



ریاست جمهوری
سازمان ملی استاندارد ایران



جزوه دوره کارآموزی

میکروبیولوژی نوشیدنی گازدار مالت

و نوشابه‌های گازدار



شماره مدرک : ۶۲۲/۳۶/ج

تاریخ تصویب : ۱۳۹۸

شماره تجدید نظر:

تاریخ تجدید نظر:

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

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

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

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

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

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) و سایل سنچس، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آنها اعطا و بر عملکرد آنها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، واسنجی و سایل سنچس، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

۱- International Organization for Standardization

۲- International Electrotechnical Commission

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

۴-Contact point

۵- Codex Alimentarius Commission

پیشگفتار

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

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

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

محتوای دوره کارآموزی میکروبیولوژی نوشیدنی گازدار مالت و نوشابه‌های گازدار

عنوان دوره کارآموزی:

میکروبیولوژی نوشیدنی گازدار مالت و نوشابه‌های گازدار

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 نوشیدنی گازدار مالت و نوشابه‌های گازدار بر اساس استانداردهای ملی ایران شماره‌های ۳۸۴۵ و ۶۳۰۷ می‌باشد و موارد زیر را در برمی‌گیرد:

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

توانایی‌های کارآموزان پس از طی دوره:

- روش تهیه و سترون‌سازی محیط کشت‌های مورد نیاز
- روش آماده‌سازی و سترون‌سازی وسایل مورد نیاز
- روش آلودگی‌زدایی مواد مصرفی و وسایل
- نحوه استفاده صحیح از تجهیزات مورد نیاز در آزمایشگاه
- روش بکارگیری از استانداردهای مرتبط
- روش اجرای آزمون طبق استاندارد
- شناسایی و تعیین هویت باکتری‌ها

پیش‌نیاز:

ندارد

رئوس مطالب آموزشی :

منبع / استانداردها	اجراکننده		مدت آموزش (ساعت)		محتوای آموزشی	رئوس مطالب	ردیف
	مدرس	کارآموز	عملی	تئوری			
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹	*		-	۰/۵	آشنایی با وسایل مورد نیاز آشنایی با اصول آزمایشگاهی آشنایی با قسمت های مختلف آزمایشگاه میکروبیولوژی	آشنایی با الزامات فنی آزمایشگاه میکروبیولوژی	۱
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹	*	*	۰/۵	۰/۵	روش تهیه محیط کشت مرتبط با میکروبیولوژی نوشیدنی گازدار مالت و نوشابه های گازدار	آشنایی با روش تهیه محیط کشت های مورد نیاز و روش سترون سازی	۲
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹	*	*	۰/۵	۰/۵	روش آماده سازی وسایل مورد نیاز و سترون سازی وسایل	آماده سازی وسایل مورد نیاز و روش سترون سازی وسایل	۳
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره های: ۶۳۰۷ و ۳۸۴۲		*	۰/۵	۰/۵	هدف و دامنه کاربرد، مواد و دستگاه های مورد نیاز جهت انجام آزمون	آشنایی با استاندارد روش آزمون	۴
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره های: ۶۳۰۷ و ۳۸۴۲			۱	۱	آشنایی با میکرو ارگانیسم های نوشیدنی گازدار مالت و نوشابه های گازدار	آشنایی با شاخص های میکروبی و حدود مجاز آنها در نوشیدنی گازدار مالت و نوشابه های گازدار	۵
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره های: ۶۳۰۷ و ۳۸۴۲	*	*	۰/۵	۰/۵	نمونه برداری از آزمايه ، توزین نمونه و تهیه سوسپانسیون اولیه و سایر رقت ها با استفاده از رقیق کننده مناسب	روش آماده سازی نمونه در آزمایشگاه	۶
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره های: ۶۳۰۷ و ۳۸۴۲	*	*	۱	۱	استفاده از سوسپانسیون اولیه و یا رقت های مورد نیاز در پلیت، برای شمارش استفاده از سوسپانسیون اولیه و یا رقت های مورد نیاز در لوله های حاوی محیط کشت مناسب برای جستجو	روش شمارش و جستجوی باکتری ها	۷

