ریاست جمهوری
سازمان ملی استاندارد ایران

جزوه دوره کارآموزی

میکروبیولوژی گلاب و عرقیات گیاهی

شماره مدرک : ۶۲۲/۳۴/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 ا ستاندارد ایران به موجب بند یک مادۀ ۳ قانون ا صلاح قوانین و مقررات مؤ س سۀ ا ستاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفۀ تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

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

پیش‌نویس ا ستانداردهایی که مؤ سسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی¬ صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند درکمیته ملی طرح، بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استانداردملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شمارۀ ۵ تدوین و در کمیتۀ ملی ا ستاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

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

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصــول اطمینان از کیفیت محصــولات و ملاحظات زیســت محیطی و اقتصــادی، اجرای بعضــی از ا ستانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی ا ستاندارد، اجباری کند. ســازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصــولات کشــور، اجرای اســتاندارد کالاهای صــادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤ سسات فعال در زمینۀ مشاوره، آموزش، بازر سی، ممیزی و صدورگواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامۀ تأیید صلاحیت به آنها اعطا و بر عملکرد آن¬ها نظارت میکند. ترویج د ستگاه بین المللی یکاها، وا سنجی و سایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

۱- International Organization for Standardization

۲- International Electrotechnical Commission

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

۴-Contact point

۵- Codex Alimentarius Commission

پیشگفتار

یکی از مهمترین وظایف سازمان ملی استاندارد ایران، آموزش های اصولی و مدون در زمینه محصولات (کالا / خدمات) مشمول استاندارد اجباری از طریق برگزاری دوره های آموزشی می باشد. بخشی از این آموزش‌ها شامل کارآموزی مدیران کنترل کیفیت و کارشناسان آزمایشگاه های همکار سازمان می باشد که برگزاری این دوره ها از طریق استان‌ها، آزمایشگاه های همکار و پژوهشگاه استاندارد انجام می‌شود. برای ایجاد وحدت رویه و هماهنگی در نحوه برگزاری این دوره ها در مراکز مختلف به منظور ارتقاء کیفیت آموزش مخاطبین مورد نظر، دفتر آموزش و ترویج استاندارد با همکاری پژوهشگاه استاندارد، در راستای استاندارد سازی فرآیند کارآموزی، اقدام به تدوین برنامه مدونی برای انجام فرآیند کارآموزی در زمینه محصولات مشمول استاندارد اجباری نموده است.

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

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

محتوای دوره کارآموزی
میکروبیولوژی گلاب و عرقیات گیاهی

عنوان دوره کارآموزی:

میکروبیولوژی گلاب و عرقیات گیاهی

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 گلاب و عرقیات گیاهی بر اساس استانداردهای ملی ایران شماره‌های ۳۲۷۰، ۳۵۴۵ و ۹۸۹۹ و موارد زیر را در برمی‌گیرد:

۱- اطلاع رسانی روش‌های بهینه و جدید آزمایشگاهی گلاب و عرقیات گیاهی
۲- یکسان‌سازی رویه آزمایشگاه میکروبیولوژی
۳- اطمینان از عملکرد صحیح آزمایشگاه ها و اعتماد به نتایج حاصله از آزمون در آزمایشگاه‌ها
۴- ارتقا سطح آگاهی و ایجاد مهارت در زمینه انجام آزمون‌های میکروبیولوژی گلاب و عرقیات گیاهی 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	-	*		جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹
۲	آشنایی با روش تهیه محیط کشت های مورد نیاز و روش سترون‌سازی	آشنایی با وسایل مورد نیاز آشنایی با اصول آزمایشگاهی آشنایی با قسمت‌های مختلف آزمایشگاه میکروبیولوژی	۰/۵	-	*		جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹
۳	آماده‌سازی وسایل مورد نیاز و روش سترون‌سازی وسایل	روش تهیه محیط کشت مرتبط با گلاب و عرقیات گیاهی	۰/۵	۰/۵	*	*	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹
۴	آشنایی با استاندارد روش آزمون	روش آماده‌سازی وسایل مورد نیاز و سترون‌سازی وسایل	۰/۵	۰/۵	*	*	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹
۵	آشنایی با شاخص‌های میکروبی و حدود مجاز آنها در گلاب و عرقیات گیاهی	هدف و دامنه کاربرد، مواد و دستگاه‌های مورد نیاز جهت انجام آزمون	۰/۵	۰/۵	*		جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره های:۳۲۷۰و ۳۵۴۵
۶	روش آماده‌سازی نمونه در آزمایشگاه	آشنایی با میکرو ارگانیسم‌های گلاب و عرقیات گیاهی	۱	۱			جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شمارهٔ های:۳۲۷۰. ۳۵۴۵
۷	روش شمارش و جستجوی باکتری‌ها	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:۳۲۷۰و ۳۵۴۵

ردیف	رئوس مطالب	محتوای آموزشی	مدت آموزش (ساعت)		اجراکننده		منبع / استانداردها
			تئوری	عملی	مدرس	کارآموز	
۸	گرمخانه‌گذاری	استفاده از سوسپانسیون اولیه و یا رقت‌های مورد نیاز در پلیت، برای شمارش استفاده از سوسپانسیون اولیه و یا رقت‌های مورد نیاز در لوله‌های حاوی محیط کشت مناسب برای جستجو	۱	۱	*	*	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره‌های: ۳۲۷۰و ۳۵۴۵
۹	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره-های: ۳۲۷۰و ۳۵۴۵	بررسی و نحوه شمارش و محاسبه کلنی‌ها پس از گرمخانه‌گذاری -تعیین وجود یا عدم وجود باکتری‌ها	۱	۱	*	*	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره‌های: ۳۲۷۰و ۳۵۴۵
۱۰	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹	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:

استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۲۸۰، عرقیات گیاهی – آیین کار تولید

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 میکروبیولوژی گلاب و عرقیات گیاهی

تهیه کننده/ تهیه کنندگان:
شهپر مقدمی

گروه پژوهشی/ آزمایشگاه:
گروه پژوهشی میکروبیولوژی/ آزمایشگاه گلاب و عرقیات
گیاهی
به سفارش دفتر آموزش و ترویج استاندارد

منابع و مآخذ:

۱- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۲۷۰، میکروبیولوژی گلاب - ویژگی‌ها
۲- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۵۴۵، میکروبیولوژی عرقیات گیاهی- ویژگی‌ها
۳- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۶۹۰، فرآورده های کشاورزی- نمونه برداری از فرآورده های بسته بندی شده که مصرف غذایی دارند.
۴- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۱، میکروبیولوژی زنجیره غذایی -روش جامع برای شمارش میکروارگانیسم‌ها-قسمت ۱- شمارش کلنی در ۳۰ درجه سلسیوس با استفاده از روش کشت آمیخته
۵ - استاندارد ملی شمارهٔ ۵۳۵۳، آب - جستجو و شمارش اسپورکلستریدیوم‌های احیأکننده سولفیت با استفاده از صافی غشایی
۶ - استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲-۷۷۲۴، کیفیت آب - جستجو و شمارش انتروکوک‌های روده‌ای – قسمت دوم - روش صافی غشایی
۷ - استاندارد ملی شمارهٔ ۱-۷۷۲۵، کیفیت آب- جستجو و شناسایی اشریشیاکلی و کلی فرم ها قسمت اول - روش صافی غشایی
۸ - استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۶۶۳، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام و آب- آماد سازی، ساخت، ذخیره سازی و آزمون عملکرد محیط های کشت
۹ - استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۸۶۹، کیفیت آب- شناسایی و شمارش سودوموناس آئروژینوزا به روش صاف کردن غشایی

۱۰ - استاندراد ملی ایران شمارهٔ ۱-۸۹۲۳، میکروبیولوژی مواد غـــذایی و خـــوراک دام - آماده سازی آزمایه- سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی- قسمت اول- مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری.
۱۱ - استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴-۸۹۲۳، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون میکروبی- قسمت ۴- مقررات ویژه برای آماده سازی فرآورده ها به جز شیر، گوشت، ماهی و فرآورده های آنها
۱۲ - استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -راهنمای الزامات کلی برای آزمون
۱۳ - استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۱۰۸۹۹، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش شمارش کپک‌ها و مخمر ها – قسمت اول : روش شمارش کپک‌ها و مخمرها – روش شمارش کلنی در فرآورده‌های با فعالیت آبی (aw) مساوی یا بیشتر از ۰/۹۵
۱۴ - یگانه، مهرداد. استاندارد و استاندارد کردن، چاپ اول، موسسه دانش پارسیان، ۱۳۸۹

فهرست

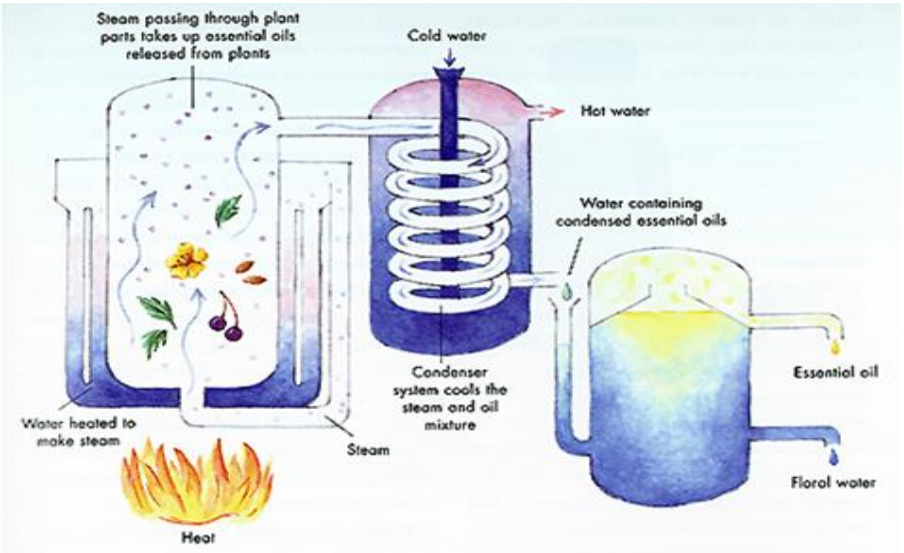
عنوان	صفحه
آشنایی با سازمان ملی استاندارد	ب
پیشگفتار	ج
محتوای دوره کار آموزی	د
جزوه دوره کار آموزی میکروبیولوژی گلاب و عرقیات گیاهی	ی
مقدمه	م
۱ هدف	۱
۲ استانداردهای ملی ایران	۱
۳ اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی	۲
۴ نمونه برداری	۳۰
۵ روش‌های آزمون	۳۱
۶ محیط‌های کشت و رقیق‌کننده‌ها	۳۲
۷ روش اجرای آزمون	۳۳
۸ بیان نتایج	۵۶
پیوست الف- استانداردهای مرتبط با (GMP)	۵۹
پیوست ب – انواع استاندارد	۶۱
پیوست پ – مفاهیم مورد استفاده در کنترل	۶۳
پیوست ت -(اطلاعاتی)	۶۴
پیوست ث - نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌های میکروبیولوژی گلاب و عرقیات گیاهی طبق استاندارد ملی ایران شماره‌های ۳۲۷۰ و ۳۵۴۵	۶۷

مقدمه:

تولید صنعتی گلاب و سایر عرقیات گیاهی به روش تقطیر

فرایند تقطیر نوعی روش ا ستخراج ا ست که قدمت طولانی دا شته و در آن، مایع به ترکیباتی که نقطه جوش متفاوت دارند تق سیم می شود. تکنولوژی تقطیر ن سبتاً ساده می‌با شد. تقطیر با آب قدیمی‌ترین و ارزان‌ترین روش تقطیر است که طراحی و ساخت آن ساده و کم هزینه می‌باشد. این روش به طور عمومی برای استخراج ا سانس از مواد خشک یا پودر شده گیاهی (مانند: ادویه‌های پودر شده) مواد چوبی پودر شده (مانند: پو ست درخت دارچین) گل‌ها (مانند: گل محمدی) و اندام‌هایی که ب سیار سخت و محکم ه ستند (مانند: ری شه‌ها، چوب‌ها و میوه‌ها) ا ستفاده می شود. به عمل تبخیر و میعان متوالی تقطیر گویند. یعنی در این فرآیند مایعات ابتدا به بخار تبدیل شـــده و پس از فرایندی بخار ســـرد و به مایع تبدیل می‌گردد. طی این فرآیند بخارات حاصل از گرما تحت تاثیر سرما تبدیل به قطرات مایع می‌گردد و با جمع‌آوری این قطرات که از میعانات پشت سر هم حاصل می‌گردد؛ موادی خالص و مقطر به دست می‌آید. معمولا با عمل تقطیر می‌توان ترکیب مختلف معطر را بدون تغییر از گیاه خارج کرد.

به طور کلی یک ســیســتم تقطیر ســاده از چهار بخش: مشــعل (به عنوان منبع گرما)، مخزن تقطیر، مبرّد و قسمت جداکنندهٔ اسانس[1] تشکیل شده می‌شود.



شکل۱ – مراحل تولید عرقیات

۱ – اســانس گیاهی، معمولا شــامل مجموعه ای از روغن‌های فرار و معطر که به‌یکی از روش‌های تقطیر با آب، تقطیر با بخار آب، جداســازی به‌روش مکانیکی بدون استفاده از حرارت و همچنین استخراج با حلال، از بخش‌های مختلف گیاهان استحصال می‌شوند. و معمولا از فاز آبی، به‌وسیله یک روش فیزیکی منا سب جدا می شود. ساختمان شیمیایی ا سانس‌ها شامل ا سترها، آلدئیدها، الکل‌ها، فنل‌ها، کتن‌ها، و ترپن‌ها می‌با شند. و ب سته به ساختار شیمیایی دارای عطر و طعم و ویژگی‌های متفاوتی می‌باشند و معمولا در آب نامحلول و در حلال‌های آلی و الکل محلول می‌باشند.

جزوه دوره کارآموزی میکروبیولوژی گلاب و عرقیات گیاهی

۱ هدف

هدف از تدوین این جزوه کارآموزی آشنایی با روش‌های میکروبیولوژی انواع گلاب و عرقیات گیاهی بر اساس استانداردهای ملی ایران شماره‌های ۳۲۷۰و ۳۵۴۵ می‌باشد.

یادآوری۱- توصیه می‌شود کارآموزان این دوره با الزامات آزمایشگاهی میکروبیولوژی و نیز استانداردهای ملی ایران شماره‌های ۴۲۰۷، ۱-۵۲۷۲، ۵۳۵۳، ۲-۷۷۲۴، ۱-۷۷۲۵، ۸۶۶۳، ۸۸۶۹، ۱-۸۹۲۳، ۱-۱۰۸۹۹و ۹۸۹۹ آشنایی داشته باشند.

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

۲ استانداردهای ملی ایران

استانداردهای ملی ایران مرتبط با آزمون میکروبیولوژی گلاب و عرقیات گیاهی به شرح جدول ۱ می‌باشند.

جدول ۱- لیست استانداردهای گلاب و عرقیات گیاهی

ردیف	عنوان استاندارد	شمارهٔ استاندارد
۱	میکروبیولوژی گلاب- ویژگی‌ها	۳۲۷۰
۲	میکروبیولوژی عرقیات گیاهی- ویژگی‌ها	۳۵۴۵
۳	میکروبیولوژی زنجیره غذایی -روش جامع برای شمارش میکروارگانیسم‌ها-قسمت ۱- شمارش کلنی در ۳۰ درجه سلسیوس با استفاده از روش کشت آمیخته	۵۲۷۲-۱
۴	کیفیت آب– جستجو و شمارش باسپور کلستریدیوم‌های احیاء کننده سولفیت با استفاده از صافی غشایی	۵۳۵۳
۵	کیفیت آب- جستجو و شمارش انتروکوک‌های روده ای – قسمت دوم : روش صافی غشایی	۷۷۲۴-۲
۶	کیفیت آب- جستجو و شناسایی اشریشیا کلی و کلی فرم‌ها قسمت اول : روش صافی غشایی	۷۷۲۵-۱
۷	میکروبیولوژی موادغذایی و خوراک دام و آب- آماد سازی، ساخت، ذخیره سازی و آزمون عملکرد محیط های کشت	۸۶۶۳
۸	کیفیت آب - شناسایی و شمارش سودوموناس آئروژینوزا به روش صاف کردن غشایی	۸۸۶۹

ادامه جدول ۱- لیست استانداردهای گلاب و عرقیات گیاهی

ردیف	عنوان استاندارد	شماره استاندارد
۹	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - آماده سازی آزمایه-سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی- قسمت اول- مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری.	۸۹۲۳-۱
۱۰	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت-های اعشاری برای آزمون میکروبی- قسمت ۴- مقررات ویژه برای آماده سازی فرآورده‌ها به جز شیر، گوشت، ماهی و فرآورده‌های آنها	۸۹۲۳-۴
۱۱	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -راهنمای الزامات کلی برای آزمون	۹۸۹۹
۱۲	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش شمارش کپک‌ها و مخمر ها – قسمت اول: روش شمارش کپک‌ها و مخمرها – روش شمارش کلنی در فرآورده های با فعالیت آبی (aw) مساوی یا بیشتر از ۰/۹۵	۱۰۸۹۹-۱

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 نمونه‌ها، آزمون و فضای عمومی باشد.

۳-۱- ۱ فضای مربوط به‌نمونه وآزمون

با توجه 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.
- از خوردن و آشامیدن درآزمایشگاه خودداری شود.
- کشیدن پی‌پت با دهان ممنوع می‌باشد.

۳-۳ وسایل و تجهیزات

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

پیش از ا ستفاده بهترا ست و سایل از نظردا شتن شرایط لازم برای کارت صدیق و در صورت لزوم در طی استفاده، عملکرد آن پایش شود.

