ریاست جمهوری
سازمان ملی استاندارد ایران

جزوه دوره کارآموزی

میکروبیولوژی فرآورده‌های لبنی

غیر 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 استانداردایران به موجب 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 به عهده دارد.

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

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند درکمیته ملی طرح، بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد(ISO)[۱]،کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)[۲] و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی(OIML)[۳] است و به عنوان تنها رابط[۴] کمیسیون کدکس غذایی(CAC)[۵] در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهایملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست محیطی، 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 آن‌ها نظارت میکند. ترویج دستگاه بین المللی یکاها، واسنجی و سایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

۱- International Organization for Standardization

۲- International Electrotechnical Commission

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

۴-Contact point

۵- Codex Alimentarius Commission

پیشگفتار

یکی از مهمترین وظایف سازمان ملی استاندارد ایران، آموزش های اصولی و مدون در زمینه محصولات (کالا / خدمات) مشمول استاندارد اجباری از طریق برگزاری دوره های آموزشی می باشد. بخشی از این آموزش‌ها شامل کارآموزی مدیران کنترل کیفیت و کارشناسان آزمایشگاه های همکار سازمان می باشد که برگزاری این دوره ها از طریق 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 به‌منظور ارتقاء کیفیت آموزش مخاطبین مورد نظر، دفتر آموزش و ترویج استاندارد با همکاری پژوهشگاه استاندارد، در راستای استاندارد سازی فرآیند کارآموزی، اقدام به‌تدوین 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 به‌منظور 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 های کارآموزی
میکروبیولوژی فرآورده‌های لبنی غیر تخمیری

عنوان دوره کارآموزی:

میکروبیولوژی فرآورده‌های لبنی غیرتخمیری

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 غیر تخمیری بر اساس استانداردهای ملی ایران شماره‌های ۵۴۸۴، ۵-۸۹۲۳، ۱-۸۹۲۳، ۳۲۶، ۱-۵۰۲۸، ۱-۵۴۸۶، ۲-۲۴۶۱، ۱-۲۴۶۱، ۵۲۳۴، ۱۰۱۵۴، ۶۸۰۶، ۳۱۹۶، ۱۹۱، ۱۸۱۰، ۲۶۲۹، ۹۴۳۲، ۸۲۴۸، ۱۶۰۳۳، ۲۴۰۶و ۹۸۹۹ و موارد زیر را در برمی‌گیرد:

۱- اطلاع رسانی روش‌های بهینه و جدید آزمایشگاهی
۲- یکسان سازی رویه آزمایشگاه میکروبیولوژی فرآورده‌های لبنی غیرتخمیری
۳- اطمینان از عملکرد صحیح آزمایشگاه ها و اعتماد به‌نتایج حاصله از آزمون در آزمایشگاه‌ها
۴- ارتقا سطح آگاهی و ایجاد مهارت در زمینه انجام آزمون‌های میکروبیولوژی فرآورده‌های لبنی غیر 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 قسمت‌های 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 غیرتخمیری	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، ۸۶۶۳، ۱-۸۹۲۳، ۵-۸۹۲۳، ۱۱۱۶۶، ۱۰۱۵۴، ۱-۱۰۸۹۹
۵	آشنایی با شاخص‌های میکروبی و حدود مجاز آنها فراورد های لبنی غیرتخمیری	آشنایی با میکرو ارگانیسم‌های فرآورده‌های لبنی غیر تخمیری	۱	۱			جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره‌های: ۳۶۹۰، ۱۸۱۰، ۵۲۳۴، ۳-۶۸۰۶، ۸۶۶۳، ۱-۸۹۲۳، ۵-۸۹۲۳، ۱۱۱۶۶، ۱۰۱۵۴، ۱-۱۰۸۹۹
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: ایران شماره های: ۳۶۹۰، ۱۸۱۰، ۵۲۳۴، ۳-۶۸۰۶، ۸۶۶۳، ۱-۸۹۲۳، ۵-۸۹۲۳، ۱۱۱۶۶، ۱۰۱۵۴، ۱-۱۰۸۹۹

ردیف	رئوس مطالب	محتوای آموزشی	مدت آموزش (ساعت)		اجراکننده		منبع / استانداردها
			تئوری	عملی	مدرس	کارآموز	
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 شماره های: ایران شماره‌های: ۳۶۹۰، ۱۸۱۰، ۵۲۳۴، ۳-۶۸۰۶، 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 شماره های: ایران شماره‌های: ۳۶۹۰، ۱۸۱۰، ۵۲۳۴، ۳-۶۸۰۶، 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	۰/۵	*	*	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره های: ایران شماره‌های: ۳۶۹۰، ۱۸۱۰، ۵۲۳۴، ۳-۶۸۰۶، ۸۶۶۳، ۱-۸۹۲۳، ۵-۸۹۲۳، ۱۱۱۶۶، ۱۰۱۵۴، ۱-۱۰۸۹۹
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 فرآورده های لبنی غیرتخمیری

تهیه کننده/ تهیه کنندگان:

شهپر مقدمی

گروه پژوهشی/ آزمایشگاه:

گروه پژوهشی میکروبیولوژی فرآورده‌های لبنی غیرتخمیری

به‌سفارش دفتر آموزش و ترویج استاندارد

منابع و مآخذ:

۱- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۸۱۰، میکرو بیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش جستجوی سالمونلا در مواد غذایی

۲- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۶۹۰، فرآورده های کشاورزی - نمونه برداری از فرآورده‌های بسته بندی شده که مصرف غذایی دارند.

۳- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵۲۳۴، شیر و فرآورده‌های آن-شمارش اشرشیاکلی-روش بیشترین تعداد احتمالی

۴- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش جستجو و شمارش اشریشیاکلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی

۵- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱- ۵۴۸۶، شیر و فرآورده های آن – شمارش کلی فرم‌ها قسمت اول- روش شمارش پرگنه‌ها در۳۰ درجه سلسیوس (بدون تقویت سازی)

۶- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲- ۵۴۸۶، شیر و فرآورده‌های آن – شمارش کلیفرم‌ها قسمت دوم – روش شمارش بیشترین تعداد احتمالی۳۰ درجه سلسیوس

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

۸- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۲۸۴، کره – شیرهای تخمیری و پنیر تازه – شمارش میکروارگانیسم-های آلوده کننده– روش شمارش کلی در ۳۰ درجه سلسیوس

۹- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵-۸۹۲۳، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -آماده سازی آزمایه ،سوپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی – قسمت ۵ – مقررات ویژه برای آماده سازی شیر و فرآورده‌های
۱۰- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۴۳۲، میکروبیولوژی موادغذایی و خوراک دام – روش جامع برای شمارش باکتری‌های احیاء کننده سولفیت در شرایط بی‌هوازی
۱۱ - استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۰۱۵۴، شیر وفرآورده‌های آن-شمارش واحدهای تشکیل دهنده کلنی کپک و/یا مخمر –شمارش کلنی در پلیت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس
۱۲ - استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -روش جامع برای شناسایی و شمارش کلیفرم‌ها
۱۳-استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۰۸۳۴، میکروبیولوژی زنجیره مواد غذایی -روش های نمونه برداری برای آزمون‌های میکروب شناسی
۱۴-یگانه، مهرداد، استاندارد و استاندارد کردن، چاپ اول، موسسه دانش پارسیان، ۱۳۸۹

۱۵-D. SAMARŽIJA et al.: Psychrotrophic bacteria and milk quality, Mljekarstvo۶۲ (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 غیرتخمیری		ح
فهرست		ی
مقدمه		ک
۱	هدف	۱
۲	استانداردهای ملی ایران	۱
۳	اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی	۲
۴	نمونه برداری	۳۳
۵	روش‌های آزمون میکروبیولوژی فرآورده‌های لبنی غیرتخمیری	۳۵
۵-۱	اصول آزمون	۴۰
۶	محیط‌های کشت و رقیق‌کننده‌ها	۴۱
۷	روش اجرای آزمون	۴۴
۸	بیان نتایج	۱۰۶
پیوست الف استانداردهای مرتبط با (GMP) فرآورده‌های لبنی		۱۱۰
پیوست ب- انواع استاندارد		۱۱۳
پیوست پ- مفاهیم مورد استفاده در کنترل کیفیت		۱۱۵
پیوست ت-(اطلاعاتی)		۱۱۶
پیوست ث-نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌های میکروبیولوژی فرآورده‌های لبنی طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۴۰۶		۱۲۰

مقدمه

شیر و فرآورده‌های آن

- **شیر طعم دار**

شیر طعم‌دار، فرآوردهای است که، پس از افزودن مواد طعم دهنده طبیعی مانند: پوره و تکه‌های میوه و پایدار کننده‌ها، قوام دهنده‌ها و امولسیفایر بدست می‌آید.

- **شیر خشک**

شیر خشک فرآوردهای است که از خشک کردن شیز تازه و سالم و پاستوریزه به‌یکی از روش‌های صنعتی معمول (غلطکی یا افشان) تهیه می‌شود شیر خشک ممکن است از شیر کامل، شیر کم چرب، بدون چربی و یا پودر پس آب کره تهیه شود.

- **تراویده شیر حاصل از فرآیند اولترافیلتراسیون (فرا پالایش شیر)** [1]

پریمیت، تراویده شیر به‌رنگ زرد روشن متمایل به‌سبز شفاف، بخشی از شیر است که در نتیجه حذف پروتئین‌ها و چربی‌ها (کامل، کم چرب و بدون چربی) توسط فیلتراسیون غشایی به‌دست می‌آید به‌عبارت دیگر شامل ترکیبات قابل عبور شیر از غشاهایی با نفوذ پذیری انتخابی مانند: لاکتوز و مواد معدنی شیر بخش کم پروتئین نوان تراویده شیر یا پرمیت (پودر حاصل از آب پنیر تولید شده از فرایند UF) تقسیم می‌شود پریمیت به‌عنوان ماده افزودنی کمکی و مغذی در صنایع مختلف غذایی مانند قنادی، نانوایی، صنایع پودری لبنی حائز اهمیت است .

- **پودر آب پنیر**

آب پنیر، آب جدا شده از شیر، پس از فرآیند تولید پنیر و یا پرمئیت (پودر حاصل از آب پنیر تولید شده از فرایند UF) است. آب پنیر حاوی بیش از٪ ۹۳ آب و دارای حدود نیمی از ارزش غذایی شیر است. ترکیبات آن شامل پروتئین‌های محلول در آب، لاکتوز، مواد معدنی و ویتامین‌ها می‌باشد. و هنگام تولید محصولات لبنی، خصوصا در تولید پنیر مقادیر زیادی تولید می‌شود. آب پنیر حاوی مقدار کمی لاکتوز و مواد معدنی و پروتئین‌های غیرحساس به‌اسید قند، پروتئین است. پودر آب پنیر محصول فرآیند خشک کردن آب پنیر، تا رسیدن به رطوبت ٪۴تا٪۳ است. انواع آن شامل موارد زیر می‌باشد:

-**پودر آب پنیر شیرین**: پودر آب پنیر شیرین به‌نام پودر آب پنیر رنت هم شناخته شده است.

۱- permeate

-پودر آب پنیر اسیدی (ترش):آب پنیر ترش یا آب پنیر اسیدی، دارای pH برابر ۴/۳ تا ۴/۶ است. و سرشار از لاکتوز، پروتئین، و مواد معدنی است که در مقایسه با پودر حاصل از آب پنیر شیرین، دارای لسیتین کمتر ولی اسید لاکتیک، فسفر، کلسیم، روی، آهن و مس بیشتری است.

-پودر آب پنیر دمینرال: [۱] :پودر آب پنیر دمینرال حاوی لاکتوز بالا، پروتئین‌های محلول در آب، ویتامین‌ها، آنزیم‌ها و اسیدهای آلی می‌باشد و علاوه بر خواص تغذیه‌ای آب بهبود یافته و شوری کاهش یافته است و جایگزین مناسبی برای شیر خشک در فرآورده‌های حجیم شده مانند: غلات، کیک، بیسکوئیت و فرآورده‌های گوشتی می‌باشد.

- **کازئینات سدیم وکلسیم**

کازئینات از خنثی کردن کازئین اسیدی توسط کلسیم هیدروکسید یا سدیم هیدروکسید به‌طوری که pH آن به ۶/۷ برسد، بدست می‌آید. کازئینات‌ها (سدیم،کلسیم و...) در واقع فرم بهینه شده‌ای از کازئین می‌باشند که در آنها قابلیت انحلال و خواص رئولوژیک بهبود یافته است. کازئینات منبع خوبی از پروتئین‌ها بوده و دارای نقش امولسیفایر، حجم دهنده و به عنوان یک منبع غذایی مناسب،کلیه اسیدهای آمینه ضروری بدن را تامین می‌کند و دارای مقادیر بالایی از آمینو اسید گلوتامین است که در بهبود سطح ایمنی بدن نقش موثری دارد. کازئین در شیر به‌صورت سوسپانسیونی از میسل‌های کازئین که به‌واسطه یون‌های کلسیم و تاثیرات متقابل هیدروفوبی در کنار هم نگه داشته شده‌اند، است و بر اساس شاخص‌های تغذیه‌ای و کیفی یکی از بهترین پروتئین‌ها محسوب شده و به‌عنوان یک جزء مهم در فرمولاسیون مکمل‌های غذایی کاربرد فراوانی یافته دارد.

- **خامه** [۲]

خامه امولسیونی است که در نتیجه تغلیظ شدید گویچه‌های چربی شیر به‌وجود می‌آید و از طریق جداسازی فیزیکی به‌صورت لایهٔ خامه در سطح شیر تشکیل می‌شود و به‌عنوان ماده اولیه در تولید کره و بعضی از انواع پنیر مورد استفاده قرار می‌گیرد. عطر و طعم خامه، از مهمترین ویژگی‌های آن بوده، لیپولیز و اکسیداسیون تأثیر بسیار نامطلوبی بر کیفیت خامه می‌گذارد. کیفیت شیر مورد استفاده در تولید خامه از نظر اکسیداسیون و رنسیدیتی دارای اهمیت زیادی است. برای تولید خامه، ابتدا شیر در دمای ۷۲ °C به‌مدت زمان۱۵ sec پاستوریزه شده و سپس خامه گیری با سپراتور در دمای۵۰ °C انجام می‌گیرد و تا دمای۵ °C سرد می‌شود. به‌منظور کریستالیزاسیون چربی، خامه تولید شده برای مدت نسبتا طولانی در دمای ۴ °C تا ۶ °C در تانک‌های چند جداره (ژاکت حرارتی) نگهداری می‌شود. در تولید خامه‌های استریلیزه و UHT، هموژنیزاسیون پس از فرآیند حرارتی صورت می‌گیرد تا از نواقص فیزیکی محصول در زمان نگهداری مانند: کلوخه شدن چربی و روغن انداختن جلوگیری شود. از آنجائی‌که انجام هموژنیزاسیون قبل از فرآیند حرارتی،

۱- Demineralize whey powder

۲- Cream

پایداری فرآورده را کاهش می‌دهد، برای دستیابی به‌خامه‌ای با ویسکوزیته بالا، باید هموژنیزاسیون در دمای پایین‌تر و در یک مرحله انجام شود.

- **خامه طعم دار**

خامه طعم‌دار با افزودن برخی طعم دهنده‌های مجاز مانند : شکر، شربت، کارامل، انواع کنسانتره میوه، پالپ و یا پوره میوه‌ها، خرما، عسل، عصاره مالت، شیره انگور، شیره خرما، زعفران، طعم دهنده‌های گیاهی مانند: دارچین و زنجبیل تولید می‌شود.

- **کره**

کره از خامه شیرین یا خامه ترش تهیه می‌شود.تبدیل خامه به‌کره شامل شکستن امولسیون روغن در آب و تبدیل آن مولسیون آب در روغن (پخش و پراکنده‌گی یکنواخت و هموژن قطرات کوچک آب در فاز روغن) است. کره از اسیدهای چرب مختلف با زنجیرهای کوتاه، متوسط و بلند تشکیل شده است و در اثر افزودن استارترهای تولید کننده اسیدلاکتیک به‌کره و حرارت دادن، مواد معطری مانند: دی استیل به‌وجود می‌آید. کره تقریباً دارای ۸۲٪ چربی، ۱۶٪ رطوبت، ٪ ۱/۵تا۲٪ و معمولاً کمتر از٪ ۰/۵ پروتئین، ویتامین‌های (A و D)، کربوهیدارت‌ها، نمک، و املاح است.

- فساد کره

منشاء اصلی میکروارگانیسم‌های کره، ماده اولیه آن یعنی خامه شیرین یا ترش می‌باشد . انتظار می‌رود که فلور میکروبی خامه مانند شیر کامل باشد. فرآیند تبدیل خامه به‌کره تا اندازه‌ای تعداد میکرواورگانیسم‌ها را کاهش می‌دهد.

۱) عامل فساد کره و تولید طعم نامناسب به‌واسطه رشد *استرپتوکوکوس لاکتیس* واریته *مالتجنس*[۱] است.

۲) تولید بوی نامناسب و ایجاد لکه‌های سیاه رنگ در کره اغلب توسط گونه‌های پسودوموناس[۲] ایجاد می‌شود.

باکتری‌ها سبب دو نوع فساد کلی در کره می‌شوند:

-فساد سطحی کره[۳] که به‌سبب رشد پسودوموناس در سطح کره اتفاق می‌افتد. فساد در دمای ۴ °C تا ۷ °C پس از ۷تا ۱۰روز ظاهر می‌شود. بوی بد ناشی از این فساد ظاهرا به‌برخی از اسیدهای آلی خصوصا به‌اسید ایزووالریک مربوط است.

-تندی کره

تندی کره در اثر هیدرولیز کره و آزاد شدن اسیدهای چرب (C_4-C_6, C_{10}..C_{12}) ایجاد می‌شود. میکروارگانیسم اصلی هیدرولیز کره و ایجاد عامل تندی در آن گونه‌های پسودوموناس و گونه‌های

---

۱ - *Sterptoccus.lactis.var.Maltigenes*

۲ - *P. mephitica, P. nigrifaciens, P. fragi, P. fluorescens*

۳ - Surface taint

باسیلوس[1] می‌باشد. قارچ‌ها عموما در سطح محصول رشد کرده و بر حسب رنگ اسپورهایشان موجب تغییر رنگ سطح خارجی کره می‌شوند. رنگ سیاه توسط گونه‌هایی از جنس *رودوتورولا*[2] بوجود می‌آید. مهم‌ترین گونه‌های شناسایی شده *کلادوسپوریوم*[3]، *آلترناریا*[4]، *آسپرژیلوس*[5]، *موکور*[6]، *رایزوپوس*[7] و *پنیسیلیوم*[8].است. البته لیپاز غیر میکروبی هم قادر به‌تولید تندی کره می‌شود.

- **بستنی و دسرها**

بستنی نوعی دسر منجمدی از ترکیب اجزاء شیر، مواد پایدار کننده، امولسیفایر، شیرین‌کننده مجاز خوراکی، طعم‌دهنده مجاز خوراکی و دارای حداقل ۱۰٪ چربی شیر می‌باشد. مقدار این چربی می‌تواند از ٪۱۰ تا ٪۱۶ متغیر باشد. در ترکیب بستنی مواد دیگری مانند: تخم مرغ، رنگ و نشاسته هیدرولیز شده، نیز ممکن است، باشد. در تهیه بستنی از خامه استفاده می‌شود ساختمان بستنی شامل یک سیستم فیزیکی و شیمیایی پیچیده است که در این سیستم سه فاز جامد، مایع و گاز وجود دارد هوا و بلورهای یخ در یک فاز پیوسه مایع پخش شده است. فاز مایع حاوی چربی جامد، پروتئین‌های کلوئیدی شیر، نمک‌های غیر محلول شیر، بلورهای لاکتوز، پایدار کننده‌های کلوئیدی، قندها و نیز نمک‌های محلول می‌باشد. در صورت استفاده از میوه‌ها و شکولات، بستنی با طعم‌های متفاوت عرضه می‌شود.

میکروبیولوژی شیر و فرآورده‌های آن

میکروبیولوژی شیر و فرآورده‌های آن در ارتباط با دو بخش گاو داری و واحد تبدیلی می‌باشد که این دو بخش ارتباط تنگاتنگی با یکدیگر دارند.

شیر و محصولات لبنی از جمله خامه، کره و پنیر منبعی غنی از پروتئین، قند و املاح و ویتامین‌ها است و به‌علت ترکیبات شیمیایی خاص، همواره در معرض هجوم میکروب‌ها بوده و مهمترین عامل مسمومیت انسان‌ها محسوب می‌شود شیر خام ممکن است دارای استافیلوکوکوس، استرپتوکوکوس، لوکونوستک، لاکتوباسیلوس پروپیونی باکتریوم، میکروکوکوس، کلیفرم‌ها، پرتئوس و پسودوموناس باشد .

---

۱ - *Bacillus spp*
۲ - *Rhodotorula species*
۳ - *Cladosporium spp*
۴ - *Alternaria*
۵ - *Aspergillus*
۶- *Mucor*
۷ - *Rhizopus*
۸ - *Penicillum*

منشاء وجود میکروارگانیسم‌ها در شیر

✓ **ورود میکروارگانیسم‌ها به‌شیر از طریق بافت‌های بدن دام بیمار**

الف: دام درگیر بیماری سیستمیک است. در این حالت میکروب درهمه ترشحات بدن یافت می‌شود.

ب: دام مشکل عمومی ندارد، و تنها دچار ماستیتیس[1] (تورم پستان) است.

تورم پستان یکی از شایعترین بیماری‌ها در بین گاوهای شیری است، مهمترین تغییراتی که درنتیجه ورم پ ستان در شیر ایجاد می شود شامل:تغییر رنگ، وجود لخته و پیدایش تعداد زیادی لوکو سیت، گلبول سفید با علائم تورم، گرمی، درد و سفت شدن غدد پستانی می‌باشد. ورم پستان به‌عنوان پر هزینه‌ترین بیماری گاو شیری در سراسر جهان مطرح است به‌طوری که سالیانه خسارات زیادی را به صنعت دام پروری در جهان وارد می‌سازد. خسارات اقتصادی آن ناشی از کاهش تولید و افت کیفیت شیر، هزینه‌های درمان، دامپزشک و حتی تلفات دامی می‌باشد هم چنین می‌توانند بر روی باروری حیوان نیز اثرات نامطلوبی برجای گذارند، باکتری‌های ا صلی ایجادکننده ورم پ ستان را به‌دو د سته واگیردار(*ا ستافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس آگالاکتیه، کورینه با کتریوم بویس* و *مایکوپلاسما بویس*) و محیطی (*ا شر شیاکلی، ا سترپتوکوکوس دیس گالاکتیه* و *ا سترپتوکوکوس یوبریس*) تق سیم بندی می‌کنند. از سایر عوامل باکتریایی ورم پستان می‌توان به *پسودوموناس آئروجینوزا، استافیلوکوکوس اپیدرمییس، بروسلا ملیتنسیس، کلبسیلا پنومونیه، کلبسیلا اکسیتوکا، انتروباکترآئروجنز* و گونه های *پاستورلا، پروتئوس* و *مایکوپلاسما* اشاره کرد

✓ **ورود میکروارگانیسم‌ها به‌شیر حین مراحل شیردوشی و پس از آن**

عوامل بی‌شماری از قبیل نوع تغذیهٔ دام، بهداشت محیط نگهداری دام، بهداشت زمان شیر دوشی و وسایل شیر دوشی، استفاده از مواد ضد عفونی کننده یا عدم استفاده از آنها و سلامت یا بیماری دام در فلور میکروبی شیر خام تولیدی تاثیر مستقیمی دارد. میکروارگانیسم‌هایی که قادر به‌رشد در شیر خام هستند ارتباط مستقیمی با درجه حرارت نگهداری شیر خام دارند.

✓ **ورود میکروارگانیسم‌ها به‌شیر از طریق انسان مبتلا**

دو بیماری عمده تیفوئید و عفونت استافیلوکوکی حائز اهمیت است. تیفوئید که عامل مولد آن سالمونلا تیفی است و عفونت استافیلوکوکی (از طریق گونه‌های مختلف استافیلوکوک ایجاد می‌شود) از طریق افراد ناقل یا مبتلا، به‌شیر منتقل می‌شود این دو باکتری معمولا حرارت پاستوریزاسیون را تحمل نمی‌کنند، اما سم تولیدی توسط استافیلوکوکی مقاومت حرارتی بالایی دارد. و باعث مبتلا شدن مصرف کنندگان شیر می‌شود.

۱- Mastitis

✓ **ورود میکروارگانیسم‌ها به‌شیر و آلودگی شیر در واحد تبدیلی**

در واحد تبدیلی معمولا عمل پاستوریزاسیون شیر خام انجام می‌گیرد و قسمت عمده بار میکروبی از بین می‌رود و عواملی مانند: دمای فرایند، زمان فرایند، بهداشت تجهیزات مورد استفاده، محیط و کارگران و شرایط نگهداری پس از فرایند بر میزان بار میکروبی محصول نهایی تاثیرگذار است.

باکتری‌های عمده در شیر خام

- **بروسلا**[1]

باکتری‌های گرم منفی، هوازی و غیر متحرّک، فاقد کپسول و اسپور می‌باشند. این باکتری‌ها انگل داخل سلولی هستند.رشد آنها کند است. عامل تب مالت است، در افرادی که با دام سر و کار دارند نیز می‌توانند. باعث انتقال این باکتری به‌شیر شوند. این میکروارگانیسم در مقابل حرارت پاستوریزاسیون مقاومت نمی‌کند و اهمیت آن بیشتر در فرآورده‌هایی است که از شیر خام تهیه می‌شود، است.

شکل۱ - بورسلا

- ***کوکسیلا بورنتی***[2]

عامل مولد تبQ، می‌تواند از طریق دام‌های مبتلا وارد ترشح شیر و از طریق شیر به‌انسان منتقل شود. امروزه مبنای عمل پاستوریزاسیون سریع (HTST) از بین رفتن باکتری *کوکسیلا بورنتی* است. اما چون کشت و تشخیص این میکروارگانیسم نیاز به‌زمان طولانی دارد، مبنای پاستوریزاسیون را از بین رفتن آنزیم فسفاتاز قلیایی در شیر که مقاومتی معادل *کوکسیلا بورنتی* دارد، قرار داده‌اند. همچنین به‌باکتری‌های عمده در شیر خام مانند: باکتری‌های، *یرسینیا انتروکولیتیکا، باسیلوس سرئوس، استرپتوکوکوس آگالاکتیا، استرپتوکوکوس ترموفیلوس، لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، انتروباکتر، اشرشیا، کورینه باکتریوم گونه‌های استافیلوکوکوس، گونه-های میکروکوکوس، لاکتو باسیلوس* نیز می‌توان اشاره کرد.

۱-*Brucella*

۲- *Coxiella burneti*

همچنین ممکن است میکروارگانیسم‌های سرمادوست[1] مانند: گونه‌های مختلف پسودوموناس ، گونه‌های مختلف *فلاووباکتریوم* و *آئروموناس* و اکثر باکتری‌های جنس باسیلوس مثل *باسیلوس سیرکولانس*، *باسیلوس اسفاریکوس* نیز در شیر خام دیده شوند.
تمام باکتری‌های ذکر شده به‌استثنای باسیلوس معمولا درجه حرارت پاستوریزاسیون را تحمل نمی‌کنند. بنابر این اگر در شیر پاستوریزه دیده شوند یا نشان دهندهٔ آلودگی پس از پاستوریزاسیون (آلودگی ثانویه) است یا به‌دلیل عدم کفایت حرارتی یا پاستوریزاسیون ناکافی است.
همچنین آلودگی ثانویه شیر پاستوریزه بیشتر توسط ظروف و تجهیزات آلوده، ایجاد می‌شود. اغلب آلودگی تجهیزات توسط باسیل‌های گرم منفی، میکروکوکوس‌های گرم مثبت اتفاق می‌افتد. باکتری‌های مذکور در دمای پائین توانائی رشد و تکثیر ندارند و به‌تعداد بسیار اندکی مشاهده می‌شوند.

