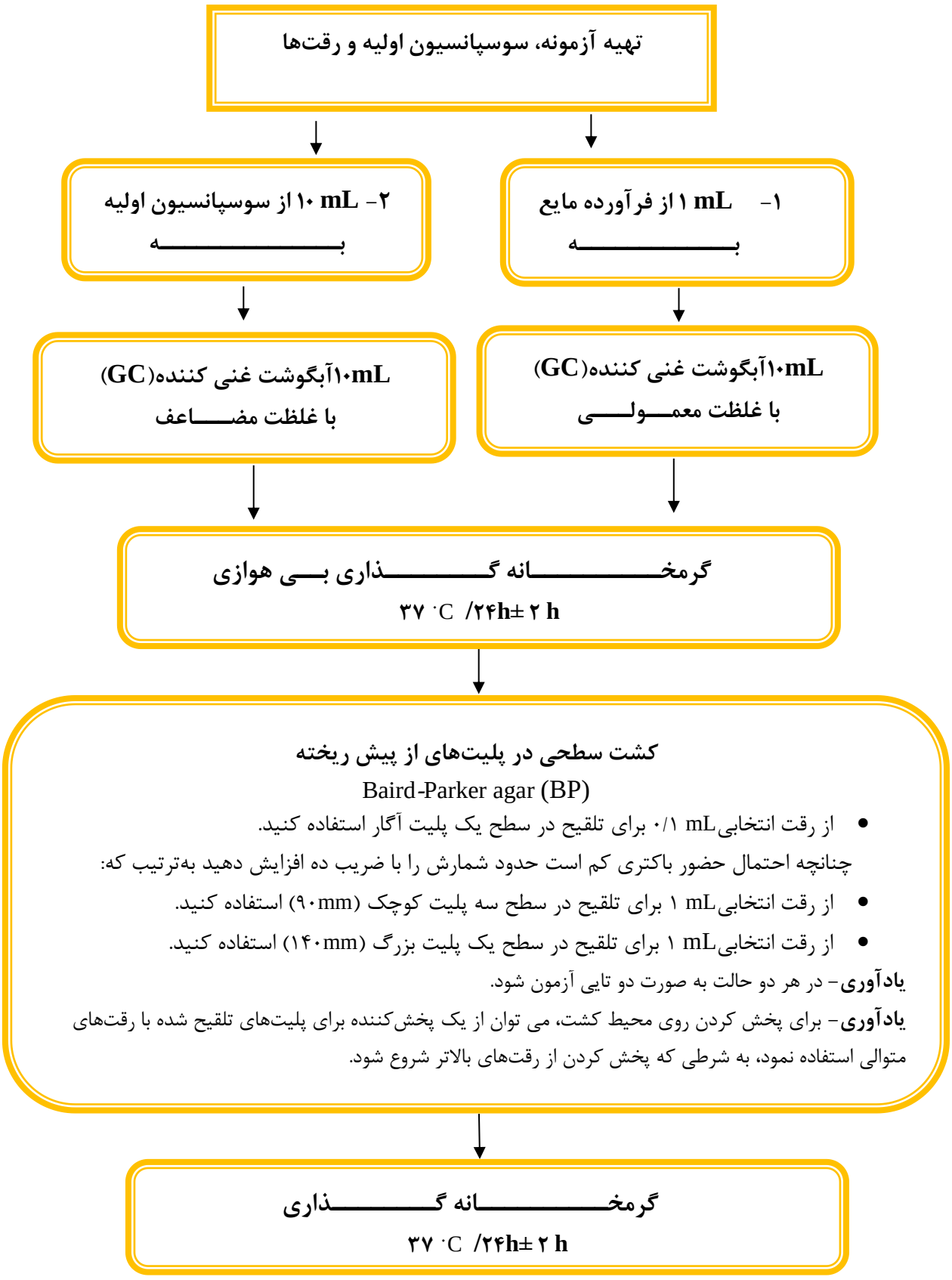
استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت، باکتری کروی گرم مثبت، بدون اسپور، غیرمتحرک، هوازی اختیاری و گاهی اوقات دارای کپسول بوده با کلنی‌های صاف که معمولاًرنگدانهٔ زرد دارند شبیه به‌خوشه‌های انگور تجمع می‌کنند. ویژگی‌های اصلی *استافیلوکوکوس اورئوس* برای شناسائی، رشد روی محیط انتخابی خاص، کاتالاز مثبت و کواگولاز مثبت می‌باشد. *استافیلوکوکوس اورئوس* یک باکتری فرصت طلب و بیماری-زا برای انسان است که روی پوست افراد سالم بدون ایجاد بیماری می‌تواند وجود داشته باشد. وجود استافیلوکوکوس در محصول معمولاً نشاندهنده آلودگی به‌وسیله پوست، دهان یا بینی افرادی است که با محصول سروکار دارند ممکن است مستقیما در خط تولید به‌وسیله کارگرانی که دارای زخم‌های استافیلوکوکوس در روی دست و بازوها هستند و یا در نتیجه سرفه و عطسه که معمولاً در عفونت‌های دستگاه تنفسی ایجاد می‌گردد، وارد محصول شود.