منبع / استانداردها	اجراکننده		مدت آموزش (ساعت)		محتوای آموزشی	رئوس مطالب	ردیف
	کارآموز	مدرس	عملی	تئوری			
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره‌های: ۳۸۴۲ و ۶۳۰۷	*	*		۰/۵	گرمخانه‌گذاری در دما و زمان مناسب بر حسب باکتری‌های مورد نظر	گرمخانه‌گذاری	۸
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره‌های: ۳۸۴۲ و ۶۳۰۷	*	*	۱	۱	بررسی و نحوه شمارش و محاسبه کلنی‌ها پس از گرمخانه‌گذاری - تعیین وجود یا عدم وجود باکتری‌ها	تشخیص، شمارش کلنی‌ها و آزمون تاییدی	۹
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹	*	*	۰/۵	۰/۵	نحوه گزارش نتایج بررسی شده	ارائه گزارش آزمون	۱۰

مدت دوره کارآموزی: دو روز

سایر استانداردها و منابع:

- ۱- استاندارد ملی ایران شماره ۱۹۴۶۰، نوشیدنی مالت - آیین کار تولید
 - ۲- استاندارد ملی ایران شماره ۳۶۹۰، آئین کار بهداشتی واحدهای تولید کننده نوشابه گازدار
- ۱۲- Brackett R.E., Splittstoesser D.F, *Fruit and Vegetables in compendium of methods for the microbiological examination of foods*, third edition ., USA : APHA, ۲۰۰۵, p۵۱۵ - ۵۱۸

نحوه برگزاری آزمون:

تئوری	عملی
*	*

جزوه دوره کارآموزی میکروبیولوژی نوشیدنی گازدار مالت و نوشابه‌های گازدار

تهیه کننده / تهیه کنندگان:

شهپر مقدمی

گروه پژوهشی / آزمایشگاه:

گروه پژوهشی میکروبیولوژی نوشیدنی گازدار مالت و نوشابه‌های گازدار
به سفارش دفتر آموزش و ترویج استاندارد

منابع و مآخذ:

- ۱- استاندارد ملی ایران شماره ۶۳۰۷، نوشیدنی گازدار مالت - ویژگی‌ها و روش‌های آزمون میکروبیولوژی
- ۲- استاندارد ملی ایران شماره ۳۸۴۵، نوشابه‌های گازدار - ویژگی‌ها و روش‌های آزمون میکروبیولوژی
- ۳- استاندارد ملی ایران شماره ۶۶۹۳، نوشابه‌های ورزشی و انرژی‌زا-ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- ۴- استاندارد ملی ایران شماره ۸۹۲۳-۱، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -آماده سازی آزمایش-سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی-قسمت اول -مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری
- ۵- استاندارد ملی ایران شماره ۸۹۲۳-۴، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-آماده سازی آزمایش، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون میکروبی- قسمت ۴-مقررات ویژه برای آماده سازی فرآورده‌ها به‌جز شیر، گوشت، ماهی و فرآورده‌های آنها
- ۶- استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- راهنمای الزامات کلی برای آزمون
- ۷- استاندارد ملی ایران شماره ۸۶۶۳، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - راهنمای آماده سازی و ساخت محیط‌های کشت
- ۸- استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۸۹۹-۱، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جامع برای شمارش کپک‌ها و مخمرها - قسمت اول - روش شمارش کلنی در فرآورده‌های با فعالیت آبی بیشتر از ۰/۹۵ "

- ۹- استاندارد ملی ایران شماره ۲-۱۰۸۹۹، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جامع برای شماره کپک‌ها و مخمرها - قسمت دوم - روش شمارش کلنی در فرآورده های با فعالیت آبی مساوی یا کمتر از ۰/۹۵
- ۱۰- استاندارد ملی ایران شماره ۲۰۸۳۴، میکروبیولوژی زنجیره مواد غذایی - روش های نمونه برداری برای آزمون های میکروب شناسی
- ۱۱- یگانه، مهرداد. استاندارد و استاندارد کردن، چاپ اول، موسسه دانش پارسیان، ۱۳۸۹.
- ۱۲- Brackett R.E., Splittstoesser D.F, Fruit and Vegetables in compendium of methods for - the microbiological examination of foods, third edition ., USA : APHA, ۲۰۰۵,