- ***مایکوباکتریوم توبرکلوزیس***[2]

عامل بیماری سل است و دام مبتلا به‌سل قادر به‌انتقال این باکتری به‌شیر می‌باشد. از آن جا که مقاومت حرارتی بالایی دارد در گذشته به‌عنوان شاخص پاستوریزاسیون شیر مورد استفاده قرار می‌گرفت، روش پاستوریزاسیون کند (LTLT) بر مبنای از بین رفتن همین میکروارگانیسم است.

شکل ۲- *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*

- **مایکوتوکسین عمده در شیر خام**

آفلاتوکسین گروه مهمی از سموم قارچی است (مایکو توکسین) هستند که بیماری آفلاتوکسیکوزیس را در حیوان‌های اهلی و انسان ایجاد می‌کنند و از عوامل ایجادکننده ناهنجاری-های مادرزادی و کارسینوژنی هستند. که به‌دنبال رشد برخی از گونه‌های *اسپرژیلوس* به‌خصوص *آسپرژیلوس فلاووس* و *اسپرژیلوس پارازیتکوس* در محصولا ت کشاورزی تولید می‌شود. افلاتوکسین B۱ که سمی‌ترین عضو خانواده آفلاتوکسین است بیش از دیگر آفلاتوکسین‌ها در مواد

۱- Psychrophiles
۲- *Mycobacterium tubercolosi*

غـذایی و علوفـه کپـک زده یافـت مـی‌شـود آفلاتوکسـین M۱ از مشـتقات هیدروکسـیله شـده آفلاتوکسین B۱ است که در کبـد دام تولیـد و قسـمتی از آن وارد شـیر مـی‌شـود و بـه‌دلیـل تـاثیر نـاچیز پاستوریزاسـیون، استرلیزاسـیون، و فـرآوری شـیر بـر بقـا و کـاهش آن، سـرانجام بـه‌فـرآورده‌هـای مختلـف شـیر انتقـال مـی‌یابـد توسـط آژانـس بـین المللـی تحقیقـات سـرطان، افلاتوکسـین B۱ در گـروه ۱ و افلاتوکسـین M۱ در گـروه ۲ مـواد کارسـینوژن طبقـه بنـدی مـی‌شـوند. آفلاتوکسـین M۱ متابولیـت مونوهیدروکسـیله شـده آفلاتوکسـین B۱ اسـت کـه توسـط آنـزیم سـیتوکروم P۴۵۰ در کبـد متـابولیزه می‌گـردد و بـه‌ایـن وسـیله وارد شـیر چهارپایـانی کـه از رژیـم غـذایی آلـوده بـه‌آفلاتوکسـین B۱ اسـتفاده کـرده‌انـد، مـی‌گـردد. رابطـه مسـتقیمی میـان محتـوای آفلاتوکسـین B۱ در شـیر و میـزان آفلاتوکسـین B۱ مصـرف شـده در جیـره غـذایی وجـود دارد. دانشـمندان بـرآورد کـرده‌انـد کـه حـدود ۶٪تـا۵٪ آفلاتوکسـین B۱ موجـود در غـذای حیوانـات، بـه‌آفلاتوکسـین M۱ در شـیر تبـدیل مـی‌شـود. سـمیت آفلاتوکسـین M۱ کمتـر از ترکیـب مولـد آن یعنـی آفلاتوکسـین B۱ مـی‌باشـد امـا تـاثیرات سیتوتوکسیک، ژنوتوکسیک و سرطانزایی آن به‌خوبی اثبات شده است.

آفلاتوکسین M۱ باقیمانـده در شـیر در طـول تولیـد، فرآینـد کـردن و نگهـداری محصـولات متنـوع لبنـی نسـبتا پایـدار مـی‌باشـد. ایـن سـم توسـط فرآینـدهای حرارتـی اسـتفاده شـده در صـنعت لبنیـات ماننـد: پاستوریزاسیون و تیمار حرارتی با دمای بالا(UHT) غیرفعال نمی‌گردد.

جزوه دوره کارآموزی میکروبیولوژی فرآورده‌های لبنی غیرتخمیری

۱ هدف

هدف از تدوین این جزوه آموزشی آشنایی با روش‌های میکروبیولوژی انواع فرآورده‌های لبنی غیرتخمیری 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 ، ۲۹۴۶و ۹۸۹۹ آشنایی 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 غیر تخمیری به‌شرح جدول ۱ می باشند:

جدول ۱- استانداردهای فرآورده‌های لبنی غیر تخمیری

ردیف	عنوان استاندارد	شمارهٔ استاندارد
۱	میکروبیولوژی موادغذایی وخوراک دام – شمارش میکروارگانیسم های سرماگرا – روش آزمون	۲۶۲۹
۲	میکرو بیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جامع برای جستجوی ،شناسایی و شمارش آنتروباکتریاسه –قسمت اول –جستجو،شناسایی و شمارش به‌شیوه محتمل‌ترین تعداد (MPN) یا پیش غنی سازی	۱-۲۴۶۱
۳	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-روش جامع برای جستجو، شناسایی و شمارش انتروباکتریاسه- قسمت دوم –روش شمارش کلنی	۲-۲۴۶۱
۴	فرآورده های کشاورزی - نمونه برداری از فرآورده های بسته بندی شده که مصرف غذایی دارند	۳۶۹۰
۵	میکرو بیولوژی مواد غذایی . خوراک دام – روش جستجوی سالمونلا در مواد غذایی	۱۸۱۰
۶	شیر– یاخته‌های پیکری- قسمت اول – روش میکروسکوپی (روش مرجع)	۱-۵۰۲۸
۷	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش جستجو و شمارش اشریشیاکلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی	۲۹۴۶

ادامه جدول ۱-ادامه استانداردهای فرآورده‌های لبنی غیر تخمیری

ردیف	عنوان استاندارد	شمارهٔ استاندارد
۸	شیر و فراورده‌های آن-روش شمارش کلی پرگنه‌های میکروارگانیسم‌ها در ۳۰ درجه سلسیوس	۵۴۸۴
۹	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-روش جامع برای شمارش استافیلوکوکوس¬های گوآگولاز مثبت (استافیلوکوکوس و سایر گونه ها) قسمت سوم جستجو شناسایی و شمارش به شیوه محتمل‌ترین تعداد (MPN) برای تعداد کم میکروارگانیسم	۸۶۰۶-۳
۱۰	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام و آب- آماد سازی، ساخت، ذخیره سازی و آزمون عملکرد محیط های کشت	۸۶۶۳
۱۱	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 رقت های اعشاری	۸۹۲۳-۱
۱۲	میکروبیولوژی مواد غذایی وخوراک دام -آماده سازی آزمایه، سوپانسیون اولیه و رقت ها¬ی اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی– قسمت ۵ –مقررات ویژه برای آماده سازی شیر و فراورده‌های آن	۸۹۲۳-۵
۱۳	میکروبیولوژی موادغذایی و خوراک دام – روش جامع برای شمارش باکتری‌های احیاء کننده سولفیت درشرایط بی هوازی	۹۴۳۲
۱۴	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -راهنمای الزامات کلی برای آزمون	۹۸۹۹
۱۵	شیر و فرآورده¬های آن-شمارش واحدهای تشکیل دهنده کلنی کپک و/یا مخمر –شمارش کلنی در پلیت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس	۱۰۱۵۴
۱۶	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

۳-۱-۲ فضای عمومی

فضاهای جداگانه برای موارد زیر توصیه می‌شود:

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

۳-۲ بهداشت کارکنان

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 ترجیحاً 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

تو صیه می شود مطابق با شرایط خوب آزمای شگاهی، کلیهٔ و سایل و تجهیزات تمیز و در محل منا سب نگهداری شوند.پیش از ا ستفاده بهترا ست و سایل از نظردا شتن شرایط لازم برای کارت صدیق و در صورت لزوم در طی اســتفاده، عملکرد آن پایش شــود. از وســایل معمول در آزمایشــگاه میکروبیولوژی مطابق با اســتاندارد 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	ترازوی آزمایشگاهی
۳	حمام مایع بادمای ثابت (بن ماری)
۴	میکروسکوپ
۵	pH متر
۶	انکوباتور
۷	فور دستگاه
۸	سیستم فیلتراسیون
۹	تجهیزات کشت در شرایط اتمسفری تغییر یافته
۱۰	اتوکلاو

وسایل و ظروف شیشه‌ای آزمایشگاهی

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

شکل ۳- وسایل شیشه‌ای

ترازوی آزمایشگاهی

دستگاهی است که برای توزین اجسام یا مایعات، با دقت بالا و حساسیت بالا در آزمایشگاه‌ها به‌کار می‌رود و با توجه به‌نیاز آزمایشگاه‌ها از ترازوهایی با دقت g ۰/۱، g ۰/۰۱، g ۰/۰۰۱، g ۰/۰۰۰۱ و g ۰/۰۰۰۰۱ استفاده می‌شود. ترازوهای آزمایشگاهی با دقت mg ۱ و دقت بالاتر آن نیاز به‌محفظه دارند. چون به علت حساسیت بالای آن‌ها در توزین جریان هوا نیز روی توزین این ترازوها تاثیر می‌گذارد. تمام دستگاه‌های توزین (مانند: باسکول یا ترازو) باید به‌طور دوره‌ای کالیبره[1] شوند. تا به‌درستی کار انجام دهند. گذشت زمان، فرسودگی، جابه‌جایی ترازو و حوادث غیرقابل پیش بینی، باعث می‌شوند تا قابلیت ردیابی نتایج آن‌ها زیر سؤال رفته و نیازمند تایید مجدد باشند. 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 نیاز به‌یک سنگ کالیبره استاندارد وجود دارد که معمولا بر اساس ظرفیت ترازو دیجیتال انتخاب می‌شود. نحوه کالیبره کردن در تمام ترازوهای دیجیتالی یکسان است و فقط سنگ کالیبره متفاوت است کالیبراسیون باید طبق دستورالعمل سازنده با وزنه‌های استاندارد انجام گیرد با این روش ارزیابی‌های دقیق‌تر و قابل اطمینان هستند و درصد خطا بسیار کم است برای تجهیزات کالیبره شده گواهی کالیبراسیون صادر شده و ضمیمه دستگاه می‌گردد.

شکل۴- ترازوی آزمایشگاهی

حمام مایع[2] (بن ماری[3])بادمای ثابت

این وسیله برای انجام تست‌های سرولوژیک، آگلوتیناسیون، بیوشیمی، تست‌های دارویی، در دمای تثبیت شده کار برد دارد. حرارت آب دستگاه به‌وسیله یک ترموستات قابل تنظیم است. بهتر است که برای جلوگیری از رسوب املاح بر روی المنت دستگاه از آب مقطر استفاده شود اگر چه در تعداد معدودی از آن‌ها از روغن نیز استفاده

---

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

۲- Water bath

۳- Bain marie

می‌شود. داغ شدن بیش ازحد المنت‌ها، به‌علت کم آبی بن ماری، موجب آسیب رساندن به‌دستگاه می‌شود، باید به‌حداقل حجم آب مورد نیاز جهت حفظ کارکرد مطلوب دستگاه توجه گردد.

کاربرد اصلی این دستگاه در آزمایشگاه میکروبیولوژی به‌شرح زیراست:

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

ب- نگهداری محیط کشت جامد سترون ذوب شده در طی آماده‌سازی محیط کشت؛

پ- تعدیل دمای محیط کشت جامد ذوب شده سترون برای استفاده در روش‌های خاص؛

ت- آماده‌سازی سوسپانسیون‌های اولیه یا محلول‌ها در یک دمای کنترل شده؛

ث- فرآیند حرارتی سوسپانسیون‌های اولیه در یک دمای کنترل شده (مانند پاستوریزاسیون)؛

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

شکل۵ –انواع حمام مایع با دمای ثابت

.

میکروسکوپ [۱]

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

- **بزرگنمایی :** به‌نسبت اندازه تصویر نمونه، به‌اندازه واقعی آن گفته می‌شود. در همه میکروسکوپ‌ها از عدسی‌ها برای بزرگنمایی تصویر استفاده می‌شود.

۱ - Microscopes

- **قدرت تفکیک :** توانایی تشخیص بین دو شیء نزدیک به هم به‌صورت دو شیء متمایز و جدا را قدرت تفکیک می‌گویند.قدرت تفکیک به‌کیفیت عدسی‌ها و طول موج نور تابیده شده بستگی دارد. با کاهش طول موج، قدرت تفکیک افزایش می‌یابد.
- **کنتراست :** به‌تفاوت بین بخش‌های مختلف یک نمونه می‌گویند. مثلا یک اندامک تیره‌تر از اندامک دیگر دیده شود.

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

شکل۶- میکروسکوپ نوری

فور[۵] 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°Cاز زمان رسیدن به‌دمای ۱۷۰°C به وسیلهٔ حرارت خشک به‌مدت زمان حداقل1h 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. توصیه می‌شود:

---

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

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

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

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

۵ - Oven

- از قرار دادن مواد قابل اشتعال و آتش‌زا در داخل و اطراف آون دوری شود.
- در زمان کارکردن با آون وسایل حفاظت فردی نظیر دستکش عایق، عینک محافظ و انبرک (برای گذاشتن و برداشتن وسایل) به‌کار گرفته شوند.
- از قرار دادن محلول‌های اسیدی و یا ایجاد بخارات خورنده در درون آون جلوگیری شود. این کار سبب از بین رفتن سطح درونی آون خواهد شد.
- به‌دلیل عایق بودن دستگاه، چند ساعت طول می‌کشد تا اشیاء داخل دستگاه آون خنک شود، مگر آن که مجهز به فن باشد. پس از سترون‌سازی، به‌منظور پیشگیری از شکستن وسایل شیشه‌ای درب آون را باز نکنید تا اتاقک، ظروف و مواد داخل آن تا دمای حدود$60^{\circ}C$ 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 به‌سبز.

از این ویال در هر سری کاری استفاده می‌شود.

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

شکل۷- فور یا آون

pH متر[3]

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

۱- *Bacillus subtilis*

۲ -*Bacillus atrophaeus*

۳- pH meter

نمایش می‌دهد. این دستگاه متشکل از دو بخش اصلی یعنی میله کاوشگر [1]و اندازه‌گیر[2] است. میله کاوشگر pH محلول را تبدیل به‌سیگنال الکتریکی کرده و اندازه‌گیر آن را تحلیل و میزان pH را نمایش می‌دهد. انتهای کاوشگر از غشاء شیشه‌ای و حباب مانند است که نسبت به‌یون‌ها حساس می‌باشد و رأس الکترود داخلی در داخل آن قراردارد. بخش داخلی و بیرونی محفظه حاوی KCl و HClیک 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 به‌مدت زمان ۲hدر آب مقطر نگهداری کنید و سپس آن را در محلول نگهدارنده قرار دهید .کاوشگر را به‌وسیله آب مقطر بشویید. برای تنظیم[3] pH متر، الکترود را در محلولpH۷ رار داده، حداقل sec ۳۰زمان بدهید تا عدد ثابتی را نشان دهد. سپس آن را روی عدد ۷ تنظیم کنید(pH متر عدد ۷ را نشان دهد). دوباره الکترود را با آب مقطر بشویید و آن را در محلول۷ pH قرار دهید .اجازه دهید اندازه گیر عدد ثابتی را نشان دهد. آن را روی عدد ۴ تنظیم کنید(pH متر عدد ۴ را نشان دهد). حالا pH متر شما تنظیم شده و آماده اندازه گیری pH محلول های مورد آزمایش است قبل از قرار دادن اندازه گیر در محلول مورد آزمایش آن را دوباره با آب مقطر بشویید.

شکل۸- pHمتر

انکوباتور

انکوباتور شامل اتاقک عایق بندی شده است که برای کشت و رشد دادن نمونه‌های زنده مانند: سلول‌ها یا میکروب‌ها به‌کار می‌رود. این دستگاه دارای قابلیت نگهداری دمایی ثابت و توزیعی یکنواخت دما با حداکثر خطای مجاز در مقدار نوسانات دمایی تعیین شده در روش‌های آزمون است. که درجه حرارت مناسب رشد،

۱- Probe

۲- Meter

۳ - Calibration

تکثیر و تشـــکیل کلنی را فراهم می‌کند. و در انواع انکوباتورهای آزمایشـــگاهی (معمولی، شـــیکردار، یخچالدار، و مجهز به‌سیستم تزریق CO_2) در آزمایشگاه‌های میکرو بیولوژی و بیولوژی سلولی کاربرد اساسی دارد.

شکل ۹- انکوباتور

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 ۱۰ – سیستم فیلتراسیون

اتوکلاو[1]

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 C° ۱۲۱ 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 C° ۱۲۱ ابزارآلات باید حداقل به مدت زمان ۱۵min، تحت فرآیند استریلیزاسیون قرار گیرند کل مدت زمان کار دستگاه اتوکلاو از فشار دادن دکمه

۱ - Autoclave

(شروع کار)[1] تا پایان کار سیستم، مجموع سه زمان (زمان اولیه)[2]، (زمان استریلیزاسیون) [3] و (زمان خشک شدن)[4] است. کنترل کیفیت و عملکرد دستگاه اتوکلاو الزامی است.

شکل ۱۱- اتوکلاو

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

اندیکاتورهای شیمیایی : به‌صورت نوارهای اتوکلاو (چسب اتو کلاو) TST [5] که سه عامل زمان، بخار و دما را کنترل می‌کند. یا بسته های پزشکی هستند که وقتی به‌دمای معینی رسیدند تغییر رنگ می‌دهند.

اندیکاتور بیولوژی : شامل اسپور باکتری‌های مقاوم به‌حرارت، مانند *ژئوباسیلوس استئاروترموفیلوس*[6] است.

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

شکل ۱۲- تعدادی از اندیکاتورهای شیمیایی، فیزیکی و بیولوژی

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 بی‌هوازی) در طی مدت گرمخانه گذاری محیط کشت، باشد .

۱- Start

۲ - Preheating Time

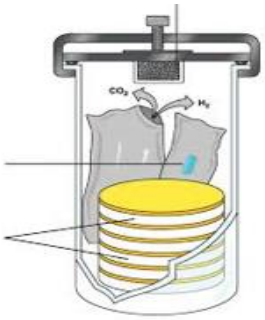
۳- Sterilization Time

۴- Drying Time

۵- Time, Steam,Tempreture

۶- *Geobacillus stearothermophilus*

ترکیب اتمسفر مورد نیاز می‌تواند به‌وسیله 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 ۱۳ - 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 *ژئو باسیلوس استئاروترموفیلوس* استفاده می‌شود.
- ✓ **روش شیمیایی** : به‌وسیله مواد ضدعفونی کننده مانند: آب اکسیژنه و انجام واکنش‌های شیمیایی (مانند: رادیکال‌های آزاد) برای سترون کردن استفاده می‌شود.
- ✓ **روش پرتودهی** : به‌وسیله تابش پرتوهای ایکس و گاما نیز می‌توان برای سترون کردن مواد بیولوژیک، داروها، گاز، باند، نخ‌های کات گوت و لوازم یک‌بار مصرف استفاده کرد.
- ✓ **روش فیلتراسیون** : معمولا برای سترون سازی مایعات استفاده می‌شود و شامل عبور دادن مایع از فیلترهای مخصوص می‌باشد.

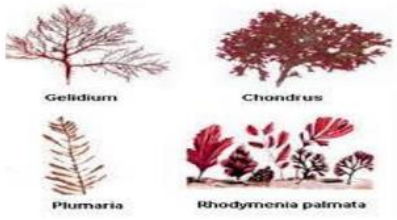
۱- *Bacillus subtilis*

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.. محیط‌های کشت عمومی را با اضافه کردن اجزای مغذی، غنی می‌کنند. این مواد مغذی بطور سترون، به‌محیط اصلی استریل شده اضافه می-شوند.

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 قابلیت زیستی میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. آگار به‌عنوان عامل سفت کننده در محیط کشت‌های جامد و نیمه جامد کار برد دارد. آگار ترکیبی است پلی ساکاریدی که از دیواره سلولی برخی از گونه‌های جلبک[۱] قرمز (از جنس گراسیلاریا [۲]و جیلیدیوم[۳]) استخراج می‌شود. آگار برای میکروارگانیسم‌ها ارزش غذایی ندارد و هیچ میکروارگانیسمی نمی‌تواند آنرا هضم کند. نقطه ذوب آن°C ۹۵ و با رسیدن دمای آن به‌حدود°C ۴۳ شبکه ای ایجاد می‌کند که سبب جامد شدن محیط می‌شود. محیط‌های کشت جامد معمولاً دارایL/۱۵g تا L/ ۱۳g آگار هستند.



شکل ۱۴ -گونه‌های از جلبک دریایی
جلبک دریایی جنس جیلیدیوم

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

۱- Algae

۲- Gracilari

۳ -Gelidium

آن به‌دلیل خالص بودن پایین‌تر از آب‌های طبیعی بوده و خاصیت خورندگی ندارد و آب مقطر باید در ظروف در دار و ساخته شده از مواد بی اثر مانند: شیشه خنثی، پلی‌اتیلن و غیره نگهداری شود. و همچنین توصیه می‌شود، آب مقطر تولید شده هر چه زودتر استفاده شود.

۳-۵-۱-۲ 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.

۳-۵-۲ طبقه بندی محیط کشت

محیط کشت را از جنبه‌های مختلف طبقه بندی می‌کنند:

۳-۵-۲-۱ طبقه بندی محیط کشت بر اساس ترکیبات

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

۳-۵-۲-۲-۱ محیط کشت جامد[1]

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

۱-Solid media

باکتری‌ها، دیدن منطقه همولیز، دلیل به‌کارگیری محیط جامد است. کشت در پلیت جامد به‌سه صورت و برای اهداف خاص انجام می‌گیرد :

شکل ۱۵- محیط کشت آگار دار

الف کشت در داخل محیط جامد[۱]

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

کشت‌های عمقی[۲]

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

ب کشت شیب دار[۳]

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

شکل۱۶-محیط کشت شیبدار

۳-۵-۲-۲-۲ محیط کشت نیمه جامد[٤]

محیط‌های نیمه جامد.که میزان آگار آن نسبت به‌محیط‌های جامد کمتر است ٪۰/۲تا ٪۰/۵. برای مشاهده حرکت باکتری‌ها استفاده می‌شود. مانند:" SIM"ا چنانچه این نوع محیط کشت هنگام جامد

۱- Shake Cultures

۲- Stab Cultures

۳- Slant media

۴ - Semi Solid media

شدن، به‌حالت شیبدار جامد شوند "اسلنت" گفته می‌شود. و اگر محیط کشت در ته ظروف ریخته شود به‌آن "بات" گفته می‌شود.

۳-۵-۲-۲-۳ محیط کشت مایع یا آبگوشتی [۱]

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.

۳-۵-۲-۳ طبقه بندی محیط کشت بر اساس کاربرد آنها

۳-۵-۲-۳-۱ محیط کشت انتقالی [۲]

محیط کشتی است که به‌منظور نگهداری و حفظ قابلیت زیستی میکروارگانیسم‌ها در ضمن به‌حداقل رساندن تغییر در شمارش در دوره زمانی بین جمع آوری نمونه و کار آزمایشگاهی بر روی آن، طراحی شده است. مانند: "محیط کشت استوارت یا آمیس[۳] "

۳-۵-۲-۳-۲ محیط کشت نگه‌داری کننده [۴]

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[۵]"، اسلوپ‌های"نوترینت آگار [۶]"

۳-۵-۲-۳-۳ محیط کشت بازیابی [۷]

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[۸]".

۱-Liquid or broth media

۲ -Transport medium

۳ -Stuart or amies transport medium

۴-Preservation medium

۵ -Dorset agar medium

۶ -Nutrient medium

۷-Resuscitation medium

۸-Buffered peptone water

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

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

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" .

۳-۵-۲-۳-۴-۱ محیط کشت غنی کننده انتخابی[۳]

محیط کشت غنی کننده‌ای است که به‌میکروارگانیسم‌های خاص امکان رشد می‌دهد و به‌واسطه یک ماده مهار کننده، رشد تمام میکروارگانیسم‌ها به‌جز میکروارگانیسم مورد نظر را کاملاً یا تا حدودی مهار می‌کنند. مانند: محیط کشت "پپتون سوی راپاپورت- واسیلادیس[۴] "

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

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

۳-۵-۲-۳-۴-۳ محیط کشت جداکننده[۶]

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

۳-۵-۲-۳-۴-۴ محیط کشت جداکننده انتخابی [۷]

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

۳-۵-۲-۳-۴-۵ محیط کشت جداکننده غیر انتخابی [۸]

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

۳-۵-۲-۳-۴-۶ محیط کشت انتخابی کروموژنیک [۹]/ فلوروژنیک [۱۰]

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

۱-Pre- enrichmen medium

۲-Enrichmen medium

۳-Selective enrichment medium

۴-Rappaport-Vassiliadis (RV)

۵-Non- selective enrichment medium

۶ -Selective isolation medium

۷-Selective enrichment medium

۸- Non-selective isolation medium

۹- Chromogenic selective culture medium

۱۰- Fluorogenic selective culture medium

۳-۵-۲-۳-۴-۷ محیط کشت افتراقی[۱]

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

۳-۵-۲-۳-۴-۸ محیط کشت شناسایی [۲]

محیط کشت با قدرت تشخیصی بالا برای ایجاد یک واکنش تشخیصی خاص که نیاز به‌استفاده از محیط کشت‌های تاییدی ندارد. مانند: "بایل اسکولین آزاید[۳] ".

۳-۵-۲-۳-۴-۹ محیط کشت شمارش [۴]

محیط کشت انتخابی یا غیر انتخابی که برای شمارش میکروارگانیسم‌ها به‌کار می‌رود. مانند:"برد پارکر[۵] "یست اکسترکت آگار [۶]".

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

۳-۵-۲-۳-۴-۱۰ محیط کشت تاییدی [۷]

محیط کشتی است که برای شناسایی یا تعیین هویت مشخصات میکروارگانیسم‌ها پس از یک مرحله بازیابی مقدماتی و/یا غنی سازی و/یا جداسازی، به‌کار گرفته می‌شود مانند:"کلینگر آیرون آگار[۸]" .

۳-۵-۲-۳-۴-۱۱ محیط کشت دارای ترکیبات خنثی کننده [۹]

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

۳-۵-۲-۳-۴-۱۲ محیط کشت با موارد استفاده متعدد

محیط کشتی است که در دسته بندی‌های متعدد قرار می‌گیرد. مانند: "بلاد آگار[۱۰]"که یک محیط بازیابی است، می‌تواند به‌عنوان محیط کشت جداکننده و همچنین محیط کشت افتراقی برای رد یابی همولیز به‌کار رود. و یا "بافر پپتون واتر" که یک رقیق کننده است می‌تواند یک محیط کشت پیش غنی کننده نیز باشد.

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

۳-۵-۲-۴-۳-۱۳ محیط کشت مرجع

محیط کشت غیر انتخابی مانند:"تریپتون سوی آگار[۱]"که برای ارزیابی مقایسه‌ای کنترل عملکرد محیط کشت به‌کار می‌رود.