از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی مطابق با استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹ و همچنین وسایل مندرج در جدول ۲ استفاده شود:

جدول ۲- فهرست تجهیزات مورد نیاز برای آزمون میکروبیولوژی

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

وسایل و ظروف شیشه‌ای آزمایشگاهی

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

شکل۲ - وسایل شیشه‌ای

حمام مایع[۱] (بن ماری[۲])بادمای ثابت

این وسیله برای انجام تست‌های سرولوژیک، آگلوتیناسیون، بیوشیمی، تست‌های دارویی، در دمای تثبیت شده کاربرد دارد. حرارت آب دستگاه به‌وسیله یک ترموستات قابل تنظیم است. بهتر است که برای جلوگیری از رسوب املاح بر روی المنت دستگاه از آب مقطر استفاده شود اگر چه در تعداد معدودی از آن‌ها از روغن نیز استفاده می‌شود. داغ شدن بیش ازحد المنت‌ها، به‌علت کم آبی بن‌ماری موجب آسیب رساندن به‌دستگاه می‌شود، باید به‌حداقل حجم آب مورد نیاز جهت حفظ کارکرد مطلوب دستگاه توجه گردد.

کاربرد اصلی این دستگاه در آزمایشگاه میکروبیولوژی به‌شرح زیراست:

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

۱- Water bath

۲- Bain marie

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.

شکل۳-حمام مایع با دمای ثابت

.

میکروسکوپ [۱]

میکروسکوپ یکی از وسایل آزمایشگاهی اصلی در آزمایشگاه زیست شناسی است. از دو واژه یونانی میکرو به معنی 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 به طور 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 :** به‌اندازه تصویر نمونه، به‌اندازه واقعی آن گفته می‌شود. در همه میکروسکوپ-ها از عدسی‌ها برای بزرگنمایی تصویر استفاده می‌شود.
- **قدرت تفکیک :** توانایی تشخیص بین دو شیء نزدیک به‌هم به صورت 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.

۱- Microscopes

- **کنتراست :** به‌تفاوت بین بخش‌های مختلف یک نمونه می‌گویند. مثلا یک اندامک تیره‌تر از اندامک دیگر دیده شود.انواع مختلفی از میکروسکوپ‌ها شامل: استریو میکروسکوپ[1]، میکروسکوپ اینورت[2]، میکروسکوپ فلورسنت[3]، میکروسکوپ دوچشمی[4] می‌باشند.

شکل۴- میکروسکوپ نوری

شمارشگر کلنی[5]

این دستگاه برای شمارش کلنی باکتری‌ها، به‌صورت دیجیتال کاربرد دارد. معمولا دارای صفحه مدرج برای سهولت در شمارش، عدسی با قدرت بزرگنمایی ۸ برابر و ثبت در حافظه در هنگام قطع برق می‌باشد.

شکل۵-شمارشگر

ترازوی آزمایشگاهی

دستگاهی است که برای توزین اجسام یا مایعات، با دقت بالا و حساسیت بالا به‌کار می‌رود آزمایشگاه‌ها با توجه به‌نیازشان از ترازوهایی با دقت g ۰/۱ ،g ۰/۰۱ ،g ۰/۰۰۱ ،g ۰/۰۰۰۱ وg ۰/۰۰۰۰۱ استفاده می‌کنند. ترازوهای آزمایشگاهی دقت۱mg و دقت بالاتر آن نیاز به‌محفظه دارند چون به‌علت حساسیت بالای آن‌ها در توزین جریان هوا نیز روی توزین این ترازوها تاثیر می‌گذارد. تمام دستگاه‌های توزین (مانند: باسکول یا ترازو) باید به‌طور دوره‌ای کالیبره[6] شوند. کالیبره کردن باید

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- Colony counter

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

در مدت زمان‌های معینی با سنگ کالیبره استاندارد 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 ارزیابی‌ها دقیق‌تر و قابل اطمینان هستند و درصد خطا بسیار کم است برای تجهیزات کالیبره شده گواهی کالیبراسیون صادر شده و ضمیمه دستگاه می‌گردد.

شکل ۶- ترازوی آزمایشگاهی

اتوکلاو[۱]

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

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

شکل ۷–اتو کلاو

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

انـدیکاتورهای شـیمیایی : بـه‌صـورت نوارهـای اتـوکلاو (چسـب اتـو کـلاو) TST [۱] کـه سـه عامـل زمان، بخـار و دمـا را کنتـرل مـی‌کنـد. یـا بسـته هـای پزشـکی هسـتند کـه وقتـی بـه‌دمـای معینـی رسیدند تغییر رنگ می‌دهند.

انـــدیکاتور بیولـــوژی : شـــامل اســـپور بـــاکتری‌هـــای مقـــاوم بـــه‌حـــرارت، ماننـــد *ژئوباســـیلوس استئاروترموفیلوس*[۲] است.

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

انکوباتور[۳](اتو)

انکوبـاتور شـامل اتاقـک عـایق بنـدی‌شـده اسـت کـه بـرای کشـت و رشـد دادن نمونـه‌هـای زنـده ماننـد: سـلول‌هـا یـا میکـروب‌هـا بـه‌کـار مـی‌رود. ایـن دسـتگاه دارای قابلیـت نگهـداری دمـایی ثابـت و تـوزیعی یکنواخـت دمـا بـا حـداکثر خطـای مجـاز در مقـدار نوسـانات دمـایی تعیـین شـده در روش‌هـای آزمـون است. که درجـه حـرارت مناسـب رشـد، تکثیـر و تشـکیل کلنـی را فـراهم مـی‌کنـد. و در انـواع انکوبـاتور-هـای آزمایشـگاهی (معمـولی، شـیکردار، یخچالـدار، و مجهـز بـه‌سیسـتم تزریـق CO_2) در آزمایشـگاه‌هـای میکروبیولوژی و بیولوژی سلولی کاربرد اساسی دارد.

۱- Time, Steam,Tempreture

۲- *Geobacillus stearothermophilus*

۳- Incubator

شکل ۸-انواع انکوباتور

فور[1] یا آون

فور یا آون دستگاهی است که قابلیت تنظیم در دما ۳۰۰°C را دارد و برای استریل یا خشک کردن وسایل شیشه‌ای و یا فلزی که در میحط‌های آزمایشگاهی کاربرد دارند. عمل استریل و خشک کردن وسایل فلزی تمیز شده. بر اساس استاندارد در دمای ۱۷۰°C(۱۰ ±) (از زمان رسیدن به‌دمای ۱۷۰°C) به وسیلهٔ حرارت خشک به‌مدت زمان حداقل۱h انجام می‌شود. با بالا بردن تدریجی دمای داخل آون، رطوبت موجود در وسایل شیشه‌ای تبخیر و در نتیجه سبب حذف هر نوع فعالیت زیستی خواهد شد. پیش از سترون‌سازی، همه وسایل فلزی و شیشه‌ای را تمیزکرده، سپس در آون قرار دهید. پس از سترون‌سازی، به‌منظور پیشگیری از شکستن وسایل شیشه‌ای بهتراست پیش ازخارج کردن از آون، آن‌ها را خنک کنید. توصیه می‌شود: از قرار دادن مواد قابل اشتعال و آتش‌زا در داخل و اطراف آون دوری شود.

- در زمان کارکردن با آون وسایل حفاظت فردی نظیر دستکش عایق، عینک محافظ و انبرک (برای گذاشتن و برداشتن وسایل) به‌کار گرفته شوند.
- از قرار دادن محلول‌های اسیدی و یا ایجاد بخارات خورنده در درون آون جلوگیری شود. این کار سبب از بین رفتن سطح درونی آون خواهد شد.
- به‌دلیل عایق بودن دستگاه، چند ساعت طول می‌کشد تا اشیاء داخل دستگاه آون خنک شود، مگر آن که مجهز به‌فن باشد. پس از سترون‌سازی، به‌منظور پیشگیری از شکستن وسایل شیشه‌ای درب آون را باز نکنید تا اتاقک، ظروف و مواد داخل آن تا دمای حدود۶۰°C خنک شوند. اگر هوای سرد ناگهان وارد دستگاه شود ممکن است ظروف شیشه‌ای ترک بخورند.

۱- Oven

شکل۹- فور یا آون

pH متر[۱]

وسیله‌ای الکترونیکی است که جهت سنجش میزانpH (میزان اسیدی یا بازی بودن ماده) به‌کار می‌رود. (اندازه‌گیری غلظت یون هیدروژنH+ با استفاده از الکترود حساس به‌یونH+) این ابزار دارای الکترودهای خاصی است که با قرار دادن در محلول، عدد pH را روی صفحه نمایشگر خود نمایش می‌دهد. این دستگاه متشکل از دو بخش اصلی یعنی میله کاوشگر [۲]و اندازه‌گیر[۳] است. میله کاوشگرpH محلول را تبدیل به‌سیگنال الکتریکی کرده و اندازه‌گیر آن را تحلیل و میزان pH را نمایش می‌دهد. انتهای کاوشگر از غشاء شیشه‌ای و حباب مانند است که نسبت به‌یون‌ها حساس می‌باشد و رأس الکترود داخلی در داخل آن قراردارد. بخش داخلی و بیرونی محفظه حاوی KCl و HCl ۰/۱ مولار(محلول رفرانس) است. قبل از شروع کار با pH متر ابتدا باید مطمئن شوید که میله کاوشگر در محلول نگهدارنده یا محلول با pH=۴ نگهداری شده است. در غیر این صورت ممکن استpH متر در تعیین pH محلول مورد مطالعه دچار خطا شود. لذا میله کاوشگر را به‌مدت زمانh ۲ در آب مقطر نگهداری کنید و سپس آن را در محلول نگهدارنده قرار دهید. کاوشگر را به‌وسیله آب مقطر بشویید. برای تنظیم pH متر، الکترود را در محلول۷ pH قرار داده، حداقلsec ۳۰زمان بدهید تا عدد ثابتی را نشان دهد. سپس آن را روی عدد ۷ تنظیم کنید (pHمتر عدد ۷ را نشان دهد). دوباره الکترود را با آب مقطر بشویید و آن را در محلول۷ pH قرار دهید. اجازه دهید اندازه‌گیر عدد ثابتی را نشان دهد. آن را روی عدد ۴ تنظیم کنید(pH متر عدد ۴ را نشان دهد). حالا pH متر شما تنظیم شده و آماده اندازه گیری pH محلول‌های مورد آزمون است قبل از قرار دادن اندازه‌گیر در محلول مورد آزمایش آن را دوباره با آب مقطر بشویید.

۱- pH meter

۲- probe

۳- meter

شکل۱۰-pH متر

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 و۰/۲۲ mμ استفاده می‌شود.

شکل ۱۱- سیستم فیلتراسیون

تجهیزات کشت در شرایط اتمسفری تغییر یافته

این تجهیزات کشت ممکن است یک جار غیر قابل نفوذ یا هر وسیله مناسب دیگری باشد که قادر به‌ایجاد و حفظ شرایط اتمسفری تغییر یافته (مانند: شرایط بی هوازی) در طی مدت گرمخانه‌گذاری محیط کشت، باشد. 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 ۱۲- 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 سترون‌سازی را می‌توان با استفاده از اندیکاتورهای شیمیایی و اندیکاتورهای بیولوژیک ارزیابی کرد. در پایش بیولوژیک، از اسپورهای *باسیلوس سوبتیلیس*[۱] و *باسیلوس استئاروترموفیلوس*[۲] استفاده می‌شود.
- ✓ **روش شیمیایی** : به‌وسیله مواد ضدعفونی کننده مانند: آب اکسیژنه و انجام واکنش‌های شیمیایی (مانند: رادیکال‌های آزاد) برای سترون کردن استفاده می‌شود.
- ✓ **روش پرتودهی** : به‌وسیله تابش پرتوهای ایکس و گاما نیز می‌توان برای سترون کردن مواد بیولوژیک، داروها، گاز، باند، نخ‌های کات گوت و لوازم یک‌بار مصرف استفاده کرد.
- ✓ **روش فیلتراسیون** : معمولا برای سترون سازی مایعات استفاده می‌شود و شامل عبور دادن مایع از فیلترهای مخصوص می‌باشد.

۳-۵ محیط کشت

کشت و تکثیر باکتری‌ها در محیط‌های مصنوعی از مهمترین روش‌های تشخیصی در باکتری شناسی است. برای کشت موفق باید شرایط مناسب برای رشد باکتری فراهم گردد. از جمله این شرایط مواد غذایی و مغذی، حرارت، رطوبت کافی، موادآلی و معدنیpH مناسب، حضور یا عدم

۱- *Bacillus subtilis*

۲- *Bacillus. Stearothermophilus*

حضور اکسیژن می‌باشد. بیشتر محیط‌های کشت که در پلیت مصرف می‌شوند، محیط‌های کشت عمومی هستند که برای تهیه مواد غذایی لازم جهت رشد میکروارگانیسم ساخته شده‌اند. محیط-های کشت عمومی را با اضافه کردن اجزای مغذی که موجب افزایش سریع رشد ارگانیسم‌های سخت رشد می‌شوند، غنی می‌کنند. این مواد مغذی به‌طور سترون، به‌محیط اصلی استریل شده اضافه می‌شوند. نمونه‌هایی از این مواد مغذی عبارتند از: شیر بدون چربی، خون گوسفند، زرده تخم مرغ و ....

۳-۵-۱ اجزای تشکیل دهنده محیط کشت

محیط کشت فرمولاسیونی است از مواد، 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 کاربرد 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 شبکه‌ای ایجاد می‌کند که سبب جامد شدن محیط می‌شود. محیط‌های کشت جامد معمولاً دارای g/Lتا۱۵g/L ۱۳ آگار هستند.

۳-۵-۲ آب

آب قابل استفاده برای آماده‌سازی محیط‌های کشت باید آب مقطر و عاری از مواد تاثیرگذار 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 به‌وسیله فیلترهای اسمز معکوس و نانو فیلتر تولید می‌شود. آب مقطر دارای pH خنثی و در حدود ۷ می‌باشد .دمای جوش آن به‌دلیل خالص بودن پایین‌تر از آب‌های طبیعی بوده و خاصیت خورندگی ندارد و آب مقطر باید در ظروف دردار و ساخته شده از مواد بی‌اثر مانند: شیشه خنثی، پلی‌اتیلن و غیره نگهداری شود و همچنین توصیه می‌شود، آب مقطر تولید شده هر چه زودتر استفاده شود.

۳-۵-۳ ویژگی محیط کشت

- تمام محیط کشت‌ها باید دارای مواد غذایی ضروری برای رشد میکروب‌ها باشند .
- pH محیط کشت باید در حد معین قبل از استفاده برای کشت تنظیم شود.
- ظروف مورد استفاده برای تهیه محیط‌های کشت باید کاملا تمیز و عاری از مواد خارجی باشند
- آب مقطر مورد استفاده باید صحیح تهیه شود .

۱- Algae

۲- Gracilari

۳- Gelidium

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

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

۳-۵-۴ طبقه بندی محیط کشت

محیط کشت را از جنبه‌های مختلف طبقه‌بندی می‌کنند:

۳-۵-۴-۱ طبقه بندی محیط کشت بر اساس ترکیبات

۳-۵-۴-۲ طبقه بندی محیط کشت بر اساس قوام فیزیکی

۳-۵-۴-۲-۱ محیط کشت جامد[۱]

محیط‌های جامد به‌علت دارا بودن آگار در ترکیب خود به‌صورت جامد بوده و در لوله، پتری دیش (پلیت) و یا ظروف دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرد. تشکیل کلنی، تولید پیگمانت، خصوصیات خاص هر کلنی، تشخیص انواع باکتری‌ها، دیدن منطقه همولیز، دلیل به‌کارگیری محیط جامد است.کشت در محیط جامد به‌سه صورت و برای اهداف خاص انجام می‌گیرد :

شکل ۱۳- محیط کشت آگاردار

الف کشت در داخل محیط جامد[۲]

به‌لوله‌های آزمایش محتوی محیط کشت آگاردار جامد با دمای ۴۵ °C، 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.

ب کشت‌های عمقی[۳]

۱- Solid media

۲- Shake Cultures

۳- Stab Cultures

بـا ایـن روش مـی‌تـوان میکروارگانیسـم را بطـور عمـودی توسـط سـوزن کشـت (آنـس) در عمـق محـیط جامد کشت داد.

پ کشت شیب دار[1]

بـرای کشـت میکروارگانیسـم‌هـا، سـوزن کشـت (آنـس) در عمـق و سـطح و/ یـا بـه‌وسـیله فیلـدوپلاتین حلقه‌ای (لوپ) در سطح شیب‌دار کشت می‌دهند.

شکل۱۴-محیط کشت شیبدار

۳-۵-۴-۲-۲ محیط کشت نیمه جامد[2]

محیط‌های نیمه جامد که میزان آگار آن نسـبت به‌محیط‌های جامد کمتر اسـت .٪(۰/۲تا ۰/۵). برای مشـاهده حرکت باکتری‌ها اسـتفاده می‌شـود. مانند:" SIM" چنانچه این نوع محیط کشـت هنگام آماده شـدن، به‌حالت شیبدار جامد شوند "ا سلنت" گفته می شود. و اگر محیط ک شت در ته ظروف ریخته شود به‌آن "بات" گفته می‌شود.

شکل۱۵-محیط کشت نیمه جامد

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

محیط‌های مـایع بـه‌علـت نداشـتن آگـار در ترکیـب خـود بـه‌صـورت جامـد در نیامـده و متناسـب بـا نـوع میکروارگانیسم و آزمایش‌های مورد نظـر مـی‌تـوان آنهـا را در لولـه‌هـای آزمـایش، ارلـن مـایر و یـا ظـروف 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.