فهرست

صفحه	عنوان
ب	آشنایی با سازمان ملی استاندارد
ج	پیشگفتار
د	محتوای دوره کارآموزی
ز	جزوه دوره کارآموزی
ی	مقدمه
۱	۱ هدف
۱	۲ استانداردهای ملی ایران
۲	۳ اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی
۲۸	۴ نمونه برداری
۲۹	۵ روش آزمون میکروبیولوژی نوشیدنی گازدار مالت و نوشابه‌های گازدار
۳۰	۶ محیط‌های کشت و رقیق‌کننده‌ها
۳۰	۷ روش اجرای آزمون
۴۰	۸ بیان نتایج
۴۱	پیوست الف- انواع استاندارد
۴۳	پیوست ب - مفاهیم مورد استفاده در کنترل
۴۴	پیوست پ (اطلاعاتی)
۴۷	پیوست ت- نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌های میکروبیولوژی نوشیدنی گازدار مالت و نوشابه‌های گازدار طبق استاندارد ملی ایران شماره‌های ۳۸۴۵ و ۶۳۰۷

مقدمه:

نوشابه‌گازدار، نوشیدنی‌های گازدار غیر الکلی دارای آب آشامیدنی، انواع کربوهیدرات‌ها مانند: گلوکز، فروکتوز، مالتودکسترین و یا ترکیبی از آنها، گاز کربنیک، افزودنی‌های خوراکی عوامل اسیدی کننده (سیتریک و اسید فسفریک)، رنگ، امولسیفایر^۱، طعم دهنده‌های طبیعی یا مصنوعی و نگهدارنده‌ها (اسیدهای سوربیک^۲ و بنزوئیک^۳ و نمک‌های آنها) می‌باشد. نوشابه‌های ورزشی علاوه بر ترکیبات نوشابه‌های گازدار، دارای الکتrolیت‌ها (شامل: سدیم، پتاسیم، فسفر، کلر)، اسیدهای آمینه، کافئین، گلیسرول، ستیرات‌ها، ویتامین‌ها، طعم دهنده‌های مجاز خوراکی و انواع اسانس‌ها می‌باشد. شواهدی قوی حاکی از وجود خطرات بهداشتی مرتبط با مصرف بیش از حد، برخی از رنگ‌های مصنوعی، نگهدارنده‌ها و شیرین کننده‌ها وجود دارد.

شن کننده‌های مایع (ساکارز و فروکتوز) می‌تواند یک منبع غذایی برای مخمرها، کپک‌ها، کپک-های مقاوم در برابر حرارت و مخمرهای اسموفیلیک^۴ باشد وجود اسیدهای خوراکی pH پائین در اینگونه فرآورده‌ها، رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌ها خصوصاً انواع بیماری‌زا و هاگ‌دار را محدود می‌کند. به‌علاوه گاز کربنیک موجود نیز با کم کردن فشار اکسیژن رشد کپک‌ها را کاهش می‌دهد.

باکتری‌های مزوفیل و مخمرها نیز در صورتی که به‌تعداد کافی در فرآورده وجود داشته باشند می‌توانند نسبت به محیط نوشابه سازگاری حاصل کرده و در آن تکثیر شوند. رشد آنها در فرآورده معمولاً با ایجاد رسوب و کدورت، تولید گاز و تغییرات طعم و رنگ و بو همراه است.

بیشترین عامل فساد نوشیدنی‌ها مخمر می‌باشد مخمرها می‌تواند در pH اسیدی و بدون اکسیژن رشد و تکثیر یابند. مهمترین مخمرهای عامل فساد که می‌توانند غلظت بالای از مواد نگهدارنده و شرایط کربناته را تحمل کنند، مانند:

مخمر برتانومایسس، شیزوساکرومایسس پومبی، زیگوساکرومایسس بیلی^۵، ساکرومایسس^۶ و گونه‌های برتانومایسس^۷، مخمر رودوتورولا موسیلاژینوزا^۸، رودوتورولا مینوتا^۹، رودوتورولا

۱-Emulsifying

۲- Sorbic

۳- Benzoic

۴- Osmophilic

۵- *Zygosaccharomyces bailii*

۶- *Saccharomyces*

۷- *Brettanomyces*

۸- *Rhodotorula mucilaginosa*

۹- *Rhodotorula minuta*

گلوکوتینیس^۱، رودوتورولا روبرا، تورولوپسیس هولمیای^۲، پیکیا پاسستوریس^۳، پیکیا متانولیکا^۴، می‌باشند.