۳-۵-۲-۴ طبقه بندی محیط کشت بر اساس آماده سازی

۳-۵-۲-۴-۱ محیط کشت آماده مصرف

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

۳-۵-۲-۴-۲ محیط کشت کامل شده

محیط کشتی است که برای تلقیح آماده باشد.

۳-۵-۲-۴-۳ محیط کشت آماده مصرف بعد از ذوب مجدد

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

۳-۵-۲-۴-۴ محیط کشت آماده مصرف بعد از ذوب مجدد و افزودن مکمل

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

مانند"تریپتوز سولفیت سیکلو سرین (TSC)آگار" ، "برد پارکر آگار" یا "رابیت پلاسما فیبرینوژن (RFP)آگار".

۳-۵-۲-۴-۵ 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.

۳-۵-۲-۴-۶ محیط کشت آماده شده از اجزای مجزا

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

۳-۶ آماده سازی و استریلیزاسیون محیط‌های کشت در آزمایشگاه

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

با رعایت دستور العمل تولید کننده، و با توجه به‌نشانه گذاری آن، مقدار لازم از محیط کشت (پودر خشک) با دقت توزین می‌شود. و با آب خالص (مقطر)، آب بدون املاح یا آب یون زدایی شده با

۱- Tryptic Soy Agar(TSA)

استفاده از اسمز معکوس یا کیفیتی معادل آن، در داخل ارلن مخلوط کنید سپس در صورت لزوم همراه با گرم کردن، سریعاً یکنواخت کنید. و به‌حجم برسانید.
آلودگی میکروبی آب از 10^2 *cfu /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 ۲۵میکروزیمنس[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 pH 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 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 آماده‌سازی سترون کنید. سترون‌سازی محیط‌های کشت و معرف‌ها معمولاً با استفاده از حرارت مرطوب با استفاده از اتوکلاو یا فیلترا سیون انجام می شود. بعضی از محیط‌های کشت به سترون‌سازی با اتوکلاو نیاز ندارند، ولی می‌توان آنها را با دمای جوش سترون نمود. برای مثال: محیط‌های کشت آنتروباکتریاسه‌ها که حاوی برلیانت گرین بوده و بخصوص به‌حرارت و نور حساس هستند و بهتر است به‌سرعت پس از جوشیدن سرد شده و در برابر نور شدید محافظت شوند. همچنین، بعضی از معرف‌ها را نیز می‌توان بدون سترون سازی 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 $5 \pm 3\ ^{\circ}C$ نگهداری کنید.

---

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.

اگر محیط‌های کشت در یخچال نگهداری شود معمولاً توصیه می‌شود مدت زمان نگهداری برای پلیت‌ها از دو تا چهار هفته و برای بطری‌های بسته شده و لوله‌ها سه تا شش ماه بیشتر نشود.
برای ذوب مجدد، محیط‌های کشت را به‌وسیله قرار دادن آن در حمام آب جوش و یا هر فرآیند دیگری که همان نتیجه را دهد، ذوب کنید (مانند: قرار دادن در بخار اتوکلاو) محیط کشت ذوب شده، در حمام آب گرم با دمای تنظیم شده، با دمای $47^{\circ}C$ تا $50^{\circ}C$، خنک کنید.

۳-۶-۵ افزودن مکمل‌ها

مکمل‌هایی که حساس به‌حرارت هستند، باید بعد از اینکه دمای محیط به‌کمتر از $50^{\circ}C$ 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 سرعت در ظروف نهایی تقسیم کنید. در هر صورت طبق دستورالعمل تولیدکننده عمل کنید.

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

محیط کشت آگاردار ذوب شده را در 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 به‌طول می‌انجامد، یا دمای گرمخانه‌گذاری بیش از $40^{\circ}C$ است، محیط کشت بیشتری ممکن است در پتری دیش‌ها ریخته شود. پلیت‌ها را به‌صورت در بسته روی یک سطح افقی و خنک قرار دهید تا آگار سرد شده و ببندد.

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. و بسته به‌ماهیت نمونه و میزان آلودگی مورد انتظار، رقت‌های لازم را تهیه کنید.
برای آزمون شمارش، رقت‌های دهدهی را با رعایت شرایط اسپتیک تهیه کنید.
یادآوری- برای تهیه سوسپانسیون فرآورده‌های اسیدی، pH را نزدیک خنثی و برابر با ۷/۰±۰/۵ تنظیم کنید. از آب پپتونه بافری و برای بیشتر فرآورده‌های با pH بیشتر یا برابر ۴/۵ استفاده کنید. برای فرآورده‌های اسیدی‌تر

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

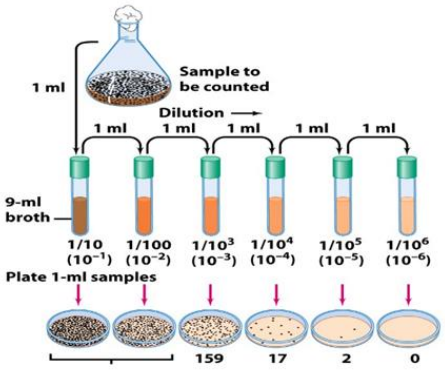
یاد آوری۱- برای اطلاعات بیشتر در باره تهیه فرآورده‌های ا سیدی قبل از آزمون برای گروه‌های خاص میکروارگانیسم‌هایی مانند اسید دوست‌ها، به استاندارد ملی ایران ۴-۸۹۲۳ مراجعه کنید.

برای رقت‌های ۱۰برابر، 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.

یادآوری۲-توصیه می‌شود، دمای محلول رقیق کننده‌ها تقریبا برابر با دمای محیط آزمایشگاه باشد.

سوسپانسیون اولیه را کاملا مخلوط کنید. (۱۰ بار با حرکت دست به شعاع ۳۰۰mm به‌مدت زمان حدود زمان۷ sec بچرخانید) رقت بدست آمده$^{-1}$۱۰ می‌باشد.

یادآوری۳-برای شمارش اسپورها، بلافاصله پس از تهیه سوسپانسیون اولیه باید شوک حرارتی دهید، سپس به سرعت خنک کنید.



شکل۱۷- سوسپانسیون اولیه و رقت ها 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 به مدت زمان۳ sec تا ۵ sec مخلوط کنید. رقت بدست آمده$^{-2}$۱۰ می‌باشد. در صورت لزوم، به‌همین ترتیب و رقت‌های بعدی ($^{-3}$۱۰ ،$^{\cdots}$) را تهیه کنید -تا حدی که برای شمارش میکروارگانیسم‌ها مناسب باشند. مراقب باشید، پی‌پت را بیش از۱cm داخل سوسپانسیون اولیه فرو نکنید و از تماس پی‌پت حاوی سوسپانسیون اولیه با محلول رقیق کنندهٔ سترون جلوگیری کنید. هنگام آماده سازی رقیق کننده سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری بعدی، زمان بین پایان آماده سازی تا لحظه تماس ماده تلقیحی با محیط کشت یا آبگوشت غنی کننده نباید بیش از۴۵ min باشد.

۳-۷-۱ روش‌های کشت در میکروبیولوژی

کشت در پلیت به‌سه روش قابل انجام است.

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

۳-۷-۱-۱ کشت خطی

در این روش از محیط پیش ریخته استفاده می‌شود. 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 می‌شود و با نوک حلقه کشت که محتوی کلنی باکتری است، بصورت خط‌های موازی کشیده و بعد خطوط را در منطقه دوم از انتهای خط انتهایی منطقه اول در جهت دیگر ادامه داده و در منطقه سوم و چهارم هم به‌همین صورت عمل می‌شود. خصوصیت این روش این است که وقتی خطوط موازی را روی سطح محیط می‌کشید به ترتیب از تراکم باکتری‌ها کاسته می‌شود و در انتهای خط، تراکم باکتری بسیار کمتر خواهد بود تا جایی که در منطقه چهارم دسترسی به‌کلنی‌های تک وجود خواهد داشت. که کلنی خالص نامیده می‌شود.

شکل ۱۸ - کشت خطی

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

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

۳-۷-۱-۲ کشت سطحی

این روش کشت اغلب برای شمارش میکروارگانیسم‌های فرآورده‌های مورد مصرف انسان و خوراک دام، نمونه های محیطی و همچنین در مورد فرآورده‌هایی که دارای میکروارگانیسم‌های حساس به‌گرما[۱] هستند و احتمال دارد قسمت معنی داری از فلور کل را تشکیل دهند (مانند: ارگانیسم‌های سرماگرا [۲])کار برد دارد.

همچنین در غذاهای خشک شده، غذاهای یخزده و منجمد، که ممکن است دارای میکروارگانیسم-های حساس به‌گرما باشند یا فرآورده‌هایی که دارای باکتری‌های هوازی اجباری هستند که احتمال دارد قست معنی داری از فلور کل را تشکیل دهند (مانند:گونه‌های پسودوموناس [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 می‌شود، فرآورده‌هایی که برای تشخیص بین انواع مختلف کلنی به‌عنوان قسمتی از ارزیابی کمیت غذا مورد نیاز است و بالاخره برای کشت میکرو ارگانیسم‌هایی است که قابلیت رشد و تشکیل کلنی در سطح محیط کشت جامد را دارند، به‌کار برده می‌شود. در این نوع کشت، از محیط پیش ریخته استفاده می‌شود. در روش سطحی، برای پلیت‌هائی با قطر ۹۰mm تا ۱۰۰mm، حجم آزمونه و یا رقتی از آن باید بین ۰/۱mL تا ۰/۵mL باشد رقت را باید به‌گونه‌ای انتخاب کرد که در آن تعداد مورد انتظار کلنی‌های تشکیل شده بین ۱۰ تا ۱۵۰ کلنی تیپیک باشد. تعداد کل کلنی‌های تیپیک و غیر تیپیک روی پلیت باید کمتر از ۲۰۰ کلنی باشد.

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

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

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

۱- Heat-sensitive organisms

۲- Psychrotrophic

۳- Pseudomonas spp.

شکل ۱۹ -کشت سطحی

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

الف- میزان رطوبت مهم است زیرا رشد بهینه باکتری‌ها به شرایط رطوبت درون و سطح محیط کشت بستگی دارد. از دست دادن رطوبت زیاد ممکن است منجر 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 به سرعت روی محیط کشت پخش نمی شود 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 بی مورد رطوبت می‌شود.

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

ت- چنانچه برای خشک شدن کردن پلیت‌ها از اتاقک با جریان هوای لایه‌ای[1] استفاده نمی‌کنید، برای پیشگیری از آلودگی پلیت‌ها، سطح محیط کشت را پایین قرار دهید.

ث- در عمل پلیت‌ها را با قرار دادن در دمای ۲۵ °C تا ۵۰ °C به‌گونه‌ای که سطح آگار پلیت‌ها به‌طرف 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 به مدت 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.

۱- Laminsr-flow safety cabinet

۳-۷-۱-۳ کشت آمیخته یا پورپلیت

در روش کشت آمیخته، حجم آزمونه و یا رقتی از نمونه بسته به‌اندازه پلیت و حجم محیط کشت مورد استفاده بین ۰/۱ mL تا ۵ 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.

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

محیط کشت مورد استفاده را در حمام آب جوش ذوب کنید از سایر فرآیندهای مناسب مانند: قرار دادن در جریان بخار آزاد اتوکلاو و یا ماکروویو و سایر فرآیندهای مناسب که ترکیب دما و زمان آن برای آماده سازی محیط کشت، صحه گذاری شده است نیز می‌توانید استفاده کنید از 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.

یادآوری۱–محیط‌های کشت را برای مدت زمان بیشتر از h ۴ به‌صورت ذوب شده نگه داری نکنید

یادآوری ۲- محیط‌های کشت آگاردار را بیشتر از یکبار ذوب نکنید.

ارلن دارای محیط کشت را از حمام آب خارج کنید پس از خشک کردن قسمت بیرونی آن، گردن ظرف را از روی شعله عبور دهید. محیط کشت را بدون تاخیر به‌پلیت‌ها به‌گونه‌ای بیافزایید که ایجاد شوک حرارتی به‌حداقل برسد.

شکل۲۰-کشت پورپلیت

به‌طور کلی برای یک ۱mm تا ۲mm آزمونه مقدار ۱۵ mm تا ۲۰mm محیط کشت سترون که حرارت آن به حدود۴۵°Cرسیده، 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

شـدن، روی سـطح افقـی قـرار گرفتـه و محـیط جامـد مـی‌شـود. پـس از جامـد شـدن آگـار، پلیـت‌هـا بـدون تاخیر در گرمخانه قرار می‌گیرد.

۳-۷-۱-۳-۱ کشت‌های دو لایه

در کشـت دو لایـه، پـس از تلقـیح و کشـت آمیختـه یـا پـور پلیـت در صـورت لـزوم سـطح محـیط کشـت بـا باکتری، مجددا با یک لایه نـازکی از همـان محـیط کشـت پوشـانده مـی‌شـود در ایـن حالـت بـه‌آن کشـت دو لایه هم گفته می‌شـود. پـس از بسـته شـدن محـیط ظـرف‌هـای پتـری را بـه‌طـور واژگـون در گرمخانـه قـرار می‌دهند تا از ریختن قطرات آب درسطح محیط جلوگیری گردد.

۳-۷-۱-۴ شمارش در محیط کشت مایع

اصول آزمون

آزمونه نمونـه بـه‌محـیط کشـت مـایع تلقـیح مـی‌شـود تـا از رشـد میکروارگانیسـم‌هـای خـاص یـا گروهـی از میکروارگانیسـم‌هـا اطمینـان حاصـل شـود بیشـترین تعـداد احتمـالی (MPN) میکروارگانیسـم‌هـای موجـود در نمونه اصلی و دقت تخمین، را می‌توان بـر اسـاس تعـداد آزمـون‌هـای مثبـت و منفـی مشـاهده شـده پـس از گرمخانه گذاری، با استفاده از روش‌های آماری تخمین زد.

۳-۷-۱-۴-۱ تخمین بیشترین تعداد احتمالی(MPN)

اســـاس روش MPN، در بیشـــتر موارد، تلقیح آزمون‌های متعدد از یک نمونه و یا رقت‌های آن به‌لوله‌های دارای محیط کشـت مایع اسـت. پس از گرمخانه گذاری لوله‌های تلقیح شـده که دارای یک میکروارگانیسـم یا بیشـتر باشد، علائم رشد را نشان خواهد داد که با یا بدون تغییرات مشخص در محیط کشت مشاهده می‌شود بر اساس نتایج مثبت یا منفی در برخی از لوله‌ها، بیشـــترین تعداد احتمالی میکروارگانیســـم در حجم معین از نمونه را می‌توان از تعداد و توزیع لوله‌هایی که واکنش مثبت داشته‌اند تخمین زد.

در میان ترکیب‌های مختلف MPN با توجه به تعداد مورد انتظار میکروارگانیسـم‌ها در نمونه مورد آزمون، الزامات قانونی و دقت لازم است. دقت به‌عداد آزمونه مثبت مشاهده شده در روش تقریبا مشابه بستگی دارد همان طور که دقت شمارش کلنی‌ها به‌تعداد کلنی‌ها بستگی دارد . دقت به‌صورت تابعی از جذر تعداد لوله‌های استفاده شده افزایش می‌یابد برای دو برابر شـــدن دقت، تعداد لوله‌ها باید چها برابر شـــود در روش‌هایی که فقط از تعداد کمی لوله‌های چند تایی استفاده می‌کنند، دقت کم است. از طرف دیگر، این روش‌ها در عمل، از حساسیت کافی (که به حجم کل نمونه آزمون شده بستگی دارد) برخوردار هستند. تفسیر ساده نتایج مثبت، مزیت مشخص و متمایز بیشتر روش‌های MPN است .

یادآوری۱- افزودن آزمونه نباید سبب تغییر محیط کشت شود و برای رشد میکروارگانیسم‌های مورد نظر مزاحمت ایجاد کند به طور معمول، آزمایه‌های کمتر از ۱mL به‌مقدار ۵ برابر یا بیشـتر از محیط کشـت با غلظت معمولی اضـافه می‌شـود. به‌طور معمول آزمایه‌های بین ۱mL تا ۱۰۰mL به‌حجم‌های مساوی از محیط کشت با غلظت دو برابر اضافه می‌شود . اگر نمونه دارای مقادیر زیاد

نمک‌های معدنی، مواد سمی یا مغذی که روی ر شد باکتری‌ها اثر می‌گذارد، نبا شد. روش‌های ک شت مایع معمولا مقادیر زیاد مواد جامد معلق را تحمل می‌کنند.

۳-۷-۱-۴-۲ انتخاب روش تلقیح

معمول‌ترین روش MPN که مورد استفاده قرار می‌گیرد استفاده از روش ۳ لوله‌ای یا ۵ لوله‌ای برای هر رقت است (به‌ویژه ۳ لوله‌ای) دقت کمی دارد. از کار برد روش سه لوله‌ای (به‌دلیل کم بودن دقت آن) برای غلظت‌های بالای میکروارگانیسم‌ها خودداری کنید برای افزایش دقت روش تو صیه می شود از روش ۵ لوله‌ای یا بیشتر ا ستفاده کنید.

۳-۷-۱-۴-۳ تلقیح در محیط کشت مایع

با رعایت شرایط سترون، حجم معینی از نمونه یا رقتی از آن را با توجه به‌روش انتخاب شده به‌لوله یا ارلن تلقیح کنید.

۳-۷-۱-۴-۴ آزمون وجود یا عدم وجود میکروارگانیسم‌ها

پس از تلقیح و گرمخانه گذاری یک آزمونه منفرد از نمونه در یک لوله دارای محیط کشت مایع و ایجاد علائم ظاهری رشد یک میکروارگانیسم مورد نظر در آن، تنها می‌توان به‌وجود و یا عدم وجود میکروارگانیسم مورد نظر در حجم نمونه آزمون، پی برد. در صورت نمونه برداری لحظه‌ای، نتیجه را به‌صورت "وجود" یا "عدم وجود میکروارگانیسم مورد نظر در میلی لیتر" بیان کنید. با این روش نمی‌توان: وجود" یا " عدم وجود" میکروارگانیسم در آزمونه دیگر و غلظت میکروارگانیسم مورد نظر را تخمین زد و همچنین امکان شمارش و تعیین غلظت میکروارگانیسم ها وجود ندارد.

۳-۸ رنگ آمیزی

۳-۸-۱ رنگ آمیزی گرم

۳-۸-۱-۱ تهیه گسترش روی لام:

ابتدا توسط آنس استریل از کلنی میکروارگانیسم درسطح محیط کشت را برداشته مورد نظر، ودرسرم فیزیولوزی ایزوتونیک موجود روی لام حل کنید. و یا توسط آنس حلقه‌ای، یک لوپ از سوسپانسیون میکروبی را برروی لام قرارداده وآن رابر روی سطح لام پخش کنید. بهتر است سوسپانسیون باکتری به صورت ورقه نازک ویکنواخت روی لام پخش شود. جهت جلوگیری از شسته شدن باکتری طی مراحل رنگ آمیزی بایستی باکتری تاحدودی به سطح لام بچسبد و فیکس شود. فیکس کردن به روش‌های متعددی انجام می‌شود. از ساده‌ترین روش‌ها، عبور دادن لام دارای گسترش برای چندین مرتبه از روی شعله چراغ بونزن[1] است. لام باید در حدی گرم شودکه درصورت تماس با پشت دست آن را نسوزاند.

۱- Bunsen burner

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 زمان۱min، صبر کنید تا رنگ در دیواره سلولی میکروب‌ها نفوذ کند.

۳-۸-۱-۳ مرحله شستشو:

پس از سپری شدن مدت زمان۱min ، رنگ اضافی روی لام را خالی کرده، در حالی‌که لام را به صورت مایل نگهداشته شده است با استفاده از آب مقطر به آرامی به‌مدت چند ثانیه سطح روی گسترش را شستشو شود.

۳-۸-۱-۴ مرحله اضافه کردن محلول ید:

با چند قطره از محلول ید[۱] روی گسترش را پوشانیده و به‌مدت زمان۱min، صبر کنید.

۳-۸-۱-۵ مرحله شستشو:

پس از سپری شدن مدت زمان۱min، در حالیکه لام را به‌صورت مایل نگهداشته‌اید با استفاده از آب مقطر به آرامی 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 بسرعت آن را بی‌رنگ کنید. دقت کنید مرحله بی‌رنگ سازی بیش از اندازه نباشد. بعد از آن لام را بسرعت بشوئید. این عمل، بی‌رنگ شدن را متوقف خواهد کرد.

۳-۸-۱-۷ رنگ آمیزی با محلول سافرانین:

در این مرحله سطح لام را با محلول سافرانین را با رنگ ثانویه یعنی سافرانین، به‌مدت زمان۱۰ sec بپوشانید سپس رنگ اضافی را خالی کرده و با آب مقطر لام را شستشو دهید.

۳-۸-۱-۸ خشک کردن لام:

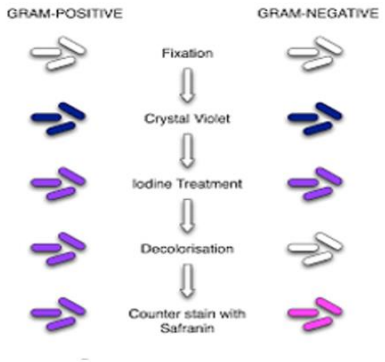
لام رنگ آمیزی شده را آهسته روی کاغذ خشک کن قرار دهید ولی کاغذ را روی گسترش نکشید.

۳-۸-۱-۹ مشاهده و تفسیر

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

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

۱- Iodine



شکل۲۱- مراحل روش رنگ آمیزی

یادآوری نکات مهم:

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

دقت شود هنگام تهیه گسترش روی لام از محیط کشت، سن کشت باکتری باید۲۴ h یا کمتر باشد. بنابر این در محیط کشت‌هایی که از عمر آنها گذشته و کهنه شده‌اند، در قابلیت نفوذ دیواره سلولی باکتری‌ها تغییراتی حاصل می‌شود که خاصیت گرم مثبت بودن را از دست می‌دهد.

۳-۸-۲ رنگ آمیزی شفر- بولتون

رنگ آمیزی شفر- بولتون یک رنگ آمیزی افتراقی است که برای مشاهده آندوسپور و سلول رویشی ابداع شده است. با استفاده از این روش، اسپور رنگ می‌گیرد و اسپورهای آزاد به‌آسانی قابل روئیت خواهند بود. در این روش برای نفوذ رنگ اولیه (مالاشیت گرین) به داخل پوشش اسپور از حرارت استفاده می‌شود . همان خصوصیاتی که رنگ آمیزی اسپور را مشکل می‌کند، رنگ را پس از نفوذ آن به داخل 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 بنا براین 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 لام و عبور شعله به‌تناوب از روی رنگ انجام دهید. وقتی که رنگ شروع به-بخار شدن کرد شعله را کنار ببرید همین که تبخیر متوقف شد دو بار کار را تکرار کنید و نگذارید رنگ بجوشد. مدت زمان۳min، تا مدت زمان۵min، به‌ترتیب ذکر شده عمل کنید و اگر مالاشیت گرین کاملا از روی لام تبخیر شد دوباره مقداری رنگ به‌لام اضافه کنید. بگذارید لام سرد شود تا از شکستن آن جلوگیری شود. به موازات سرد شدن لام به‌اضافه کردن رنگ ادامه دهید زیرا رنگ هنوز در حال تبخیر است.

۳-۸-۲-۳ مرحله شستشو:

رنگ اضافی روی لام را خالی کرده در حالی که لام را به‌صورت مایل نگهداشته‌اید با استفاده از آب مقطر به‌آرامی به‌مدت زمان۳۰ sec سطح روی گسترش را شستشو دهید.

۳-۸-۲-۴ رنگ آمیزی با سافرانین:

سطح گسترش میکروبی را با رنگ سافرانین. به‌مدت زمان۱min، بپوشانید.

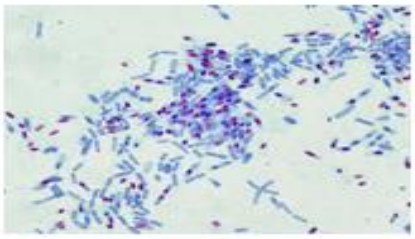
۳-۸-۲-۵ مرحله شستشو:

رنگ اضافی روی لام را خالی کرده. در حالی‌که مایل نگهداشته‌اید با استفاده از آب مقطر به‌آرامی به مدت زمان زمان۳۰ sec سطح روی گسترش را شستشو دهید.

۳-۸-۲-۶ مشاهده و تفسیر:

در مشاهده میکروسکوپی لام رنگ آمیزی شده، اسپورها گرد بیضی به‌رنگ سبز مشاهده می-شوند. و سلول‌های رویشی، قرمز دیده می‌شوند. چون اسپور پوشش مقاومی است که در برابر نفوذ رنگ مقاومت می‌کند بنابر این در رنگ آمیزی معمولی می 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.



شکل۲۲ – رنگ آمیزی اسپور

۳-۸-۳ رنگ آمیزی گرانول های ولوتین (دانه های متاکروماتیک) به‌روش آلبرت

رنگ آمیزی آلبرت یک رنگ آمیزی افتراقی است که برای مشاهده گرانول های ولوتین (دانه‌های متاکروماتیک) ابداع شده است. با استفاده از این روش، گرانول‌های ولوتین رنگ می‌گیرد و به‌آسانی قابل روئیت خواهند بود. اغلب برای تشخیص تشخیص باسیل *کورینه باکتریوم* (عامل بیماری دیفتری) و دیگر اعضا *کورینه باکتریوم*ها استفاده می شود.

ترتیب رنگ آمیزی گرانول های ولوتین (دانه های متاکروماتیک) به‌روش آلبرت به‌این شرح است:

۳-۸-۳-۱ تهیه گسترش روی لام:

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

۳-۸-۳-۲ رنگ آمیزی با آبی تولوئیدین / مالاشیت گرین[1]

مقداری از رنگ آبی تولوئیدین / مالاشیت گرین را با قطره چکان به‌روی سطح گسترش میکروبی روی لام بریزید. و به‌مدت زمان5min، صبر کنید. و رنگ اضافی روی لام را بدون شستشو دور بریزید.

۳-۸-۳-۳ رنگ آمیزی با پتاسیم یدید/ ید[2]:

سطح گسترش میکروبی را با رنگ یدور پتاسیم /ید به‌مدت زمان1min، بپوشانید.

۳-۸-۳-۴ مرحله شستشو:

رنگ اضافی روی لام را خالی کرده. در حالی که مایل نگهداشته‌اید با استفاده از آب مقطر به‌آرامی به مدت زمان۳۰ sec سطح روی گسترش را شستشو دهید. در هوا خشک کرده و توسط عدسی روغنی به مطالعه بپردازید.

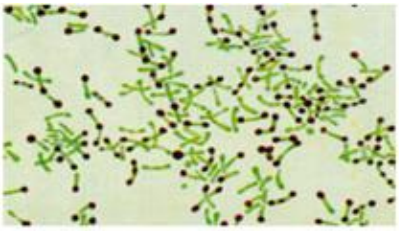
۳-۸-۳-۵ مشاهده و تفسیر

در مشاهده میکروسکوپی لام رنگ آمیزی شده، گرانول‌های متاکروماتیک در دو سر باکتری به‌رنگ سبز تیره تا سیاه و پیکر باکتری به‌رنگ سبز روشن مشاهده می‌گردند.