۱- Slant media

۲- Semi Solid media

۳- Liquid or broth media

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

۳-۵-۴-۳-۱ محیط کشت انتقالی[۱]

محیط کشتی است که به‌منظور نگهداری و حفظ قابلیت زیستی میکروارگانیسم‌ها در ضمن به‌حداقل رساندن تغییر در شمارش در دوره زمانی بین جمع‌آوری نمونه و کار آزمایشگاهی بر روی آن، طراحی شده است. مانند: "محیط کشت استوارت یا آمیس[۲] "

۳-۵-۴-۳-۲ محیط کشت نگه‌داری کننده [۳]

محیط کشتی است که به‌منظور نگهداری و حفظ قابلیت زیستی میکروارگانیسم‌ها در یک دوره زمانی طولانی طراحی شده، تا از آنها در برابر اثرات نامطلوبی که ممکن است در طی ذخیره‌سازی طولانی مدت به‌وجود آید محافظت کرده و پس از این مدت، به‌آنها قدرت بازیابی دهد.
مانند: "محیط کشت دورستاگ[۴]"، اسلوپ‌های"نوترینت آگار [۵]"

۳-۵-۴-۳-۳ محیط کشت بازیابی [۶]

محیط کشتی است که به‌میکروارگانیسم‌های آسیب دیده و تحت تنش امکان ترمیم و بازیابی می‌دهد تا رشد طبیعی را به‌دست آورند، ولی لزوما باعث تکثیر آنها نمی‌شوند.
مانند" آب پپتونه بافری[۷]"
یادآوری- محیط کشت بازیابی می‌تواند به‌عنوان یک محیط پیش غنی کننده نیز به‌کار رود برای مثال" آب پپتونه بافری"

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

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

۳-۵-۴-۳-۱ محیط کشت غنی کننده انتخابی[۱۰]

محیط کشت غنی‌کننده‌ای 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[۱۱] "

۱- Transport medium
۲- Stuart or amies transport medium
۳- Preservation medium
۴- Dorset agar medium
۵- Nutrient medium
۶- Resuscitation medium
۷- Buffered peptone water
۸- Pre- enrichmen medium
۹- Enrichmen medium
۱۰- Selective enrichment medium
۱۱- Rappaport-Vassiliadis (RV)

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

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

۳-۵-۴-۳-۴-۳ محیط کشت جداکننده[۲]

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

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

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

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

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

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

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

۳-۵-۴-۳-۴-۷ محیط کشت افتراقی[۷]

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

۳-۵-۴-۳-۴-۸ محیط کشت شناسایی [۸]

محیط کشت با قدرت تشخیصی بالا برای ایجاد یک واکنش تشخیصی خاص که نیاز به‌استفاده از محیط کشت‌های تاییدی ندارد. مانند: "بایل اسکولین آزاید[۹] "

۳-۵-۴-۳-۴-۹ محیط کشت شمارش [۱۰]

۱- Non- selective enrichment medium

۲- Selective isolation medium

۳- Selective isolation medium

۴- Non-selective isolation medium

۵- Chromogenic selective culture medium

۶- Fluorogenic selective culture medium

۷- Differential medium

۸- Identification medum

۹- Bile Esculin Azide Agar (Enterococcus Selective Agar)

۱۰- Enumeration medium

محیط کشـــت انتخابی یا غیر انتخابی که برای شـــمارش میکروارگانیســـم‌ها به‌کار می‌رود. مانند:"بردپارکر[1] "ایست اکسترکت آگار [2]"

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

۳-۵-۴-۳-۴-۱۰ محیط کشت تاییدی [3]

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[4]"

۳-۵-۴-۳-۴-۱۱ محیط کشت دارای ترکیبات خنثی کننده [5]

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

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

محیط کشـــتی اســـت که در دســـته بندی‌های متعدد قرار می‌گیرد. مانند: "بلاد آگار[6]"که یک محیط بازیابی ا ست، می‌تواند به‌عنوان محیط ک شت جداکننده و همچنین محیط ک شت افتراقی برای ردیابی همولیز به‌کار رود و یا "بافر پپتون واتر" که یک رقیق کننده است می‌تواند یک محیط کشت پیش غنی کننده نیز باشد.

۳-۵-۴-۳-۴-۱۳ محیط کشت مرجع

محیط کشت غیر انتخابی مانند:"تریپتون سوی آگار[7]"که برای ارزیابی مقایسه‌ای کنترل عملکرد محیط کشت بکار می‌رود.

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

۳-۵-۴-۴-۱ محیط کشت آماده مصرف

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

۳-۵-۴-۴-۲ محیط کشت کامل شده

محیط کشتی است که برای تلقیح آماده باشد.

۱- Baird-Parker Agar

۲- Yeast Extract Agar

۳- Confirmation medium

۴- Kligler Iron Agar (KIA)

۵- Medium containing nutralisers

۶- Blood agar

۷- Tryptic Soy Agar(TSA)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

۳-۶ آماده سازی و استریلیزاسیون محیط‌های کشت در آزمایشگاه

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

با رعایت دستور العمل تولید کننده، و با توجه به‌نشانه گذاری آن، مقدار لازم از محیط کشت (پودر خشک) با دقت توزین می‌شود. و با آب خالص (مقطر)، آب بدون املاح یا آب یون زدایی شده با استفاده از اسمز معکوس یا کیفیتی معادل آن، در داخل ارلن مخلوط کنید سپس در صورت لزوم همراه با گرم کردن، سریعاً یکنواخت کنید. و به‌حجم برسانید.

آلودگی میکروبی از 10^2 *cfu*/ mL بیشتر نباشد و طبق استاندارد ملی ایران شمارۀ۵۲۷۱ پایش شود.

هدایت الکتریکی[1] آب استفاده شده برای تهیه محیط کشت نباید بیشتر از ۲۵ میکروزیمنس[2] باشد و طبق استاندارد ملی ایران شمارۀ 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 ۲۵ °C، باید در محدوده مورد نظر±۰/۲ واحد اندازه گیری باشد، مگر اینکه مقادیر دیگری توصیه شده باشد.pH معمولاً با استفاده از محلول سدیم هیدروکسید با غلظت تقریبی: ۴۰g/L یا هیدروکلریک

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.

اسـید انجـام مـی‌شـود. اگـر تنظـیم pH پـس از سـترن‌سـازی انجـام شـود، بایـد از محلـول‌هـای سـترون استفاده شود.

۳-۶-۳ توزیع

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

۳-۶-۴ سترون سازی

محیط‌های کشت تهیه شده را در روز آماده سازی سترون کنید. سترون سازی محیط‌های کشت و معرف‌ها معمولاً با استفاده از حرارت مرطوب با استفاده از اتوکلاو یا فیلترا سیون انجام می شود. بعضی از محیط‌های کشـت به‌سـترون‌سـازی با اتوکلاو نیاز ندارند، ولی می‌توان آنها را با دمای جوش سـترون نمود. برای مثال: محیط‌های کشت آنتروباکتریاسه‌ها که حاوی برلیانت گرین بوده و بخصوص به‌حرارت و نور حساس هستند و بهتر است به سرعت پس از جوشیدن سرد شده و در برابر نور شدید محافظت شوند. همچنین، بعضی از معرف‌ها را نیز می‌توان بدون سـترون‌سـازی مورد اسـتفاده قرار داد. در همه موارد طبق دسـتورالعمل‌های 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 خشـک شـدن محافظت کنید. اگر محیط کشـت بلافاصله استفاده نشوده در یخچال در دمای ۵ °C ±۳ °C یا در شرایطی که در استاندارد خاصی مشخص شده باشـد، نگهداری کنید. معمولاً توصـیه می‌شـود 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 کشـت را به‌وسـیله 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 دمای۴۷°C تـا۵۰°C، خنک کنید.

۳-۶-۵ افزودن مکمل‌ها

مکمل‌هایی که حساس به‌حرارت هستند، باید بعد از اینکه دمای محیط به‌کمتر از ۵۰°C رسید، به‌محیط اضافه شـوند. مکمل سـترون شـده باید قبل از افزودن به‌محیط آگاردار به‌دمای اتاق برسـد. 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 کشـت به‌آرامی و کامل مخلوط کرده و به‌سـرعت در ظروف نهایی تقسـیم 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 پلیت‌ها بریزید تا حداقل ضخامت آن۳mm 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 $^{\circ}C$ ۴۰ است، محیط کشت بیشتری ممکن است در پلیت‌ها 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

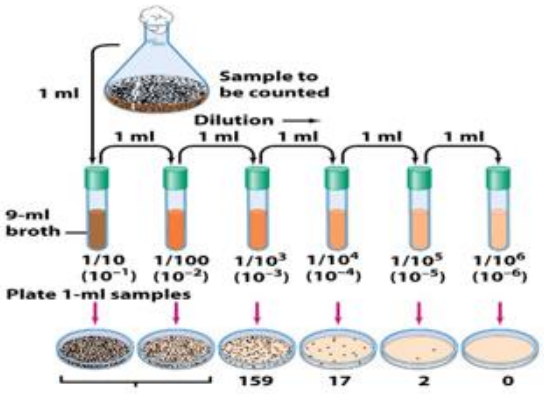
برای دستیابی به‌توزیع یکنواخت میکروارگانیسم‌ها، پیش از انجام آزمون، نمونه‌ها را با تکان دادن شدید کاملا مخلوط کنید. و بسته به‌ماهیت نمونه و میزان آلودگی مورد انتظار، رقت‌های لازم را تهیه کنید.

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

برای رقت‌های۱۰برابر، 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، رقت‌های۱۰ برابر را تهیه کنید.

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

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



شکل۱۶- 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 به‌مدت زمان ۵ sec تا ۳ sec مخلوط کنید. رقت بدست آمده$^{-۲}$۱۰ می‌باشد. در صورت لزوم، به‌همین ترتیب و رقت‌های بعدی ($^{-۳}$۱۰، ...) را تهیه کنید تا حدی که برای شمارش میکروارگانیسم‌ها مناسب باشند. مراقب باشید، پی‌پت را بیش از۱cm داخل سوسپانسیون اولیه فرو نکنید و از تماس پی پت حاوی سوسپانسیون اولیه با محلول رقیق کنندهٔ سترون جلوگیری کنید. هنگام آماده سازی رقیق کننده سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری بعدی، زمان بین پایان

آماده سازی تا لحظه تماس ماده تلقیحی با محیط کشت یا آبگوشت غنی کننده نباید بیش از min ۴۵ باشد.

۳-۷-۱ روش‌های کشت در میکروبیولوژی

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

شکل ۱۷ - کشت خطی

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

۳-۷-۱-۲ کشت سطحی

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[۴] هستند و احتمال دارد قسمت معنی‌داری از فلور کل را تشکیل دهند (مانند: ارگانیسم‌های سرماگرا[۵])کاربرد دارد.

۱- Streak plate

۲- Surface plate

۳- Pour plate

۴- Heat-sensitive organisms

۵- Psychrotrophic

همچنین در غذاهای خشک شده، غذاهای یخزده و منجمد، که ممکن است دارای میکروارگانیسم‌های حساس به‌گرما باشند یا فرآورده‌هایی که دارای باکتری‌های هوازی اجباری هستند که احتمال دارد قست معنی داری از فلور کل را تشکیل دهند (مانند:گونه‌های پسودوموناس[1]) و فرآوردهایی که داری ذرات کوچکی هستند که تشخیص آنها از کلنی‌های تشکیل شده در کشت آمیخته به‌سختی انجام می‌شود، همچنین فرآورده‌هایی که رنگ شدید آنها باعث جلوگیری از تشخیص کلنی در کشت آمیخته می شود، فرآورده‌هایی که برای تشخیص بین انواع مختلف کلنی به‌عنوان قسمتی از ارزیابی کمیت غذا مورد نیاز است و بالاخره برای کشت میکروارگانیسم‌هایی است که قابلیت رشد و تشکیل کلنی در سطح محیط کشت جامد را دارند، به‌کار برده می‌شود. در این نوع کشت، از محیط پیش ریخته استفاده می‌شود. در روش سطحی، برای پلیت‌هائی با قطر ۹۰mm تا ۱۰۰mm، حجم آزمونه و یا رقتی از آن باید بین ۰/۱ mL تا ۰/۵ mL باشد. رقت را باید به‌گونه‌ای انتخاب کرد که در آن تعداد مورد انتظار کلنی‌های تشکیل شده بین ۱۰ تا ۱۵۰ کلنی تیپیک باشد. تعداد کل کلنی‌های تیپیک و غیرتیپیک 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 ۱۵ mL محیط کشت را آماده و نشانه گذاری کنید و در صورت لزوم سطح محیط کشت پیش از استفاده خشک می‌شود. معمولا ۰/۱ mL از آزمایه (فرآورده‌های مایع) و یا ۰/۱ mL از سوسپانسیون اولیه (سایر فرآورده‌ها) در سطح محیط جامد از پیش ریخته تلقیح شده و توسط میله پخش کننده یا وسایل مکانیکی سترون روی سطح پخش می‌شود. و بعد از جذب ماده تلقیحی، پلیت‌ها گرمخانه‌گذاری می‌شود.

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

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

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

ب- در مورد باکتری‌هایی که کلنی آنها به‌سرعت روی محیط کشت پخش نمی‌شود و سطح محیط کشت در پلیت‌ها خشک به‌نظر می‌رسد، خشک کردن سطح پلیت ضرورت ندارد. در این موارد می‌توانید خشک کردن سطح پلیت را حذف کنید. زیرا باعث افزایش احتمال آلودگی و از دست دادن بی‌مورد رطوبت می‌شود.

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

۱- Pseudomonas spp.

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

ث- در عمل پلیـت‌هـا را بـا قـرار دادن در دمـای C° ۲۵ تـا C°۵۰ بـه‌گونـه‌ای کـه سـطح آگـار پلیـت‌هـا بـه طرف پایین باشد و در پلیت نیمه باز باشد، خشک می‌شود.

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

شکل ۱۸-کشت سطحی

۳-۷-۱-۳ کشت آمیخته یا پورپلیت

در روش کشـــت آمیخته، حجم آزمونه و یا رقتی از نمونه بســـته به‌اندازه پلیت و حجم محیط کشـــت مورد استفاده بین mL ۰/۱ تا mL ۵ است. رقت را باید به‌گونه‌ای انتخاب کرد که تعداد مورد انتظار کلنی‌های تیپیک تشکیل شده روی پلیت‌هایی با قطر mm ۹۰ تا mm ۱۰۰ 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.

محـیط کشـت مـورد اسـتفاده را در حمـام آب جـوش ذوب کنیـد از سـایر فرآینـدهای مناسـب ماننـد: قـرار دادن در جریـان بخـار آزاد اتـوکلاو و یـا مـاکروویو و سـایر فرآینـدهای مناسـب کـه ترکیـب دمـا و زمـان آن بـرای آمـاده سـازی محـیط کشـت، صـحه‌گـذاری شـده اسـت نیـز مـی‌توانیـد اسـتفاده کنیـد از حرارت دادن زیـاد محـیط کشـت خـودداری کنیـد و آن را بـه‌محـض ذوب شـدن از حمـام خـارج کنیـد و محیط کشـت ذوب شـده را درحمـام آب بـا دمـای C° ۴۵ قـرار داده تـا دمـای آن بـه C° ۴۵ برسـد پـس 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 نگه‌داری نکنید.

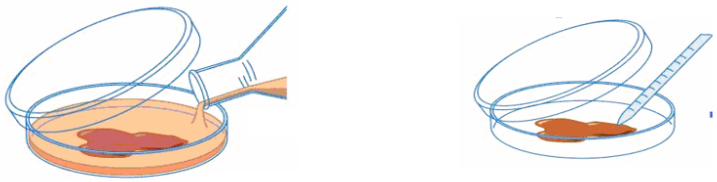
یادآوری ۲- محیط‌های کشت آگاردار را بیشتر از یک بار ذوب نکنید.

۱-Laminsr-flow safety cabinet

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. برای ۱mm تا ۲mm آزمونه مقدار ۱۵ mm تا ۲۰mm محیط کشت سترون که حرارت آن به‌حدود۴۵°Cرسیده، استفاده می‌شود. برای حجم‌های بیشتر آزمونه، مقدار محیط کشت را بر همین اساس تنظیم کنید. سپس با حرکات دورانی به صورت۸ کاملا مخلوط می‌شود. و تا سرد شدن، روی سطح افقی قرار گرفته و محیط جامد می‌شود. پس از جامد شدن آگار، پلیت‌ها بدون تاخیر در گرمخانه قرار می‌گیرد.

۳-۷-۱-۳-۱ کشت‌های دو لایه

در کشت دو لایه، پس از تلقیح و کشت آمیخته یا پور پلیت در صورت لزوم سطح محیط کشت با باکتری، مجددا با یک لایه نازکی از همان محیط کشت پوشانده می‌شود در این حالت به‌آن کشت دو لایه هم گفته می‌شود. پس از بسته شدن محیط ظرف‌های پتری را به‌طور واژگون در گرمخانه قرار می‌دهند تا از ریختن قطرات آب درسطح محیط جلوگیری گردد.



شکل۱۹ -کشت پورپلیت

۳-۷-۱-۴ صافی غشایی

در این روش آزمونه از صافی غشایی عبور داده می‌شود و میکروارگانیسم‌های مورد جستجو روی سطح صافی باقی می‌مانند سپس صافی روی محیط کشت آگار یا پد جاذب اشباع شده از محیط کشت قرار داده می‌شوند پس از گرمخانه‌گذاری، کلنی‌ها روی سطح صافی تشکیل می‌شوند. همچنین برای میکروارگانیسم‌های خاص مانند باکتری‌های بی‌هوازی، صافی را می‌توان به‌گونه‌ای در پلیت قرار داد که سطح آن به طرف پایین باشد و با لایه دیگری از محیط کشت آگاردار پوشانده شود.

یادآوری ۱- انتخاب اندازه منافذ فیلتر غشایی بستگی به‌میزان کدورت نمونه دارد .

یادآوری ۲- فیلترهای غ شایی باید بدون خ صو صیات مهارکنندگی یا تحریک ر شد باکتری با شند و مرکب مورد ا ستفاده در چاپ خطوط شطرنجی نباید بر رشد باکتری‌ها اثر بگذارد. هر بهر فیلتر غشایی باید مطابق استاندارد ملی ایران به‌شماره ۷۹۹۳ آزمون شود، بویژه وقتی که استفاده از برندهای مختلف فیلتر غشایی باعث نتیجه متفاوت در بازیافت و ایجاد رنگ شود.