محیط کشت‌ها

- **Modified Giolitti and Cantoni broth**
- **Tryptic Soy Agar (TSA)**
- **Baird-Parker agar (BP)**
- **Brain – heart infusion broth**
- **Rabbit Plasma Fibrinogen agar**

- **جستجوی *استافیلوکوکوس‌های* کوآگولاز مثبت**

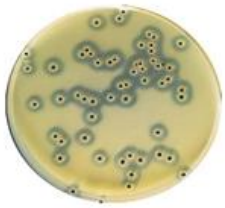
روش انجام آزمون (جستجو)



در صورت لزوم گرمخانه‌گذاری را تا ۲۴ h ±۲h دیگر در دمای ۳۷ °C ادامه دهید.

- **خصوصیات کلنی *استافیلوکوکوس* اورئوس کواگولاز مثبت**

کلنی‌های سیاه یا خاکستری براق، محدب احاطه شده با هاله شفاف



شکل ۵۲- کلنی *استافیلوکوکوس اورئوس* کواگولاز مثبت

آزمون تاییـــدی

↓

آزمون کواگولاز

↓

انتقـــال

۰/۱ mL از سوسپانسیون Brain-heart infusion broth

به ۰/۳ mL پلاسمای خرگوش (EDTA یا سیتراته)

↓

گرمخـــــــانه گـــــــذاری

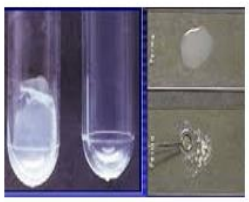
۳۷ °C / ۴h تا ۶ h

↓

تشکیل لخته و انعقاد پلاسما

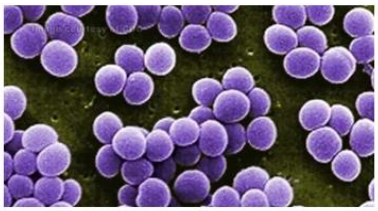
↓

کواگولاز: مثبت



شکل ۵۳- آزمون کواگولاز

- **مشاهده میکروسکوپی *استافیلوکوکوس اورئوس* کواگولاز مثبت**



شکل ۵۴- *استافیلوکوکوس اورئوس*

تفسیر نتایج

نتایج آزمون را بر اساس وجود *استافیلوکوکوس* کواکولاز مثبت، مطابق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹ بر حسب گرم یا میلی لیتر در فرآورده به‌صورت "منفی " یا " مثبت" گزارش کنید.

شمارش *استافیلوکوک*های کوآگولاز مثبت

روش انجام آزمون شمارش

↓

MPN
(Most probable number method)

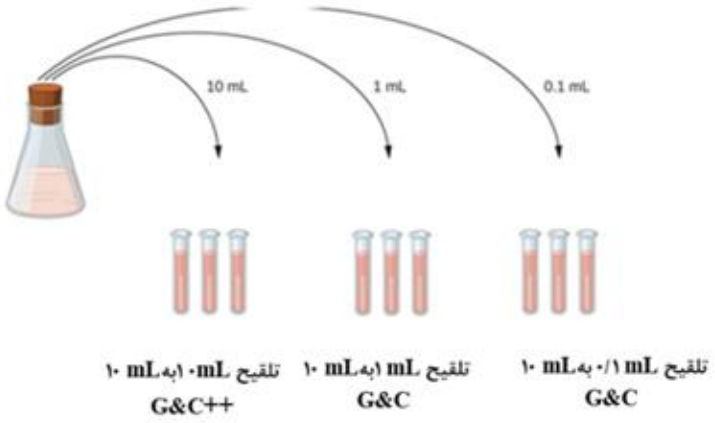
روش MPN وقتی مناسب است، که تعداد مورد انتظار باکتری بین ۱۰ cfu/mL تا ۱۰۰ cfu/ mL یا ۱۰ cfu/g تا ۱۰۰cfu/ gاز نمونه باشد.

تهیه آزمونه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها

- سه لوله آزمایش بزرگ دارای ۱۰mL محیط کشت غنی کننده با غلظت دو برا بر را انتخاب کنید به‌هریک به‌وسیله پی پت سترون ۱۰ mL از نمونه مورد آزمایش چنانچه مایع باشد و یا ۱۰ mL از سوسپانسیون اولیه را در مورد سایر فرآورده‌ها اضافه کنید. این آزمونه برابر با ۱gنمونه در هر لوله می‌باشد.