---

۱ - آبی تولوئیدین۰/۱۵g، سبز مالاشیت۰/۰۲g، الکل اتیلیک(۹۵٪)۲mL، آب مقطر۱۰۰mL

۲ - پتاسیم یدید(KI) ۳ g، ید۲g، آب مقطر۱۰۰ml



شکل ۲۳ - دانه‌های متاکرو ماتیک

۴ نمونه برداری

نمونه‌هایی که به آزمایشگاه ارسال می‌شود، باید نماینده واقعی کل کالا بوده و در طی حمل، جابجائی و نگه داری آن صدمه ندیده و یا تغییرات فیزیکی و شیمیایی در آن ایجاد نشده باشد. نمونه‌ها باید در شرایطی نگه داری شوند که امکان رشد میکروارگانیسم‌ها در آن وجود نداشته باشد. همچنین، در صورت عدم مطابقت نمونه با مندرجات نامه، نقص در بسته بندی، کافی نبودن مقدار نمونه، مشاهده آثار ظاهری رشد میکروبی، شرایط نامناسب حمل به‌آزمایشگاه، ، نامناسب بودن درجه حرارت نمونه‌ها، سپری شدن تاریخ مصرف، عدم وجود استاندارد میکروبی، قابلیت انجام آزمون میکروبیولوژی را دارا نبوده و به‌رسال کننده عودت داده می‌شود. برای کسب آگاهی‌های بیش‌تر از شرایط کلی نمونه برداری 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 این روش نمونه‌برداری از سه فاکتورn، c، m استفاده می‌شود. در این روش معیار میکروبیولوژی، m می‌باشد در صورتی که هر ویژگی میکروبی ارزشی کمتر از m داشته باشد و تعداد واحدهای معیوب کمتر از c باشد، قابل قبول است.

۴-۲ نمونه برداری سه کلاسه:

در این روش نمونه برداری، علاوه بر از سه فاکتورn، c، m از فاکتورM نیز.استفاده می‌شود. اساس این روش بر شمارش ما بین m و M است و ارزش‌های ما بین m و M در صورتی که c صفر نباشد قبول است و بالاتر از M غیر قابل قبول است.

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

c -بیشترین واحدهای معیوب (نقص‌دار) قابل اغماض می‌باشد در مورد میکروارگانیسم‌هایی که وجود آنها در ماده غذایی یا فرآورده، خطر آفرین است c برابر صفر می‌باشد (این فاکتور بسته به‌تعداد کل نمونه‌ها، نوع عیب و سطح کیفیت قابل پذیرش تعیین می‌گردد).

m -معیار میکروبیولوژی است که هر ویژگی با ارزش برابر یاکمتر از آن قابل قبول است.در مورد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا m برابر صفر است.

M -معیار میکروبیولوژی است که حداکثر آستانه پذیرش هر ویژگی میکروبی را نشان می‌دهد و هر ارزش برابر یا بالاتر از M غیر قابل قبول است. این معیار در مورد میکروارگانیسم‌هایی که وجود تعداد کمی از آنها در مواد غذا برای سلامتی مخاطره آمیز نمی‌باشد به‌کار می‌رود و برای این میکروارگانیسم‌ها ارزش‌های ما بین M و m قابل قبول می‌باشد.

۵ روش‌های آزمون میکروبیولوژی انواع فرآورده‌های لبنی غیرتخمیری

روش‌های آزمون میکروبیولوژی انواع فرآورده‌های لبنی غیر تخمیری در جدول‌های ۳ تا ۲۰ زیرآورده شده است:

جدول۳- روش ازمون میکروبیولوژی شیر خام(ممتاز، درجه ۱، درجه ۲، درجه ۳)

ردیف	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲
۲	تعدادیاخته‌های پیکری[۱]	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵۰۲۸
- این ویژگی‌ها برای شیرخام گاو، گوسفند، بز و شتر نیز الزام گردیده است. - تصمیم گیری در خصوص شیر خام دارای شمارش کلی میکروارگانیسم های بالاتر از ۱۰^۶ بر عهده مرجع ذی صلاح و قانونی کشور است. درحال حاضر مرجع ذی صلاح و قانونی کشور سازمان دامپزشکی کشور می¬باشد. ۱-Somatic cells		

جدول ۴- شیرپاستوریزه[۱] با ماندگاری بالا

ردیف	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲
۲	کلی فرم الف	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶و۹۲۶۳
۳	اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶
۱- شامل ویژگی‌های میکروبی انواع شیر پاستوریزه با ماندگاری بالا، غنی شده و رژیمی مانند شیرکم لاکتوز و بدون لاکتوز می‌باشد. الف- در این استاندارد استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶روش مرجع می¬باشد		

جدول۵- شیر پاستوریزه و شیر (باز ساخته[۱] - باز ترکیبی[۲]) پاستوریزه

ردیف	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲
۲	کلی فرم الف	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶و۹۲۶۳
۳	اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶
یاد آوری- ویژگی‌های میکروبی انواع شیر پاستوریزه غنی شده و رژیمی مانند شیرکم لاکتوز و بدون لاکتوز، مطابق شیر پاستوریزه تازه می‌باشد. ۱ - شیر باز ساخته حاصل افزودن آب به پودر شیر پس چرخ (SMP) یا پودر شیر کامل (WMP) می‌باشد. ۲ - شیر بازترکیبی فرآورده‌ای است حاصل از اختلاط چربی شیر و مواد جامد بدون چربی شیر (MSNF) با افزودن آب به آن به نحوی که ترکیب فرآورده شیری مناسب با نوع کاربرد آن باشد. الف – در این استاندارد استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶ روش مرجع می¬باشد.		

جدول۶- شیر طعم دار پاستوریزه

ردیف	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲
۲	انترو باکتریاسه [الف]	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲ و ۱-۲۴۶۱
۳	اشریشیا کلی	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶
٤	کپک و مخمر	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۰۱۵۴
الف- در این استاندارد، استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۲۴۶۱روش مرجع می‌باشد.		

جدول۷- انواع شیر پاستوریزه و فرآورده های تغلیظ شده / شیر تغلیظ شده شیرین[1]

ردیف	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲
۲	انترو باکتریاسه [الف]	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲ و ۱-۲۴۶۱
۳	اشریشیا کلی	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶
٤	کپک و مخمر	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۰۱۵۴
	مخمر اسموفیلیک	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۱۹۶
الف- در این استاندارد، استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۲۴۶۱روش مرجع می‌باشد. ۱-حد مجاز کمتر از ده مربوط به شمارش کپک می‌باشد.		

جدول۸- خامه پاستوریزه یا ماندگاری بالا

ردیف	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	گرمخانه گذاری در دمای $30^{0}C$ به مدت ۳ روز یا گرمخانه گذاری در دمای $37^{0}C$ به مدت ۲ روز	-
۲	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲
۳	کلی‌فرم [الف]	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶و۹۲۶۳
٤	اشریشیا کلی	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶
۵	استافیلوکوکوس کواگولاز مثبت	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳-۰۶-۶۸
الف- در این استاندارد، استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶روش مرجع می‌باشد. یاد آوری- چنانچه در طی دوران گرمخانه گذاری در نمونه بادکردگی و نشتی مشاهده شود، این نمونه غیر قابل قبول است و آزمون کشت میکروارگانیسم‌ها بر روی آنها صورت نمی گیرد		

جدول ۹- انواع خامه طعم دار

ردیف	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲
۲	آنتروباکتریاسه [الف]	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲و۱-۲۴۶۱
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 ۱-۲۴۶۱ روش مرجع می‌باشد.		

جدول ۱۰- انواع خامه پاستوریزه[۱]

ردیف	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲
۲	کلی فرم [الف]	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶و۹۲۶۳
۳	اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶
۴	استافیلو کوکوس کواگولاز مثبت	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳-۶۸۰۶
۱-خامه پاستوریزه شامل انواعی است که در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۹۱ ذکر شده است. الف- در این استاندارد استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶ روش مرجع می‌باشد.		

جدول۱۱- انواع کره[۱]

ردیف	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	کلی فرم‌ها	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۲۶۳
۲	اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶
۳	استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز مثبت	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳- ۶۸۰۶
۴	میکروارگانیسم‌های سرماگرا	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۴۵۱
۵	کپک و مخمر	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۰۱۵۴
۱-برای آماده سازی کره به استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ – ۸۹۲۳ مراجعه کنید.		

جدول۱۲- انواع شیر، انواع خامه و دسرهای شیری فرادما(UHT)

ردیف	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	گرمخانه گذاری در°C ۳۰ به مدت ۱۰ روز	-
۲	گرمخانه گذاری در°C ۵۵ به مدت ۷ روز	-
۳	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در°C ۳۰ از نمونه ردیف ۱	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲
۴	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در°C ۵۵ از نمونه ردیف ۲	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲
یادآوری -چنانچه در طی دوران گرمخانه‌گذاری در نمونه‌ها یادکردگی و نشتی و یا دو قاز شدن مشاهده شود، این نمونه‌ها غیرقابل قبول است و آزمون کشت میکروارگانیسم‌ها بر روی آنها صورت نمی‌گیرد.		

جدول۱۳- انواع دسر پاستوریزه و پاستوریزه با ماندگاری طولانی و انواع بستنی[1] دارای مغزهای خوراکی و میوه

ردیف	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲
۲	آنتروباکتریاسه [الف]	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲و۱-۲۴۶۱
۳	اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶
۴	استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز مثبت	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳- ۶۸۰۶
۵	سالموتلا	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۸۱۰
۶	کپک و مخمر	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۰۱۵۴

۱- شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در بستنی پروبیوتیک و تخمیری طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۲۴۸ انجام می‌شود.
الف- در این استاندارد استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۲۴۶۱ روش مرجع می‌باشد.

جدول ۱۴- خامه پاستوریزه طعم دار با ماندگاری بالا

ردیف	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	گرمخانه گذاری در دمای ۲۵ °C به مدت ۴- ۳ روز یا گرمخانه گذاری در دمای ۳۰ °C به مدت ۳- ۲ روز	-
۲	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲
۳	آنتروباکتریاسه [الف]	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲و۱-۲۴۶۱
۴	اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶
۵	استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز مثبت	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳-۶۸۰۶
۶	کپک و مخمر [ب]	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۰۱۵۴

یادآوری-چنانچه در طی دوران گرمخانه گذاری در نمونه‌ها یادکردگی و نشتی و یا دو قازشدن مشاهده شود، این نمونه‌ها غیر قابل قبول است و آزمون کشت میکروارگانیسم‌ها بر روی آنها صورت نمی‌گیرد.
الف- در این استاندارد استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۲۴۶۱ روش مرجع می‌باشد.
ب- شمارش کپک و مخمر درخامه پاستوریزه طعم دار یا ماندگاری بالا در صورت وجود تکه‌های میوه و یا مغزهای خوراکی الزامی است.

جدول۱۵- انواع شیرخشک

ردیف	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲
۲	کلی فرم‌ها [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

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

جدول ۱۶- انواع دسرپاستوریزه با ماندگاری بالا[1]

ردیف	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	گرمخانه گذاری در دمای ۳۰ °C به مدت ۳ روز یا گرمخانه گذاری در درمای۳۷ °C به مدت ۲روز	-
۲	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲
۳	آنتروباکتریاسه الف	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲و۱-۲۴۶۱
۴	کلی فرم ب	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۲۶۳و۱۱۱۶۶
۵	اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶
۶	استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز مثبت	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳-۶۸۰۶
۷	کپک و مخمر ب	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۰۱۵۴

یادآوری-چنانچه در طی دوران گرمخانه گذاری در نمونه‌ها یادکردگی و نشتی و یا دو قازشدن مشاهده شود، این نمونه‌ها غیر قایل قبول است و آزمون کشت میکروارگانیسم‌ها بر روی آنها صورت نمی‌گیرد.

الف- در این استاندارد استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۲۴۶۱ روش مرجع می‌باشد.

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

پ- شمارش کپک و مخمر در انواع دسر یا ماندگاری بالا در صورت وجود تکه‌های میوه و یا مغزهای خوراکی الزامی است.

جدول ۱۷- انواع بستنی[1]

ردیف	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲
۲	آنتروباکتریاسه الف	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ شمارهٔ ۲و۱-۲۴۶۱
۳	اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶
۴	استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز مثبت	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳- ۶۸۰۶
۵	سالمونلا	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۸۱۰

۱- شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در بستنی پروبیوتیک و تخمیری طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۲۴۸ انجام می‌شود.

الف- در این استاندارد استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۲۴۶۱ روش مرجع می‌باشد.

جدول ۱۸- شیر پاستوریزه طعم دار با ماندگاری بالا[1]

ردیف	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲
۲	آنتروباکتریاسه الف	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲و۱-۲۴۶۱
۳	اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶

الف- در این استاندارد استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۲۴۶۱ روش مرجع می باشد.

یادآوری- شمارش کپک و مخمر درخامه پاستوریزه طعم‌دارباماندگاری بالاو انواع دسردر صورت وجود تکه های میوه و یا مغزهای خوراکی الزامی است.

جدول ۱۹- روش آزمون میکروبیولوژی پودر خامه و شیرخشک فوری

ردیف	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲
۲	کلی فرم ها [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
الف- در این استاندارد استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶روش مرجع می‌باشد.		

جدول ۲۰- روش آزمون میکروبیولوژی انواع پودر شیر کاکائو و شیر قهوه

ردیف	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲
۲	آنتروباکتریاسه [الف]	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲و۱- ۲۴۶۱
۳	اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۹۴۶
۴	استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳- ۶۸۰۶
۵	سالمونلا	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۸۱۰
الف- در این استاندارد استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۲۴۶۱ روش مرجع می‌باشد.		

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

۵-۱ اصول آزمون

الف- شمارش

برای ارزیابی کیفیت میکروبی و/ یا ایمنی فرآورده تنها شناخت میکروارگانیسم‌های موجود در آنها کافی نیست و در بیشتر موارد،کمیت میکروارگانیسم‌ها هم به‌همان اندازه حائز اهمیت است که باعث ضرورت شمارش میکروارگانیسم‌ها می‌شود. شمارش میکروارگانیسم‌ها به‌روش‌های مختلف انجام 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)

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

ب-۱ اساس روش جستجو

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

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

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

۶ محیط‌های کشت و رقیق‌کننده‌ها

دستورالعمل‌های کلی برای تهیه محلول‌های رقیق‌کننده و محیط‌های کشت در استانداردهای ملی ایران شماره‌های ۱-۸۹۲۳، ۲-۸۹۲۳، ۳-۸۹۲۳، ۴-۸۹۲۳ ، ۵- ۸۹۲۳ و ۹۸۹۹ تعیین شده است.

یادآوری- برای اطلاعات بیشتر از اصطلاحات و تعاریف به‌استاندارد ملی ایران شماره ۱-۸۹۲۳ مراجعه کنید.

اطلاعات مربوط به‌اصطلاحات، برای استفاده در استانداردها در آدرس‌های زیر وجود دارد:

- IEC Elecrtopedia قابل دسترسی در سایت http://www.elecrtopedia.org
- پلت فرم جستجوگر آنلاین ISO قابل دسترسی در سایت http://www.iso.org/obp/

جدول ۲۱–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 می شود. 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 می‌شود) . 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 ۲۲ – لیست محیط های 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) Xylose lysine desoxycholate agar (XLD) Bismuth sulfite agar (BS) Brilliant Green agar (BG) Nutrient agar Triple sugar/iron agar (TSI) 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 آماده سازی و دست کاری نمونه باید رعایت شرایط اسپتیک و تجهیزات سترون انجام شود.

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

یادآوری۱- برای اطلاعات بیشتر در باره تهیه فرآورده‌های اسیدی قبل از آزمون برای گروه‌های خاص میکرو ارگانیسم‌هایی 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 زیر بند ۳-۷-۱ این جزوه آموزشی انجام دهید.

۷-۱-۲ گرمخانه گذاری

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

یادآوری۶ - نمونه‌هایی که در طول مدت گرمخانه گذاری 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

۷-۲ شمـــارش کلـــی میکـــروارگانیســـم‌هـــای هـــوازی

۷-۲-۱ اســـتاندارد ملـــی ایـــران شـــمارهٔ ۱-۵۲۷۲، میکروبیولـــوژی زنجیـــره غـــذایی -روش جـــامع بـــرای شـــمارش میکروارگانیســـم‌هـــا-قســـمت ۱- شـــمارش کلنـــی در ۳۰درجـــه ســـانتی گراد با استفـــاده از روش کشـــت آمیختـــه

شمارش میکروارگانیسم‌های هوازی مزوفیل متداولترین روش جهت نشان دادن کیفیت میکروبی محصول است و مبنای قضاوت بهداشتی یک محصول تولید شده می‌باشد ولی ارزش تشخیصی آن محدود است.این روش در تعیین شرایط بهداشتی و کنترل تولید، شرایط حمل و نقل و نگهداری محصول، تعیین میزان آلودگی ماده اولیه یا تشخیص احتمالی آلودگی در ضمن تولید حائز اهمیت است.

۷-۳ شمارش میکروارگانیسم‌های سرماگرا

۷-۳-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۶۲۹، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – شمارش میکروارگانیسم‌های سرماگرا [۱]

فساد به معنای تخریب بافت، رنگ، بو یا طعم مواد غذایی است که از نظر مصرف کننده نامطلوب است، فساد میکروبی غذا اغلب شامل تجزیه پروتئین‌ها، چربی‌ها توسط میکروارگانیسم‌ها یا آنزیم‌های آنها است. در شیر میکروارگانیسم‌هایی که عمدتاً در فساد نقش دارند، میکروارگانیسم‌های سایکروتروف یا میکروارگانیسم‌های سرماگرا هستند. به‌طورکلی میکروارگانیسم‌های عامل فساد از طریق مصرف مواد مغذی مورد نیاز،مانند: لاکتوز، پروتئین، چربی‌ها و سایر مواد، موجب ایجاد رنگ و طعم نامطلوب در فرآورده می‌شوند.

میکروارگانیسم‌های سرماگرا، شامل، طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها نظیر پسودوموناس، *اکروموباکتر*، *فلاوباکتریوم*، *آلکالی ژنز*، کپک‌ها و مخمرها هستند، که در دمای زیر $15\ ^{\circ}C$ به‌راحتی رشد می‌کنند و حتی در دمای $4\ ^{\circ}C$ نیز قادر به‌رشدند.

دمای اپتیمم رشد میکروارگانیسم‌های سرماگرا $20\ ^{\circ}C$ تا $30\ ^{\circ}C$ است. این میکروارگانیسم‌ها از عمده‌ترین عوامل فساد گوشت و فرآورده‌های آن، شیر و فرآورده‌های آن و سبزی‌های نگهداری شده در دمای یخچال محسوب می‌شوند. اغلب آنها طی فرآیند پاستوریزاسیون از بین می‌روند، اما برخی از آنها مثل *پسودوموناس فلورسنس* و *پسودوموناس فراجی* آنزیم‌های لیپولیتیک و پروتئولیتیک مقاوم به‌حرارت تولید می‌کنند و عامل ایجاد عطر وطعم نامطلوب و تغییرات فیزیکوشیمیایی حتی در شیر استریل می‌شوند، به‌عنوان مثال: از طریق هیدرولیز پروتئین‌ها ایجاد طعم تلخی می‌کنند. جمعیت میکروبی دمای سرد را در درجه اول پسودوموناس، اسینتوباکتر و موراکسلا تشکیل می‌دهند و از خانواده آنتروباکتریاسه: آنتروباکتر و کلبسیلا نیز به جمع میکروبی فوق اضافه می‌شود.

اغلب دمای یخچال بین $4\ ^{\circ}C$ تا $8\ ^{\circ}C$ است که در این محیط، رشد باکتری‌ها کند خواهد بود، اما برخی از باکتری‌های سرماگرا، مانند *یرسینیا*، *لیستریا مونوسیتوژنز* می‌توانند در دمای پایین و حتی در یخچال رشد کند.

این میکرارگانیسم‌ها تحت شرایط تعیین شده در این استاندارد، کلنی‌های قابل شمارش تشکیل می‌دهند.

۱- Psychrotroph

محیط کشت

- **Plate Cont Agar (PCA)**

↓

آماده سازی، تهیه آزمونه و سوسپانسیون اولیه و رقت

برای پیشگیری از صدمه به میکروارگانیسم‌های سرماگرا و به‌علت کاربرد محیط کشت خیلی گرم، روش کشت سطحی توصیه شده است.

روش انجام آزمون

کشت سطحی از رقت‌های مناسب روی سطح پلیت‌های از پیش ریخته Plate Cont Agar (PCA)

از هر یک از رقت‌های انتخابی ۰/۱ mL برای تلقیح در دو پلیت آگار جداگانه استفاده کنید.

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.

↓

گرمخـــــــــانه گـــــــــذاری

(۱۰ d / ۶/۵°C) یـــــا (۲ d / ۲۱°C) یـــــا (۳ d / ۱۸ °C)

↓

شمارش کلنی‌ها

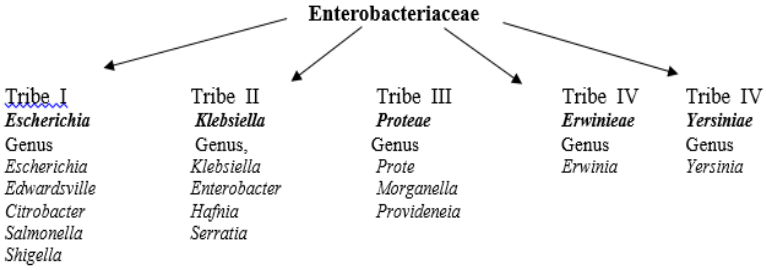
تعداد کلنی در همه پلیت‌های دارای بیش از ۳۰ کلنی و کمتر از ۳۰۰ کلنی، شمارش شود.

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

۴-۷ جستجو، شناسایی و شمارش آنتروباکتریاسه

۱-۴-۷ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱- ۲۴۶۱، میکروبیولوژی زنجیره غذایی- روش جامع برای جستجو، شناسایی و شمارش انتروباکتریاسه- قسمت ۱: جستجوی آنتروباکتریاسه

این خانواده شامل باسیل و کوکوباسیل گرم منفی،متحرک و اکسیداز منفی است و به‌دلیل اینکه اکثر آنها ساکن مجاری گوارشی انسان و حیوان هستند به‌این گروه باسیل روده‌ای نیز گفته می شود.این باکتری‌ها بی هوازی اختیاری بوده و هم عمل تنفس و هم تخمیر را انجام می دهند.کربوهیدرات‌ها بویژه گلوکز را تخمیر کرده و اسید و گاهی گاز تولید می‌کنند. اما خصوصیت کلیدی در تشخیص آنها تخمیر لاکتوز است و براین اساس آنها را به‌دو دسته لاکتوز مثبت و لاکتوز منفی تقسیم می‌کنند. اکثر جنس‌های این خانواده بزرگ ساپروفیت هستند ولی جنس های بیماری‌زا نظیر سالمونلا[۱]، شیگلا[۲]، یرسینیا[۳] و اشریشیا [۴]، پروتئوس[۵]، انتروباکتر[۶]، سراشیا[۷]، سیترو باکتر[۸] و کلبسیلا[۹] در بین آنها دیده می‌شود. روش ارائه شده در استاندارد شماره ۱-۲۴۶۱ بر اساس مشاهده کلنی‌های شاخص روی محیط کشت جامد ویولت رد بایل گلوکز آگار[۱۰] (VRBG) و آزمون‌های تاییدی اکسیداز و واکنش تخمیر می‌باشد.



شکل ۲۴- طبقه بندی انتروباکتریاسه

۱-*Salmonella*
۲-*Shigella*
۳-*Yersinia pestis*
۴-*Escherichia coli*
۵-*Proteus*
۶-*Enterobacter*
۷-*Serratia*
۸-*Citrobacter*
۹-*Klebsiella*
۱۰-*Violet Red Bile Glucose* agar (VRBGA)

محیط کشت‌ها

- **Violet neutral red bile lactose agar (VRBG)**
- **Buffered peptone water (BPW)**
- **Buffered brilliant green bile glucose broth (BGBG)**
- **Nutrient agare, Glucose agar. Oxidas Reagent**

۱-روش آزمون جستجو و شناسایی

↓

آماده سازی، تهیه آزمونه و غنی سازی

انتقال (۱۰ g) آزمونـه بـــه (۹۰ mL) BPW

↓

گرمخـــــــــــــــانه گـــــــــــــــــذاری

۱۸h ±۲h / ۳۷ °C

با استفاده از حلقه کشت از محیط غنی سازی شده به‌محیط کشت انتخابی کشت دهید.

کشت خطی در محیط از پیش ریخته VRBG

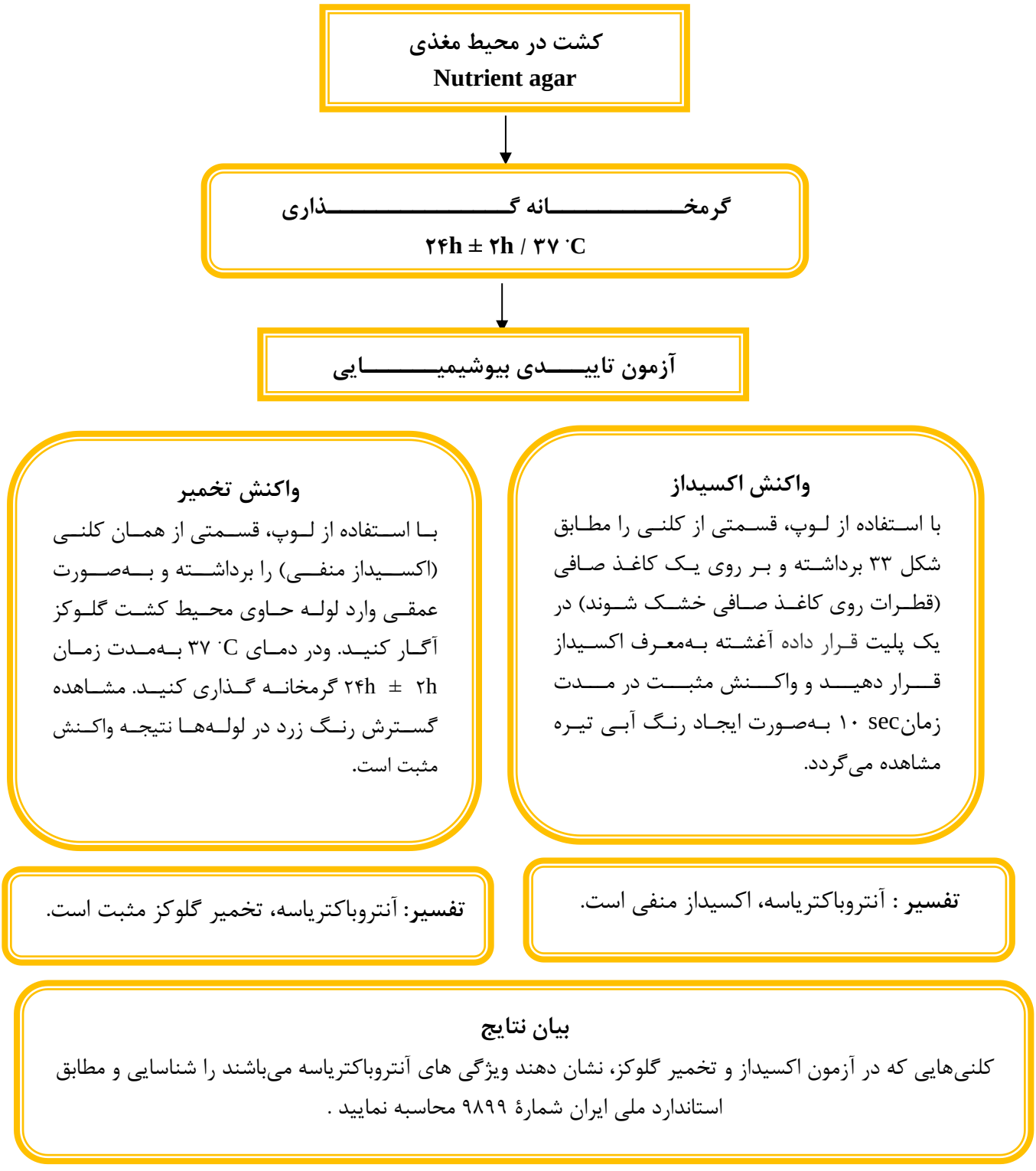
↓

گرمخـــــــــــــــانه گـــــــــــــــــذاری

۲۴h ± ۲h / ۳۷ °C

- **خصوصیات کلنی آنترو باکتریاسه در محیط VRBG**
  - کلنی‌های صورتی، قرمز یا ارغوانی و به‌ندرت کلنی‌های بی‌رنگ
  - احااطه شده با رسوب یا بدون رسوب

- اگر بیش از یک کلنی مشخص از نظر ظاهری وجود داشته باشد یک کلنی از هر مرفولوژی را برای کشت مجدد انتخاب کنید . در صورت عدم مشاهده کلنی مشخص از کلنی‌های متمایل به‌سفید را برای تایید انتخاب کنید .