۳-۷-۱-۴-۱ صاف کردن

دستگاه‌های صافی سترون را به‌منبع خلاء وصل کنید. روی صفحهٔ متخلخل پایهٔ صافی یک صافی غشائی سترون را که سطح چهارخانهٔ آن به‌طرف بالا باشد، قرار دهید. قسمت بیرونی صافی غشائی را با استفاده از گیرهٔ سر پهن محکم کنید. قیف سترون را روی پایهٔ صافی قرار دهید. درحالیکه پمپ خلاء خاموش است یکی از آزمونه‌های زیر را درون قیف بریزید.

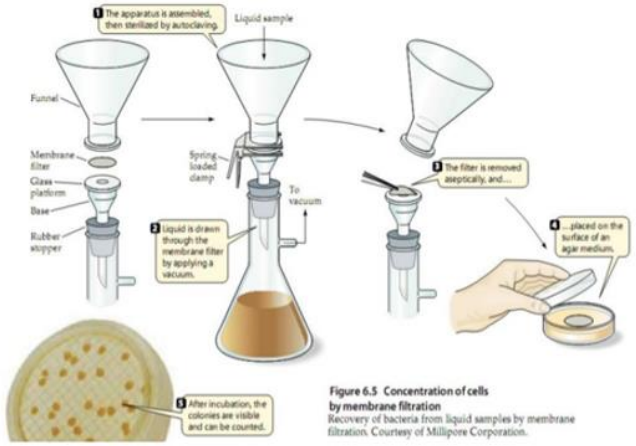
الف-حجم مشخصی از نمونه و یا رقتی از آن که کاملاً مخلوط شده باشد (حداقل۱۰mL)

ب-محتوای ظرف حاوی آزمونه و مقدار کافی محلول رقیق کننده برای رساندن حجم کل به‌حداقل ۱۰mL

پ-چنانچه آزمونه با پی‌پت اندازه گرفته می‌شود حداقل ۱۰mL محلول رقیق کننده را مستقیما به‌آن بیافزایید و با پی‌پت مخلوط کنید.

پمپ خلاء را روشن کنید تا خلاء برقرار شود.(حدود[1] ۷۰ kPa) نمونه را از صافی عبور دهید. به‌محض صاف شدن نمونه، پمپ خلاء را خاموش کنید. بهتر است دیواره‌های قیف را در حالی‌که صافی هنوز در جای خود قرار دارد، با استفاده از mL (۱۰تا۳۰) محلول رقیق کنندهٔ سترون، شستشو دهید.

یادآوری- برای آزمون اسپورباکتری‌ها مانند اسپور کلستریدیوم‌های احیأکننده سولفیت، از صافی غشایی با اندازه روزنهμm ۰/۲۲ استفاده کنید.



شکل۲۰ -مراحل فیتراسیون با صافی غشایی

۳-۷-۱-۴-۲ انتقال صافی

پس از اطمینان از خاموش بودن پمپ خلاء، قیف را بردارید و صافی را با گیره سترون به‌یکی از موارد زیر انتقال دهید.

الف- به‌پلیت حاوی محیط کشت آگاردار (از پیش ریخته)

ب- به‌پد جاذب که از پیش با محیط کشت مایع اشباع شده است و یا پد جاذب دارای دارای محیط کشت بدون آب که آب مقطر به‌آن اضافه می‌شود، برای پیشگیری از تداخل کلنی، پیش از قرار دادن صافی روی پد جاذب، محیط کشت اضافی آن بیرون ریخته شود.

---

۱ - پاسکال با علامت اختصاری (Pa) در فیزیک، واحد فشار است و برابر است با فشار یک نیوتن بر متر مربع. یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های فشار مایعات این می‌باشد که اگر مقداری مایع را درون ظرفی محصور تحت فشار قرار دهیم یا به‌عبارتی دیگر به‌آن فشار وارد کنیم فشار وارده از سوی ما بدون هیچگونه ضعیف شدن یا کم و کاستی به‌تمام نقاط آن می‌رسد و حتی به‌دیواره‌های ظرف هم منتقل می‌شود که به‌آن اصل پاسکال گفته می‌شود. و به‌این شکل تعریف می‌شود P=F/A

P فشار مساوی است با F نیروی وارد بر سطح و A مساحت سطحی است که F بر آن تأثیر می‌کند . بدیهی است که با در نظر گرفتن یکای نیوتن برای نیرو و متر مربع برای مساحت، یکای فشار به‌صورت نیوتن بر متر مربع تعریف خواهد شد. این یکا جهت احترام به‌دانشمند فیزیک‌دان فرانسوی، به‌نام پاسکال نامگذاری شد.

پ- به‌پلیت دارای مقدار کمی محیط آگاردار و سپس افزودن لایه دیگر از محیط کشت با دمای ۴۵°C±۱°C روی صافی غشایی هنگام انتقال صافی‌ها، از نبودن حباب هوا بین صافی و محیط کشت اطمینان یابید.

یادآوری- برای حجم‌های مختلف یک نمونه، در صورتی که کمترین و رقیق‌ترین نمونه را ابتدا صاف کنید، می‌توانید قیف را بدون گندزدایی، برای رقت‌های پایین‌تر همان نمونه استفاده کنید برای صاف کردن نمونه دیگر از وسایل سترون جدید استفاده کنید.

یاداوری-انتخاب روش به‌عوامل مختلف بستگی دارد. این عوامل شامل ویزگی‌های فیزیکی و شیمیایی، ماهیت میکروارگانیسم‌های مورد جستجو، غلظت احتمالی آنها، باز یافت موثر میکرو ارگانیسم‌های آسیب دیده و تحت تنش، دقت آزمون و حساسیت لازم می‌باشد.

۳-۷-۲ گرمخانه‌گذاری

پلیت‌های تلقیح شده را وارونه کنید و آنها را در گرمخانه و یا حمام آب (پس ازقرار دادن در شرایط و ظروف غیر قابل نفوذ به آب) قرار دهید. در صورت لزوم پلیت‌ها رابرای پیشگیری از خشک شدن در یک کیسه پلاستیکی قرار دهید. مانند مواردی که از گرمخانه دارای تهویه استفاده می‌کنید. پلیت‌هایی که دارای صافی روی پد جاذب هستند را برای پیشگیری ازخشک شدن در ظروف مقاوم به‌نفوذ هوا و آب در گرمخانه روی هم قرار دهید. بیش از ۶ پلیت را در گرمخانه روی هم قرار ندهید. زمان و درجه حرارت گرمخانه گذاری را با استفاده از استانداردهای خاص مربوط به‌میکروارگانیسم های خاص انتخاب کنید گرمخانه‌گذاری می‌تواند در دو مرحله به شرح زیر انجام شود. برای احیا میکروارگانیسم‌های تحت تنش می‌توانید پلیت ها را در زمان‌های مختلف برای مثال۲h تا ۴h در درجه حرارت کمتر مانند ۲۵°C تا ۴۰°C و متعاقب آن برای مدت زمان بیشتر در درجه حرارت معمول برای میکروارگانیسم مورد جستجو، پیش گرمخانه گذاری کنید.

تغییرات دما ممکن است با انتقال به‌گرمخانه و یا حمام آب دیگر و یا با استفاده از دستگاه‌هایی که درجه حرارت آنها به‌طور خودکار پس از زمان معین تغییر می‌یابد، تحت تاثیر قرار گیرد بهتر است تمام پلیت‌ها را به‌طور معمول هم زمان در گرمخانه یا حمام آب قرار دهید.

همچنین می‌توانید صافی‌ها را برای مدت کوتاهی (مانند ۲h تا ۴h) در محیط کشتی که سبب احیاء میکروارگانیسم‌ها می‌شود قرار دهید و سپس برای گرمخانه‌گذاری بیشتر به‌محیط دیگر (معمولا محیط انتخابی) منتقل کنید.

۳-۷-۳ روش شمارش

پلیت‌های صافی‌ها را بلافاصله پس از پایان گرمخانه‌گذاری برر سی کنید. در مواردی که این کار امکان ندارد می‌توانید آن را برای مدت کوتاهی (برای مثال چند روز) در دمای ۵ °C تا ۳ °C در صورت نداشتن اثرات سوء بر تعداد و ظاهر میکروارگانیسم‌ها و همچنین آزمون‌های تاییدی قرار دهید. در صورتی که پلیت‌ها یا صافی‌ها را نگهداری می‌کنید، مدت زمان قابل قبول را با توجه به‌نوع نمونه و روش آزمون، صحه‌گذاری کنید.

۳-۷-۴ شمارش و تایید کلنی

برای شمارش روی محیط غیر انتخابی، تمام کلنی‌ها را شمارش کنید. در محیط‌های انتخابی و افتراقی، فقط کلنی‌هایی را که ظاهر مختص میکرارگانیسم مورد جستجو را نشان می‌دهند شمارش کنید. برای تعیین ویژگی‌های دقیق‌تر، آزمون‌های تاییدی باید انجام شود اگر چه هنگامی که تعداد کلنی‌ها زیاد است، تایید مشخصات همه آنها عملی نیست. در چنین مواردی تمام کلنی‌های تیپیک از قسمت‌های حاشیه پلیت با صافی را مورد بررسی قرار دهید.

۳-۸ رنگ آمیزی

۳-۸ -۱ رنگ آمیزی گرم

۳-۸ -۱-۱ تهیه گسترش روی لام:

ابتدا از نمونه باکتری یک گسترش روی لام تهیه شود.

۳-۸ -۱-۲ رنگ آمیزی با کریستال ویوله:

در این مرحله مقداری از رنگ کریستال ویوله را با قطره چکان به‌روی سطح گسترش میکروبی روی لام بریزید و به‌مدت زمان min ۱صبرکنید تا رنگ در دیواره سلولی میکروب‌ها نفوذ کند.

۳-۸ -۱-۳ مرحله شستشو:

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

۳-۸ -۱-۴ مرحله اضافه کردن محلول ید:

با چند قطره از محلول ید[1] روی گسترش را پوشانیده و به‌مدت زمان min ۱صبر کنید.

۳-۸ -۱-۵ مرحله شستشو:

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

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

درحالی‌که لام را با زاویه ۴۵ درجه نگهدارید بعد با استفاده از محلول رنگ بر الکل– استن به‌سرعت آن را بی‌رنگ کنید. دقت کنید مرحله بی‌رنگ‌سازی بیش از اندازه نباشد. بعد از آن لام را بسرعت بشوئید. این عمل، بی‌رنگ شدن را متوقف خواهد کرد.

۱- Iodine

۳-۸ -۱-۷ رنگ آمیزی با محلول سافرانین:

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

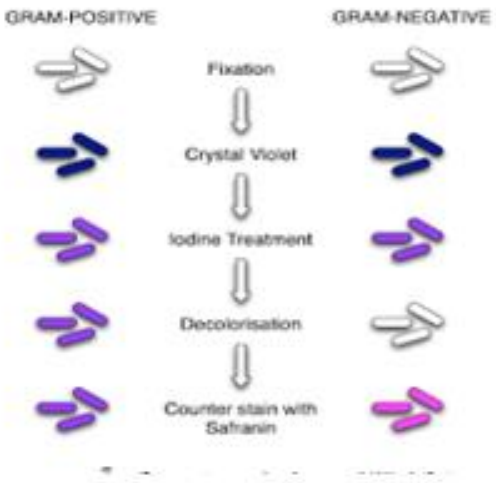
۳-۸ -۱-۸ خشک کردن لام:

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

۳-۸ -۱-۹ مشاهده و تفسیر

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

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



شکل۲۱ -مراحل روش رنگ آمیزی

یادآوری نکات مهم:

- حرارت بـیش از انـدازه هنگـام تثبیـت گسـترش باعـث پـاره شـدن دیـواره سـلولی بـاکتری شـده بنابراین باکتری گرم مثبت رنگ اولیـه (کریسـتال ویولـه) را هنگـام رنـگ‌بـری از دسـت مـی‌دهـد و رنگ ثانویـه را جـذب مـی‌کنـد و در نتیجـه بـاکتری گـرم مثبـت، بـه‌صـورت گـرم منفـی دیـده می‌شود.

- اگـر گسـترش ضـخیم باشـد هنگـام مرحلـه بـی‌رنـگ شـدن، ممکـن اسـت ماننـد یـک گسـترش معمولی رنگ نشود و این مسـئله باعـث خطـا در تشـخیص شـما در گـرم منفـی یـا مثبـت بـودن باکتری خواهد شد.
- غلظت درست و تازه بودن رنگ‌ها هم در رنگ‌آمیزی موثر است .

- رنگ‌بری 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 به‌صورت گرم منفی دیده می‌شود.
- دقت شود هنگام تهیه گسترش روی لام از محیط کشت، سن کشت باکتری بایدh ۲۴ یا کمتر باشد. بنابراین 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

رنگ‌آمیزی 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 مشاهده خواهند بود. در این روش برای نفوذ رنگ اولیه (مالاشیت گرین) به‌داخل پوشش هاگ از حرارت استفاده می‌شود . همان خصوصیاتی که رنگ‌آمیزی اسپور را مشکل می‌کند، رنگ را پس از نفوذ آن به‌داخل هاگ بخوبی حفظ می‌کند. مالاشیت گرین به‌آسانی از باکتری‌های مولد شسته می‌شود زیرا دیواره سلولی باکتری‌های بدون هاگ بر اثر حرارت آسیب دیده و پاره شده است بنابراین سلول رویشی رنگ دوم، یعنی سافرانین را جذب می‌کند.

۳-۸ -۲-۱ تهیه گسترش روی لام:

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

۳-۸ -۲-۲ رنگ آمیزی با مالاشیت گرین

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

لام آغشته به‌رنگ را حرارت دهید تا رنگ بخار شود. این عمل را با وارونه کردن شعله گاز بر روی لاک و عبور شعله به‌تناوب از روی رنگ انجام دهید. وقتی که رنگ شروع به بخار شدن کرد شعله را کنار ببرید همین که تبخیر متوقف شد دو بار کار را تکرار کنید و نگذارید رنگ بجوشد.مدت ۳min تاmin ۵ به‌ترتیب ذکر شده عمل کنید و اگر مالاشیت گرین کاملا از روی لام تبخیر شد دوباره مقداری رنگ به‌لام اضافه کنید. بگذارید لام سرد شود تا از شکستن آن جلوگیری شود. به‌موازات سرد شدن لام، به اضافه کردن رنگ ادامه دهید زیرا رنگ هنوز در حال تبخیر است.

۳-۸ -۲-۳ مرحله شستشو:

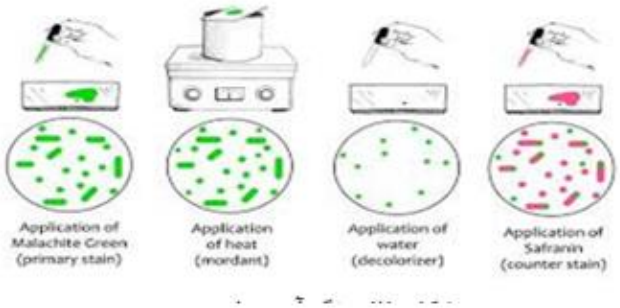
رنگ اضافی روی لام را خالی کرده در حالیکه لام را به‌صورت مایل نگهداشته‌اید با استفاده از آب مقطر به آرامی به‌مدت sec ۳۰ سطح روی گسترش را شستشو دهید.

۳-۸ -۲-۴ رنگ آمیزی با سافرانین:

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

۳-۸ -۲-۵ مرحله شستشو:

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

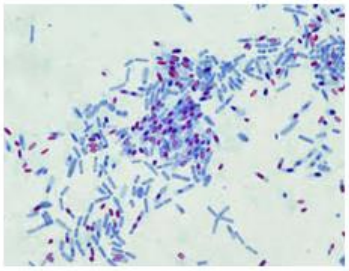


شکل۲۲- رنگ آمیزی اسپور

۳-۸ -۲-۶ مشاهده و تفسیر:

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

چون هاگ پوشش مقاومی است که در برابر نفوذ رنگ مقاومت می کند بنابراین در رنگ‌آمیزی معمولی می‌توان اسپورها را به صورت ناحیه رنگ نشده در داخل سلول رویشی (باکتری مولد) مشاهده نمود. اگر تعداد اسپورها موجود کم باشد و یا اگر از داخل باکتری مولد خارج شده و در گستره به‌صورت پراکنده باشند، اغلب توسط رنگ‌آمیزی ساده و یا گرم قابل مشاهده نخواهند بود.



شکل۲۳- اسپور

۴ نمونه برداری

نمونه‌هایی که به‌آزمایشگاه ارسال می شود، باید نماینده واقعی کل کالا بوده و در طی حمل، جابجائی و نگه داری آن صدمه ندیده و یا تغییرات فیزیکی و شیمیایی در آن ایجاد نشده باشد. 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 بسته‌بندی، کافی نبودن مقدار نمونه، مشاهده آثار ظاهری رشد میکروبی،

شرایط نامناسب حمل به آزمایشگاه، نامناسب بودن درجه حرارت نمونه‌ها، سپری شدن تاریخ مصرف، عدم وجود استاندارد میکروبی، قابلیت انجام آزمون میکروبیولوژی را دارا نبوده و به ارسال کننده عودت داده می‌شود. برای کسب آگاهی‌های بیش‌تر از شرایط کلی نمونه برداری و نگه‌داری نمونه، به منظور انجام آزمون‌های میکروبیولوژی، به استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۰۸۳۴، مراجعه کنید.