کپک‌های دارای آسکواسپور مقاوم به حرارت، مانند: کپک بایسوکلامیس نیو^۵ بایسوکلامیس فولو^۶ با تولید آسکوسپورهای مقاوم به حرارت، در طی پاستوریزاسیون زنده می‌ماند و یکی از عوامل اصلی فساد قارچی است. آسپرژیلوس اورایز^۷، آسپرژیلوس فلاووس^۸، آسپرژیلوس ترئوس^۹، آسپرژیلوس نئوسارتوریا^{۱۰}، آسپرژیلوس تالارومیسیس^{۱۱}، آسپرژیلوس فومیگاتوس^{۱۲}، آسپرژیلوس پارازیتیکوس^{۱۳} توانایی رشد در شرایط بسیار پایین اکسیژن را نیز دارند معمولاً رشد به صورت کرکی، توده‌های پنبه‌ای سفید در مایع به حالت تعلیق شده، مشاهده می‌شود.
مهمترین جنس‌هایی که در فساد مواد غذایی دخالت دارند عبارتند از:

آسپرژیلوس^{۱۴}، رایزوپوس^{۱۵}، موکور^{۱۶}، پنی سیلیوم^{۱۷}، کلادیوسپوریم^{۱۸}، فوزاریوم^{۱۹}، آلترناریا^{۲۰}، بوتریتیس^{۲۱} است.

باکتری‌های مقاوم به اسید

میکروارگانیزم‌های اسیددوست و باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) مانند لاکتو باسیلوس^{۲۲}، لاکونوستوک^{۲۳}، استوباکتر^{۲۴} و گلوکونوباکتر^{۲۵} نیز می‌تواند در نوشابه‌های غیر الکلی دارای آب میوه و مواد مغذی کافی

-
- ۱- *Rhodotorula glutinis*
 - ۲- *Torulopsis holmii*
 - ۳- *Pichia pastoris*
 - ۴- *Hansenula (Pichia methanolica)*
 - ۵- *Byssochlamys nivea*
 - ۶- *Byssochlamys fulva*
 - ۷- *Aspergillus oryzae*
 - ۸- *Aspergillus flavus*
 - ۹- *Aspergillus. terreus, A. clavatus,*
 - ۱۰- *Aspergillus Neosartorya*
 - ۱۱- *Aspergillus Talaromyces*
 - ۱۲- *Aspergillus fumigatus*
 - ۱۳- *Aspergillus parasiticus*
 - ۱۴- *Aspergillus*
 - ۱۵- *Rhizopus*
 - ۱۶- *Mucor*
 - ۱۷- *Penicillium*
 - ۱۸- *Cladosporium*
 - ۱۹- *Fusarium*
 - ۲۰- *Alternariat*
 - ۲۱- *Botrytis*
 - ۲۲- *Lactobacillus*
 - ۲۳- *Leuconostoc*
 - ۲۴- *Acetobacter*
 - ۲۵- *Gluconobacter*

حضور یابند. این باکتری‌ها مقاوم به اسید بنزوئیک و اسید سوربیک هستند. و در شرایط مساعد عامل فساد نوشابه‌ها می‌باشند. باکتری‌های اسید استیک^۱ (AAB) گروهی از باکتری‌های گرم منفی هستند که از تخمیر، اسید استیک تولید می‌کنند دارای ۱۰ جنس در خانواده/ستوباکتریاسه^۲ هستند باکتری‌های اسید استیک در نوشابه‌های غیر الکلی نسبت به باکتری‌های اسید لاکتیک کمتر رایج هستند زیرا آنها به شدت هوازی هستند. در (۳-۸) pH رشد می‌کنند و استالدئید و یا کتون‌ها را تولید می‌کنند بسیاری از (AAB) به مواد نگهدارنده مانند: بنزوات، سوربیت‌ها و دی‌متیل دی‌ان‌ای کربنات مقاوم هستند. معمولاً در موارد نقص در بسته بندی فرآورده و افزایش اکسیژن محلول می‌توانند سبب فساد آب میوه‌ها شوند. رشد آنها در نوشیدنی‌ها می‌تواند موجب تغییرات طعم، تورم بسته، کدورت و یا تولید رسوب شود. بسیاری از گونه‌ها در سطوح خط تولید یا مواد بسته‌بندی بیوفیلم تولید می‌کنند. باکتری‌های اسید لاکتیک نسبت به حرارت پاستوریزاسیون حساس هستند. منابع آلودگی نوشابه‌های گازدار عبارتند از: مواد اولیه آلوده مانند: آب و شکر، شستشوی ناقص و غیر کافی ظروف و تجهیزات، بسته‌بندی ناقص و در مجموع عدم توجه به بهداشت فردی و عدم رعایت شرایط ساخت خوب^۳ است. لذا بررسی میکروبیولوژی انواع نوشیدنی‌های گازدار به لحاظ حفظ کیفیت آن دارای اهمیت است. در نوشابه‌های گازدار که دارای مواد مغذی کمتری می‌باشند مانند سودا^۴ رشد میکروارگانیسم‌ها بسیار محدودتر است.