۲-روش آزمون شما ش ***(Most probable number method)*** MPN

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

آماده سازی، تهیه آزمونه و پیش غنی سازی

انتقال ۱۰ mL آزمونه به ۹۰ mL آب پپتون بافری (BPW)

شکل ۲۵ - سوسپانسیون اولیه (رقت اولیه)

یادآوری–در هر۱۰ mL از رقت 10^{-1}، معادل ۱ گرم نمونه وجود دارد.

تلقیح و گرمخانه گذاری

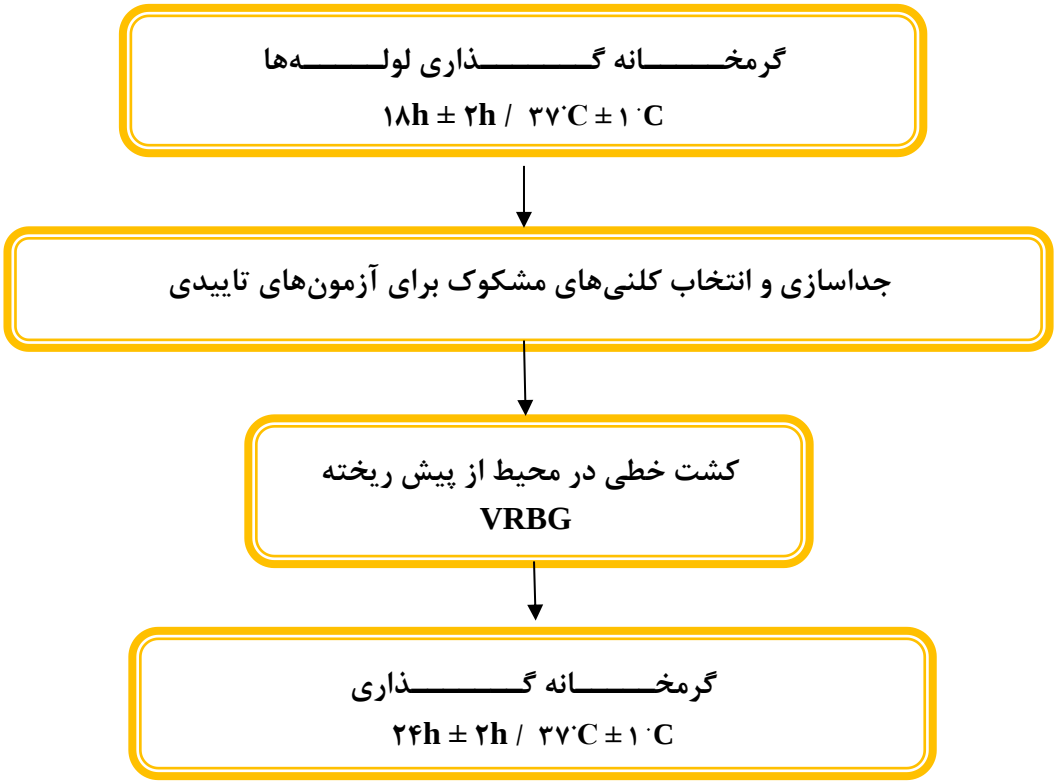
- مقدار۱۰mL ×۳ از سوسپانسیون اولیه را به‌سه لوله آزمایش، انتقال دهید.
- مقدار۱ mL ×۳ از سوسپانسیون اولیه را به‌سه لوله دارای۹ mL آب پپتونه بافری بیفزایید. و رقت 10^{2} را تهیه کنید.
- مقدار۱ mL ×۳ از رقت 10^{2} بدست آمده را به‌سه لوله آزمایش دارای۹ mL آب پپتونه بافری بیفزایید و رقت 10^{3} را تهیه کنید.

شکل ۲۶- تلقیح ۱ ml از رقت بعدی به ۹ml Buffered peptone water

شکل۲۷-تلقیح ۱ ml از رقت اولیه به ۹ml Buffered peptone water

شکل ۲۸- تلقیح ۱۰ ml از رقت اولیه به ۳ لوله آزمایش

- در صورت نیاز رقت‌های دهدهی را تهیه 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.



- **خصوصیات کلنی آنترو باکتریاسه فرضی در محیط VRBG**

کلنی‌های صورتی، قرمز یا ارغوانی و احاطه شده با رسوب یا بدون رسوب

به‌ندرت کلنی‌های بی‌رنگ

بعضی از آنترو باکتریاسه‌ها ممکن است بر روی محیط کشت، کلنی‌های بی‌رنگ داشته باشند، در صورت عدم مشاهده کلنی مشخص از کلنی‌های متمایل به‌سفید را برای تایید انتخاب کنید.

شکل۲۹ - محیط کشت VRBC

شمارش و انتخاب کلنی‌ها برای تایید
کشت مجدد در محیط مغـــذی
Nutrient agar
گرمخـــــــــانه گـــــــــــذاری
۲۴h ± ۲h / ۳۷ °C
آزمون تـــاییدی بیـــوشیمیـــایی
واکنش اکسیداز[1]
بـا اسـتفاده از لـوپ، قسـمتی از کلنـی را برداشته و بر روی یـک کاغـذ صـافی (قطـرات روی کاغـذ صـافی خشـک شـوند) در یـک پلیـت قـرار داده آغشـته بـه‌معـرف اکسـیداز قرار دهید. مشاهده رنـگ آبـی تیـره در مـدت زمـــان sec ۱۰ ، نتیجـــه واکـــنش اکسیداز مثبت است.
واکنش تخمیر
با استفاده از لوپ، قسمتـی از همان کلنـی (اکسـیداز منفـی) را برداشـته و بـه‌صـورت عمقـی وارد لوله حـاوی محـیط کشـت گلـوکز آگـار کنیـد. و در دمـــای ۳۷ °C بـــه‌مـــدت زمـــان ۲۴h±۲h گرمخـــانه گـــــذاری کنیـد. گسـترش رنـگ زرد در لوله‌ها نتیجه واکنش تخمیر، است.

شکل ۳۰- واکنش تخمیر

- **تفسیر واکنش اکسیداز :**
  - آنترو باکتریاسه،کسیداز منفی است.
- **تفسیر واکنش تخمیر :**
  - آنترو باکتریاسه، تخمیر گلوکز مثبت است.

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

- **تعیین مقادیر MPN:**

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

۷-۵ شمارش آنتـــــرو باکتـــریاســـــه

۷-۵-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲-۲۴۶۱، میکروبیـــولـــوژی زنجیر غذایی - روش جامع برای جستجو ،شناسایی و شمارش آنتـــروباکتـــریاســـه-قسمت دوم-روش شمارش کلنی

آنتروباکتریاسه به‌میکروارگانیسم‌هایی گفته می‌شود که طبق روش ارائه شده در استاندارد شمارهٔ ۲-۲۴۶۱ کلنی‌های شاخص روی محیط کشت جامد ویولت رد بایل گلوکز آگار (VRBG) تولید کند و واکنش اکسیداز آنها منفی و قادر به‌تخمیر گلوکز باشند.

محیط کشت‌ها

- **Violet neutral red bile lactose agar (VRBG)**
- **Buffered peptone water**
- **Nutrient agare**
- **Glucose agar , Oxidas Reagent**

آماده سازی، تهیه آزمونه و سوسپانسیون اولیه و رقت

انتقال آزمونه (۱۰ mL) به ۹۰ mL آب پپتون بافری (BPW)

شکل ۳۱- سوسپانسیون اولیه (10^{-1})

یادآوری – در هر mL ۱۰ از سوسپانسیون اولیه (رقت 10^{-1})، معادل g ۱ یا mL ۱ نمونه وجود دارد.

روش انجام آزمون شمارش : پور پلیت

-با استفاده از پی‌پت سترون ۱mL از آزمایه (فرآورده‌های مایع) و یا ۱mL از سوسپانسیون اولیه (سایر فرآورده‌ها) را بطور جداگانه به‌دو پتری دیش سترون تلقیح کنید.

-در صورت لزوم رقت‌های بعدی را تهیه کرده و در پتری دیش‌های سترون تلقیح کنید.

محیط کشت VRBG

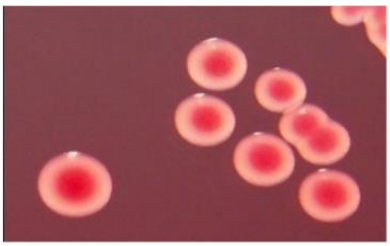
به‌منظور جلوگیری از گسترش رشد کلنی‌ها و ایجاد شرایط نیمه بی‌هوازی، بعد از اینکه محیط کشت کاملاً بسته شد مجددا یک لایه از محیط کشت VRBG با دمای ۴۴ °C تا ۴۷ °C به‌پلیت‌ها اضافه کنید اجازه دهید تا محیط کشت جامد شود.

گرمخانه گذاری

۲۴h ± ۲h / ۳۷°C ± ۱ °C

یاد آوری- دمای گرمخانه گذاری ۳۷ °C یا ۳۰ °C، برای غنی سازی و جداسازی / شمارش، روی محیط-های کشت پلیت شده، معمولا هنگامی مورد استفاده قرار می‌گیرد که جستجو و شناسایی و شمارش آنتروباکتریاسه به‌عنوان یک شاخص بهداشتی مطرح است. هنگامی جستجو و شناسایی یا شمارش آنتروباکتریاسه، برای اهداف فناوری انجام می‌شود و شامل شمارش آنترو باکتریاسه‌های سرما گرا است، به طور جایگزین می‌توان دمای ۳۰ °C را انتخاب کرد. در این استاندارد، دمای گرمخانه گذاری ۳۷ °C است.

- **خصوصیات کلنی آنترو باکتریاسه در محیط VRBG**
  - کلنی‌های صورتی، قرمز یا ارغوانی، احاطه شده با رسوب یا بدون رسوب
  - بعضی از آنتروباکتریاسه‌ها ممکن است بر روی محیط کشت، کلنی‌های بی‌رنگ داشته باشند، در صورت عدم مشاهده کلنی مشخص از کلنی‌های متمایل به‌سفید را برای تایید انتخاب کنید .



شکل ۳۲- محیط کشت VRBC

شمارش و انتخاب کلنی‌ها برای تایید

پلیت‌های دارای کمتر از ۱۵۰ کلنی مشخص را انتخاب کنید و آنها را شمارش کنید سپس کمینه ۵ کلنی با خصوصیات آنترو باکتریاسه را انتخاب کنید.

↓

آزمون تـــاییدی

↓

کشت در محیط مغذی
Nutrient agar

آزمـــون تاییـــــدی بیـــــــوشیمیـــایـــی

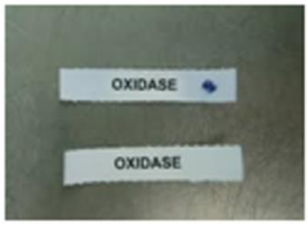
↓ ↓

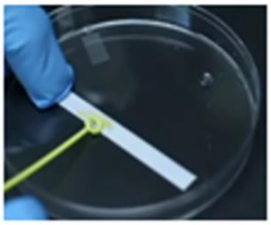
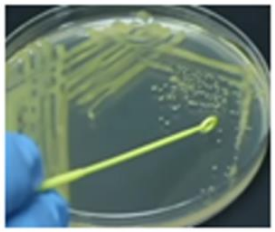
واکنش اکسیداز

با اسـتفاده از لـوپ، قسـمتی از کلنـی را برداشـته و بـر روی یـک کاغـذ صـافی (قطـرات روی کاغـذ صـافی خشـک شـوند) در یـک پلیـت قـرار داده آغشـته بـه‌معـرف اکسـیداز قـرار دهیـد واکـنش مثبـت در مـدت زمـان۱۰ sec بـه‌صـورت ایجـاد رنگ آبی تیره مشاهده می‌گردد.

واکنش تخمیر

با اســتفاده از لوپ، قســمتی از همان کلنی (اکسیداز منفی) را برداشته و به‌صورت عمقی در لوله‌های حاوی محیط کشـــت گلوکز OF آگار کشـــت دهید. ســطح یکی از لوله‌ها را با حداقل ۱cm از روغن معدنی سترون بپوشانید.



شکل ۳۳-آزمون اکسیداز

- **تفسیر:**
  - آنتروباکتریاسه، اکسیداز منفی است.
- **تفسیر:**
  - آنتروباکتریاسه، گلوکز تخمیر می‌کند. (مشاهده رنگ زرد در سرتا سر لوله، نشاندهنده واکنش مثبت است)
- **مشاهده میکروسکوپی:**
  - آنتروباکتریاسه‌ها معمولا به‌اشکال میله‌ای ۱-۵ µm و گرم منفی هستند.

شکل ۳۴-آنتروباکتریاسه

شمارش کلنی ها

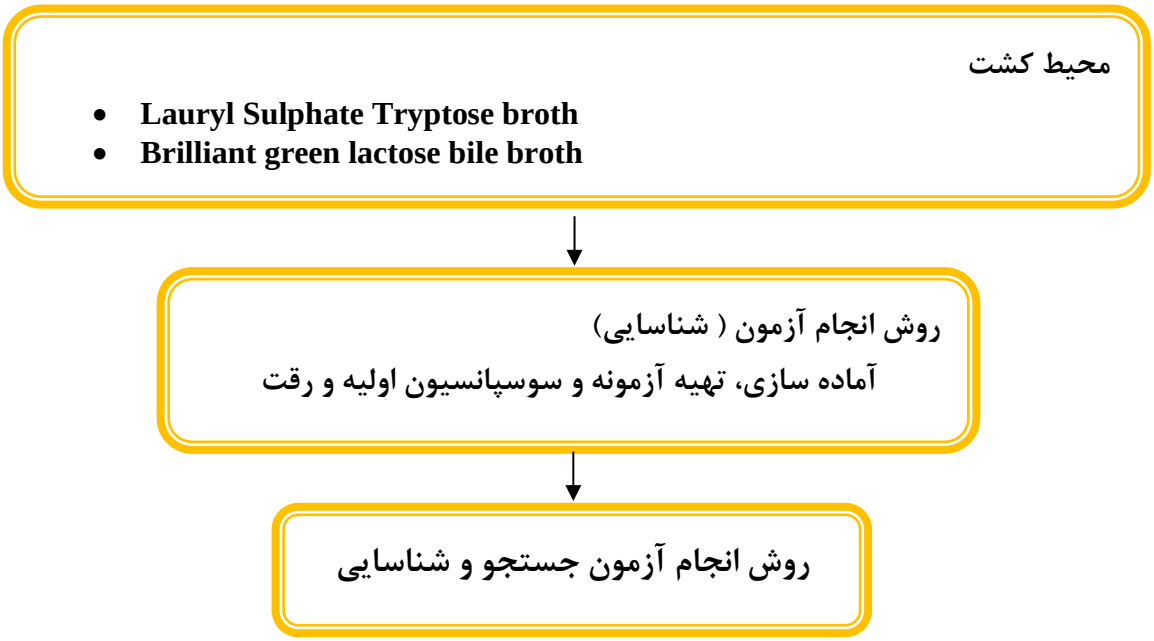
تعداد CFU باکتری را در هر گرم را طبق مقدار میانگین ریاضی وزن داده شده، مطابق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹ محاسبه نمایید .

۷-۶ شناسایی و شمارش کلیفرم‌ها

۷-۶-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۱۶۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش جامع برای شناسایی و شمارش کلیفرم‌ها – روش بیشترین تعداد احتمالی(MPN[1])

کلیفرم‌ها گروهی از باکتری‌های خانوادهٔ آنتروباکتریاسه هستند گرم منفی، باسیل، متحرک، هوازی، بی‌هوازی اختیاری که در دمای ۳۰°C یا ۳۷ °C روی محیط کشت کریستال ویوله دارای قرمز خنثی، نمک‌های صفراوی، لاکتوز و آگار (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 کلی فرم‌ها 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 با روش بیشترین تعداد احتمالی(MPN) در محیط کشت مایع بعد از گرمخانه‌گذاری، در دمای ۳۰ °C ±۱°C یا ۳۷ °C ±۱°C انجام می‌شود. همچنین کار برد این استاندارد به‌متغیرهای زیادی بستگی دارد



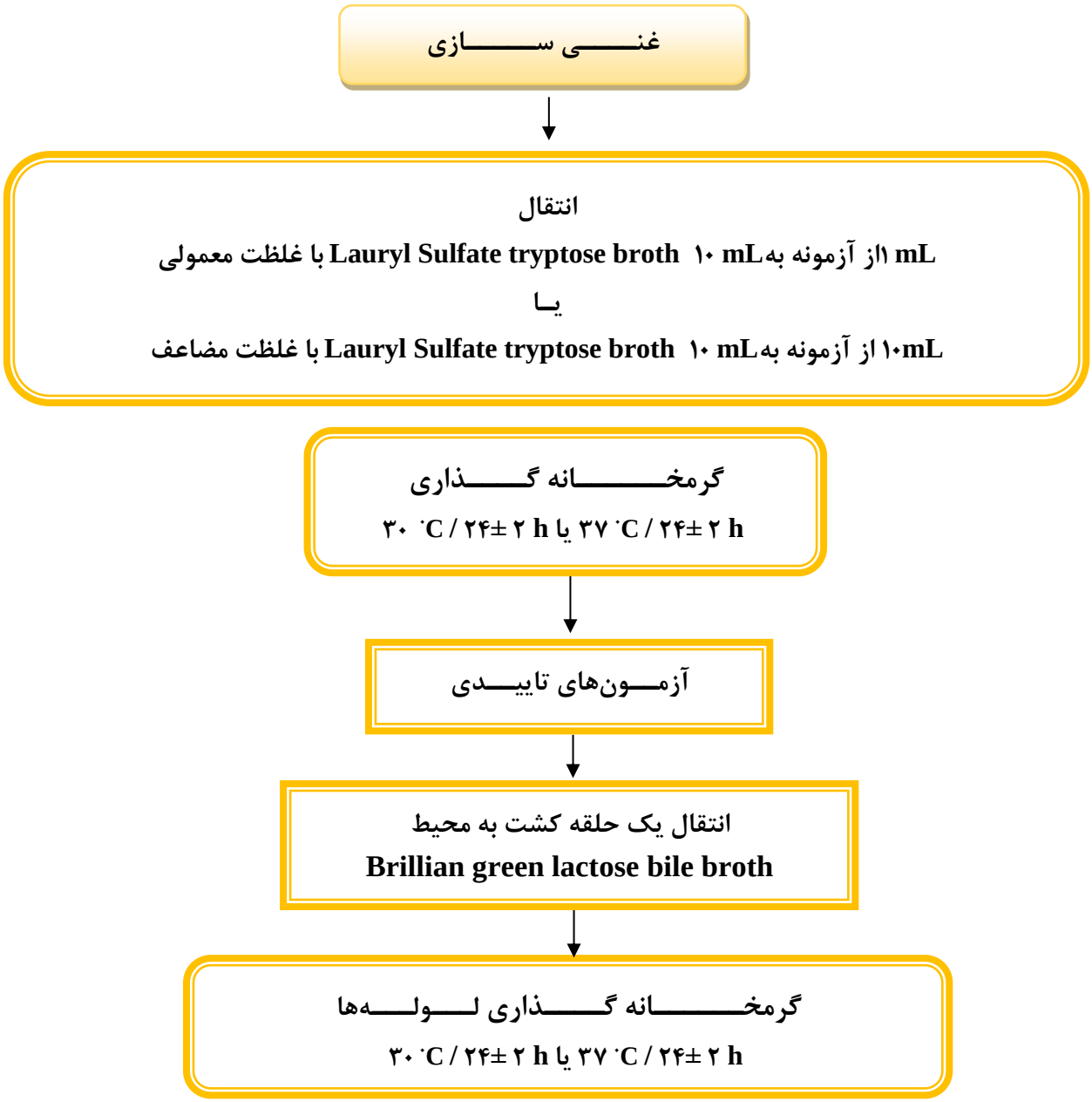
۱ -از آنجایی که این روش شمارش روشی آماری است که از قوانین احتمالات با توجه به نحوه توزیع نمونه در لوله‌های محیط کشت تبعیت می‌کند به آن روش MPN می‌گویند. این اصطلاح از حرف اول سه کلمه‌های Most Probable Number به معنای حداکثر تعداد احتمالی گرفته شده است. نحوه محاسبه تعداد میکرو ارگانیسم‌ها در هر mL ۱۰۰ نمونه مورد آزمایش به این صورت است که تعداد لوله‌های مثبت مرحله تأییدی و در صورتی که 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 به جدول MPN (و یا در برخی موارد با استفاده از فرمول‌هایی خاص که درمورد برخی روش‌های MPN در دسترس است) به دست می‌آورند. و واحد آن به صورت MPN Index/۱۰۰mL نوشته می‌شود.

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

-اگر ۱mL < x < ۱۰mL باشد (مقدار متغیر باید بزرگتر از ۱ و کوچکتر از ۱۰باشد.) 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**



مشاهده گاز در لوله دورهام

↓

در صورت عدم مشاهده گاز یا کدورت، گرمخانه‌گذاری را در دمای ۳۷ °C به‌مدت زمان۲۴h±۲h ساعت دیگر در ادامه دهید.

شکل ۳۵- 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.

شکل ۳۶- کلی فرم

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

این روش شمارش وقتی مناسب است، که تعداد مورد انتظار باکتری بین *cfu/ml* ۱۰ تا *cfu/ml* ۱۰۰ یا ۱۰ *cfu/g* تا *cfu/g* ۱۰۰ از نمونه باشد.

روش انجام آزمون شمارش

آماده سازی، تهیه آزمونه و سوسپانسیون اولیه و رقت

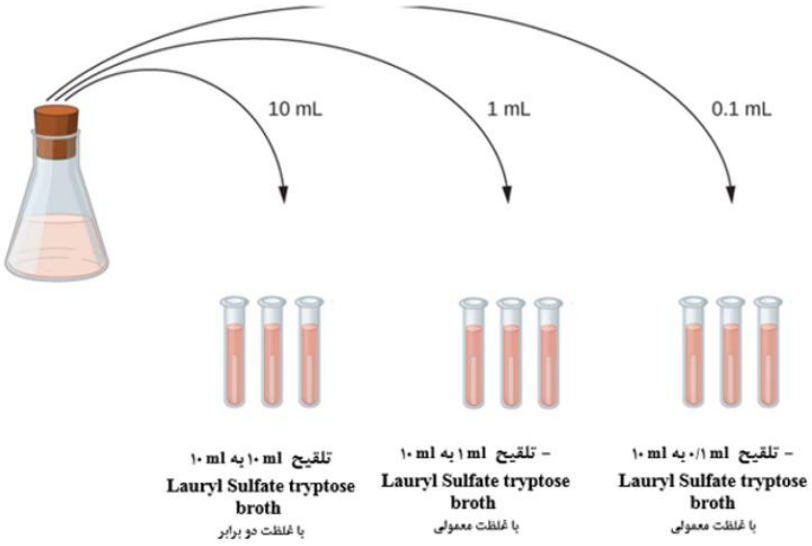
شکل ۳۷- سوسپانسیون اولیه

غنی سازی انتخابی

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

- سه لوله آزمایش دیگر دارای۱۰ mL محیط کشت غنی کننده انتخابی با غلظت معمولی را انتخاب کنید به‌هریک به‌وسیله پی پت سترون ۱mL از نمونه مورد آزمایش چنانچه مایع باشد و یا ۱mL 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 پی‌پت سترون۱mL از رقت‌های بعدی بدست آمده مانند: ۰/۰۱ ، ۰/۰۰۱ را اضافه کنید.
  - ✓ به‌کمک مخلوط کن مناسب ماده کشت داده شده را با محیط به‌خوبی مخلوط کنید.
  - برای تهیه رقت‌های دهدهی، هر بار از یک پی پت سترون جدید استفاده کنید.



شکل ۳۸ – تلقیح از سوسپانسیون اولیه

گرمخـــــــانه گـــــــــذاری لولـــــــه ها

۲۴h ± ۲h / ۳۷°C ±۱°C

در صورت عدم مشاهده گاز یا کدورت، گرمخانه گذاری را در دمای°C ۳۷ به‌مدت ۲ ±۲۴ دیگر ساعت دیگر در ادامـه دهید. چنانچه فرآورده در ته لوله محیط کشت چسبیده باشد و پـس از ۴۸ سـاعت دوره گرمخانـه‌گـذاری، کـدورت بدون گاز ایجاد شود، از آن به‌محیط EC تلقیح کنید .

شکل۳۹- Lauryl Sulfate tryptose broth

پس از گرمخانه گذاری

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

آزمون تاییدی

↓

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

شکل ۴۰- Brillian green lactose bile broth

گرمخـــــــــانه گـــــــــذاری

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

در صورت عدم مشاهده گاز یا کدورت، گرمخانه گذاری را در دمای ۳۷°C به‌مدت زمان ۲h ± ۲۴h دیگر در 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 کلی فرم‌ها، مطابق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -الزامات کلی و راهنما برای آزمون های 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.

۷-۷ شمـــــارش کلـــی فـــــرم‌هـــا

۷-۷-۱ استاندارد 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 بیش از ۱۰۰cfu/mL یا ۱۰۰cfu/g از آزمایه باشد، توصیه می‌شود.

کلیفرم‌ها گروهی از باکتری‌های خانوادهٔ آنتروباکتریاسه هستند گرم منفی، باسیل، متحرک، هوازی، بی هوازی اختیاری که در دمای۳۰°Cیا ۳۷ °C روی محیط کشت کریستال ویوله دارای قرمز خنثی، نمک های صفراوی، لاکتوز و آگار (VRBL)، کلنی‌های مشخص تشکیل می‌دهند و در آزمون تاییدی با تخمیر لاکتوز تولید گاز می‌کنند.