۵ روش‌های آزمون میکروبیولوژی گلاب و عرقیات گیاهی

روش‌های آزمون میکروبیولوژی گلاب و عرقیات گیاهی در جدول ۳ آورده شده است:

جدول۳- روش آزمون میکروبیولوژی گلاب و عرقیات گیاهی

ردیف	نوع میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲
۲	کلیفرم	استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۷۷۲۵
۳	انتروکوک	استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲-۷۷۲۴
۴	کلستریدیوم‌های احیا کننده سولفیت	استاندارد ملی ایران شمارهٔ۵۳۵۳
۵	سودوموناس آئروژینوزا	استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۸۶۹
۶	کپک و مخمر	استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴۲۰۷

۵-۱ اصول آزمون

الف-شمارش

برای ارزیابی کیفیت میکروبی و/ یا ایمنی فرآورده تنها شناخت میکروارگانیسم‌های موجود در آنها کافی نیست و در بیشتر موارد،کمیت میکروارگانیسم‌ها هم به همان اندازه حائز اهمیت است که باعث ضرورت شمارش میکروارگانیسم‌ها می‌شود. شمارش میکروارگانیسم‌ها به روش‌های مختلف انجام می‌شود. اگر چه در این فرآورده‌ها فقط روش شمارش با استفاده از محیط آگار غیرانتخابی و با استفاده از روش کشت آمیخته یا پورپلیت انجام می‌شود.

شمارش در محیط کشت جامد بر اساس توانایی برخی میکروارگانیسم‌ها در تشکیل کلنی روی محیط کشت جامد یا داخل آن می‌باشد که با چشم مسلح یا با کمک وسایل بزرگنمایی ساده قابل تشخیص است .

ب- روش جستجو (روش کیفی)

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

ب-۱ اساس روش جستجو

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

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

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

۶ محیط‌های کشت و رقیق‌کننده‌ها

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

جدول ۴ – لیست محیط‌های کشت

ردیف	نام مواد
۱	Plate Count Agar (PCA)
۲	Lactose TTC Agar with sodium heptadecylsulfate Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) Sodium heptadecyl sulfate solution (Tergitol ۷) Tryptone soy agar (TSA) Tryptone Bile agare Tryptophane Broth Kovac,s Reagent Indole Reagent Nutrient agare
۳	Slanetz and Bartley medium (S & B) [۱] Bile – aesculin azide agar
۴	Plate Count Agar (PCA) Pseudomonas(C.N. A) Cetyltrimethylammonium bromide Mpac Nutrient agare Acetamide brat
۵	Sulfite Iron agar Tryptise sulfite agar

۱ - منظور از رقیق کننده مناسب، رقیق کننده برای اهداف خاص می‌باشد این رقیق کننده باید متناسب با ویژگی‌های فرآورده باشد و تنها برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه مورد استفاده قرار می‌گیرد.

جدول ۴ – ۱ ادامه لیست محیط‌های کشت

ردیف	نام مواد
۶	Dichloran-rose Bengal-Chloramphenicol agar(DRBC) Yeast Extract Glucose Chloramphenicol agar(YGC)

ادامه جدول ۴ – ۲ لیست رقیق‌کننده‌ها و شناساگرها

ردیف	نام مواد
۱	Saline peptone diluents Ringer's_solution Peptone solution Phosphate-buffered saline (PBS): KH_2PO_4 Triphenyl tetra zolium chloride (T. T. C) Formazan Aesculin Oxidas Reagent Nalidixic Acid Canamycin

۷ روش اجرای آزمون

۷-۱ آماده سازی آزمایه

روش آماده‌سازی آزمایه بر اساس استانداردهای ملی ایران به‌شماره‌های ۱- ۸۹۲۳ و ۴۲۰۷می‌باشد. برای اطلاع از نمونه‌برداری و آماده‌سازی آب، به‌بند ۳-۷ این جزوه آموزشی مراجعه کنید .

یـــادآوری۱- محتویـــات بطـــری در بســـته را بـــه‌وســـیله تکـــان دادن و وارونـــه کـــردن آن بـــه‌طـــور کامـــل مخلـــوط کنید.

۷-۱-۱ کشت میکروبی

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

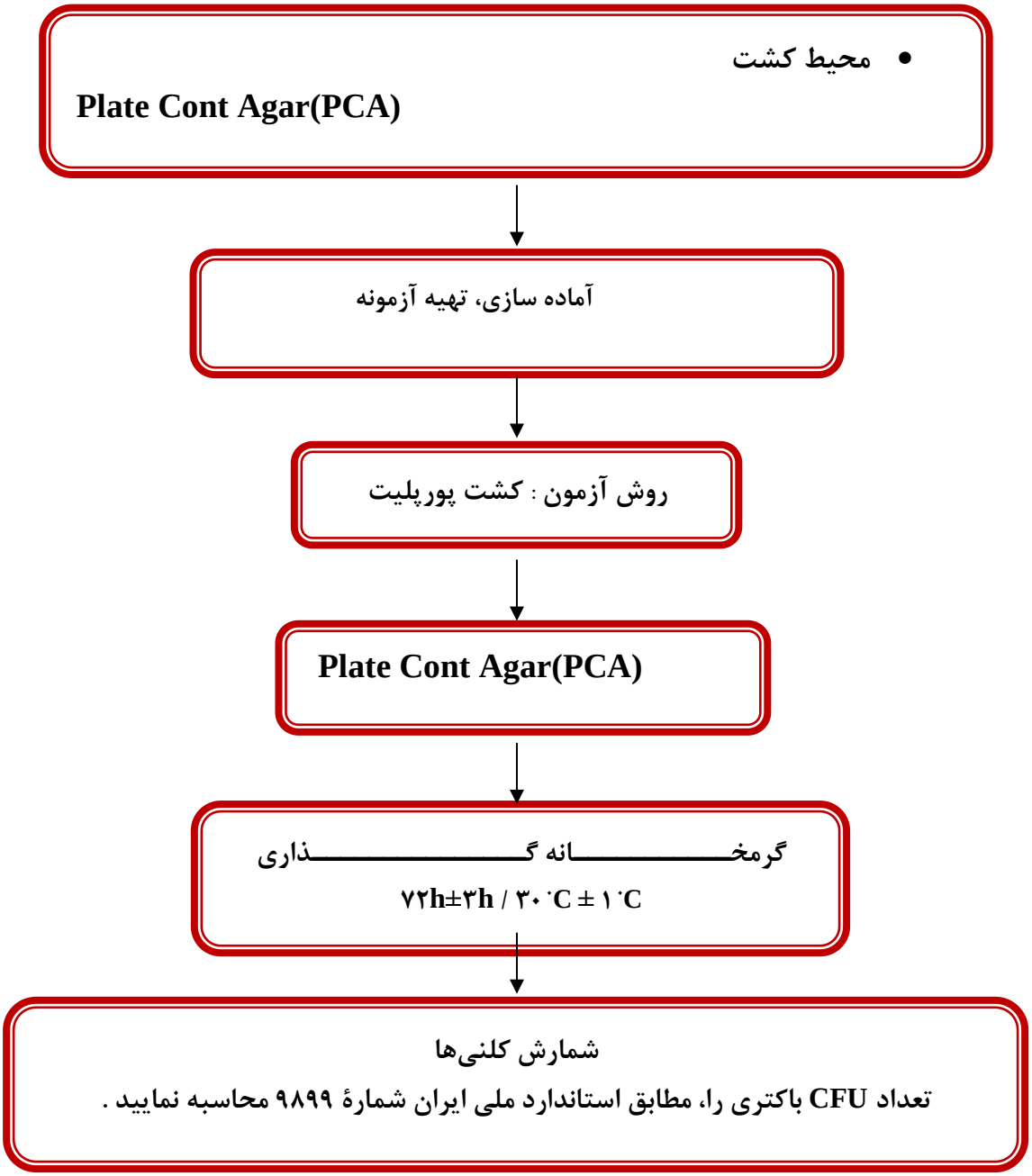
۷-۱-۲ گرمخانه گذاری

بســته به‌نوع میکروارگانیســم مورد بررســی دمای گرمخانه و مدت زمان گرمخانه‌گذاری متفاوت اســت که در ادامه، برای هریک از میکروارگانیسم‌ها که در این فرآورده آزمون می‌شوند، نوشته شده است.

۲-۷ شمارش کلی میکروارگانیسم‌های هوازی

۱-۲-۷ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۱ میکروبیولوژی زنجیره غذایی -روش جامع برای شمارش میکروارگانیسم‌ها-قسمت ۱- شمارش کلنی در ۳۰درجه سلسیوس با استفاده از روش کشت آمیخته

شمارش میکروارگانیسم‌های‌هوازی مزوفیل متداول‌ترین روش جهت نشان دادن کیفیت میکروبی محصول 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 اشریشیا کلی و کلیفرم

۷-۳-۱ استاندارد ملی ایران شمارۀ۱-۷۷۲۵، کیفیت آب- جستجو و شناسایی اشریشیاکلی و کلیفرم‌ها قسمت اول: روش صافی غشایی

اصطلاح کلیفرم به‌گروهی از باکتری‌های خانواده آنتروباکتریاسه گفته می شود که ساکن رودۀ بزرگ انسان و حیوان هستند. باسیل‌های گرم منفی، بدون اسپور، هوازی و بی‌هوازی اختیاری هستند. این باکتری‌های لاکتوز مثبت قادرند در شرایط هوازی و در مجاورت املاح صفراوی تولید اسید و گاز کنند. باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *سیترو باکتر*، *آنترو باکتر* و *کلبسیلا* در این گروه قرار دارند. باکتری کلیفرم در محیط آبی، خاک و پوشش گیاهی پیدا می‌شوند. به تعداد زیادی در مدفوع جانوران خون‌گرم وجود دارند. به‌طور معمول خود کلی‌فرم‌ها بیماری جدی ایجاد نمی‌کنند، حضور آن‌ها شاخصی برای تعیین دیگر میکروارگانیسم‌های بیماریزا است که ممکن است منشأ آن‌ها مدفوع باشد.کلیفرم‌هایی که علاوه بر آنزیم بتا-دی-گالاکتوزیداز، بتا-دی-گلوکرونیداز هم تولید کنند، *اشریشیاکلی* هستند.کلیفرم‌ها شاخص کیفیت بهداشتی در آب و برخی از مواد غذائی است شمارش و شناسایی *اشریشیاکلی* و کلیفرم‌ها با استفاده از صافی غشایی به‌دو روش ((سریع)) و ((استاندارد)) انجام می‌گیرد.

شکل ۲۴- کلیفرم‌ها

محیط کشت :

- **Bile – Lactose TTC Agar**
- **Tryptone Bile Agar**
- **Tryptophane Broth**
- **Kovac,s Reagent , Oxidas Reagen**

- **لاکتوز تی تی سی آگار حاوی سدیم هپتادسیل سولفات**[1]
- **محیط کشت تریپتون صفرا آگار**

محیط کشت تریپتون صفرا آگار را طبق دستورالعمل سازنده آماده کنید. pH محیط را به‌گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون شدن، برابر ۷/۲ ±۰/۱ شود. پس از سرد نمودن دمای محیط کشت تا ۴۵ °C±۲ °C، به‌ضخامت حداقل ۵mm، در پلیت‌های سترون تقسیم نمایید .

- **لاکتوز تی تی سی آگار حاوی سدیم هپتادسیل سولفات**[1]

-محیط کشت لاکتوز (پایه)

محیط کشت لاکتوز آگار را طبق دستورالعمل سازنده آماده کنید.

لاکتوز، پپتون، عصاره مخمر، عصاره گوشت، بروموتیمول آبی و آگار را در ۱L آب مقطر حل نموده، در اتوکلاو با دمای ۱±۱۲۱ °C به‌مدت ۱۵ min سترون نمایید. pH محیط را به‌گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون شدن، برابر ۰/۱± ۷/۲ شود.

-محلول تری‌فنیل‌تترازولیوم‌کلراید[1] **/TTC :**

TTC را در مقدار کمی آب مقطر حل نموده، سپس حجم آن را به ۱۰۰ mL برسانید. محلول فوق را با عبور دادن از صافی غشایی با اندازه روزنه ۰/۲ µm سترون کنید .

-محلول سدیم‌هپتادسیل‌سولفات[2] **(ترجیتول ۷):**

ترجیتول ۷ را در مقدار کمی آب مقطر حل نموده، حجم آن را به ۱۰۰ mL برسانید. سپس در اتوکلاو با دمای ۱°C±۱۲۱ °C بمدت ۱۵ min سترون کنید .

روش استاندارد

روش استاندارد براساس قرار دادن صافی غشایی بر روی محیط کشت انتخابی جامد لاکتوز دار و گرمخانه گذاری در دمای ۳±۳۶ °C به‌مدت زمان ۳h تا ۲۱ h می‌باشد. همه کلنی‌های تشکیل شده در سطح صافی غشایی، به‌عنوان باکتری های لاکتوز مثبت شمارش می شود. پس از انجام آزمون‌های تأییدی (ایندول و اکسیداز)، به‌عنوان *کلی‌فرم* و *اشریشیاکلی* شمارش می‌شوند.

روش سریع

روش سریع براساس قرار دادن صافی غشایی بر روی محیط کشت حاوی کازئین و گرمخانه گذاری در دمای ۳±۳۶ °C به‌مدت زمان ۴h تا ۵h و تجدید کشت کلنی ها بر روی محیط کشت دارای کازئین و نمک‌های صفراوی و گرمخانه‌گذاری در دمای ۰/۵°C±۴۴ °C به مدت ۲۰h تا ۱۹h می‌باشد. در این روش کلنی‌های تشکیل شده در سطح صافی غشایی، که قادر به‌تولید ایندول از تریپتوفان می‌باشند، به‌عنوان *اشریشیاکلی* شمارش می‌شوند.

روش آزمون

آماده سازی و فیلتراسیون را مطابق زیر بند۳-۷-۱-۴، روش صافی غشایی انجام دهید.

Bile – Lactose TTCAgar
(Tergitol ۷)

↓

گرمخـانه-گـــذاری
۳۶ °C± ۲ °C/۲۱ h± ۳ h

↓

شمارش کلنی

↓

خصوصیات کلنی کلیفرم‌ها
در محیط
Bile – Lactose TTCAgar
کلیـه کلنـی‌هـای رشـد کـرده، بـاکتری‌هـای لاکتوز مثبت می‌باشند.

Tryptone soye agar

↓

گرمخـانه‌گـــذاری
۳۶ °C± ۲ °C/۵ h تا ۴h

↓

Tryptone Bile Agar

↓

گرمخـانه گـذاری
۴۴ °C± ۰/۵ °C/۲۰ h تا ۱۹h

↓

انتقال صافی غشایی بر روی یک بالشتک جاذب به‌معرف ایندول

↓

قرار دادن صافی غشایی تحت تابش لامپ فراء بنفش با طول موج ۲۵۴ nm به‌مدت زمان ۱۰ min تا ۳۰ min