- سه لوله آزمایش دیگر دارای۱۰ mL محیط کشت غنی کننده با غلظت معمولی را انتخاب کنید. به‌هریک به‌وسیله پی پت سترون ۱ mL از نمونه مورد آزمایش چنانچه مایع باشد و یا ۱ mL از سوسپانسیون اولیه را در مورد سایر فرآورده‌ها اضافه کنید. این آزمونه برابر با ۰/۱ g نمونه درهر لوله می‌باشد.
- سه لوله آزمایش دیگر دارای۱۰ mL محیط کشت غنی کننده با غلظت معمولی را انتخاب کنید به‌هریک به‌وسیله پی پت سترون ۱ mL از رقت‌های بعدی بدست آمده مانند: ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ را اضافه کنید.

✓ برای تهیه رقت‌های دهدهی، هر بار از یک پی‌پت سترون جدید استفاده کنید.
✓ به‌کمک مخلوط کن مناسب ماده کشت داده شده را با محیط به‌خوبی مخلوط کنید.



شکل۵۵- تلقیح از سوسپانسیون اولیه به
Modified Giolitti and Cantoni broth

گرمخـــــــــانه گـــــــــذاری بـــی‌هـــوازی لولـــــــــــه‌ها
۳۷ ° C/۲۴h ± ۲h

از لوله‌های دارای رسوب سیاه یا به‌طور کلی هر گونه سیاهی در لوله‌های کشت، روی محیط کشت انتخابی کشت سطحی دهید.

کشت سطحی در پلیت‌های از پیش ریخته
Baird-Parker agar (BP)

- از رقت انتخابی mL ۰/۱ برای تلقیح در سطح یک پلیت آگار استفاده کنید.

چنانچه احتمال حضور باکتری کم است حدود شمارش را با ضریب ده افزایش دهید به‌ترتیب که:

- از رقت انتخابی mL ۱ برای تلقیح در سطح سه پلیت کوچک (۹۰mm) استفاده کنید.
- از رقت انتخابی mL ۱ برای تلقیح در سطح یک پلیت بزرگ (۱۴۰mm) استفاده کنید.

یادآوری- در هر دو حالت به‌صورت دو تایی آزمون شود.

یادآوری- 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.

آزمون‌ها به‌صورت (به صورت دو پلیتی) انجام می‌گیرد.

گرمخـــــــــانه گـــــــــــذاری بـــی‌هـــوازی پلیت‌ها
۳۷ ° C/۲۴h ± ۲h

↓

آزمون تاییـــدی

↓

آزمون کواگولاز

- **خصوصیات کلنی *استافیلوکوکوس اورئوس* کواگولاز مثبت در محیط انتخابی بردپارکر آگار :**
  کلنی‌های سیاه یا خاکستری براق، محدب احاطه شده با هاله شفاف

انتقال یک کلنی به‌محیط
Brain-heart infusion broth

↓

گرمخـــــــــانه گـــــــــــذاری هـــوازی
۳۷ ° C / ۲۴h ± ۲h

↓

انتقال ۰/۱ mL از سوسپانسیون **Brain-heart infusion broth**
به ۰/۳ mL پلاسمـــای خرگـوش (EDTA یا سیتراته)

↓

گرمخـــــــــانه گـــــــــــذاری هـــوازی
۳۷ ·C / ۴h تا ۶ h

↓

تشکیل لخته و انعقاد پلاسما

↓

کواگولاز: مثبت

- **تفسیر نتایج:**

با توجه به‌معیار تشخیص نتایج مثبت، تعداد نتایج مثبت به‌دست آمده از لوله‌ها را شمارش و ثبت کنید.

- **تعیین مقادیر MPN:**

مقادیر MPN/*استافیلوکوکوس ارئوس*، مطابق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - الزامات کلی و راهنما برای آزمون‌های میکروبیولوژی تعیین می‌شود.

۷-۸ قارچ‌ها[۱]

قارچ‌ها یوکاریوت، هتروتروف، غیرفتوسنتتیک 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 را دارند pH مناسب برای بیشتر گونه‌ها ۵/۶ و محدوده pH برای آنها بین ۲ تا ۹ است. قارچ‌ها به کپک‌ها، مخمرها تقسیم می‌شوند.

۷-۸-۱ کپک‌ها[۲]

کپک‌ها، قارچ‌های رشته‌ای، هوازی هستند آنها غیر فتو سنتتیک، چند سلولی، هتروتروف، هوازی، هستند. کپک‌ها تولید واحدهای میکروسکوپی بنام تال [۳] می‌کنند که با تجمع آنها، جرم رشته‌ای تشکیل می‌گردد که به‌آن میسیلیوم گفته می‌شود. معمولا به‌صورت کلنی[۴]، پروپاگول[۵] یا جوانه[۶] 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. 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.