در نوشابه‌های ورزشی^۵ و نوشابه‌های انرژی‌زا^۶ علاوه بر قند بالا (چهار برابر نوشابه‌های معمولی) میزان سدیم و پتاسیم نیز بالا است. محرک‌های کافئین و گوارانا، برخی ویتامین‌های گروه B و مواد معدنی، از دیگر ترکیبات نوشابه‌های ورزشی و نوشابه‌های انرژی‌زا است. لذا در شرایط غیر بهداشتی رشد میکروارگانیسم‌ها می‌تواند بسیار گسترده‌تر باشد.

۱- Acetic acid bacteria (AAB)

۲- *Acetobacteraceae*

۳- Good Manufacturing Practice (GMP)

۴- Soda

۵- Sport drink

۶- Energy drink

جزوه دوره کارآموزی میکروبیولوژی نوشیدنی گازدار مالت و نوشابه‌های گازدار

۱ هدف

هدف از تدوین این جزوه آموزشی کارآموزی آشنایی با روش‌های آزمون میکروبیولوژی نوشیدنی گازدار مالت و نوشابه‌های گازدار، بر اساس استانداردهای ملی ایران شماره‌های ۶۳۰۷، ۳۸۴۵ می‌باشد.

یادآوری ۱- توصیه می‌شود کارآموزان این دوره با الزامات آزمایشگاهی میکروبیولوژی و نیز استانداردهای ملی ایران شماره ۹۸۹۹ آشنایی داشته باشند.

یادآوری ۲- به‌منظور رعایت نکات ایمنی و سلامت کارکنان آزمایشگاه، توصیه می‌شود آزمون‌ها توسط افراد با تجربه، متخصص و آموزش دیده در خصوص 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 نوشیدنی گازدار مالت و نوشابه‌های گازدار، به شرح جدول ۱ می‌باشند.

جدول ۱- فهرست استانداردهای میکروبیولوژی نوشیدنی گازدار مالت و نوشابه‌های گازدار

ردیف	عنوان استاندارد	شماره استاندارد
۱	نوشابه‌های گازدار ویژگی‌ها و روش‌های آزمون میکروبیولوژی	۳۸۴۵
۲	نوشابه گازدار مالت - ویژگی‌ها و روش‌های آزمون میکروبیولوژی	۶۳۰۷
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	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام و آب - آماده سازی، ساخت، ذخیره سازی و آزمون عملکرد محیط‌های کشت	۸۶۶۳
۵	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - آماده سازی آزمایشگاه - سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی - قسمت اول - مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری.	۸۹۲۳-۱
۶	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - آماده سازی آزمایشگاه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون میکروبیولوژی - قسمت چهارم - مقررات ویژه برای آماده سازی محصولاتی به‌غیر از شیر، گوشت، ماهی و فرآورده‌های آن.	۸۹۲۳-۴
۷	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - راهنمای الزامات کلی برای آزمون	۹۸۹۹
۸	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش شمارش کپک‌ها و مخمرها - قسمت اول: روش شمارش کپک‌ها و مخمرها - روش شمارش کلنی در فرآورده‌های با فعالیت آبی (aw) مساوی یا بیشتر از ۰/۹۵	۱۰۸۹۹-۱