↓

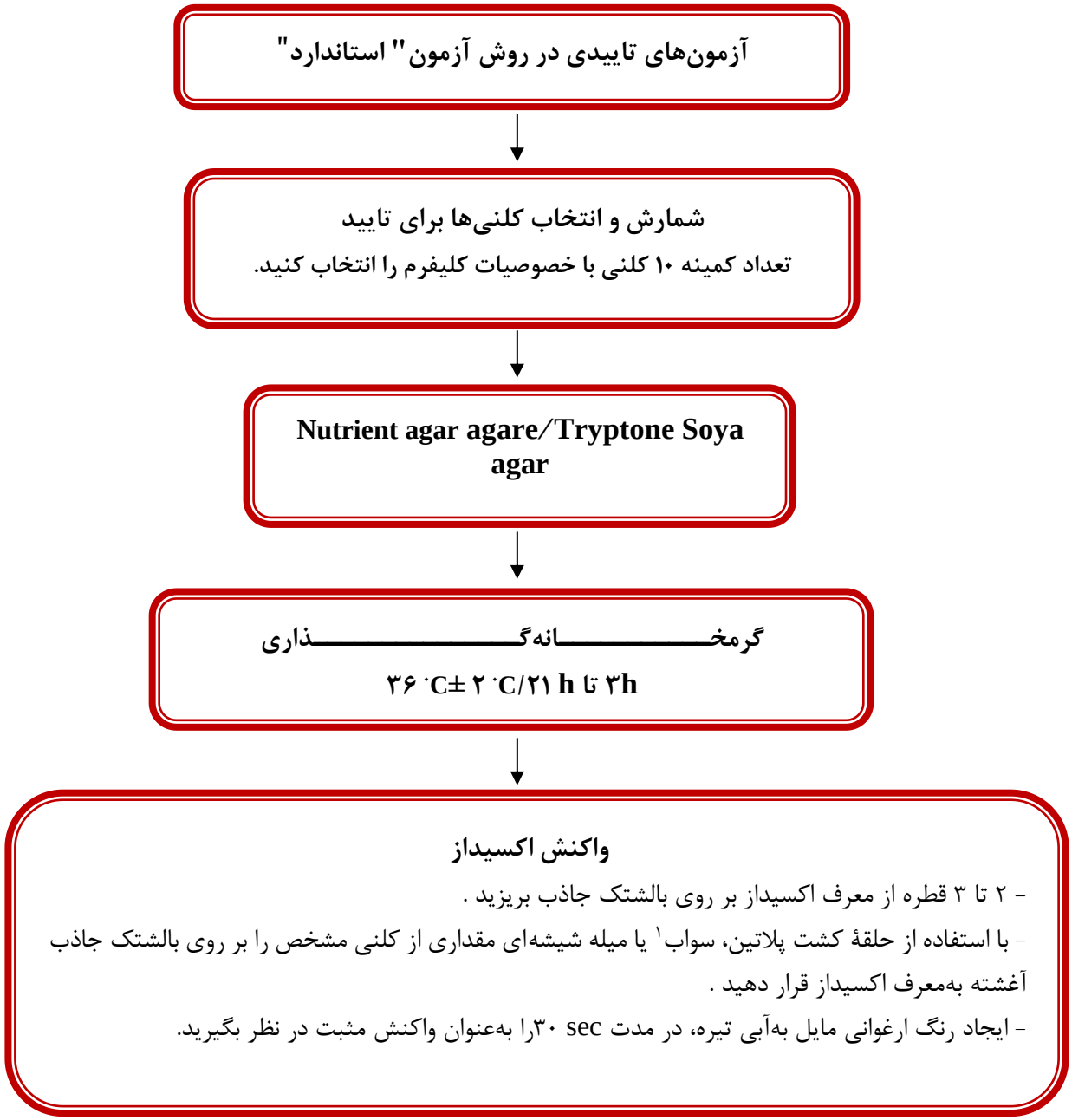
***خصوصیات* کلنی کلی فرمها در محیط:**

Tryptone Bile Agar

- کلنی‌های قرمز رنگ (*اشریشیاکلی*) پس از تابش نور فراء بنفش با طول موج ۲۵۴ nm

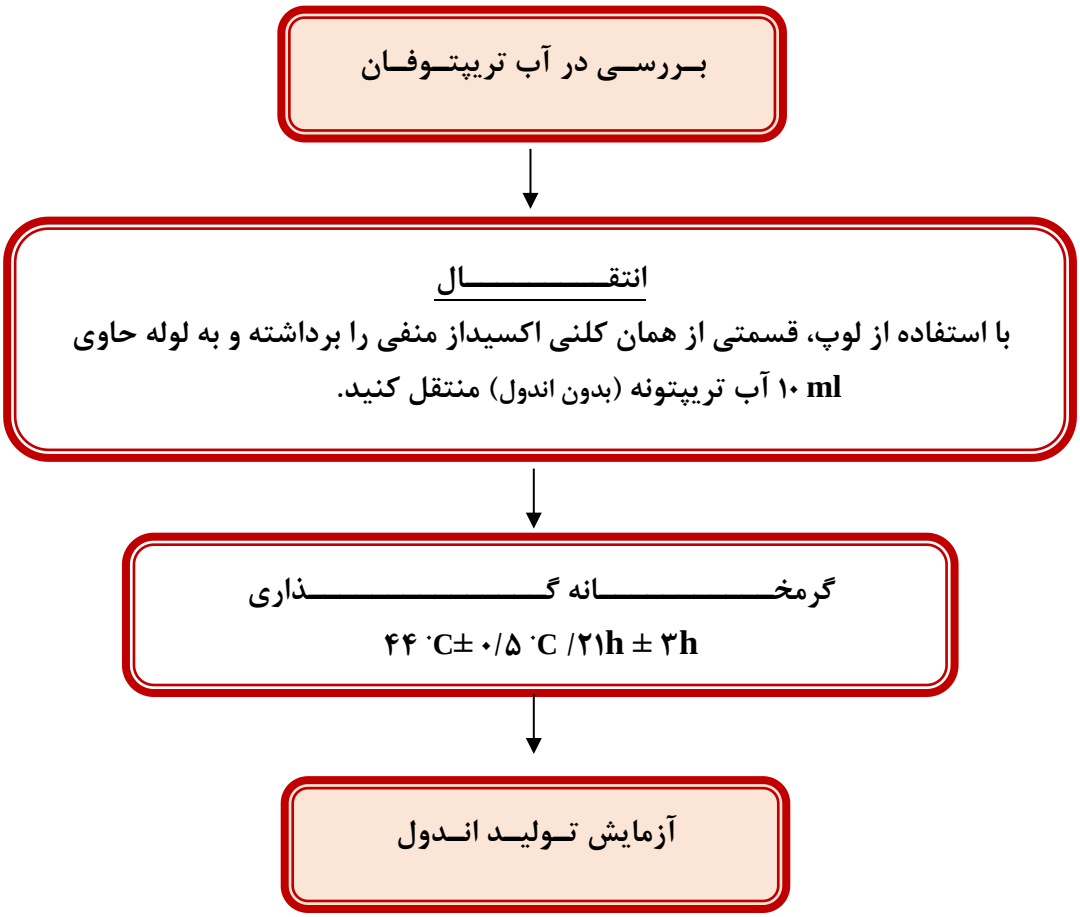
-پرتو فراء بنفش به‌چشم‌ها و پوست آسیب می‌رساند، لذا توصیه می‌شود در هنگام کار کردن با این پرتو، از دستکش و عینک ایمنی استفاده کنید .

-از آنجایی که ممکن است توزیع نامناسب کلنی‌ها، یا وجود کلنی‌های مزاحم با نفوذ رنگ به‌کلنی‌های اطراف در عملیات افتراقی فوق تولید اشکال کند، به‌منظور پیشگیری از این تداخل می‌توانید از کشت دو لایه‌ای استفاده کنید.

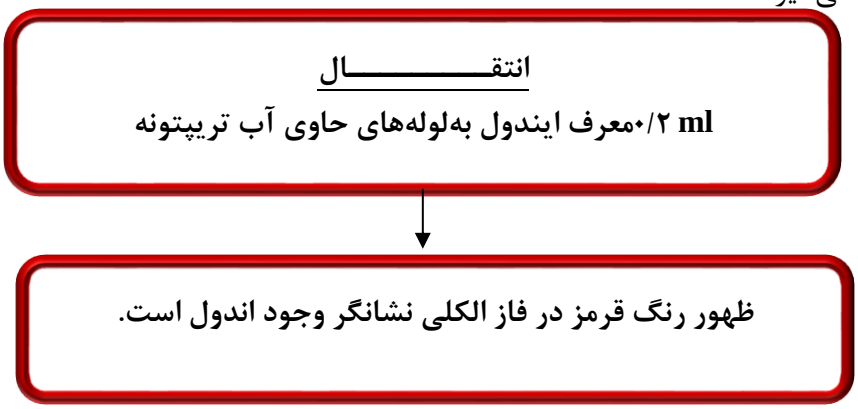


- **تفسیر** :کلیفرم‌ها، اکسیداز منفی است.

یادآوری- آزمون اکسیداز را باید با باکتری‌های شناخته شده دارای واکنش مثبت مانند:(*سودوموناس آئروژینوزا*) و واکنش منفی مانند (*اشریشیا کلی*) تکرار کنید.



ایندول توسط بعضی از میکروارگانیسم‌های معین در آب تریپتونه تولید می‌شود. آب تریپتونه غنی از اسید آمینه تریپتوفان است که توسط این باکتری‌ها به‌عنوان منبع کربن و نیتروژن و انرژی مورد استفاده قرار می‌گیرد.



تفسیر :اشریشیاکلی، اندول مثبت است

مشاهده میکروسکوپی:

کلیفرم‌ها، گرم منفی و به‌اشکال میله‌ای شکل دیده می‌شود.

شمارش کلنی ها

تمام کلنی‌های مشخص تأیید شده در (کشت در روش استاندارد) و (کشت در روش سریع) را شمارش نموده و در هر کدام، طبق فرمول یک، تعداد باکتری‌های اشریشیاکلی و کلیفرم‌ها را در ۱۰۰ml نمونه بیان کنید .

فرمول یک

$$C = \frac{A\ N\ V_s\ F}{B\ V_t}$$

C = تعداد کلنی‌های تأیید شده در ۱۰۰mL نمونه

N = تعداد کلنی‌های مشخص بر روی صافی غشایی‌ها

B = تعداد کلنی‌هایی که برای انجام آزمون‌های تأییدی کشت داده شده است .

A = تعداد کلنی‌های B که تأیید شده است .

Vt = حجم نمونه آب صاف شده

Vs = حجم نمونه برای بیان نتایج برای مثال در ۱۰۰mL

F = ضریب رقت

۷-۴ جستجوی و شمارش انتروکوک‌ها

۷-۴-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ۲-۷۷۲۴، شمارش جستجوی انتروکوک‌ها به‌روش صافی غشایی

انتروکوکوس‌های روده‌ای[۱] باکتری‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی، کوکوئیدی تا تخم مرغی شکل و اغلب به‌صورت جفت بصورت تکی، یا زنجیرکوتاه مشاهده می‌شوند مقاوم درشرایط تغییرات pH، توانائی رشد در محدوده وسیعی از دما را دارا هستند و حرارت ۶۰ °C را به‌مدت زمان h ۰/۵ تحمل می کنند. در حرارت پاستوریزاسیون و حتی حرارت بیشتر زنده می‌مانند و می‌توانند در نمک ۶/۵ درصد و بیشتر مقاومت نمایند. در محیط های قلیائی با pH =۶/۹ رشد و تکثیر می‌کنند. هوازی اختیاری بوده و برروی محیط کشت دارای خون گوسفند همولیز گاما تولید می‌کنند. *انتروکوکوس*ها قادر به‌احیاء ترکیب ۲ و ۳ و ۵- تری فنیل تترازولیوم کلرایدو تبدیل آن به‌فرمازان[۲] هستند و همچنین در دمای ۴۴ °C اسکولین موجود در محیط کشت‌های اسلنتز و بارتلی و صفرا- اسکولین‌آزاید آگار را هیدرولیز می‌کنند. *انتروکوکوس فکالیس*[۲] و *انتروکوکوس فسیوم*[۳] دو گونه کامنسال مشترک در روده انسان هستند.

برخی از سویه‌های *انتروکوک فاسیوم* به‌عنوان پروبیوتیک و خواص بهبود بخش آنها در تغذیه دام، در انواع خوراک دام (مواد افزودنی، پیش‌آمیخته‌ها و فرآورده‌های خوراک دام) کاربرد دارد.

محیط کشت:

- **Slanetz and Bartley medium (S & B)**
- **Bile Esculin Azide Agar**

- **تهیه محیط کشت:**

- **محیط کشت محیط کشت اسلنتز و بارتلی**[1]

محیط کشت پایه (تریپتوز، عصاره مخمر،گلوکز، هیدروژن فسفات دی‌پتاسیم، سدیم آزاید) را طبق دستورالعمل سازنده آماده کنید.

مواد فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل نموده و برای مدت زمان ۵ min اضافی دیگر تا حل شدن کامل، آن را در حمام آب جوش قرار دهید. سپس محیط را تا دمای ۵۰ °C تا ۶۰ °C سرد کنید .

- **محلول TTC**

معرف فوق را در آب مقطر ریخته، با تکان دادن حل کنید. سپس آن را توسط صافی غشایی با اندازه روزنه ۰/۲۲ میکرون سترون نمایید .

- **محیط کامل**

محلول تی سی را به محیط کشت پایه که تا دمای ۵۰ °C تا ۶۰ °C سرد شده است، اضافه کنید. سپس به ضخامت ۳mm تا ۵ در پلیت‌های سترون شده ریخته، در سطحی صاف قرار دهید تا بصورت جامد درآید. پلیت های تهیه شده را می‌توانید حداکثر دو هفته در دمای ۵°C±۳ °C و تاریکی نگه‌داری کنید. pH نهایی محیط باید در دمای ۲۵°C برابر ۷/۲±۰/۱ باشد .برای تنظیم pH محیط کشت از محلول‌های کربنات سدیم ۱۰۰ g/L یا هیدروکسید سدیم ۴۰ g/L یا اسید هیدروکلریک ۳۶/۵ g/L استفاده کنید .

- **تهیه محیط کشت:**

- **محیط کشت صفرا- اسکولین آزاید آگار**

محیط کشت محیط کشت صفرا - اسکولین آزاید آگار را طبق دستورالعمل سازنده آماده کنید.

نیمه عمر محیط‌های کشت حاوی سدیم آزاید کوتاه بوده و با گذشت زمان تجزیه می شوند، لذا ضروری است تاریخ انقضای محیط‌های کشت فوق مورد توجه قرار گیرد.

روش آزمون

آماده سازی و فیلتراسیون را مطابق بند۳-۷-۲-۱، روش صافی غشایی انجام دهید.

با استفاده از گیره سر صاف سترون، صافی تهیه شده را به‌گونه‌ای بر روی محیط کشت قرار دهید تا حباب هوا در زیر آن تشکیل نشود.

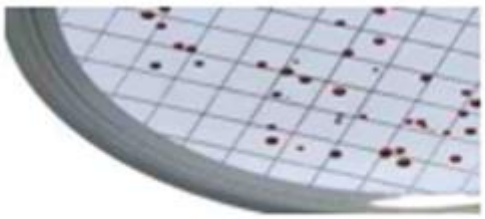
Slanetz and Bartley medium (S & B)

↓

گرمخانه گذاری

(۳۶°C ± ۲ °C / ۴۴h ± ۴h

- **خصوصیات کلنی در محیط کشت Slanetz and Bartley**
- کلنی‌های برجسته بر روی صافی غشایی به‌رنگ قرمز، صورتی و آلبالویی (در مرکز و یا تمام آن‌ها)
- مدور
- محدب، گنبدی شکل سفید و دارای سطح مات یا براق با هاله‌ای قهوه‌ای تیره تا سیاه ناشی از هیدرولیز اسکولین



شکل ۲۵- کلنی های انتروکوکوس

- **تفسیر**

انتروکوک‌های روده‌ای با احیاء ۲ و ۳ و ۵- تری‌فنیل‌تترازولیوم‌کلراید و تبدیل آن به‌فرمازان، به‌رنگ قرمز، آلبالویی یا صورتی دیده می‌شوند .

آزمون تأییدی

با استفاده از گیره سر صاف سترون صافی غشایی را به‌گونه‌ای که سطح چهارخانهٔ آن به‌طرف بالا باشد، بر روی محیط کشت از پیش ریخته قرار دهید.

Bile – aesculin azide agar

↓

گرمخانه گذاری

۴۴°C ±۰/۵ °C / ۲h

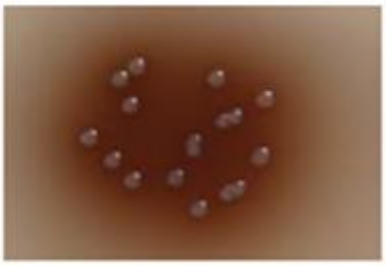
- **خصوصیات مرفولوژی انتروکوک‌ها**

کرم و مات

مدور

محدب گنبدی شکل

سفید و دارای سطح مات یا براق با هاله‌ای قهوه‌ای تیره تا سیاه



شکل ۲۶ – کلنی های انتروکوکوس در محیط بایل آسکولین آزاید

- **تفسیر:**

انتروکوک‌های روده‌ای اسکولین را در مدت h ۲ هیدرولیز نموده، تولید ترکیب ۶ و ۷- دی هیدروکسی‌کومارین می‌کنند، که با یون آهن سه ظرفیتی ترکیب شده و ایجاد رنگ قهوه‌ای روشن تا سیاه می‌کند.

بیان نتایج

برای محاسبه نتایج، با توجه به اینکه هر کلنی از یک میکروارگانیسم منشا گرفته است، نتایج را به صورت تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی در حجم معین نمونه با استفاده از فرمول یک محاسبه کنید

فرمول یک:

$$C_S = \frac{N}{(n_1 v_1 f_1) + (n_2 v_2 f_2) + \ldots}$$

C_s تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی در حجم اولیه Vs

N تمام کلنی‌های شمارش شده بر روی صافی‌ها و یا پلیت‌ها در رقت‌های مختلف

n_1 و n_2 تعداد پلیت‌های شمارش شده به ترتیب برای رقت‌های f_1 و f_2

v_1 و v_2 حجم نمونه مورد آزمون ترتیب برای رقت‌های f_1 و f_2

f_1 و f_2 رقت‌های مورد استفاده به ترتیب برای حجم‌های v_1 و v_2 و در مورد نمونهٔ رقیق نشده، ۱ = f می باشد .

Vs حجم اولیه برای بیان تعداد میکروارگانیسم‌ها در نمونه

۷-۵ سودوموناس آئروژینوزا

۷-۵-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۸۶۹، کیفیت آب- شناسایی و شمارش *سودوموناس آئروژینوزا* به روش صاف کردن غشایی

سودوموناس آئروژینوزا گونه‌ای مهم از باکتری‌های هوازی، گرم منفی، میله‌ای شکل، کاتالاز مثبت و اکسیداز مثبت است. دمای بهینه برای رشد آن°C ۳۷ تا °C ۴۲ می‌باشد ولی در درجهٔ حرارت یخچال رشد نمی‌کند. در pH ۵/۸ تا ۸ بخوبی رشد می‌کند. باکتری بیماری‌زای فرصت‌طلب است که به‌طور گسترده‌ای در همه جا وجود دارد. این میکروارگانیسم تولید پیگنان‌های پیوسین[۱]، فلورسین[۲]، پیو ملانین[۳] و پیوروبین[۴] می‌کند. روی محیط کشت انتخابی حاوی ستریماید[۵] رشد کرده و غالباً با تولید پیوسیانین، ایجاد فلورسنس[۶] زیر پرتوی فرابنفش می‌کند. همچنین بوده و

۱- pyocin

۲-fluroscein

۳- pyomelanin

۴- Pyorubin

۵- Cetrimide

۶- Fluorescence

قادر به‌تولید گاز آمونیاک از استامید است. *سودوموناس آئروژینوزا* روی محیط کشت انتخابی حاوی ستریماید رشد کرده و غالباً با تولید پیوسیانین، زیر پرتوی فرابنفش ایجاد فلورسنس می‌کند.

محیط کشت‌ها

- **Pseudomonas(C.N. A)**
- **Cetyltrimethylammonium bromide**
- **Mpac**
- **Nutrient agare**
- **Nalidixic Acid**
- **Nanamycin**
- **Acetamide brath**
- **Oxidas Reagen**

تهیه محیط کشت آگاردار از پیش ریخته

- **محیط کشت *Cetyltrimethylammonium bromide***

محیط کشت را طبق دستورالعمل سازنده آماده کنید.

- **محیط کشت *Neutrient agar***

محیط کشت را طبق دستورالعمل سازنده آماده کنید.

- **محیط کشت Pseudomonas(C.N. A)**

محیط کشت (C.N. A) آگار را طبق دستورالعمل سازنده آماده کنید.

مکمل محیط کشت(C.N. A)

هگزا دسیل تری متیل آمونیوم بروماید (ستریماید) و نالیدیکسیک اسید را با استفاده از صافی سترون کنید. و به‌محیط پایه اضافه کنید. و پس از مخلوط کردن درپلیت‌های سترون تقسیم کنید عمق محیط کشت در هر پلیت حداقل ۵mm است. پلیت‌های از پیش ریخته خشک تا یک ماه در یخچال قابل نگه‌داری هستند. در صورت نگه‌داری در یخچال، دمای پلیت‌ها ۳۰ min پیش از استفاده، به دمای اتاق برسانید. برای تهیه مکمل، ۸mg کانامایسین و ۰/۳۷gنالیدیکسیک اسید را به۱۰ml آب مقطر سترون با دمای ۳۷ C° اضافه کنید و به‌مدت۳۰ min تکان دهید. محلول را به ۹۹۰ml محیط کشت ذوب شده و نگهداری شده در دمای حدود۴۵ C°، پیش از ریختن در پلیت و خشک کردن، اضافه کنید.