۱- Fungi

۲- Mold

۳- Hypha(Tall)

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

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

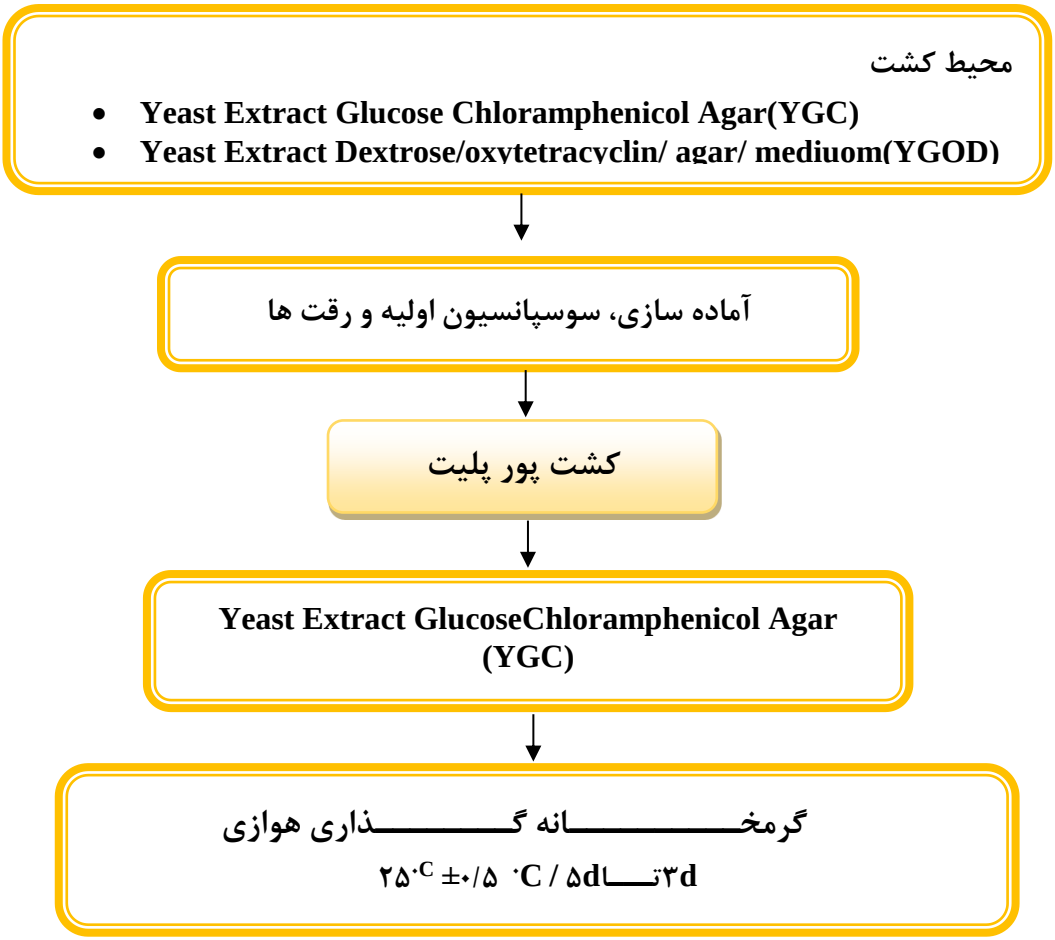
۶- Germ

۷-۸-۲ مخمرها [۱]

مخمرها یکی از گروه‌های قارچ‌های فاقد ر شته هستند به‌همین دلیل تک سلولی می‌با شند و به‌و سیله جوانه زدن تکثیر پیدا می‌کنند کلنی‌های مخمرها خامه‌ای با قوام بسیار نرم است غالباً تک یاخته هستند و ایجاد میسلیوم‌های کاذب می‌کنند. تولید مثل غیرجنسی آن‌ها به صورت جوانه زدن و در برخی به صورت تقسیم دوتایی می‌باشد. بیشتر گونه‌های آن تخمیرکننده و غیر بیماری‌زا هستند.

۷-۸-۳ شمارش کپک و مخمر

۷-۸-۳-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۰۱۵۴، شیر و فرآورده‌های آن-شمارش واحدهای تشکیل دهنده کلنی کپک و یا مخمر-شمارش کلنی در پلیت در دمای C° ۲۵



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

۱- Yeast

- **خصوصیات کلنی مخمر**

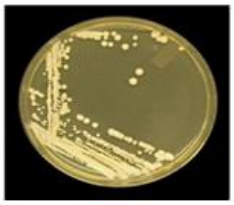
گرد مات یا درخشان، معمولا دارای پیرامون منظم و با تحدب کم یا زیاد

شمارش کلنی‌ها

تعداد کلنی در همه پلیت‌های دارای بیش از ۳۰ کلنی و کمتر از ۳۰۰ کلنی، شمارش شود.