این روش ارائه شده بسیار دقیق تر از سایر روش‌های ارائه شده برای شمارش کلی فرم‌ها 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، انتروباکتر 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

کشت پور پلیت

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

- مدت زمان بین تهیه سوسپانسیون اولیه تا هنگام ریختن محیط کشت در پلیت‌ها نباید از مدت زمان ۱۵min، بیشتر شود.
- پس از بسته شدن کامل محیط کشت مجددا حدود mL ۴ 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)

↓

گرمخانه گذاری هوازی

۳۷°C تا ۳۰ °C /۲۴h ± ۲h

↓

انتخاب کلنی و شمارش کلنی

- **خصوصیات کلنی کلی فرم‌های شاخص**
  - قرمز ارغوانی با قطر حداقل mm ۰/۵ گاهی با هاله مایل به‌قرمز ناشی از رسوب صفرا

- **خصوصیات کلنی کلی فرم‌های غیر شاخص**
  - اندازه کوچکتر
  - کلنی‌های شاخص نیاز به‌آزمون تاییدی ندارند و باید 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 کلی فرم‌های شاخص شود.
پیدایش هاله مایل به‌قرمز ناشی از رسوب صفرا در اطراف کلنی به‌نوع کلیفرم و کیفیت محیط کشت بستگی دارد.

آزمون تاییدی

↓

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

شکل ۴۱- Brillian green lactose bile broth

گرمخانه گذاری لوله‌ها
۳۷ °C / ۲۴h ± ۲h یا ۳۰ °C / ۲۴h ± ۲h

↓

مشاهده حباب های 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 هر گرم و میلی لیتر، مطابق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹ محاسبه نمایید .

۷-۸ اشـــریشیـــا کلـــی

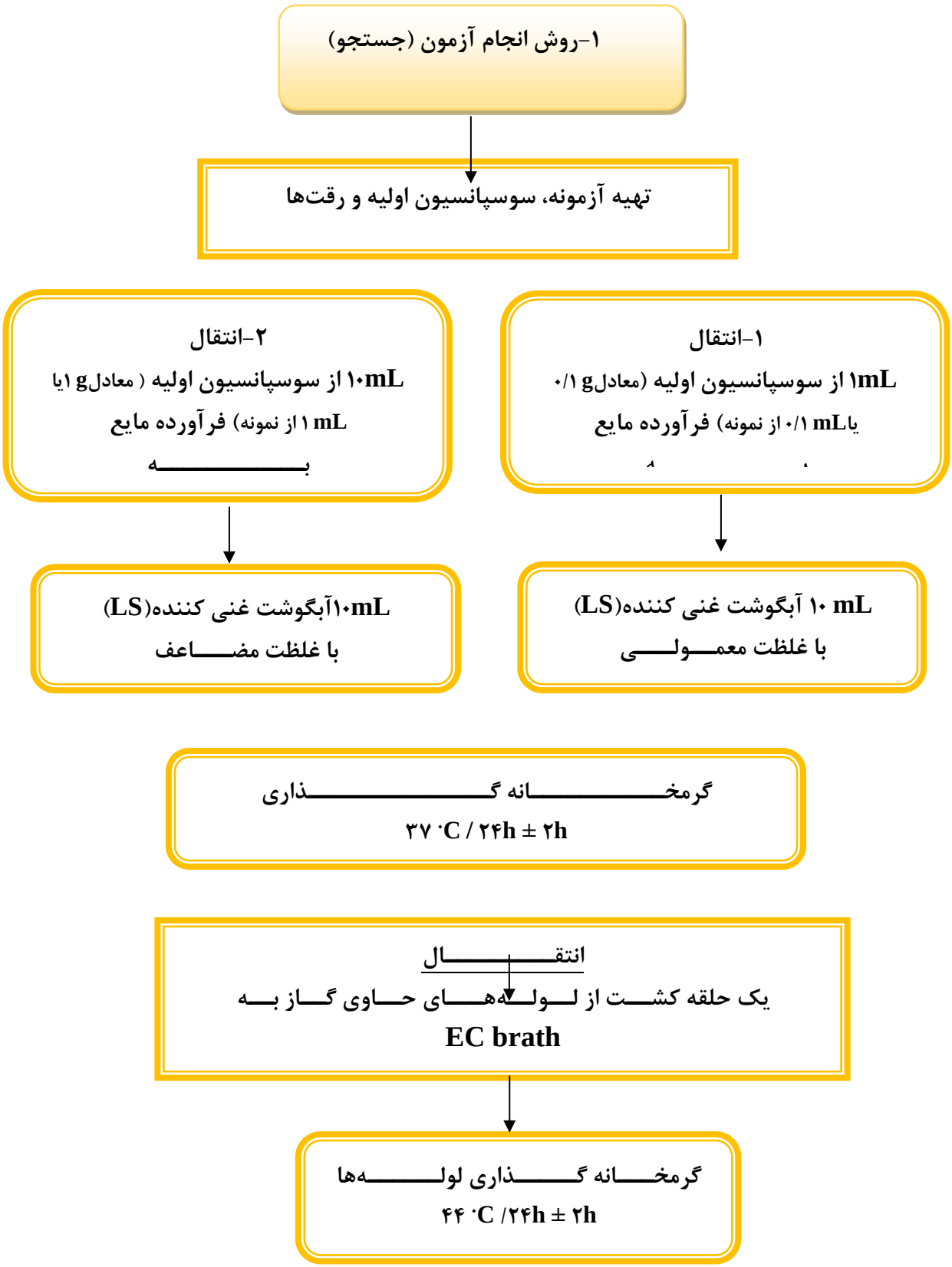
۷-۸-۱ اســـتاندارد ملـــی ایـــران شـــمارهٔ ۲۹۴۶، میکروبیولـــوژی مـــواد غـــذایی و خـــوراک دام- روش جستجو و شمارش اشریشیاکلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی

لاکتـــوز مثبـــت‌هـــای اکســـیداز منفـــی، مقـــاوم بـــه‌حـــرارت، کـــه عـــلاوه بـــر بتـــا-دی- گالاکتوزیـــداز، بتـــا-دی-گلوکرونیـــداز هـــم تولیـــد مـــی‌کننـــد و یکـــی از اعضـــای کلیفـــرم‌هـــای مقـــاوم بـــه‌حـــرارت اســـت کـــه قـــادر اســـت در دمـــای ۴۴/۵°C بـــه‌واســـطه آنـــزیم بتاگالاکتوزیـــداز از لاکتـــوز، اســـید و گـــاز و بـــه‌واســـطه آنـــزیم تریپتوفانـــاز، از تریپتوفـــان، انـــدول تولیـــد کنـــد. زیســـتگاه طبیعـــی اشریشـــیاکلی روده بزرگ انسان و حیوانات خونگرم است.

اشریشـــیاکلی طبـــق روش توصـــیه شـــده در اســـتاندارد ملـــی ایـــران شـــمارهٔ ۲۹۴۶ در محـــیط کشـــت انتخابی دارای نمک‌های صفراوی کلنی‌های اختصاصی تولید می‌کنند.

محیط کشت

- **Salt Diluent/Peptone**
- **Lauryl Suifate Tryptose Broth**
- **EC Broth**
- **Tryptophane Broth**
- **Kovac,s Reagent**
- **Oxidas Reagen**


۱-روش انجام آزمون (جستجو)
تهیه آزمونه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها
۱-انتقال
۱mL از سوسپانسیون اولیه (معادل۰/۱ g
یا۰/۱ mL از نمونه) فرآورده مایع
۲-انتقال
۱۰mL از سوسپانسیون اولیه (معادل۱ g یا
۱ mL از نمونه) فرآورده مایع
به
۱۰ mL آبگوشت غنی کننده(LS)
با غلظت معمولی
۱۰mLآبگوشت غنی کننده(LS)
با غلظت مضاعف
گرمخانه گذاری
۳۷ ·C / ۲۴h ± ۲h
انتقال
یک حلقه کشت از لوله‌های حاوی گاز به
EC brath
گرمخانه گذاری لوله‌ها
۴۴ ·C /۲۴h ± ۲h

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

چنانچه در این مرحله هیچ گازی در محیط کشت EC ایجاد نشد، گرمخانه گذاری را تا مدت زمان۲۴h±۲h ادامه دهید.از لوله‌های گرم خانه گذاری شده که تشکیل گاز داده‌اند 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.

بررسی در آب تریپتونه

انتقـــــــــــال

یک حلقه کشـــت از لـــولـــه‌هـــــای حـــاوی گـــاز بـــــــــــــه

↓

۱۰ mL آب تریپتونه (بدون اندول)

Tryptophane Broth

↓

گرمخـــانه گـــــذاری لولـــــــــه‌ها

۴۴ °C/۲۴h ± ۲h

در صـورت لـزو ۳۷ °C ادامـه دهیـد. آب تریپتونـه غنـی از اسـید آمینـه تریپتوفـان اسـت و توسـط بعضـی از میکروارگانیسـم‌هـای معـین بـه‌عنـوان منبـع کـربن و نیتـروژن و انـرژی مـورد اسـتفاده قـرار مـی‌گیـرد. و اینـدول تولیـد مـی‌شـود. همـه باکتری‌ها و حتی همه بـاکتری‌هـای روده‌ای گـرم منفـی قـادر بـه‌مصـرف تریپتوفـان و تولیـد اینـدول بـا ایـن روش نیستند. بنابراین تولید ایندول می‌تواند یک روش تشخیصی است .

آزمایش تولید اندول

انتقـــــــــــال

۰/۵ mL معرف اندول به‌لوله‌های حاوی آب تریپتونه

↓

ظهور رنگ قرمز در فاز الکلی نشانگر وجود اندول است.

شمارش تعداد 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 شمارش MPN
(Most probable number method)

روش شمارش MPN، وقتی مناسب است که تعداد مورد انتظار باکتری بین ۱۰*cfu/ml* تا ۱۰۰*cfu/ml* یا ۱۰*cfu/g* تا ۱۰۰*cfu/g* از نمونه باشد.

آماده سازی، تهیه آزمونه و سوسپانسیون اولیه و رقت

- سه لوله آزمایش بزرگ دارای mL ۱۰ محیط کشت غنی کننده انتخابی با غلظت دو برابر را انتخاب کنید به هریک به‌وسیله پی پت سترون mL ۱۰ از نمونه مورد آزمایش چنانچه مایع باشد و یا mL ۱۰ از سوسپانسیون اولیه را در مورد سایر فرآورده‌ها اضافه کنید. این آزمونه برابر با g۱ نمونه در هر لوله می‌باشد.

- سه لوله آزمایش دیگر دارای mL ۱۰ محیط کشت غنی کننده انتخابی با غلظت معمولی را انتخاب کنید به هریک به‌وسیله پی‌پت سترون mL ۱ از نمونه مورد آزمایش چنانچه مایع باشد و یا mL ۱ از سوسپانسیون اولیه را در مورد سایر فرآورده‌ها اضافه کنید.

- سه لوله آزمایش دیگر دارای mL ۱۰ محیط کشت غنی کننده با غلظت معمولی را انتخاب کنید به‌هریک به وسیله پی پت سترون mL ۱ از رقت‌های بعدی بدست آمده مانند: ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ را اضافه کنید.

گرمخـــــــانه گـــــــــذاری لولـــــــه ها

۲۴h ± ۲h / ۳۷± ۱ ۰C

- ✓ 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.

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

آزمون تاییدی

از لوله‌های گرم خانه گذاری شده دارای گاز به‌وسیله حلقه کشت، 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.

انتقال

یک حلقه کشت از لوله‌های حاوی گاز به EC brath

↓

گرمخانه گذاری لوله‌ها

۴۴ °C/۲۴h ± ۲h

چنانچه در این مرحله هیچ گازی در محیط کشت EC ایجاد نشد، گرمخانه‌گذاری را تا مدت زمان ۲۴h ±۲h دیگر ادامه دهید.

آزمون تاییدی:

بررسی در دومین محیط انتخابی

از لوله‌های گرم خانه گذاری شده که تشکیل گاز داده‌اند به‌وسیله حلقه کشت، در آب پپتونه/ تریپتونه‌ای 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

↓

آب پپتونه / تریپتونه

شکل ۴۲- محیط TW

گرمخـــــانه گـــــــذاری لولـــــــــه‌ها

۴۴ ° C/۴۸h ± ۲h

↓

بررسی تولید انـــــدول

انتقـــال ml ۰/۵ معـرف انـدول به‌لولـه‌های حـاوی آب پپتونه/ تریپتونه

↓

ظهور رنگ قرمز در فاز الکلی نشانگر وجود اندول است.

شکل ۴۳- واکنش اندول

تایید اشریشیا کلی (مثبـت)

- **تفسیر نتایج**

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

- **مقادیر MPN**:

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

شکل ۴۴- اشریشیاکلی

۷-۹ آزمون جستجوی سالمونلا

۷-۹-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۸۱۰، میکرو بیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش جستجوی سالمونلا در مواد غذایی

سالمونلا باسیل‌های گرم منفی بدون اسپور، هوازی و بی‌هوازی اختیاری، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی هستند. اکثر سالمونلاها در روی آگار مغذی بعد از ۲۴h پرگنه هایی به‌قطرmm ۳-2mm و به رنگ سفید، خاکستری، مرطوب، کروی، مسطح، برجسته و صاف ایجاد می‌کنند. سالمونلاها از نظر بیوشیمیایی خواص عمومی خانواده آنترو باکتریاسه را دارا هستند. pH پائین‌تر از ۴ باعث از بین رفتن میکروارگانیسم می‌شود . سالمونلاها از نظر آنتی ژنی دارای سه نوع آنتی ژن O (سوماتیک)، آنتی ژن H (فلاژل یا تاژک) و آنتی ژن Vi (کپسول) است. این باکتری اندوتوکسین[1] ترشح می‌کند و دارای لیپو پروتئین ساکارید [2]و لیپید A می‌باشد. سندرم‌های بالینی عفونت‌های سالمونلایی به‌چهار صورت بروز می‌کند.گاسترو انتریت (اسهال واستفراغ)، سپسمی سمی (آلودگی در خون)، تب تیفوئید (حصبه با تب روده‌ای) و حاملان بدون علامت (حامل مزمن)

به‌منظور جستجوی گونه‌های سالمونلا احتمالی موجود در کشت‌های اسید لاکتیک و بیفیدوباکتریوم‌ها اغلب لازم است ترکیب آبگوشت پیش غنی کننده اصلاح گردد تا اطمینان حاصل شود که اسید آلی تولید شده به‌وسیله باکتری‌های آغازگر است و آلوده کننده pH را به‌اندازه‌ای پائین نمی‌آورد که گونه‌های سالمونلا را نا بود کند برای انواع مواد غذایی تا مقادیر *cfu/g* ۱۰۸ باکتری‌های

۱ -سمی که بواسطه تخریب دیواره سلولی باکتری گرم منفی ایجاد می‌شود.

۲- Lipopolysaccharides(LPS)

اسیدلاکتیک یا بیفیدوباکتریوم‌ها، آب پپتونه بافری با وانکومایسین[1] (*mg/l* ۱۰) به‌کار برید. اما این روش برای باکتری‌های اسیدلاکتیک مقاوم به وانکومایسین و بیفیدوباکتریوم‌ها مناسب نیست.

- ✓ برای مواد غذایی مختلف که حاوی مقادیر تا *cfu/g* ۱۰[11] باکتری‌های اسیدلاکتیک یا بیفیدوباکتریوم‌ها هستند:
- ✓ آب پپتونه بافری با غلظت مضاعف با وانکومایسین (*mg/l* ۱۰)، مالاشیت گرین (*mg/l* ۴۰) و شیر (*mg/l* ۱۰) به‌کار می‌رود.
- ✓ به‌جای استفاده ازآب پپتونه بافری با غلظت مضاعف، می‌توان از آب پپتونه بافری که فقط غلظت بافر فسفات مضاعف شده استفاده کرد.
- ✓ برای مواد غذایی حاوی بیش از *cfu/g* ۱۰[11]، آب پپتونه بافری مضاعف شده همراه با وانکومایسین (*mg/l* ۱۰) ، مالاشیت گرین (*mg/l* ۴۰) و شیر (*mg/l* ۱۰) به‌کار ببرید. (به‌یادآوری توجه کنید.)
- ✓ جهت تضمین این که حداکثر سطح باکتری‌های اسیدلاکتیک و بیفیدوباکتریوم‌ها در آب پپتونه فورا پس از افزودن نمونه به‌آب پپتونه، از *cfu/g* ۱۰[10] تجاوز نمی‌کند، یک رقت بالاتر به‌کار برید.

یاد آوری - افزودن شیر تنها برای ترکیباتی که فاقد آن هستند ضروری است که 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 agar (XLD)**
- **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. Oxidas, Catalase & Kovac,s Reagent**
- **Mono Valnt or Polyvalent Anti-O-Sera**

- ✓ سالمونلا ممکن است به‌تعداد کم و اغلب همراه با تعداد قابل ملاحظه‌ای از سایر میکروارگانیسم‌های خانواده آنترو باکتریاسه یا خانواده‌های دیگر، موجود می‌باشد، لذا ، انجام مرحله پیش غنی سازی برای جستجوی سالمونلاهای آسیب دیده و تعداد کم ضروری است .
- ✓ برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه فرآورده‌های اسیدی باید اطمینان داشته باشید که، میزان pH در طی پیش غنی سازی پایین‌تر از ۴/۵ نباشد. pH مواد غذایی اسیدی، در صورت استفاده از پپتون بافره با غلظت دو برابر حالت پایداری بیشتری خواهد داشت. برای پخش شدن کامل فرآورده‌های تخمیری مانند شیر تخمیری، ماست، کاستارد و دسر، گلوله‌های کوچک شیشه استریل را به‌ارلن مایر حاوی آزمونه منتقل کنید و تا پخش شدن کامل آن را تکان دهید .

روش آزمون

↓

آماده سازی، تهیه آزمونه و سوسپانسیون اولیه و رقت

شکل ۴۵- آماده سازی، تهیه آزمونه

پیش غنی سازی

۲۵ mL نمونه + ۲۲۵mL محیط پیش غنی کننده غیر انتخابی

(Buffered peptone water)

↓

گرمخانه گذاری

۴۴ ° C/۲۴h ± ۲h

غنـــی ســـازی انتخـــابـی

تلقیح
۱ mL از سوسپانسیون پیش غنی کننده
به ۱۰ mL محیط MKTT n broth

تلقیح
۰/۱ mL از سوسپانسیون پیش غنی کننده
به ۱۰ mL محیط RVS broth

شکل۴۶- محیط MKTT n broth

شکل ۴۷-محیط کشت RVS broth

گرمخـــانه گـــذاری
(۳۷±۱) °C /۲۴h ± ۳ h

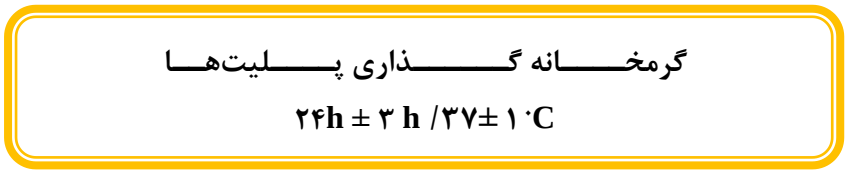
گرمخـــانه گـــذاری
(۴۱/۵±۱) °C /۲۴h ± ۳ h

کشت روی محیط جامـد انتخابـی

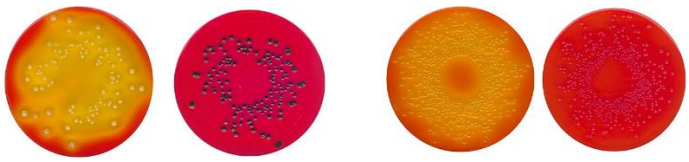
✓ هرگز محلول‌ها را با پیپت از راه دهان نکشید .

پـس از گرمخانـه گـذاری بـه‌مـدت زمـان۲۴h±۳h ، یـک حلقـه از کشـت بـه‌دسـت آمـده از RVS مـایع را بـر روی سـطح محـیط کشـت‌هـای جامـد از پـیش ریختـه انتخـابی (XLD agar) کـه سـطح آنهـا خشـک شـده است بـه‌گونـه‌ای کشـت دهیـد کـه کلنـی‌هـای مجـزا در سـطح آگـار تشـکیل شـود. همچنـین یـک حلقـه از کشـت بـه‌دسـت آمـده از RVS مایـع را بـر روی سـطح یکـی از محـیط کشـت‌هـای جامـد پـیش ریختـه انتخابی (انتخاب به عهده آزمایشگاه است) کـه سـطح آنهـا خشـک شـده اسـت بـه گونـه‌ای کشـت دهیـد کـه کلنی‌های مجزا در سطح آگار تشکیل شود.

پس از گرمخانه گذاری 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 به‌گونه‌ای کشت دهید که کلنی‌های مجزا در سطح آگار تشکیل شود. همچنین یک حلقه از کشت به‌دست آمده از MKTTn[۱] 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.



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



محیط کشت XLD شکل ۴۷- محیط کشت BGA

۱ - Xylose Lysine Deoxycholate Agar

- **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

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

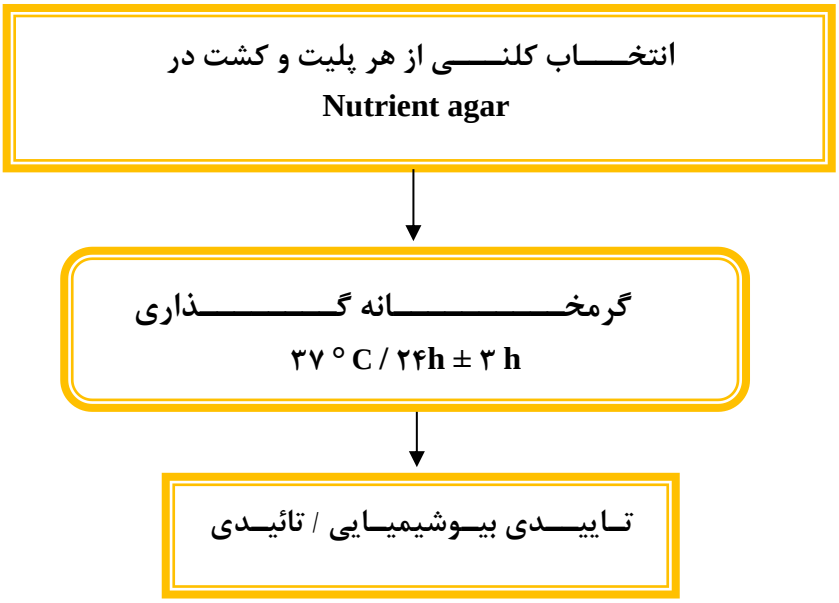
کلنی‌هایی که خصوصیات سالمونلای احتمالی را نشان می‌دهد را بررسی کنید.

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

یادآوری ۱- کلنی‌های زرد- سبزکه توسط هاله ای سبز-زرد احاطه شده (باکتری‌های لاکتوز یا ساکارز مثبت مثل پروتئوس، سیتروباکتر، کلبسیلا)

یادآوری ۲- 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 عمق محیط (TSI) به‌صورت مستقیم (Stab) تا عمق ۵ میلی‌متری (دوسوم فاصله تا انتهای لوله) ، و کشت خطی سطح شیبدار محیط کشت و گرمخانه‌گذاری در دمای C° ۳۷ به‌مدت زمان h ۱۸

- **واکنش مثبت** :

عمق لوله کشت TSI:

-زرد {گلوکز مثبت}

-قرمز {گلوکز منفی}

-سیاه {سولفید هیدرژن مثبت (H_2S)}

-حباب یا ترک {تولید گاز از گلوکز}

سطح شیبدار لوله کشت TSI :

-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 ۴۸- واکنش در محیط (TSI)

-L- لیزین - دکربوکسیلاز[2]:

کشت زیر سطح مایع وگرمخانه گذاری در دمای h ۱± ۳۷h به‌مدت زمانh ۲۴

- **واکنش مثبت:** {مشاهده کدورت و رنگ ارغوانی}

بیشتر سالمونلاها از نظر این واکنش مثبت هستند.

شکل ۴۹ - واکنش لیزین - دکربوکسیلاز

۱- Triple sugar/iron agar (TSI agar)

۲- L-Lystine decarboxylation medium

اوره آگار (کریستنسن)[1]

کشت خطی روی سطح شیب دار آگار و گرمخانه گذاری در دمای ۳۷h ±۱ h به‌مدت زمان۳h ±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.

شکل ۵۰- واکنش اوره آگار (کریستنسن)

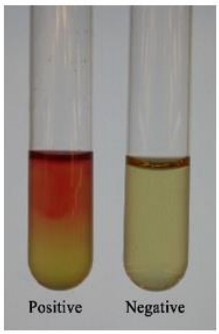
-واکنش وژس پرسکوئر[2]

یک حلقه کامل از کلنی مشکوک را در به‌لوله mL ۳ محلول vp، تلقیح کرده و در دمای ۳۷h ±۱ h به‌مدت زمان ۲۴hگرمخانه گذاری کنید.

سپس دو قطره محلول کراتین و سه قطره محلول اتانوئیک ۱- نفتول و دو قطره محلول پتاسیم هیدرو کسید را بیافزایید.

- **واکنش مثبت** {مشاهده رنگ صورتی روشن بعد از مدت زمان۱۵min، }

بیشتر سالمونلاها از نظر این واکنش منفی هستند.



شکل ۵۱- واکنش وژس پرسکوئر

۱- Urea agar (Christensen)

۲-Voges-Proskauer (VP)

-واکنش بتا- گالاکتوزیداز[1](ONPG)

تلقیح یک حلقه کامل در لوله حاویmL ۰/۲ محلول سرم فیزیولوژی و یک قطره تولوئن و قراتر دادن در حمام آب با دمای h ۱± ۳۷h به‌مدت سپس افزودنmL ۰/۲۵ معرف شناسایی بتا–گالاکتوزیداز وگرمخانه گذاری در دمای h۱± ۳۷h به‌مدت به‌مدت زمان۲۴h

- **واکنش مثبت:** {مشاهده رنگ زرد بعد از مدت زمان۲۰min، }

بیشتر سالمونلاها از نظر این واکنش منفی هستند.

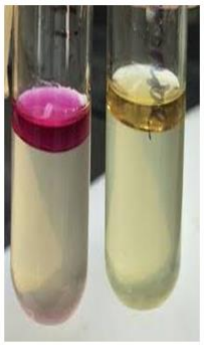
شکل ۵۲- واکنش بتا - گالاکتوزیداز

-واکنش اندول[2]

یک حلقه کامل از کلنی مشکوک تلقیح در لوله حاویmL ۵ محلول تریپتون – تریپتوفان تلقیح کرده و در دمای دمای h ۱± ۳۷h به‌مدت زمان ۲۴h گرمخانه گذاری کنید سپس mL ۱ از معرف کواکس به‌آن بیافزایید

- **واکنش مثبت:** {مشاهده حلقه قرمز رنگ آلبالویی}

بیشتر سالمونلاها از نظر این واکنش منفی هستند.



شکل ۵۳- واکنش اندول

۱- β-galactosidase

۲- Eundol

جدول ۲۳ - واکنش‌های بیوشیمیـــایی سالمونـــلا

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

آزمون تایید سالمونلا / سرولوژیکی و سروتایپی

تشخیص وجود آنتی ژن‌های -O، - VI، H سالمونلا، با مشاهده آگلو تیناسیون[۱] بر روی لام هنگامی که از کلنی‌های خالص و آنتی سرم‌های مناسب استفاده شود. این آزمون پس از حذف سویه‌های خود آگلوتینه شونده صورت، می‌گیرد. در واکنش آگلوتینه شدن آنتی‌ژن‌ها (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[۲])، که هنگام آزمون مثبت، انعقاد ایجاد می-کنند و به‌صورت تجارتی در دسترس می‌باشد برای مثال: آنتی سرم حاوی یک یا چند تپ از گروه "O" (آنتی سرم یک ظرفیتی یا چند ظرفیتی O) هم چنین آنتی سرم Vi و آنتی سرم شامل آنتی بادی برای یک یا چند ین فاکتورH [۳])، (آنتی سرم یک ظرفیتی یا چند ظرفیتیH)

حذف سویه های خود آگلوتینه شونده:

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.