- **محیط کشت (Mpac)**

محیط کشت پایه Mpac را طبق دستورالعمل سازنده آماده کنید.

و با کانامایسین و نالیدیکسیک اسید را قبل از ریختن در پلیت‌های سترون، به محیط پایه اضافه کنید. پلیت‌های از پیش ریخته خشک تا دو هفته در یخچال قابل نگه‌داری هستند. در صورت نگهداری در یخچال، دمای پلیت‌ها را ۳۰ min پیش از استفاده، به دمای اتاق برسانید.

↓

آماده سازی و فیلتراسیون را مطابق بند۳-۷-۲-۱ ، روش صافی غشایی انجام دهید.

پس از صاف نمودن، صافی غشائی را توسط انبرک سترون بردارید. به‌طوری که طرف چهار خانه آن را به‌طرف بالا باشد، روی پلیت از پیش ریخته قرار دهید و دقت نمائید تا حباب هوا در ته صافی تشکیل نگردد.

فیلتر را روی سطح یکی از پلیت‌های از پیش ریخته قرار دهید.

Mpac	Etyltrimethylammonium bromide	Pseudomonas (C.N. A)
گرمخانه گذاری ۴۲°C ±۲ °C / ۲۴h±۴۸h	گرمخانه گذاری ۴ °C /۲۴h±۴۸h و ۴۲°C ±۲ °C / ۲۴h±۴۸h	گرمخانه گذاری ۳۶°C ±۲ °C / ۴۴h±۴h

- **بررسی رشد در دماهای** °C (۴۲) و °C (۴)
- *سودوموناس آئروژینوزا* در دمای °C (۴۲) رشد می‌کند.
- *سودوموناس آئروژینوزا* در دمای °C (۴) رشد نمی‌کند.

- **بررسی صافی‌ها**

پس ازپایان زمان گرمخانه‌گذاری، پلیت‌ها را زیر پرتوی فرابنفش بررسی کنید.

کلنی‌های مشخص *سودو موناس آئرو ژینوزا* با قطر ۰/۸ µm تا ۲/۲ µm هریک از محیط‌های کشت دارای خصوصیات تشخیصی خاص، هستند.

- **خصوصیات کلنی *سودوموناس آئروژینوزا* در محیط کشت‌های:**

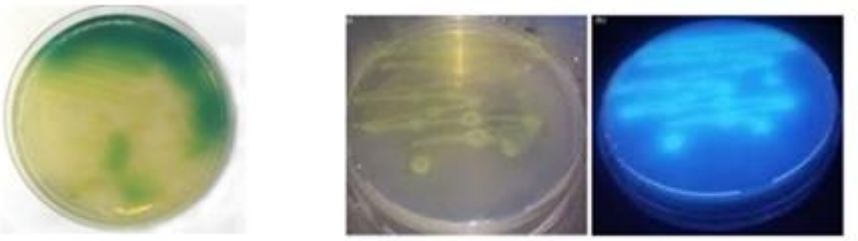
-Pseudomonas(C.N. A)

-Cetyltrimethylammonium bromide

مشاهده کلنی های سبز/ آبی ایجاد کننده فلورسنس زیر پرتو فرا بنفش (*سودو موناس آئروژینوزای* تایید شده)

مشاهده کلنی‌های غیر سبز / آبی ایجاد کننده فلورسنس زیر پرتو فرا بنفش (*سودو موناس آئروژینوزای فرضی*)

مشاهده کلنی‌های قهوه‌ای مایل به‌قرمز ایجاد کننده فلورسنس زیر پرتو فرا بنفش (*سودوموناس آئروژینوزای* فرضی)



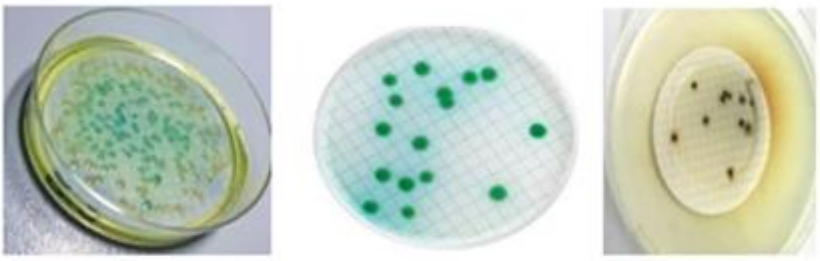
شکل ۲۷ – کلنی های سودوموناس زیر پرتو فرابنفش

یادآوری- کلنی‌های سبز – زرد فلورسنس سودوموناس زیر پرتو فرا بنفش به‌واسطه پیگمان پیووردین است.

- **خصوصیات کلنی *سودوموناس آئروژینوزا* در محیط کشت:**

-(Mpac)

مشاهده کلنی‌های قهوه‌ای با مرکز سیاه مایل به‌سبز و هاله روشن در اطراف (*سودوموناس آئروژینوزای* فرضی)

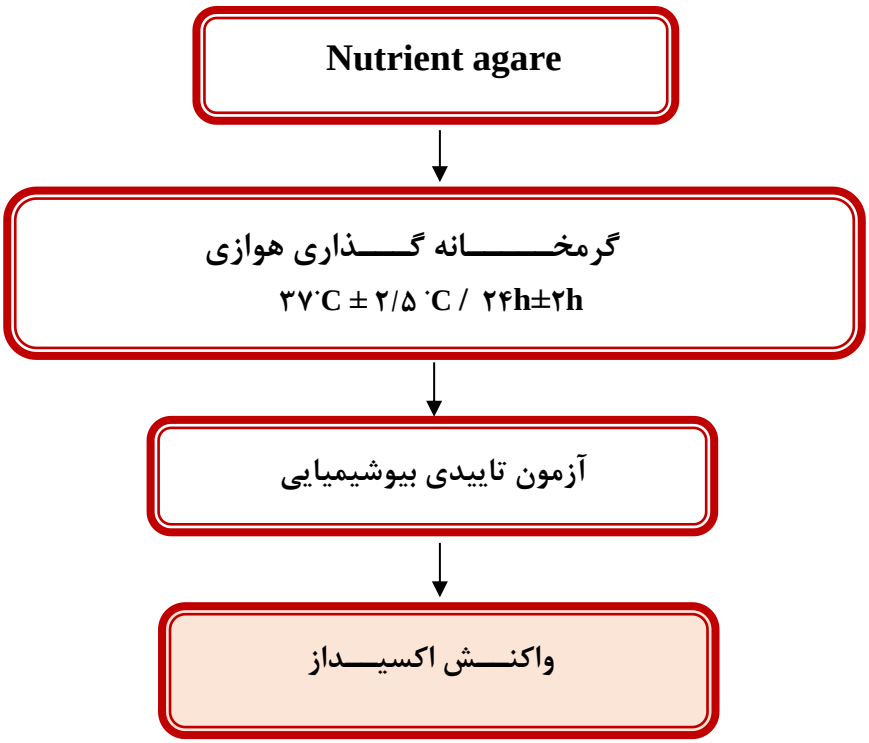


شکل ۲۸ – کلنی های سودوموناس

یادآوری- رنگ سبز – آبی کلنی سودوموناس برای شناسایی گونه مورد استفاده قرار می‌گیرد.

آزمون‌های تاییدی

کلنی‌های انتخاب شده برای انجام آزمون‌های تاییدی بیوشیمیایی را بر روی محیط کشت آگار مغذی کشت خطی دهید.



- اکسیدازها آنزیم‌هایی هستند که واکنش‌های اکسیداسیون را کاتالیز (تسهیل) می‌کنند. در زیست‌شیمی یک اکسیدورداکتاز آنزیمی است که انتقال الکترون را از یک مولکول (احیاکننده) به‌مولکول دیگر (اکسیدان) کاتالیز می‌کند $A^- + B \rightarrow A + B^-$

- باکتری‌ها اصولاً به‌دو روش تخمیر یا اکسیداسیون مواد آلی انرژی تولید می‌کنند. باکتری‌هایی که با اکسیداسیون مواد آلی انرژی تولید می‌کنند، آنزیم اکسیداز دارند و اصطلاحاً اکسیداز مثبت هستند. اگر باکتری دارای آنزیم سیتوکروم اکسیداز باشد (مانند: پسودوموناس یا گونوکوک) در صورت مجاورت با رنگ‌های احیا شونده مانند تترامتیل-پی‌فنیلین‌دی‌آمین آن‌را احیا نموده به‌رنگ بنفش تغییر رنگ می‌دهد و اگر اکسیداز منفی باشد (مانند: آسینتوباکتر) تغییر رنگ مشاهده نمی‌شود.

- برای انجام آزمون اکسیداز، با استفاده از لوپ، قسمتی از کلنی را برداشته و بر روی یک کاغذ صافی آغشته به‌معرف اکسیداز قرار دهید واکنش مثبت در مدت sec ۱۰ به‌صورت ایجاد رنگ آبی تیره مشاهده می‌گردد

شکل ۲۹ – آزمون اکسیداز

واکنش استامید

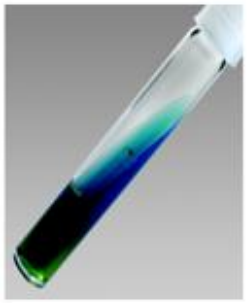
- برای انجام این آزمون استامید، از محیط افتراقی استامید آگار استفاده می‌شود. این محیط دارای استامید به‌عنوان تنها منبع کربن و معرف بروموتیمول بلو (BTB) است این معرف در pH خنثی به‌رنگ سبز و در pH قلیایی به‌رنگ آبی دیده می‌شود. با استفاده از لوپ، قسمتی از کلنی را برداشته و به‌لوله حاوی محیط کشت استامید آگار(شیبدار) منتقل کنید.

انتقال یک کلنی به‌محیط Acetamide

↓

گرمخانه گذاری

۳۷ °C / ۲۴h±۳۶h



شکل ۳۰ – آزمون استامید

هشـــدار – اســتامید مــاده ای ســرطان‌زا و تحریــک کننــده اســت. بنــابراین هنگــام وزن کــردن، آمــاده ســازی و دفــع محیط کشت باید دقت لازم به‌عمل آید.

- **تفسیر :**

ســودوموناس آئروژینــوزا، اســتامید مثبــت اســت و تولیــد آمونیــاک مــی‌کنــد. تولیــد گــاز آمونیــاک بــا ایجاد رنگ آبی پررنگ مشخص می‌شود.

- **مشاهده میکروسکوپی:** به‌اشکال میله‌ای

شکل ۳۱ –سودوموناس

شمارش کلنی‌ها

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

۷-۶ کلستریدیوم‌های احیأکننده سولفیت

۷-۶-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵۳۵۳، آب - جستجو و شمارش اسپورکلستریدیوم‌های احیأکننده سولفیت با استفاده از صافی غشایی

این باکتری‌ها گروهی ناهمگون از نظر تاکسونومی هستند به‌این معنا که در انواع اشکال و اندازه در بین اعضای این گروه دیده می‌شوند. برخی از این باکتری‌ها کوکسی و برخی باسیل‌اند. برخی توانایی تولید اندوسپور دارند درحالی‌که بسیاری چنین توانایی را ندارند. در واقع هر باکتری که بتواند فرآیند احیای گوگرد اکسید شده به‌انواع احیا شده را انجام دهد بدون درنظر گرفتن قرابت تاکسونومیکی (یعنی اینکه به‌چه خانواده یا جنس باکتریایی تعلق دارد) در این گروه بررسی می‌شود. این باکتری‌ها به‌اشکال خمیده، بیضی، کروی، رشته ای با ۱ µm تا ۵ µm و عرض ۰/۵ µm تا ۲ µm بوده و اغلب دارای تاژه و متحرک هستند. اکسیژن برای این باکتری‌ها مضر است، اگرچه آنها را از بین نمی‌برد اما غیر فعال می‌کند. فرق بین انواع آنها (دی سولفو ویبریو، کلستریدیوم و توماکولم) مربوط به‌چگونگی احیاء مواد آلی است. اسپور این میکروارگانیسم‌ها به‌طور وسیعی در محیط پراکنده هستند و نسبت به‌مواد شیمیایی و عوامل فیزیکی مقاوم بوده و به‌مدت طولانی به‌خصوص در آب باقی می‌مانند، این میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان شاخص آلودگی متناوب آب معرفی می‌شوند و حضور آنها در آب تصفیه شده، نشانه وجود نقص در فرآیند تصفیه آب در تصفیه خانه‌ها محسوب شوند.

محیط کشت

- **Iron Sulphite Agar (ISA)**
- **Tryptise sulfite Agar**
- **Nutrient Agare**
- **Tryptose Sulfite Cycloserine Agar (TSC)**

↓

روش آزمون

↓

شوک حرارتی در بن ماری $75 \pm 5^{\circ}C$ به مدت 15min

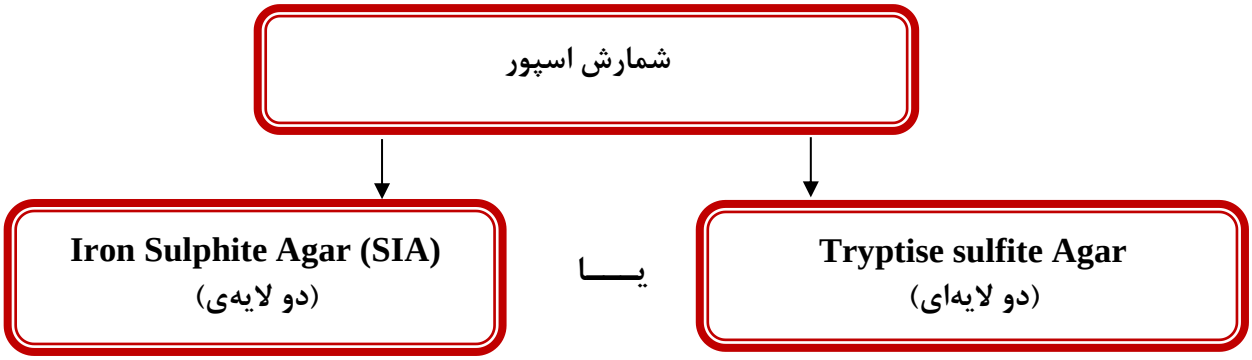
قبل از انجام آزمایش، نمونه بایستی در بن ماری $75 \pm 5^{\circ}C$ به مدت زمان 15 min حرارت داده شود. برای کنترل درجه حرارت مقداری آب معمولی را به‌یک ظرف مشابه اضافه نموده، و یک دماسنج را در آن قرار داده، و ظرف را در مجاورت نمونه مورد آزمون در بن‌ماری بگذارید. از زمانی‌که دماسنج حرارت $75^{\circ}C$ را نشان می‌دهد، زمان را یادداشت نموده، و بعد از زمان 15 min نمونه مورد آزمون را از بن‌ماری خارج کنید.

↓

آماده سازی و فیلتراسیون را مطابق بند۳-۷-۲-۱، روش صافی غشایی انجام دهید.

یادآوری- برای آزمون اسپورکلستریدیوم‌های احیاکننده سولفیت، از صافی غشایی با اندازه روزنه $0/22\ \mu m$ استفاده کنید.

نمونه را طوری رقیق کنید تا پرگنه‌های سیاه به‌طور مجزا تشکیل شوند و به‌آسانی قابل شمارش باشند. پس از صاف نمودن، صافی غشائی را توسط انبرک سترون بردارید. به‌طوری که طرف چهار خانه آن را به‌طرف بالا باشد، روی پلیت از پیش ریخته قرار دهید و دقت نمائید تا حباب هوا در ته صافی تشکیل نگردد.



پس از قرار دادن فیلتر در سطح یکی از پلیت‌های از پیش ریخته، ۱۸mL از محیط کشت کامل و ذوب شده با درجه حرارت حدود۵۰°C را بر روی صافی بریزید. صبر کنید تا محیط جامد شود.

- **خصوصیات کلنی:**
  - کلنی‌های سیاه دارای هاله سیاه
  - کلنی‌های سیاه که احتمالا دارای هاله سیاه در محیط کشت هستند، نشان دهنده باکتری‌های بی‌هوازی احیاء کننده سولفیت می‌باشند.

کلستریدیوم پرفرنژنس[1] باسیل ولشای گونه‌ای باکتری از جنس کلستریدیوم است و شاخص ارزشی برای آلودگی مدفوعی شناخته شده است و حضور این باکتری در آب بیانگر آلودگی متناوب و جزئی است این باکتری میله‌ای شکل گرم مثبت بی‌هوازی، بدون حرکت و دارای یک هاگ بیضی شکل مرکزی یا نزدیک به‌انتها است که باعث تورم سلول نمی‌شود و بر اساس توکسین به ۵ تیپ تقسیم می‌شود. عامل اصلی بیماری گاز گانگرن است. چنانچه از این استاندارد برای شمارش *کلستریدیوم پرفرنژنس* استفاده می‌شود لازم است بعد از به‌دست آوردن کلنی‌های شاخص، تعداد ۵ کلنی شاخص از هر کدام از پلیت‌ها را انتخاب و آزمون‌های تاییدی برای شناسایی جنس *کلستریدیوم پرفرنژنس* انجام گیرد. *کلستریدیوم پرفرنژنس* پس از گرمخانه‌گذاری بی‌هوازی در دمای۳۷°C±۱°C به‌مدت زمان ۴۸h تا ۲۴h، کلنی‌های سیاه یا خاکستری تا زرد متمایل به‌قهوه‌ای را روی محیط کشت تریپتوز سولفیت سیکلو سرین آگار، حتی کم رنگ ایجاد می‌کند. این کلنی‌ها دارای آنزیم فسفاتاز اسیدی هستند. کلنی‌های روی صافی غشایی بر خلاف کلنی‌های توسعه یافته در محیط کشت آگار، سیاهی واضحی ندارد بنابر این کلنی‌های کم‌رنگ نیز باید شمارش شوند.