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

شکل۵۶- کلنی‌های کپک‌ها



شکل۵۷- کلنی‌های مخمرها

۷-۹ مخمرهای اسموفیلیک

۷-۹-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۱۹۶، میکرو بیولوژی موادغذایی و خوراک دام - مخمرهای اسموفیلیک - روش شمارش

مخمرهای اسموفیلیک میکروارگانیسم‌های هستند که قادر به‌رشد در غلظت‌های زیاد قند (با درجه بریکس[۱] ۶۷ تا ۷۰) می‌باشند. بیشترین مخمرهای اسموفیلیک به‌گونه‌های زیگو ساکارومیسس تعلق دارد و اغلب به‌عنوان عامل فساد عسل، آبنبات‌های شکلاتی با مغز نرم، مرباها، ملاس، شربت ذرت، آب میوه تغلیظ شده و فرآورده‌های مشابه می‌باشد. این میکروارگانیسم-ها در محیط انتخابی، پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۰/۵ ± ۲۵°C به‌مدت ۵ d تا ۷ d در شرایط هوازی سلول‌های مخمری دارای جوانه به‌رنگ کرم و مات به‌اشکال نامنظم و دارای ابعاد مختلف تولید کنند. برای شناسایی دقیق مخمرها خصوصیات مورفولوژی[۲]، میکرومورفولوژی[۳]، قابلیت تولید آنزیم اوره، قابلیت رشد در محدوده دمایی ۴۰ °C تا ۵۰ °C، قابلیت رشد در pHهای مختلف، قابلیت

---

۱ -درجه بریکس (Brix) نشان دهنده درصد وزن مواد جامد موجود در یک محلول به وزن کل محلول می‌باشد، یا به عبارت دیگر، درصد وزنی مواد جامد موجود در محلول .پس هرچه درجه بریکس محلولی بیشتر باشد، غلظت مواد جامد در آن محلول، برای مثال ملاس، بیشتر و مقدار آب محلول کمتر است .

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

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

تولید ترکیبات آمیلوئید خارج سلولی، 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[1] مورد بررسی قرار می‌گیرد.

محیط کشت

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

Osmophilic Agar (MY۴۰G)

تهیه محیط کشت:

- **Osmophilic Agar (MY۴۰Gs)**

مقدار g ۱۲پودر عصاره مالت، g ۳ عصاره مخمر و g ۱۲ آگار را در mL ۵۵۰ آب مقطر حل کنید سپس با آب مقطر به حجم برسانید در حالی‌که هنوز گرم است، g ۴۰۰ گلوکز را یکباره به‌آن افزوده و تکان دهید تا از تشکیل لخته ممانعت شود محیط را به‌مدت min ۳۰در حمام بخار با دمای $^{\circ}C$ ۱۰۰ قرار دهید. این محیط به دلیل پایین بودن a_w نیاز به اتو 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 ۱۵در پتری دیش توزیع کنید. این محیط کشت به مدت ۲ هفته در دمای $^{\circ}C$ ۳ ± $^{\circ}C$ ۵ قابل نگه داری است.

- **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 حالی‌که هنوز گرم است، g ۲۰ گلوکز g ۶۰۰ ساکاروز را به آن بیافزایید تا کاملاً حل شود سپس حجم مخلوط را با آب مقطر به‌حجم L۱ برسانید. a_w این محیط کشت پس از سترون شدن، برابر ۰/۹۲ .

برای شمارش مخمرهای اسموفیلیک رقیق کننده‌هایی با فعالیت آبی کم مورد نیاز است در صورت استفاده از رقیق کننده هیپوتونیک[2]، مخمرهای اسموفیلیک از بین خواهند رفت. برای کاهش 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 .

۱- Cycloheximide

۲- Hypotonic

تهیه محلول رقیق کننده فسفات بافری:

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

روش انجام آزمون

↓

آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها

↓

کشت پور پلیت

↓

Potato Dextrose agar ۲٪ Glucose ۶٪ Sucrose (PDA-G-S)

Osmophilic Agar (MY۴۰G)

یـا

↓

گرمخـــــــــــانه‌گـــــــــــذاری هـــوازی

(۳۰± ۰/۵) °C/ (۵ تا ۷)d

به‌منظور افزایش رطوبت داخل انکوباتور، یک بشر آب مقطر داخل آن قرار دهید.

گرمخانه‌گذاری بیشتر از ۵ d بستگی به‌دما و میزان رشد دارد.

شمارش کلنی‌ها

تعداد CFU مخمرها 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 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 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:

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

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

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

که در این فرمول ها،

m میانگین حسابی به‌دست آمده از دو پلیت ،

V حجم ماده تلقیحی به‌هر پلیت، به میلی لیتر ،

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

c تعداد کلنی‌های شمارش شده روی یک پلیت ،

$\bar{x}_c$ میانگین ارزیابی شدهٔ شمارش کلنی‌ها ، از دو رقت متوالی می‌باشد و با استفاده از فرمول (۴) محاسبه می شود :

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

که در آن :

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

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

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

نتیجه را تا دو رقم معنی‌دار گرد کنید.