مشاهده باکتری به‌صورت توده‌های کم و بیش مجزا آگلوتینه شونده:

ن شان دهنده سویه خود آگلوتینه شونده ا ست و شنا سایی آنتی ژن مقدور نی ست. نباید در ادامه آزمون مورد استفاده قرار گیرد.

عـــــــــدم مشاهـــده باکتـــری به‌صورت توده‌های کم و بیش مجزا غیر خود آگلوتینه شونده:

۱- Agglutination

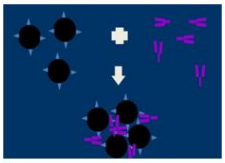
۲- Mono Valnt or Polyvalent Anti –O- Sera

۳- Mono Valnt or Polyvalent Anti –H- Sera

نشـان دهنـده سـویه غیـر خـود آگلوتینـه شـونده اسـت و شناسـایی آنتـی ژن مقـدور اسـت.باید در ادامـه آزمون تاییدی سرولوژیکی مورد استفاده قرار گیرد و شناسایی انجام گیرد.

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

شکل ۵۴-واکنش منفی واکنش مثبت



شکل ۵۵- کمپلکس آنتی ژن- آنتی بادی

ادامه آزمون تاییدی سرو لوژیکی

سویه غیـــر خود آگلوتینـــه شونـــده

آزمـــون آنتـــی ژن O

تهیـــه سوسپانســـیون کلنـــی خـالص بـا یـک قطـره آنتـی‌سرم **O**

واکـــنش ســـرواوژیکی: مثبت

تفسیر : آگلوتینه شدن

آزمـــون آنتـــی ژن VI

تهیـــه سوسپانســـیون کلنـــی خـالص بـا یـک قطـره آنتـی‌سرم VI

واکـــنش ســـرولوژیکی: مثبـت

تفسیر: آگلوتینه شدن

آزمـــون آنتـــی ژن H

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

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

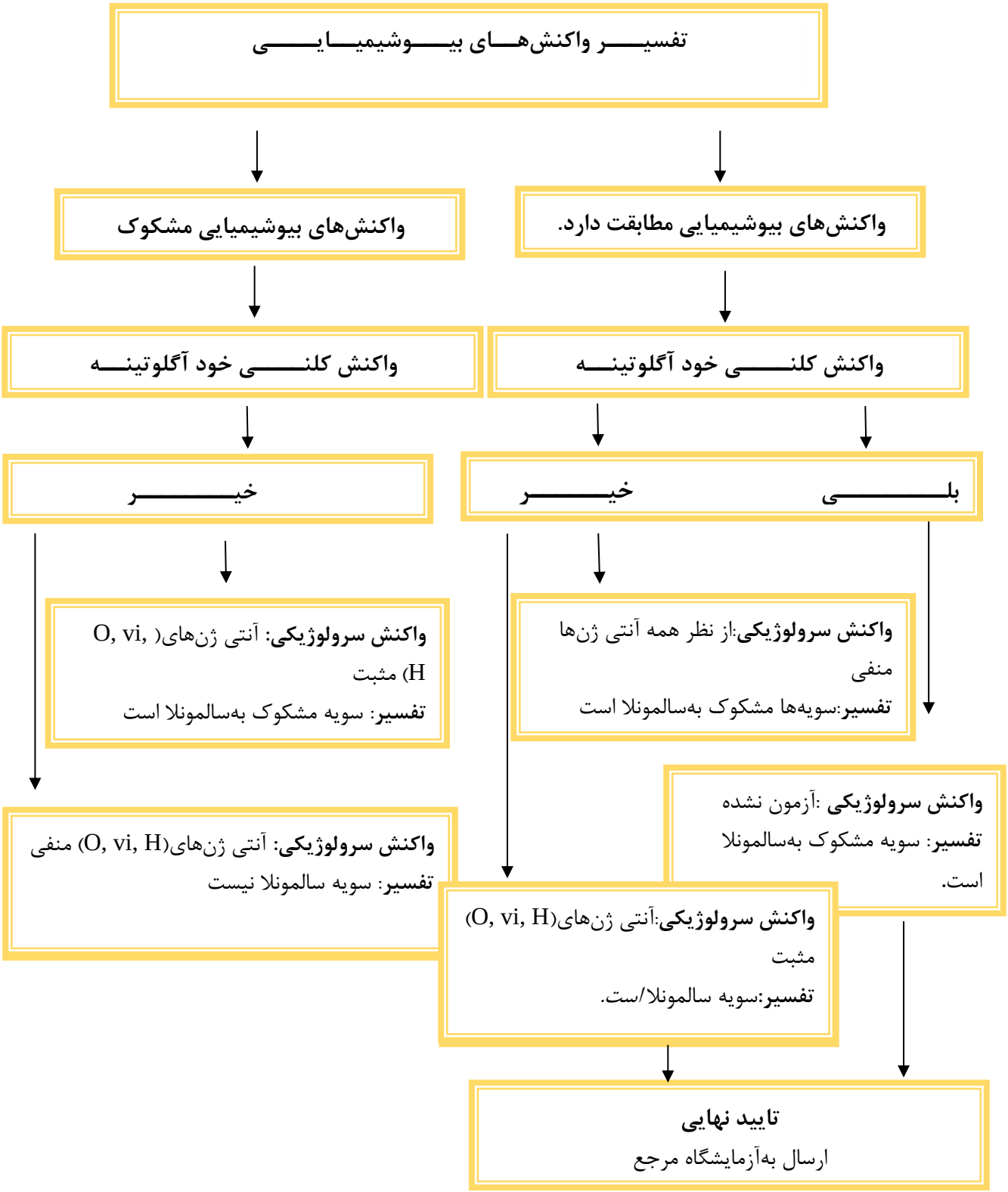
ادامه آزمـــون آنتـــی ژن H

تهیـــه سوسپانســـیون از کلنـــی‌هـای لولـه نوتریـنـت آگـار نیمـه جامـد بـا یـک قطـره آنتی ژن H

واکنش ســـرولوژیکی: مثبت

تفسیر : آگلوتینه شدن

تفسیر واکنش‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی



۷-۱۰-۱ 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-جستجو،شناسایی و شمارش به‌شیوه محتمل‌ترین تعداد (MPN) برای تعداد کم میکروارگانیسم

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 بیماری‌زا برای انسان است که روی پوست افراد سالم بدون ایجاد بیماری می‌تواند وجود داشته باشد. وجود *استافیلوکوکوس* در محصول معمولاً نشان دهنده آلودگی بوسیله پوست، دهان یا بینی افرادی است که با محصول سروکار دارند ممکن است مستقیما در خط تولید بوسیله 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 *استافیلوکوک*های کوآگولاز مثبت**

روش انجام آزمون (جستجو)

تهیه آزمونه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها
۱- ۱ mL از فرآورده مایع به
۲- ۱۰ mL از سوسپانسیون اولیه به
۱۰ mL آبگوشت غنی کننده(GC) با غلظت معمولی
۱۰mL آبگوشت غنی کننده(GC) با غلظت مضاعف
گرمخانه گذاری بی هوازی
۳۷ °C / ۲۴h ± ۲ h
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 ۱برای تلقیح در سطح سه پلیت کوچک (۹۰mm) استفاده کنید.
• از رقت انتخابی mL ۱برای 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، می توان از یک پخش کننده برای پلیت‌های تلقیح شده با رقت‌های متوالی استفاده نمود، به‌شرطی که پخش کردن از رقت‌های بالاتر شروع شود.
گرمخانه گذاری
۳۷ °C / ۲۴h ± ۲ h

در صورت لزوم گرمخانه گذاری را تا(۲±۲۴) دیگر در دمای°C ۳۷ ادامه دهید.

- **خصوصیات کلنی *استافیلو کوکوس* اورئوس کواگولاز مثبت**

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

شکل ۵۶- کلنی *استافیلو کوکوس اورئوس* کواگولاز مثبت

آزمون تاییـــــدی

↓

آزمون کواگولاز

↓

انتقال یک کلنی به محیط
Brain-heart infusion broth (BHI)

↓

گرمخـــــــــــــانه گـــــــــــذاری هوازی
۳۷ °C / ۲۴h ± ۲ h

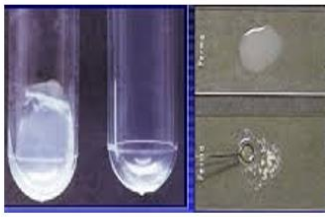
↓

انتقـــــال
۰/۱ mL از سوسپانسیون Brain-heart infusion broth
به ۰/۳ mL پلاسمای خرگوش (EDTA یا سیتراته)

تشکیل لخته و انعقاد پلاسما

↓

کواگولاز: مثبت



شکل ۵۷- آزمون کواگولاز

- **مشاهده میکروسکوپی *استافیلو کوکوس اورئوس* کواگولاز مثبت**

شکل ۵۸- *استافیلو کوکوس 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 به صورت "منفی " یـــا " 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 *cfu/ml* ۱۰ تا *cfu/ml* ۱۰۰ یا *cfu/g* ۱۰ تا *cfu/g* ۱۰۰ از 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 ۱۰mL از نمونه مورد آزمایش چنانچه مایع باشد و یا ۱۰mL 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 ۱mL از نمونه مورد آزمایش چنانچه مایع باشد و یا ۱mL 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 به وسیله پی‌پت سترون ۱mL 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.

گرمخانه گذاری بی هوازی لوله ها
۳۷ °C/۲۴h ± ۲ h

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 بصورت 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.

↓

گرمخانه گذاری بی هوازی پلیت ها

۳۷ °C/۲۴h ± ۲ h

- **خصوصیات کلنی *استافیلوکوکوس اورئوس* کواگولاز مثبت در محیط انتخابی بردپارکر آگار :**

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

آزمون تاییدی

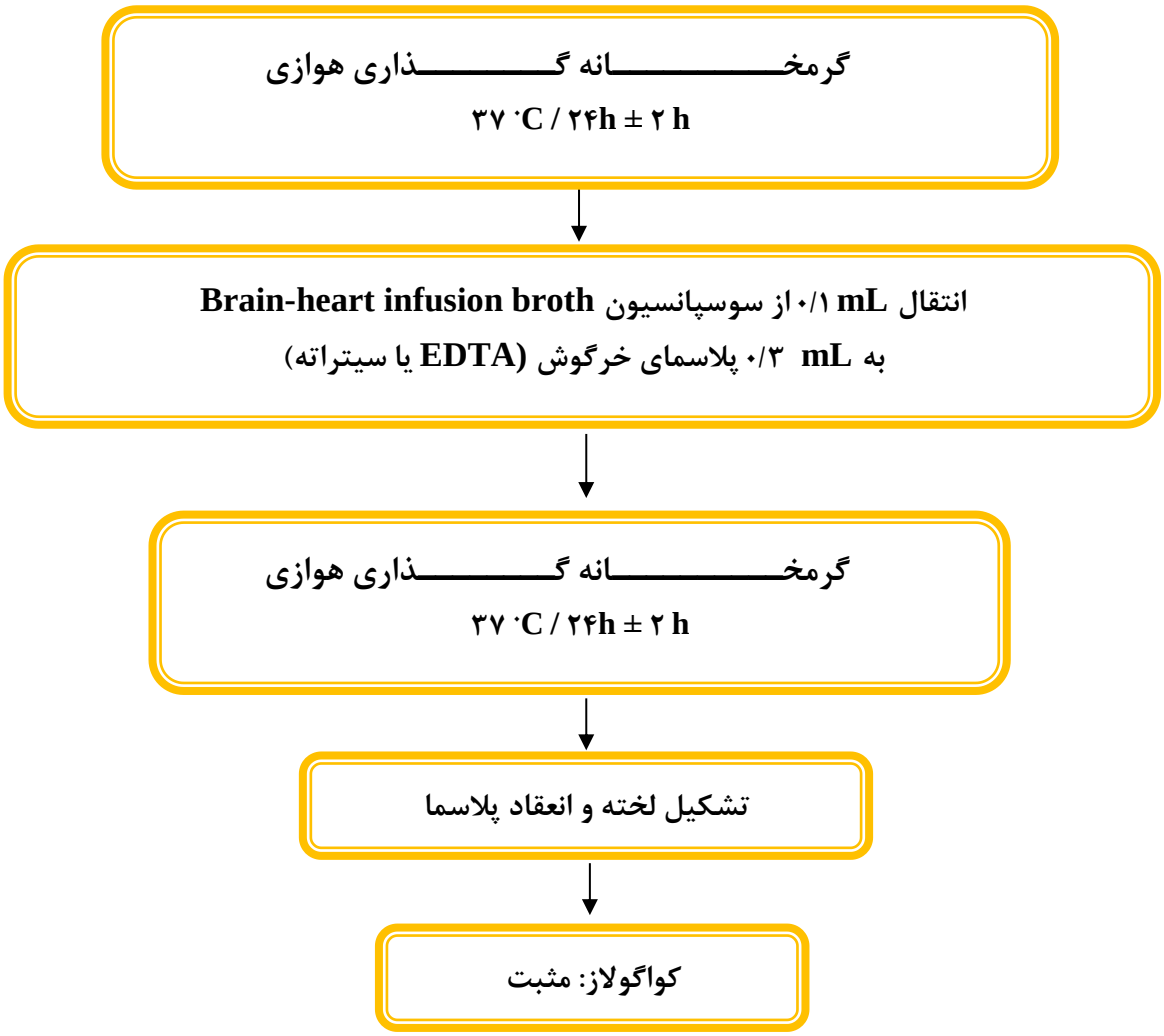
↓

آزمون کواگولاز

↓

انتقال یک کلنی به محیط

Brain-heart infusion broth



- **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.

۷-۱۱ میکرو ارگانیسم‌های قابل شمارش مانند باکترهای غیرلاکتیکی، مخمرها و کپک‌ها

۷-۱۱-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۲۴۸، کره – شیرهای تخمیری و پنیر تازه – شمارش میکروارگانیسم‌های آلوده کننده– روش شمارش کلی در ۳۰ درجه سلسیوس

محیط کشت اختصاصی

(پپتون از کازئین، پپتون از ژلاتین، کلرید سدیم، آگار و آب مقطر)

یادآوری ۱– تمامی اجزای محیط کشت باید عاری از کربوهیدرات باشد.

یادآوری ۲–فقدان کربوهیدارات‌ها در محیط کشت مورد استفاده برای آزمون شمارش میکروارگانیسم‌های آلوده کننده شیرهای تخمیری و پنیر تازه الزامی است .

یادآوری ۳– pH محیط کشت را به‌گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی برابر ۰/۱ ± ۷/۵ در دمای ۲۵ °C باشد

یادآوری ۴– برای شیرهای تخمیری pH را به‌گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی برابر ۰/۱ ± ۸ در دمای ۲۵ °C باشد

آماده سازی، تهیه آزمونه و سوسپانسیون اولیه و رقت

↓

روش انجام آزمون

↓

کشت سطحی در پلیت‌های از پیش ریخته

- 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 بصورت 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.

گرمخـــــــــانه گـــــــــذاری

۷۲h ± ۲ h /۳۰ °C

شمارش کلنی‌ها

با استفاده از دستگاه کلنـی شـمار، پلیـت هـایی را شـمارش کنیـد کـه تعـداد کلنـی میکروارگانیسـم‌هـای آلـوده کننـده بیشـتر از ۱۵۰ کلنـی نباشـد و کلنـی‌هـای سـر سـوزنی یـا خیلـی ریـز کـه از لحـاظ خصوصیات ظاهری شبیه میکروارگانیسم‌های آلوده کننده نیستند، شمارش نمی‌شوند

یاد آوری ۱- در صورت لزوم آزمون میکروسکوپی و تاییدی کاتالاز انجام شود. باکترهای لاکتیکی کاتالاز منفی هستند.

یاد آوری ۲- آزمون میکروسکوپی کلنی‌های به‌دست آمده، ممکن است اطلاعاتی در مورد منبع آلودگی به‌دست دهد لذا ثبت نوع کلنی‌های موجود (خالص، مخلوط، مخمر و کپک، گونه‌های باسیلوس) دارای اهمیت است.

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

۷-۱۲ قارچ‌ها[۱]

قارچ‌ها یوکاریوت، هتروتـروف، غیـر فتوسـنتتیک بـوده و بـرای رشـد و تکثیـر بـه‌ترکیبـات آلـی و کـربن نیـاز دارند قارچ‌ها هوازی و یـا بـی‌هـوازی اختیـاری هسـتند. سـاختار اغلـب قـارچ‌هـا از رشـته‌هـا و یـا ریسـه‌هـای نخی شکل به‌نام هیف تشـکیل شـده اسـت. در قـارچ‌هـای پسـت، ریسـه‌هـا یـا هیـف‌هـا فاقـد دیـواره عرضـی هستند .انشعابات هیف‌ها یا ریسـه‌هـا شـبکه‌ای بـه‌نـام میسـیلیوم را بـه‌وجـود مـی‌آورنـد. شـبکه میسـیلیوم را می‌توان به‌صورت کپک بر روی مواد آلـی مختلـف مشـاهده کـرد. آنـزیم‌هـایی کـه توسـط قـارچ‌هـای مختلـف به‌وجود می‌آیند مـی‌تواننـد انـواع مـواد آلـی را تجزیـه کـرده و بـه‌مـواد سـاده‌تـری تبـدیل کننـد. قـارچ‌هـا از لحاظ ساختار یاخته‌ای جـزء یوکـاریوت‌هـا هسـتند، در اطـراف هسـته و دیگـر اجـزای یاختـه غشـای دو لایـه وجود دارد. در اطراف یاخته، دیواره‌های یاخته‌ای حاوی کیتین قرار می‌گیرند.

۱- Fungi

قارچ‌ها به‌کپک‌ها، مخمرها تقسیم می‌شوند. قارچ‌ها به‌کپک‌ها، مخمرها تقسیم می‌شوند. میزان رشد قارچ[۱]، سطح کلنی[۲]، رنگ کلنی[۳]، وجود رنگدانه، مشاهده میکروسکوپی[۴]دارای ارزش تشخیصی است.

۷-۱۲-۱ کپک‌ها[۵]

کپک‌ها، قارچ‌های رشته‌ای، هوازی، غیر فتوسنتتیک، چند سلولی، هتروتروف، هستند. کپک‌ها تولید واحدهای میکروسکوپی بنام تال [۶] می‌کنند که با تجمع آنها، جرم رشته‌ای تشکیل می‌گردد که به‌آن میسیلیوم گفته می‌شود. معمولا به‌صورت کلنی[۷] پروپاگول[۸] یا جوانه[۹] صاف یا کرکدار، اغلب با ساختاراسپورزایی یا تولید مثل رنگی در سطح محیط‌های کشت قارچی رشد می‌کنند. بهترین رشد کپک‌ها در محیط اسیدی با غلظت بالای قند می‌باشد. تشکیل اسپور جنسی استوار است. وقتی شرایط برای فعالیت آن‌ها نامساعد شود فوراً ایجاد اسپور می‌کنند، اسپورها در برابرخشکی و سرما مقاوم می باشند و در فضا پراکنده می‌شوند و با مساعد شدن شرایط به‌سرعت تبدیل به‌شکل فعال می‌گردند کپک‌ها با تجزیه مواد غذایی موجب فساد مواد غذایی می‌شوند. مهمترین کپک‌های مواد غذایی از دسته پنی‌سیلیوم[۱۰]، موکور[۱۱]، رایزوپوس[۱۲]، فوزاریوم [۱۳]و آسپرژیلوس [۱۴]می‌باشند. گروهی از کپک‌ها دارای اگزوتوکسین[۱۵] هستند ترشح اگزوتوکسین کپک‌ها غالبا در حرارت بالاتر از°C ۱۰ صورت می‌گیرد.

---

۱ - مسطح، برجسته، منظم یا غیر منظم

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

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

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

۵- Mold

۶- Hypha(Tall)

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

۸- 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 .

۹- Germ

۱۰-*Penicillium*

۱۱-*Mucor*

۱۲-*Rhizopus*

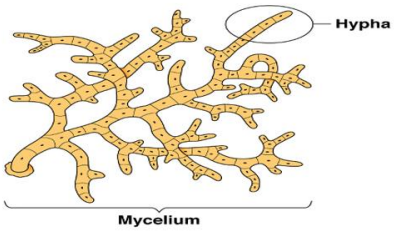
۱۳-*Fusarium*

۱۴-*Aspergillus*

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

۷-۱۲-۲ مخمرها [۱]

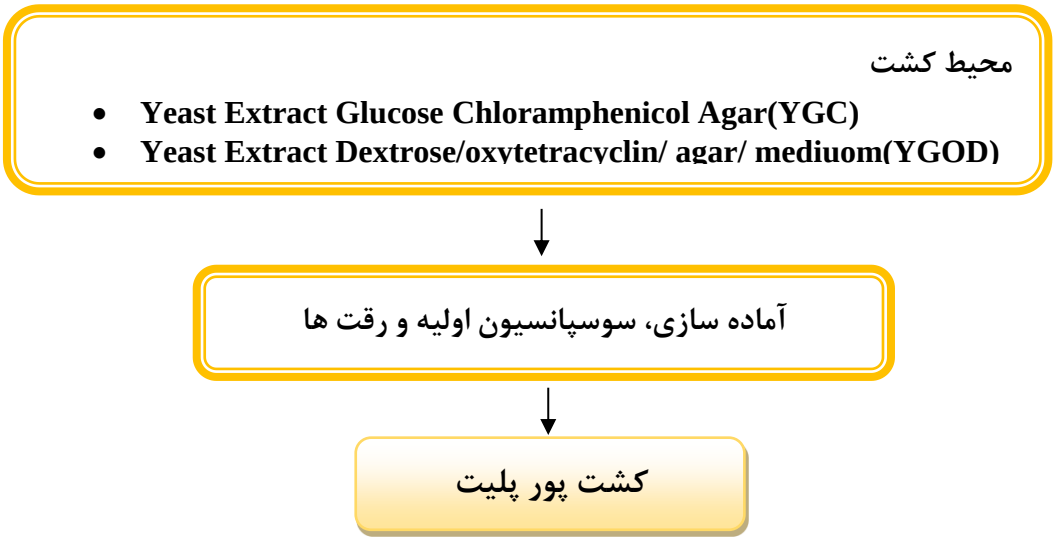
مخمرها یکی از گروه‌های قارچ‌های فاقد ر شته ه ستند به‌همین دلیل تک سلولی می‌با شند و بو سیله جوانه زدن تکثیر پیدا می‌کنند مخمرها پروتئولیتیک نیســتند در کارخانجات تخمیر صــنعتی، نانوایی، کارخانجات تقطیر بکار می‌روند این میکروارگانیـ سم‌ها تحت شرایط بی‌هوازی، قند را متابولیزه می‌کند و تولید الکل و به‌میزان کمی تولید ســلول جدید می‌کند در شــرایط هوازی تولید ســلول بیشــتری می‌کند و الکل تولید نمی‌شــود کلنی‌های مخمرها خامه‌ای با قوام بسیار نرم است غالباً تک یاخته هستند و ایجاد میسلیوم‌های کاذب می‌کنند. تولید مثل غیرجنسی آن‌ها اغلب بصورت جوانه زدن و در برخی بصورت تقسیم دوتایی می‌باشد. بیشتر گونه‌های آن تخمیرکننده و غیر بیماری‌زا هستند.



شکل ۵۹- هیف و میسیلیوم

۷-۱۲-۳ شمارش کپک و مخمر

۷-۱۲-۳-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۰۱۵۴، شیر و فرآورده‌های آن-شــمارش واحــدهای تشــکیل دهنــده کلنی کپک و یا مخمر-شمارش کلنی در پلیت در دمای ۲۵ °C



۱-Yeast

Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (YGC)

یـــا

Yeast Extract Dextrose/oxytetracyclin/ agar/ mediuom(YGOD)

↓

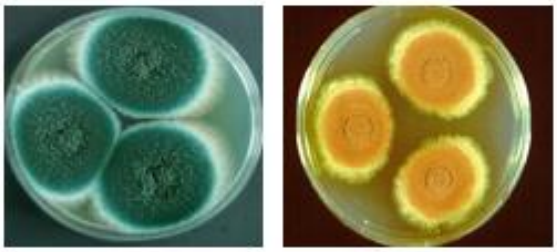
گرمخـــــــــــــانه گـــــــــــذاری هـــوازی

۲۵ ˚C±۰/۵ ˚C /۵ d تـــا ۳d

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

- **خصوصیات کلنی مخمر**

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



شکل ۶۰- کلنی‌های کپک‌ها

شکل ۶۱- کلنی‌های مخمرها

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 .

۷-۱۳ مخمرهای اسموفیلیک

۷-۱۳-۱ 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 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 میکروارگانیسم‌ها در محیط انتخابی، پس از گرمخانه گذاری در دمای ۲۵°C ± ۰/۵°C به‌مدت ۵ الی 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[۱]، میکروموفولوژی[۲]، قابلیت تولید آنزیم اوره، قابلیت رشد در محدوده دمایی ۴۰ °C تا ۵۰ °C، قابلیت رشد در pHهای مختلف، قابلیت 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 ٪ سیکلوهگزیمید[۳] مورد بررسی قرار می‌گیرد.

محیط کشت

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

***Osmophilic* Agar (MY۴۰G)**

تهیه محیط کشت:

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

مقدار ۳۹ g آگار دارای دکستروز – سیب زمینی را در ۴۰۰ mL آب مقطر حل کنید در حالی که هنوز گرم است، ۲۰ g گلوکز ۶۰۰ g ساکاروز را به‌آن بیافزایید *تا* کاملاً حل شود سپس حجم مخلوط را با آب مقطر به‌حجم ۱L برسانید. a_w این محیط کشت پس از سترون شدن، برابر ۰/۹۲ است

---

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

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

۳ - Cycloheximide

تهیه محیط کشت:

- **Osmophilic Agar (MY۴۰Gs)**

مقدار g ۱۲ پودر عصاره مالت، g ۳ عصاره مخمر و g ۱۲ آگار را در mL ۵۵۰ آب مقطر حل کنید سپس با آب مقطر به‌حجم برسانید در حالیک هنوز گرم است، g ۴۰۰ گلوکز را یکباره به‌آن افزوده و تکان دهید تا از تشکیل لخته ممانعت شود محیط را به مدت min ۳۰ در حمام بخار با دمای ۱۰۰ °C قراردهید این محیط لیل پایین بودن a_w نیاز به‌اتو کلاو کردن ندارد a_w نهایی این محیط پس از سترون شدن، حدود ۵/۵ در دمای ۲۵ °C است. محیط کشت را در مقادیر mL ۱۵در پتری دیش توزیع کنید. این محیط کشت به‌مدت ۲ هفته در دمای ۵°C ± ۳ °C قابل نگه داری است.

برای شمارش مخمرهای اسموفیلیک رقیق کننده‌هایی با فعالیت آبی کم مورد نیاز است در صورت استفاده از رقیق کننده هیپوتونیک[۱]، مخمرهای اسموفیلیک از بین خواهند رفت. برای کاهش فعالیت آبی محلول رقیق کننده عموماً از ٪ ۴۰ تا ٪ ۵۰ (وزنی/ وزنی) قندهای شش کربنه مانند: گلوکز و یا / قند اینورت باید استفاده کرد. توصیه می‌شود از محلول رقیق کننده فسفات بافری استفاده کنید .