یادآوری- محیط دارای سیکلو سرین، به‌عنوان عامل انتخابی برای جلوگیری از رشد گونه‌های باسیلوس است .

یادآوری۱- برای غیر فعال کردن فرم رویشی باکتری، نمونه در دمای ۶۰°C۲±°C توسط شوک حرارتی تیمار شود.

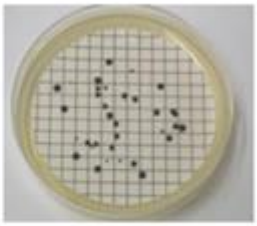
یادآوری۲- گرمخانه‌گذاری در دمای ۴۴°C قابلیت انتخابی آزمون را برای *کلستریدیوم پرفرنژنس* افزایش می‌دهد.

۱- *Clostridium perfringens*

برای اطلاعات بیشتر به‌استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۹۲۶۵، کیفیت آب- شمارش *کلستریدیوم پرفرنژنس*- با استفاده از روش صافی غشایی مراجعه کنید.

- **مشاهده میکروسکوپی:**

معمولا به‌اشکال میله‌ای با اندو اسپور انتهایی



شکل ۳۲- کلنی کلستریدیوم

شکل ۳۳- مشاهده میکروسکوپی

۷-۷ کپک و مخمر در فرآورده‌های با فعالیت آبی(aw)[1] بیشتر از ۰/۹۵

۷-۷-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱- ۱۰۸۹۹، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش جامع برای شمارش کپک‌ها و مخمرها – قسمت اوّل: روش شمارش کلنی در فرآورده‌های با فعالیت آبی(aw) بیشتر از ۰/۹۵

محیط کشت

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

تهیه محیط کشت:

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

محیط کشت دی‌کلران‌رزبنگال‌کلرام‌فنیکل آگار را طبق دستورالعمل سازنده آماده کنید.pH محیط را به‌گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون شدن، برابر ۵/۶ ± ۰/۲ شود. ۱۰mL از محلول ۱٪ کلرامفنیکل در اتانل را به محیط پایه اضافه کنید و مخلوط کنید . محیط کشت را در اتوکلاو با دمای ۱۲۱°C ±۱°C به مدت ۱۵ min سترون نمایید و در مقادیر ۱۵mL در پتری دیش توزیع کنید. به‌منظور پیشگیری از رشد بیش از حد کپک‌های خانواده موکوراسه روی سطح پلیت‌ها، افزودن ترجیتول به مقدار ۱mL به ازاء هر ۱ L محیط کشت توصیه می‌شود.

۱-Water activity(aw)

تهیه محیط کشت:

- **دی‌کلران‌رزبنگال‌کلرام‌فنیکل‌آگار**

کپک‌ها برای نمایش خصوصیات کامل ریخت شناسی به‌ویژه رنگدانه‌های خود نیاز به عناصر کمیاب دارند که ممکن است در محیط DRBC موجود نباشد. در صورت لزوم می‌توان برای شناسایی کپک‌ها و مخمرها در این محیط کشت، محلول $SO_4Zn,7H_2O$ ۱٪ و $SO_4Cu,5H_2O$، ۰/۵٪ را به مقدار ۱ mL به ازاء هر ۱ L محیط کشت، پیش از سترون کردن افزود.

همچنین برای جلوگیری از رشد بیش از حد باکتری‌ها، افزودن کلرامفنیکل و کلروتتراسیکلین توصیه می‌شود. محیط پایه را با ۵۰mg/L تهیه کنید و در حجم‌های۱۰۰mL توزیع و سترون کنید. محلول ۰/۱ ٪ کلروتترا سیکلین‌هیدروکلراید در آب مقطر را به‌تازه تهیه کنید و توسط صافی غشایی سترون کنید. بلافاصله پیش از استفاده، ۵ mL از این محلول را در شرایط سترون به۱۰۰ mL محیط کشت پایه اضافه کنید و در پتری دیش‌ها توزیع کنید. استفاده از جنتامایسین توصیه نمی‌شود زیرا ممکن است که سبب ممانعت از رشد برخی از مخمرها شود.

آزمون عملکرد برای تضمین کیفیت محیط کشت

قابلیت رشد و انتخابی بودن محیط کشت، طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۶۶۳ انجام گیرد.

- ✓ به‌دلیل رسوب سریع اسپورها در پی‌پت، پس از پر کردن پی‌پت‌ها با سوسپانسیون اولیه یا رقت‌ها، آن را به‌صورت افقی نگه دارید . برای جلوگیری از رسوب ذرات دارای میکروارگانیسم، سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها را به‌هم بزنید.
- ✓ با استفاده از گیره سر صاف سترون، صافی تهیه شده را به‌گونه‌ای بر روی محیط کشت قرار دهید تا حباب هوا در زیر آن تشکیل نشود.

Dichloran-rose Bengal-Chloramphenicol-Agar(DRBC)

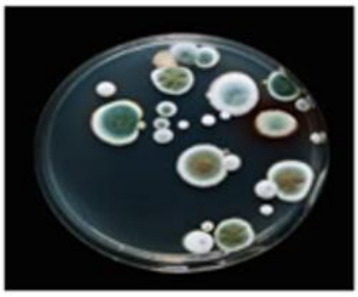
- ✓ پلیت‌ها را به‌صورت هوازی، با درپوش بالا و ایستاده در انکوباتور قرار دهید.
- ✓ اگر احتمال حضور *زیرومایسیزبیسپوروس*[1] وجود داشته باشد، پلیت‌ها را به‌مدت زمان۱۰ d گرمخانه گذاری کنید.

۱- Xeromyces bisporus

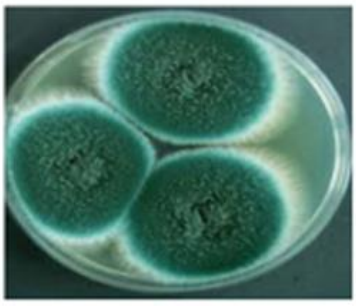
گرمخـــــــــانه گـــــــــذاری

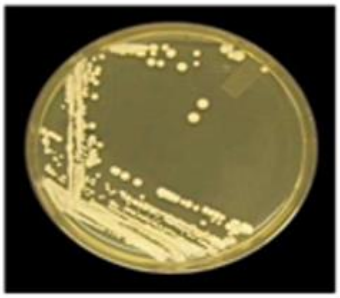
۵ d تا ۳ d / ۲۵ °C

- ✓ توصیه می‌شود که پلیت‌ها، در یک کیسه پلاستیکی در باز قرار داده شوند تا از انتشار کپک‌ها از داخل پلیت‌ها سبب آلودگی انکوباتور نشود.
- ✓ اسپورهای کپک‌ها به‌راحتی در هوا پخش می‌شوند لذا، پلیت‌ها را با احتیاط جابه‌جا کنید تا از پیدایش کلنی‌های اقماری جلوگیری شود در غیر این صورت شمارش، غیر واقعی و بالا خواهد بود.
- ✓ کلنی‌های مخمرها و کلنی‌ها یا پروپاگول‌های کپک‌ها را در صورت نیاز، جدا گانه شمارش کنید.
- ✓ به‌منظور افزایش رطوبت داخل انکوباتور، یک بشر آب مقطر داخل آن قرار دهید.
- ✓ گرمخانه‌گذاری بیشتر از d ۵ بستگی به‌دما و میزان رشد دارد.
- ✓ در صورتی که انتظار دارید تعداد زیادی باکتری مورد شمارش قرار گیرند می‌توانید رقت‌های لازم برای دستیابی به‌شمارش کلنی‌ها را کشت دهید.



شکل ۳۴- کلنی‌های کپک‌ها





شکل ۳۵- کلنی‌های مخمرها

خصوصیات کلنی مخمر

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

شمارش کلنی‌ها

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

۸ بیان نتیجه آزمون

۸-۱ شمارش

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

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

ℓ تعداد کلنی‌های 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:

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

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

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

که در این فرمول ها،

m میانگین حسابی به‌دست آمده از دو پلیت،

V حجم ماده تلقیحی 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 کلنی‌های شمارش شده روی یک پلیت،

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

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

که در آن :

$\sum c$ مجموع کلنی‌های شمارش شده از تمام پلیت‌های 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 غنی‌سازی 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 (فرآورده آلوده)، روش خنثی‌سازی و جستجو در صورتی صحه‌گذاری می‌شود باکتری از پلیت صحه‌گذاری شده، بازیافت شود.
عدم رشد روی پلیت‌های 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 فراورده و یا افزودن مقدار کافی مادهٔ خنثی کننده در محیط کشت مایع غنی‌کننده، یا با ترکیب مناسبی از این تغییرات به‌گونه‌ای که اجازهٔ رشد به‌باکتری 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.

پیوست الف

استانداردهای مرتبط با (GMP)

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

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

از آن‌جایی که دستکاری 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 نه تنها 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 محیط‌های کشت و تجهیزات در نظر گرفته شود، تعیین می‌کند.

الف ۲ - استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۲۷۰، آیین کار تولید گلاب و عرقیات گیاهی

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

الف ۳ - استانداردهای مرتبط با گلاب و عرقیات گیاهی

استاندارد ملی ایران ایران شمارهٔ ۱۰۰۷۷، عرقیات گیاهی- ویژگی‌ها

استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۰۰۷۱، نوشیدنی عرقیات گیاهی بدون گاز-ویژگی‌ها و روش‌های آزمون

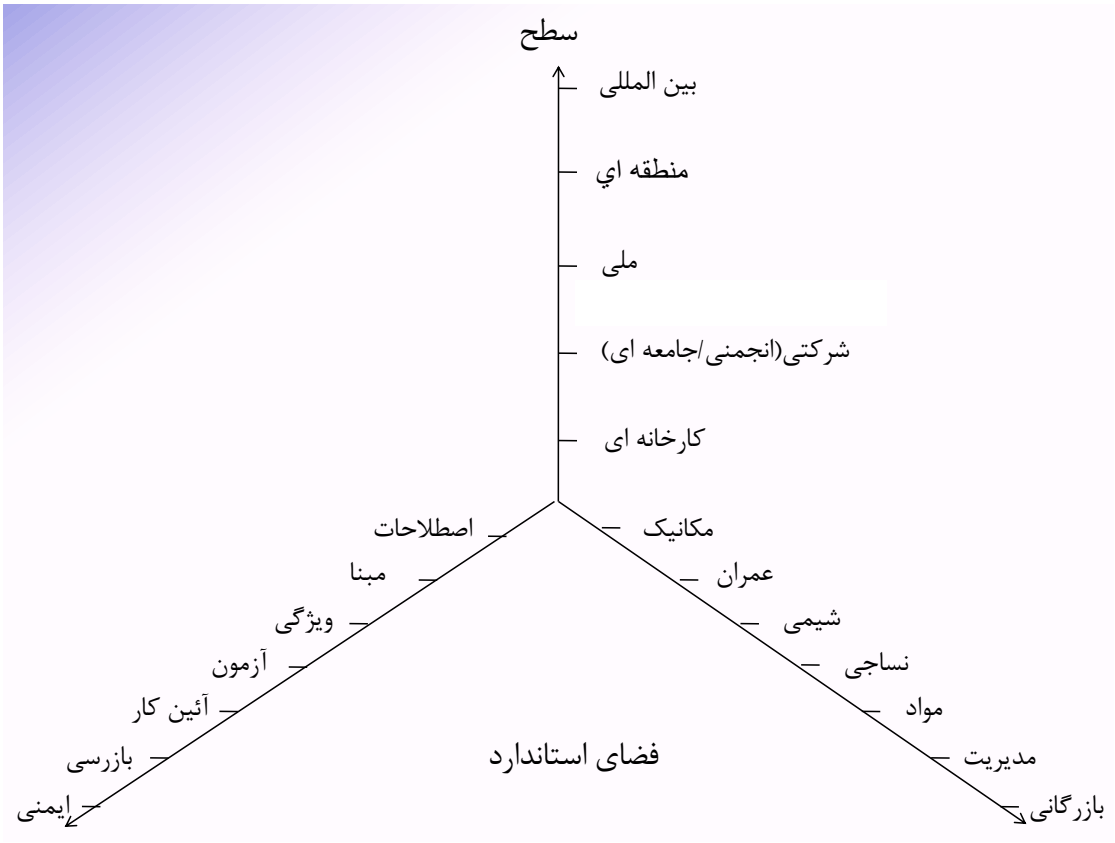
استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۲۰۱۳، نوشیدنی عرقیات گیاهی گازدار-ویژگی‌ها و روش‌های آزمون

استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۳۹۶۷، عرقیات گیاهی – روش‌های آزمون

استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۲۸۰، عرقیات گیاهی – آیین کار تولید

پیوست ب
انواع استاندارد

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



ب-۲ سطح استاندارد

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

الف- استانداردهای کارخانه ای، این گونه استانداردها توسط کارخانجات و به‌منظور استفاده در همان واحد تدوین می شود. در تدوین استاندارد کارخانه‌ای ضمن بررسی شرایط داخلی کارخانه باید شرایط و عوامل خارجی از قبیل مواد اولیه و منابع تهیه آن، چگونگی تهیه تجهیزات، بازاریابی و رقابت، نیاز مشتری و امثال آن باید مورد توجه قرار گیرد.

ب- استانداردهای ملی (مانند ISIRI, BS, BIS ASTM , و ...)، این گونه استانداردها به‌وسیله سازمان استاندارد در یک کشور که به‌عنوان مقام ذی‌صلاحی برای این کار شناخته شده است، تهیه می شود. در تدوین این

استانداردها تمامی افراد ذی نفع از قبیل تولید کنندگان، مصرف کنندگان، اعضای مراکز علمی و فنی، مراکز تجاری کارشناسان مرتبط از سازمان‌ها یا مراکز دولتی و امثال آن شرکت دارند.

پ- استانداردهای 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 منطقه‌ای 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 به‌استانداردهای ملی با توجه به‌نیاز و موقعیت زمانی کشورها از نظر توسعه فنی و صنعتی می‌باشد.

ب-۳- جنبه استاندارد

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

الف- استانداردهای ویژگی

ب- استانداردهای روش آزمون

پ- استانداردهای آیین کار

ت- استانداردهای ایمنی

ث- واژه نامه

ت- سایر استانداردها (شامل طبقه‌بندی، بازرسی و نمونه‌برداری، بسته‌بندی، حمل و نگهداری، راهنما و ...)

ب-۴- اجرای استاندارد

استانداردهای ملی از نظر اجرایی به‌دو دسته زیر تقسیم بندی می‌شوند:

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

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

رویه‌ای است که بر طبق آن از جامعه یا محموله مورد بررسی بخش یا بخش‌های کوچکی انتخاب می‌شود تا بر اساس نتایج حاصل از بازرسی آن‌ها بتوان در مورد کل جامعه یا محموله قضاوت کرد.

پ-۴- بازرسی (Inspection)

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

پ-۵-درستی (Accuracy)

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

مدیرکنترل کیفیت واحد تولیدی طبق آیین نامه مذکور،علاوه بر انجام وظایف خود از جمله حضور تمام وقت در یک نوبت کاری و بازرسی ،کنترل و نظارت کامل بر مواد اولیه، شرایط فرآورده حین ساخت ، محصول نهایی و شرایط نگهداری درکلیه مراحل تولید و یا خدمت و سایر وظایف و موارد ذکر شده، موظف است نتایج آزمون نمونه های تولید شده در کارخانه را روزانه ثبت نموده و به‌صورت کتبی ماهیانه (حداکثر تا پایان هفته اول ماه بعد) به‌اداره کل استاندارد استان (با امضاء مدیر کنترل کیفیت و مدیر عامل کارخانه) ارسال نماید.

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

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

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

ت-۲ خلاصه ای از دستورالعمل نحوه تذکر، اخطار، تعلیق و ابطال پروانه کاربرد علامت استاندارد ایران به‌علت 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 به‌علت عدم تداوم انطباق فرآورده با استاندارد مربوطه (مدرک شماره ۱۱۹/۵۰د)، نواقص موجود در کالاهای تولید شده به‌سه دسته به‌شرح زیر تقسیم می‌گردند:

ت-۲-۱-۱ نقص بحرانی:

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

ت-۲-۱-۲ نقص عمده:

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

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 نمی‌دهد یا آنکه اختلاف آن با مشخصات فنی به‌میزانی است که کارآیی آن کالا را چندان کاهش نمی‌دهد.
نقایص بحرانی ،عمده و جزئی آزمون ها به‌پیوست می‌باشد.

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

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

جدول ۱- امتیازات منفی نواقص موجود در فرآورده

نوع نقص	امتیاز منفی
بحرانی	۳۰
عمده	۱۵
جزئی	۵

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

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

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

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

یادآوری۱- رفع تعلیق و تجدید پروانه کاربرد علامت استاندارد ایران، در صورت رفع کلیه نقایص و انطباق با موازین استاندارد ملی مربوط و احراز کلیه شرایط مندرج در دستورالعملهای مرتبط صورت می گیرد.

یادآوری ۲- انجام هریک از اقدامات ذکر شده در جدول ۲، نافی و مانع یکدیگر نمی باشد و تنها ملاک هر یک از اقدامات رسیدن به‌حد نصاب امتیاز منفی ذکر شده در بندهای مذکور است.

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

پیوست ث

نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌های میکروبیولوژی گلاب و عرقیات گیاهی

طبق استاندارد ملی ایران شماره‌های ۳۲۷۰ و ۳۵۴۵

ردیف	شرح آزمون	درجه اهمیت
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌های هوازی	عمده
۲	کلی‌فرم‌ها	بحرانی
۳	انتروکوک‌ها	بحرانی
۴	سودوموناس آئروژینوزا	بحرانی
۵	اسپورکلستریدیوم‌های احیأکننده سولفیت	بحرانی
۶	کپک و مخمر	عمده