۸-۲ جستجو

اگر در شناسایی کلنی‌ها، وجود باکتری‌ها تایید شد، نتیجه را به صورت زیر بیان کنید:

وجود باکتری در نمونه S (مثبت).

چنانچه از روش‌های غنی‌سازی استفاده شود و پس از غنی‌سازی رشدی مشاهده نشد و یا چنانچه شناسایی کلنی‌ها وجود این گونه را تایید نکند، نتیجه را به صورت زیر بیان کنید:

عدم وجود باکتری در نمونه S (منفی).

۸-۳ تعیین مقادیر MPN

۸-۳-۱ اساس روش

سه روش اصلی برای تعیین مقادیر MPN وجود دارد:

۸-۳-۱-۱ فرمول ریاضی

برای تخمین میکروارگانیسم‌ها در ۱۰۰ mL نمونه و یا به عبارت دیگر برای تعیین بیشترین تعداد احتمالی MPN در ۱۰۰ mL، می توان از فرمول زیر استفاده کرد:

$$MPN/۱۰۰ml = \frac{npos \times Vs}{\sqrt{Vneg} \times Vtot}$$

npos تعداد لوله‌های دارای واکنش مثبت

Vs حجم نمونه مرجع در نمونه اصلی به‌میلی لیتر (معمولادر ۱۰۰mL)

Vneg حجم کل در تمام لوله‌های دارای واکنش منفی به mL

Vtot حجم کل نمونه در تمام لوله‌ها به mL

۸-۳-۱-۲ جدول MPN

برای تخمین میکروارگانیسم‌ها در نمونه g/mL و یا به عبارت دیگر برای تعیین بیشترین تعداد احتمالی میکروارگانیسم‌ها در نمونه(g /mL) از جداول MPN استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹، استفاده کنید.

۸-۳-۲-۳ برنامه کامپیوتری

در روش MPN که در آن محیط کشت با غلظت مضاعف یا چند برابر یا محیط کشت حل شده در نمونه استفاده می‌شود ممکن است مقدار مواد ممانعت کننده بیشتر باشد. صافی غشایی که میکروارگانیسم‌ها را از نمونه جدا می‌کند ممکن است به‌دلیل این که مواد ممانعت کننده روی صافی باقی نمی‌ماند این مشکل را نداشته باشد. همچنین اجزای بیولوژیکی مانند فلور میکروبی همراه ممکن است از طریق رقابت بیولوژیکی با رشد میکروارگانیسم‌های مورد جستجو تداخل داشته باشد این اثر به‌ویژه در محیط کشت مایع اتفاق می‌افتد در سایر روش‌های آزمون که میکرو

ارگانیسم کلنی‌های جداگانه ایجاد می‌کند این رقابت بیولوژیکی به‌علت عدم گسترش و یا رشد زیاد کلنی‌ها روی پلیت، محدود می‌شود.

توزیع تصادفی میکروارگانیسم در نمونه باعث عدم دقت در نتایج می‌شود این مشکل را می‌توان با کار برد روش تلقیح مناسب کاهش داد .
در روش MPN دقت، با افزایش تعداد لوله‌های تلقیح شده چند تایی در هر سری حجم آزمایه افزایش می‌یابد.
دقت نسبی به‌الگوی نتایج مثبت بدست آمده بستگی دارد.
در روش شمارش کلنی، دقت به‌تعداد کل کلنی‌ها بستگی دارد و نتیجه با افزایش تعداد پلیت‌ها ی کشت داده شده، افزایش می یابد و دقت همچنین با افزایش تعداد کلنی‌ها تا حداکثر حدود ۱۵۰ کلنی (تیپیک) در هر پلیت برای روش شمارش و حدود ۱۰۰ کلنی (تیپیک) در هر پلیت برای روش صافی غشایی افزایش می‌یابد.

پیوست الف

استانداردهای مرتبط با (GMP) فرآورده‌های لبنی

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

این استاندارد به‌حصول اطمینان از یکسان بودن روش‌های کلی برای انجام آزمون‌های میکروبیولوژی در آزمایشگاه‌هایی که استانداردها را پذیرفته اند کمک می‌کند. کاربرد این استاندارد، دستیابی به نتایج 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 فوق باعث آلودگی محیط نشوند.

به‌منظور دستیابی به‌موارد فوق باید تا حد امکان به‌بهداشت فردی توجه شود و روش‌هایی که از آلودگی‌های خارجی پیشگیری می‌کند به کار رود.

در این استاندارد برای اقدامات احتیاطی در طول آزمون، مثال‌های کمّی ارائه می‌شود. بنابراین داشتن اطلاعات کلی در زمینه روش های میکروبیولوژی و میکروارگانیسم‌ها ضروری است. همچنین انجام آزمون‌ها و شمارش میکروارگانیسم‌ها به‌طریقی صحیح حائز اهمیت است.