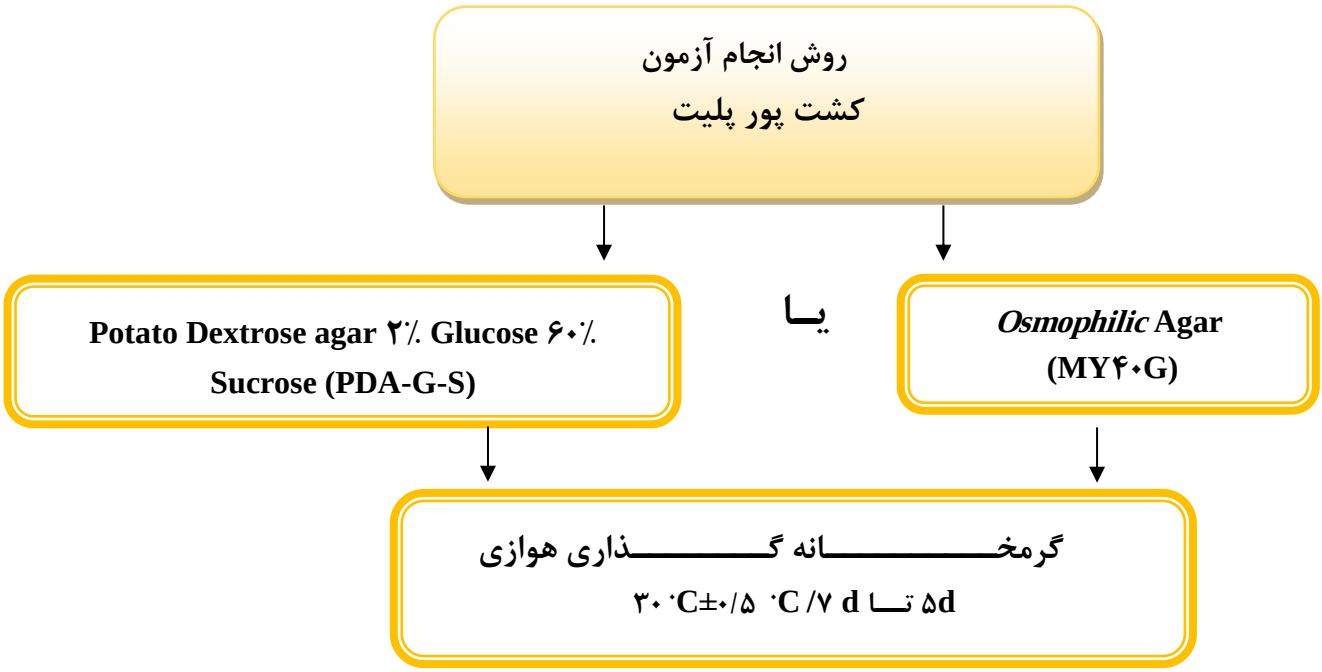
تهیه محلول رقیق کننده فسفات بافری:

مقدار g ۴۲/۵ فسفات دی هیدرژن پتاسیم (KH_2PO_4) را در mL ۱۰۰۰ آب مقطر حل کنید. pH را به گونه ای 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 min ۱۵ در دمای ۱۲۱ °C سترون کنید .

↓

آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها

۱- Hypotonic



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

شمارش کلنی‌ها

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

۷-۱۴ شمارش مستقیم میکروسکوپی

۷-۱۴-۱ اســـتاندارد ملـــی ایـــران شـــمارهٔ ۱-۵۰۲۸ ، شـــیر - یاختـــه هـــای پیکـــری-قســـمت اول - روش میکروسکوپی (روش مرجع)

ماستیتیس (ورم پستان) یک بیماری التهابی غده پستان است که به‌وسیله عوامل عفونی زیادی ایجاد می‌شود. عامل کلیدی التهاب و هجوم گلبول‌های سفید می‌باشد. و سبب افزایش تعداد سلول‌های سوماتیک در شیر می‌شود. این بیماری معمولاً بر اپیتلیوم تاثیر گذاشته در نتیجه ترکیبات شیر تغییر می‌کند. اکتینومیسس پیوژنز عامل ورم پستان در گاو است. که اغلب با دو باکتری پپتوکوکوس

ایندولیکوس و *استرپتوکوکوس دیس آگالاکتیه*[1] همراه می‌باشد که البته نقش پپتوکوکوس در بیماری زایی مشخص نشده است. علت شیوع بیماری در فصل تابستان فعالیت حشرات ناقل اکتینومیس است. *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*[2] و *استرپتوکوکوس یوبریس*[3] از عوامل مهم ایجاد بیماری هستند. تشخیص ورم پستان تحت بالینی به‌دلیل عدم علائم خاص بیماری در پستان و نیز به‌دلیل عدم تغییرات ظاهری در شیر دام مبتلا، از طریق شمارش سلول‌های سوماتیک شیر خام صورت می‌گیرد. و به‌دو روش مختلف، کیفی (مانند: آزمون کالیفرنیایی ورم پستان[4] و یا آزمون میشیگانی ورم پستان[5]) و کمی (مانند: شمارش سلول‌های سوماتیک یا پیکری[6]) تشخیص داده می‌شود. سپس نسبت به‌کشت میکروبی اقدام گردیده و با آنتی بیوگرام، آنتی بیوتیک خاص تعیین می‌گردد. شمارش سلول‌های سوماتیک، شمارش گلبول‌های سفید و سلول‌های پوششی مرده در کیسه‌های تولید شیر در هر میلی لیتر شیر خام است. و به‌عنوان شاخصی جهت شناسایی این بیماری و نیز یکی از فاکتورهای تعیین کننده است. اساس این روش، ثابت کردن یک لایه نازک از آزمونه شیر بر روی لام میکرسکوپی خشک و رنگ‌آمیزی با رنگ نیومن یا متیلن بلو، بررسی و شمارش میکروسکوپی یاخته-ها است که با ضرب تعداد یاخته‌های شمارش شده از یک ناحیه لام، در ضریب کاری، تعداد یاخته‌ها در میلی‌لیتر به‌دست می‌آید. این رنگ آمیزی به‌منظور شمارش سول‌های پیکری در شیر کاربرد فراوانی دارد در مشاهدهٔ میکروسکوپی شیرهای آلوده دام مبتلا به‌عفونت‌های مختلف مانند التهاب پستان گاو و بروسلوز، علاوه بر سلول‌های باکتریایی، سلول‌های پیکری مانند: سلول‌های پوششی، ماکروفاژها و گلبول‌های سفید رنگ آمیزی می‌شوند.

یادآوری- وجود سلول‌های بدنی با تعدادی کمتر از ۱۰۰۰۰۰ cells/mL شیر امری طبیعی بوده و مربوط به‌سلول های پوششی مجاری و آلوئول های پستانی است.چنانچه SCC بیش از ۱۰۰۰۰۰ cells/mL باشد، به‌احتمال زیاد آن کارتیه عفونی شده است.

نگه داری و آماده سازی آزمایه

نگه داری آزمایه:

آزمایه‌ها باید در مدت زمان۶ h پس از نمونه برداری آزمایش شوند در غیر این صورت و در صورت نگه‌داری آزمایه به‌مدت طولانی‌تر، لازم است نگهدارنده‌های شیمیایی مانند: اسید بوریک، برونوپول یا

۱- Streprococcus dysgalactiae

۲- Streprococcus agalactiae

۳-VStreptococcus uberis

۴- California mastitis test (CMT)

۵- Michigan mastitis test (MMT)

۶- Somatic cell count (SCC)

دیکرومات پتاسیم به‌شیر اضافه شود. بیشینه مجاز به‌ازای هر mL ۱۰۰ آزمایه در جدول ۲۴ نوشته شده است .

جدول ۲۴- بیشینه مجاز نگه دارنده

نگه دارنده	غلظت نهایی بیشینه مجاز به‌ازای هر mL ۱۰۰
اسید بوریک	۰/ ۶ g
برونوپول	۰/ ۰۵g
دی‌کرومات پتاسیم	۰/ ۱ g
- آزمایه‌های دارای مواد نگه دارنده، حداکثر تا ۶ روز در دمای ۴ °C ± ۲°C قابل نگداری است. - به‌دلایل زیست محیطی توصیه می‌شود برای نگه داری طولانی‌تر فقط از دی‌کرومات پتاسیم استفاده کنید.	

آماده سازی آزمایه

آزمایه‌ها را در حمام آبگرم با دمای ۴۰°C ± ۲°C، گرم کرده و با احتیاط مخلوط کنید، سپس تا دمای کالیبره شدن میکرو سرنگ (۲۰°C) خنک کنید.

با استفاده از فرمول شماره ۱ آزمایه‌های دارای یاخته‌های پیکری با تعداد تخمینی بیشتر از 10^6 را با محلول بافر فسفات به نحوی رقیق کنید تا به‌شمارش حدود 5×10^5 یاخته پیکری در هر میلی لیتر آزمایه دسترسی پیدا کنید. برای آماده‌سازی آزمایه به‌استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲-۵۰۲۸ بند ۹ مراجعه کنید .

$$d = \frac{V_s}{(V_s \times V_b)}$$

که در آن :

d ضریب رقت برا ی بدست آوردن شمارش حدود $10^5 \times 5$ یاخته پیکری در هر میلی لیتر آزمایه

Vs حجم آزمایه بر حسب میلی لیتر

V_b حجم بافر فسفات به‌کار رفته برای رقیق کردن آزمایه بر حسب میلی لیتر، می‌باشد

مقدار ضریب رقت، حجم آزمایه و حجم بافر به‌کار رفته برای به‌دست آوردن رقت مورد نیاز را ثبت کنید.

روش اجرای آزمون

آماده سازی گستره و رنگ آمیزی

برای هر آزمایه دو گستره تهیه و رنگ آمیزی کنید و بهترین آن شمارش کنید لام‌ها را پیش از استفاده در اتانل ۹۵٪ فرو برده و اجازه دهید الکل آن تبخیر شود.

یاد آوری–برای انجام این آزمون‌ها از میکروسرنگ استفاده شود.

- **آمـاده سـازی گسـتـره و رنگ آمیـزی با محلـول نیـومـان – لامپـرت**

↓

میکروسرنگ را با آزمایه چندین بار شستشو دهید.

↓

سطح خارجی میکروسرنگ آغشته با آزمایه را پاک کنید.

↓

۰/۰۱ml آزمایه کاملاً مخلوط شده(بدون تغییر یا رقیق شدن)
را در وسط سطح لام تمیز دارای محدوده $1cm^2$پخش کنید.

↓

آزمایه را با استفاده از سوزن در تمامی سطح محدوده یکنواخت کنید.

↓

گستره را در دمای اتاق خشک کنید.

↓

لام با گستره خشک را در محلول نیومان–لامپرت به‌مدت زمان۱۵min، غوطه‌کنید.

↓

گستره را در دمای اتاق خشک کنید.

↓

لام با گستره خشک را در آب معمولی غوطه‌ور کنید

↓

رنگ اضافی را شستشو دهید.

↓

لام را در دمای اتاق خشک کنید.

↓

لام را در شرایط مناسب و دور از گرد و غبار نگه داری کنید.

- **آمـــاده ســـازی گستـــره و رنـــگ آمیـــزی بـــا محلـــول رنـــگ اتیـدیـــوم بروماید**

۱ml آزمایه آماده سازی شده و ۱ml اتیدیوم بروماید را به‌لـولـه آزمایش منتقل کنید.
(مخلوط را از تابش نور محافظت کنید.)

↓

مخلوط (آزمایه آماده سازی شده و اتیدیوم بروماید) را در بـن مـــاری C° ۵۰ به‌مدت زمان min ۳گرمخـانه گـذاری کنید.

مخلوط را خنک کنید و با میکروسرنگ را چندین بار شستشوی دهید.

↓

۰/۰۱ml از مخـلوط را با استفاده از میکروسرنگ در وسط سطح لام تمیز (دارای محدوده cm^{2}۱) پخش و یکنواخت کنید.

↓

آزمایه را در تمامی سطح محدوده گسترده کنید.

↓

گستره را در دمای اتاق خشک کنید.

شمارش هسته یاخته‌ها با استفاده از میکروسکوپ با بزرگنمایی (از ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر)

ارزش یـــــاختـــه‌هـــا :

-یاخته دارای هسته، رنگی و معمولا µm ۸ یا بلندتر (دارای ارزش)

-یاخته با اندازه های کمتر از µm ۴ (بدون ارزش)

-یاخته متلاشی که ۵۰٪ مواد هسته‌ای قابل رویت باشد (دارای ارزش)

-یاخته‌های به‌هم چسبیده (ارزش یک یاخته)

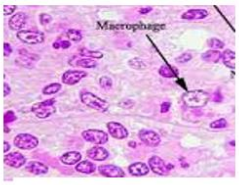
-یاخته‌های به‌هم چسبیده دارای هسته واضح و مجزا (دارای ارزش)

یاختـــه چنـــد هســـته‌ای[1]: در ورم پســـتان حـــاد تـــا ۹۰٪ و در ورم مـــزمن تـــا ۶۰٪ دیـــده مـــی‌شـــود نســـبت ســـیتو پلاســـم بـــه‌هســـته کـــم بـــوده، فاگوســـیتوز [2]اســـت ایـــن یاختـــه‌هـــا اولـــین رده دفـــاعی در بیماری ورم پستان است.

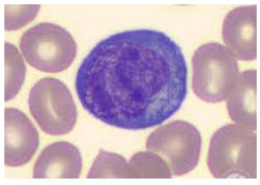
یاخته پوششی[3]: اندازه ۱۰ µm-۱۴ µm دارای هسته گرد و ستو پلاسم رنگ پذیری ضعیف دارد.

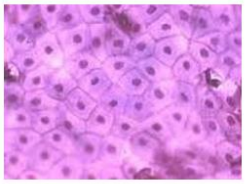
لمفوسیت[4]: اندازه ۱۰ µm-۵µm نسبت سیتو پلاسم به‌هسته کم است. هسته‌ها شدیدا رنگ آمیزی می‌شوند. به دو دسته T و B تقسیم می‌شوند.

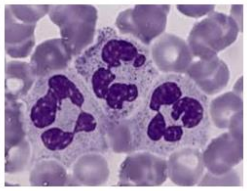
ماکرو فاژ[5] : اندازه ۱۰ µm-۱۰ µm ۵ نسبت سیتوپلاسم به‌هسته کم و فاگوسیتوز است.



شکل ۶۲- سلول‌های ماکروفاژ


شکل ۶۳- سلول‌های لمفوسیت


شکل ۶۴- سلول‌های پوششی


شکل ۶۵- سلول‌های چند هسته‌ای

محاسبه و بیان نتایج

محاســـبه و بیـــان نتـــایج طبـــق بنـــد ۱۱ اســـتاندارد ملـــی ایـــران شـــمارهٔ ۱-۵۰۲۸ شـــیر و فـــرآورده‌هـــای آن - شمارش مستقیم میکروسکوپی انجام دهید.

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،

۱- Polymorphy nuclea (PMN)

۲- phagocytosis

۳- Epithelial cell

۴- Lymphocyte

۵- Macrophage

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، به‌میلی لیتر ،

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

C تعداد کلنی های شمارش شده روی یک پلیت ،

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

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

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 به‌صورت زیر بیان کنید:
وجود باکتری در نمونه S (مثبت).
چنانچه از روش‌های غنی سازی استفاده شود و پس از غنی‌سازی رشدی مشاهده نشد و یا چنانچه شناسایی کلنی‌ها وجود این گونه را تایید نکند، نتیجه را به‌صورت زیر بیان کنید:
عدم وجود باکتری در نمونه S (منفی).

۸-۳ صحه‌گذاری

۸-۳-۱ صحه‌گذاری شمارش

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

۸-۳-۲ صحه‌گذاری جستجو

چنانچه در پلیت صحه‌گذاری، باکتری رشد کند و در پلیت شاهد رشد مشاهده نشود روش خنثی‌سازی و جستجو صحه‌گذاری شده است.
چنانچه در پلیت شاهد رشد مشاهده شود، روش خنثی‌سازی و جستجو در صورتی صحه‌گذاری می‌شود باکتری از پلیت صحه گذاری شده، بازیافت شود.
عدم رشد روی پلیت های صحه گذاری نشان دهندهٔ این است که فعالیت ضد میکروبی هنوز وجود دارد و تغییر شرایط آزمون بوسیلهٔ افزایش مقدار محیط کشت مایع مغذی با مقدار ثابت فرآورده و یا افزودن مقدار کافی مادهٔ خنثی کننده در محیط کشت مایع غنی‌کننده، یا با ترکیب مناسبی از این تغییرات به‌گونه‌ای که اجازهٔ رشد به باکتری بدهد، لازم است.
چنانچه علیرغم افزودن مقدارکافی مادهٔ خنثی‌کننده و افزایش قابل توجه در حجم محیط کشت مایع، همچنان امکان بازیافت کشت‌های زنده به‌شرح فوق وجود نداشت، نشان دهندهٔ این است که احتمال آلودگی فرآورده با باکتری مورد نظر وجود ندارد.

۸-۴ تعیین مقادیر MPN

۸-۴-۱ اساس روش

سه روش اصلی برای تعیین مقادیر MPN وجود دارد:

۸-۴-۱-۱ فرمول ریاضی

برای تخمین میکروارگانیسم‌ها در ۱۰۰ mL نمونه و یا به‌عبارت 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 به‌میلی‌لیتر (معمولادر ۱۰۰mL) .

Vneg حجم کل در تمام لوله‌های دارای واکنش منفی به mL .

Vtot حجم کل نمونه در تمام لوله‌ها به mL .

۸-۴-۱-۲ جدول MPN

برای تخمین میکروارگانیسم‌ها در نمونه و یا به‌عبارت دیگر برای تعیین بیشترین تعداد احتمالی MPN در نمونه به‌استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹، مراجعه کنید.

۸-۴-۱-۳ 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 می شود 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 پلیت‌های 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 افزایش می‌یابد.

پیوست الف

استانداردهای مرتبط با (GMP)فرآورده های لبنی

الف ۱ - استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹، راهنمای کلی برای آزمون های میکروبیولوژی

این استاندارد به‌حصول اطمینان از یکسان بودن روش های کلی برای انجام آزمون‌های میکروبیولوژی در آزمایشگاههایی که استاندارد ها را پذیرفته اند کمک می‌کند. کاربرد این استاندارد، دستیابی به‌نتایج هماهنگ در آزمایشگاههای مختلف را تسهیل کرده و با پیشگیری از خطر عفونت، باعث حفظ سلامت کارکنان آزمایشگاه می شود. هنگام انجام آزمون های میکروبیولوژی مواد غذایی توجه به‌نکات 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 روش هایی که از آلودگی های 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 روش‌های 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 روش های خود را تصدیق کند. انجام اقدامات احتیاطی خاص نه‌تنها به‌دلائل 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 آماده سازی، سترون سازی و انبارش محیط های کشت و تجهیزات در نظر گرفته شود، تعیین می‌کند.

الف ۲ - استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴۶۲۹، آئین‌کار 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 فرآورده‌های لبنی ارائه می‌دهند. این راهنما توصیه‌های سازمانی و عملی درزمینه 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، بارگیری و حمل فرآورده ی لبنی می‌باشد و راهنمای تعیین فعالیت‌هایی است که دستیابی به‌فرآورده‌ای منطبق با ویژگی‌های خاص را امکان پذیر می‌سازد.

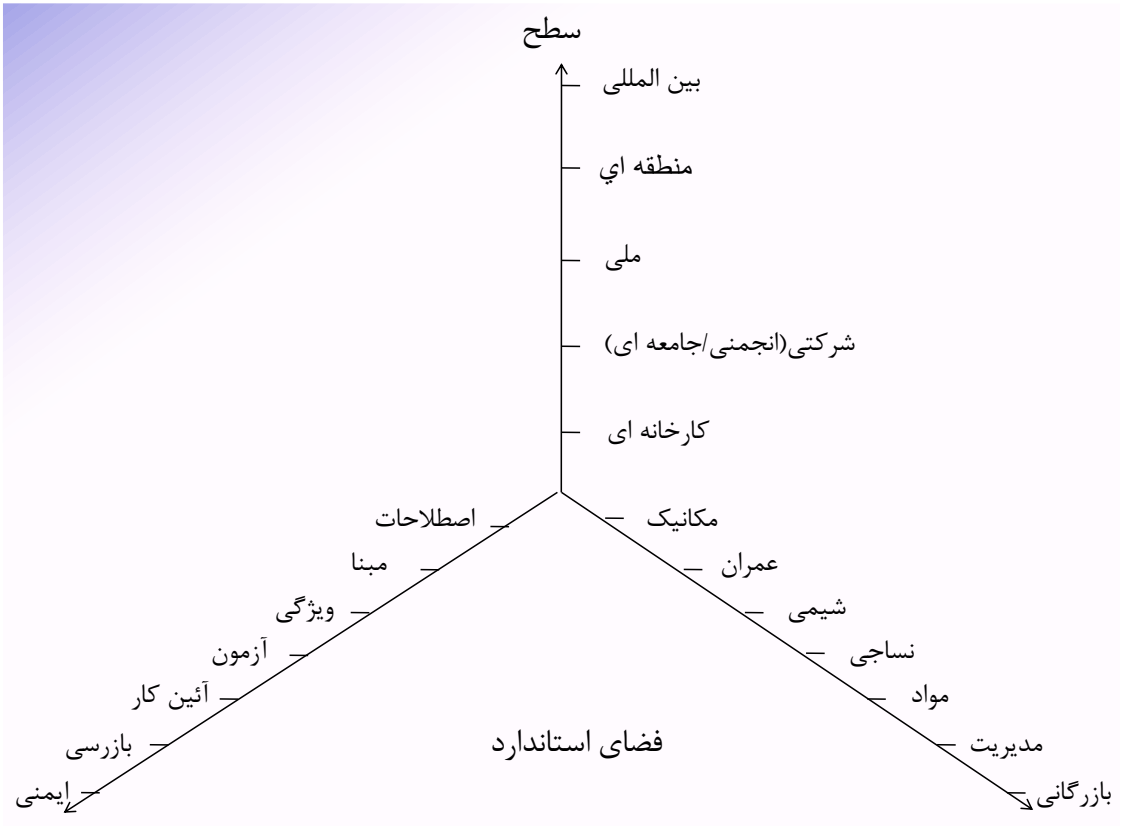
الف ۳ - استانداردهای مرتبط با فرآورده‌های لبنی

- 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 و روش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۵۲۷، شیرطعم دار-ویژگی ها وروش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۵۲۸، شیر و فرآورده 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 روش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴۴۹۴، بسته بندی –شیر و فرآ ورده‌های شیری
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵۴۸۵، واحدهای تولیدی شیر و فرآورده‌های آن -شرایط بهداشتی -بازرسی و نمونه برداری
- 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 فرآورده‌های آن –پودر پنیر-ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۷۶۸۶، پودر خامه- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۷۷۷۱،کره پاستوریزه – راهنمای استقرار سیستم تجزیه و تحلیل عوامل خطرزا و نقاط کنترل بحرانی (HACCP)
- 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 روش-های 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 روش‌های 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 روش های آزمون
- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۰۸۳۴، میکروبیولوژی زنجیره مواد غذایی –روش‌های نمونه برداری برای آزمون‌های میکروب شناسی

پیوست ب
انواع استاندارد

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



ب-۲ سطح استاندارد

استانداردها دارای سه سطح کلی می باشند که می توان آن‌ها را به‌صورت زیر تقسیم بندی کرد:

الف- استانداردهای کارخانه ای، این گونه استانداردها توسط کارخانجات و به‌منظور استفاده در همان واحد تدوین می شود. در تدوین استاندارد کارخانه ای ضمن بررسی شرایطداخلی 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 می‌شود. 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 دولتیو امثال آن شرکت دارند.

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

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

ب-۳- جنبه استاندارد

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

الف- استانداردهای ویژگی

ب- استاندارد های روش آزمون

پ- استانداردهای آیین کار

ت- استانداردهای ایمنی

ث- واژه نامه

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

ب-۴- اجرای استاندارد

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

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

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

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

www.isiri.gov.ir

پیوست 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 بررسی‌ها، اندازه گیری و آزمون‌هایی 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 جواب‌های تکراری حاصل از چند آزمایش بر روی یک نمونه است.

پ-۷- تجدید پذیری (Reproducibility)

نزدیکی میزان مقادیر بدست آمده از آزمون‌ها 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 واحدهای 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 نمونه‌های تولید شده در کارخانه را روزانه ثبت نموده و به صورت کتبی ماهیانه (حداکثر تا پایان هفته اول ماه بعد) به اداره کل استاندارد استان (با امضاء مدیر کنترل کیفیت و مدیر عامل کارخانه) ارسال نماید.

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

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

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

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 می‌گردند:

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 به نحو 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 به میزانی است که کارآیی آن کالا را چندان کاهش نمی دهد. نقایص بحرانی ،عمده و جزئی آزمون‌ها 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 فهرست زیر (جدول ۱) به واحد تولیدی تعلق گرفته و ادارات کل استاندارد استان بر اساس جمع امتیازات منفی در طول یک دوره (از هنگام صدور و یا تمدید پروانه کاربرد علامت استانداردبرای هر محصول و هر واحد تولیدی مورد نظر در مدت اعتبار تعیین شده) تصمیماتی را به شرح مندرج در جدول ۲ اتخاذ می نمایند.

جدول ۱- امتیازات منفی نواقص موجود در فرآورده

نوع نقص	امتیاز منفی
بحرانی	۳۰
عمده	۱۵
جزئی	۵

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

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

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

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

ت-۳-۳ در مورد کالاهای مشمول استاندارد اجباری، در صورتیکه امتیاز منفی یک گزارش نتیجه آزمون و یا جمع امتیازات منفی نتایج چند آزمون به ۱۲۰ رسید، اداره کل استاندارد استان مربوط، علاوه بر اخطار کتبی، برای جمع آوری کالای مغایر با استاندارد ملی با شماره سری ساخت مربوط موضوع را به کمیسیون ماده ۱۹ ارجاع می نماید. همچنین در صورتیکه امتیاز منفی مذکور ناشی از حداقل نتایج آزمون سه نمونه برداری مختلف بوده و

حداقل ۳۰ امتیاز از جمع امتیازات منفی گزارش نتیجه آزمون آخر به واسطه نقایص عمده و بحرانی باشد، نسبت به تشکیل کمیته علایم برای ابطال پروانه کاربرد علامت استاندارد اجباری اقدام نموده و در صورت ابطال پروانه، موضوع را از طریق روابط عمومی به اطلاع عموم می رساند.

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 به حد نصاب امتیاز منفی ذکر شده در بندهای مذکور است.

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

پیوست ث

نقایص بحرانی ، عمده و جزئی آزمون‌های میکروبیولوژی فرآورده های لبنی غیر تخمیری

طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۴۰۶

ردیف	شرح آزمون	درجه اهمیت
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌های هوازی	عمده
۲	تعداد یاخته‌های پیکری	عمده
۳	آنتروباکتریاسه	عمده
۴	کلیفرم‌ها	بحرانی
۵	اشریشیا کلی	بحرانی
۶	استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت	بحرانی
۷	میکروارگانیسم‌های سرماگرا	عمده
۸	اسپورکلستریدیوم‌های احیأکننده سولفیت	بحرانی
۹	سالمونلا	بحرانی
۱۰	کپک و مخمر	عمده