با توجه به‌دستکاری نمونه‌ها هنگام آزمون ممکن است به‌طور ناخواسته سبب آلودگی متقاطع شود، آزمون کننده باید صحت نتایج روش‌های خود را تصدیق کند. انجام اقدامات احتیاطی خاص نه تنها به دلائل بهداشتی بلکه برای حصول اطمینان از تجدیدی پذیری خوب نتایج ضروری است. تعیین اقدامات احتیاطی در همه شرایط امکان پذیر نیست، ولی این استاندارد حداقل اقدامات اصلی را که باید هنگام آماده‌سازی، سترون سازی و انبارش محیط‌های کشت و تجهیزات در نظر گرفته شود، تعیین می کند.

الف ۲ - استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴۶۲۹آئین‌کار بهداشتی کارخانجات شیر و فرآورده‌های آن و استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۵۴۰ آیین کار شستشو و ضدعفونی دستگاههای پنیرسازی و پنیر بعمل‌آمده و بسته‌بندی آن

این استانداردها راهنمایی است که با در نظر گرفتن نیازهای خاص صنعت لبنی تهیه شده و رهنمودهای مربوط به‌راهکارهای خوب ساخت (GMP) را برای فرآورده های لبنی ارائه می‌دهند. 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 می‌سازند.

هدف از تدوین این استانداردها تعیین راهنمای تولید، کنترل، نگهداری، و حمل فرآورده‌های لبنی می‌باشد و راهنمای تعیین فعالیت‌هایی است که دستیابی به‌فرآورده ای منطبق با ویژگی‌های خاص را امکان پذیر می‌سازد.

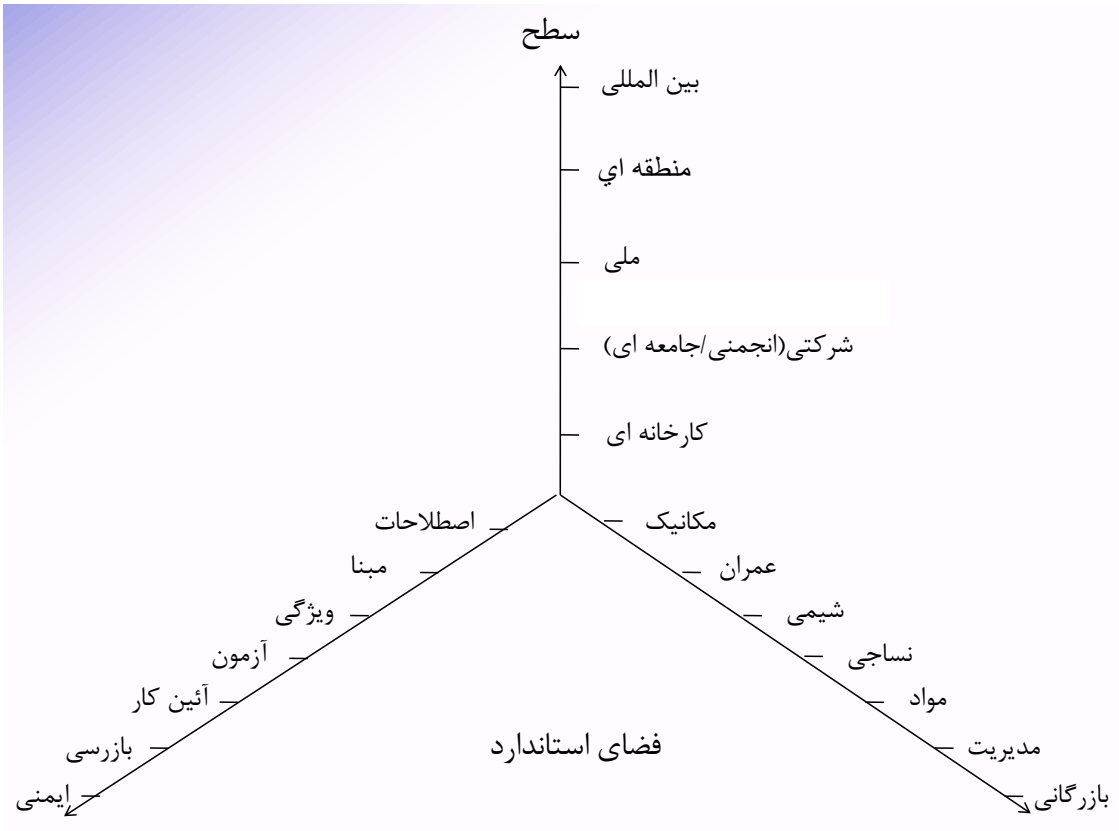
الف ۳ - استانداردهای مرتبط با فرآورده‌های لبنی

- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۳، شیر پاستوریزه–ویژگی‌ها وروش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۶۴، ویژگی‌های شیر خام
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۶۹۵، ماست–ویزگی وروش های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۵۲۷، شیرطعم دار-ویژگی ها وروش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۵۲۸، شیر وفرآورده های آن–شیر فرادما تجاری(UHT)-ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۴۵۰، بستنی–ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۴۵۲،کشک مایع- ویژگی‌ها
- استاندارد ملی ایران شماره ۴۰۴۶، شیر و فرآورده‌های آن –انواع ماست طعم‌دار-ویژگی‌ها و روش-های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴۴۹۴، بسته بندی–شیر و فرآورده‌های شیری
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵۸۷۷، شیر و فرآورده‌های آن –پودر پنیر –ویژگی‌ها
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۶۱۲۷ ، کشک مایع صنعتی –ویژگی‌ها
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۶۹۵۹، پنیر و فرآورده های آن –پودر پنیر-ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۷۶۸۶، پودر خامه- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شماره ۹۰۱۱، پنیر پارمسان-ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۰۱۲، پنیر کاچیوتا- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۰۱۳، پنیر گودا- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۰۱۴، پنیر بوتر کیزه- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۰۶۹۶، پنیر پروسس آنالوگ-ویژگی‌ها
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۳۲۴، دوغ پروبیوتیک- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۳۲۵، ماست پروبیوتیک – ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۸۳۲، پنیر چدار- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۳۹، پودرخامه‌ای کننده لبنی و غیر لبنی- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۴۸۱۳، پنیر سامسو- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شماره ۱۹۲۵۷، پودر بستنی – ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۸۳۳، پنیر آدام- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۳۳۲۸، پنیر کولومیرز- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۳۵۲۶، شیر و فرآورده‌های آن- پنیر پیتزای پروسس– ویژگی‌ها و روش‌های آزمون

- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۳۶۹۹، پنیر دانبو- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۳۷۰۲، پنیر بری- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۳۷۰۱، پنیر امنتال- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۴۶۸۱، شیر و فرآورده‌های آن -دسرهای شیری – ویژگی‌ها و روش-های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۹۶۹۷، دسر نوشیدنی بر پایه لبنی – ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۶۸۸۱، شیر و فرآورده‌های آن -نوشیدنی شیری میوه‌ای – ویژگی‌ها و روش‌های آزمون

پیوست ب
انواع استاندارد

ب-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.



ب-۲ سطح استاندارد

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

الف- استانداردهای کارخانه‌ای، این گونه استانداردها توسط کارخانجات و به‌منظور استفاده در همان واحد تدوین می شود. در تدوین استاندارد کارخانه‌ای 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 سازمان‌ها یا مراکز دولتی و امثال آن شرکت دارند.

پ- استانداردهای منطقه‌ای (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.

ت- استانداردهای بین‌المللی (ISO)، هدف از تدوین استانداردهای بین المللی حفظ و نگهداری پیشرفت‌های 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 به‌نیاز و موقعیت زمانی کشورها از نظر توسعه فنی و صنعتی می باشد.

ب-۳- جنبه استاندارد

در راستای رشد و تکامل دانش بشری جنبه‌های مختلف استاندارد نیز گسترش یافته و می‌تواند 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 نمونه‌برداری، بسته‌بندی، حمل و نگهداری، راهنما و ...)

ب-۴- اجرای استاندارد

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

الف- استاندارد های اجباری، شامل استانداردهایی می‌باشد 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 می‌شوند.

ب- استاندارد های تشویقی، شامل استانداردهایی است که تولید کننده با توجه به‌توان 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 به‌آدرس زیر و لینک «استانداردهای ملی» در دسترس می‌باشد.

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

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) 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 و طبق آیین نامه ذکر شده می تواند منجر به اعمال تنبیهاتی به ترتیب 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، 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-۲-۱ درجه بندی نواقص موجود در کالاهای تولیدی

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

ت-۲-۱-۱ نقص بحرانی:

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

ت-۲-۱-۲ نقص عمده:

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

ت-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 به پیوست می باشد.

ت-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) 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

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 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.

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 به‌تشکیل 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 به‌عدم 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.

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 به‌تشکیل کمیته علایم برای ابطال پروانه کاربرد علامت استاندارد اجباری اقدام نموده و در صورت ابطال پروانه، موضوع را از طریق روابط عمومی به‌اطلاع عموم 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 ث

نقایص بحرانی ، عمده و جزئی آزمون ها ی میکروبیولوژی فرآورده های لبنی تخمیری طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۴۰۶

ردیف	شرح آزمون	درجه اهمیت
۱	شمـــارش کلـــی میکـــروارگانیســـم‌هـــای هوازی	عمده
۲	کلـــی‌فـــرم‌هـــا	بحرانی
۳	اشریشیا کلی	بحرانی
۴	استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت	بحرانی
۵	اسپورکلستریدیوم‌های احیأکننده سولفیت	بحرانی
۶	سالمونلا	بحرانی
۷	کپک و مخمر	عمده