۳ اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

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

۳-۱ فضای آزمایشگاه

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

۳-۱-۱ فضای مربوط به نمونه و آزمون

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

- دریافت و انبارش نمونه‌ها.
- آماده‌سازی نمونه‌ها خصوصاً برای مواد خام (مانند : فرآورده‌های پودری حاوی تعداد زیاد میکروارگانیسم‌ها).
- آزمون نمونه‌ها (از سوسپانسیون اولیه) شامل گرمخانه‌گذاری میکروارگانیسم‌ها.
- آزمون میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای احتمالی.
- نگهداری سوبه مرجع و سایر سوبه‌ها.
- آماده‌سازی و سترون‌سازی محیط‌های کشت و وسایل.
- انبارش محیط‌های کشت و واکنشگرها.
- آزمون سترونی مواد غذایی.
- آلودگی زدایی.
- شستشو و تمیز کردن وسایل شیشه‌ای و سایر تجهیزات.
- انبارش مواد شیمیایی مخاطره آمیز، ترجیحاً نگهداری در کابینت‌ها، قفسه‌ها، اتاق‌ها.

۳-۱-۲ فضای عمومی

فضاهای جداگانه برای موارد زیر توصیه می شود:

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

۲-۳ بهداشت کارکنان

به منظور پیشگیری از آلودگی نمونه‌ها، محیط‌های کشت و خطر عفونت کارکنان اقدامات بهداشتی زیر باید انجام شود:

- استفاده از لباس و کفش مخصوص در محیط آزمایشگاه
- ناخن‌ها را تمیز و ترجیحاً کوتاه نگهداشتن
- هنگام کار در آزمایشگاه از صحبت کردن خودداری شود.
- از خوردن و آشامیدن در آزمایشگاه خودداری شود.
- کشیدن پیپت با دهان ممنوع می‌باشد.

۳-۳ وسایل و تجهیزات

توصیه می‌شود مطابق با شرایط خوب آزمایشگاهی، کلیه وسایل و تجهیزات تمیز و در محل مناسب نگهداری شوند.

پیش از استفاده بهتر است وسایل از نظر داشتن شرایط لازم برای کار تصدیق شوند و در صورت لزوم در طی استفاده، عملکرد آن پایش شود.

از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ و همچنین وسایل زیر استفاده شود:

جدول ۲- فهرست تجهیزات مورد نیاز برای آزمون میکروبیولوژی

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

ترازوی آزمایشگاهی

دستگاهی است که برای توزین اجسام یا مایعات، با دقت بالا و حساسیت بالا به کار می‌رود آزمایشگاه‌ها با توجه به نیازشان از ترازوهای با دقت ۰/۱ g، ۰/۰۱ g، ۰/۰۰۱ g، ۰/۰۰۰۱ g و ۰/۰۰۰۰۱ g

استفاده می‌کنند. ترازوهای آزمایشگاهی دقت ۱ mg و دقت بالاتر آن نیاز به محفظه دارند چون به علت حساسیت بالای آن‌ها در توزین جریان هوا نیز روی توزین این ترازوها تاثیر می‌گذارد. تمام دستگاه‌های توزین باید به‌طور دوره‌ای کالیبره^۱ شوند. کالیبره کردن باید در مدت زمان‌های معینی انجام شود، گاهی لازم است چند بار در سال یا گاهی بر اساس ضرورت یک یا دو بار در ماه، انجام گیرد. برای کالیبره کردن ترازوی دیجیتال نیاز به یک سنگ کالیبره استاندارد وجود دارد که معمولاً بر اساس ظرفیت ترازو دیجیتال انتخاب می‌شود. نحوه کالیبره کردن در تمام ترازوهای دیجیتالی یکسان است و فقط سنگ کالیبره متفاوت است کالیبراسیون باید طبق دستورالعمل سازنده با وزنه‌های استاندارد انجام گیرد با این روش، ارزیابی‌ها دقیق‌تر و قابل اطمینان هستند و درصد خطا بسیار کم است برای تجهیزات کالیبره شده گواهی کالیبراسیون صادر شده و ضمیمه دستگاه می‌گردد.



شکل ۱- ترازوی آزمایشگاهی

حمام مایع^۲ (بن ماری^۲) بادمای ثابت

این وسیله برای انجام تست‌های سرولوژیک، آگلوتیناسیون، بیوشیمی، تست‌های دارویی، در دمای تثبیت شده کار برد دارد. برای جلوگیری از رسوب املاح بر روی المنت دستگاه از آب مقطر استفاده شود اگر چه در تعداد معدودی از آن‌ها از روغن نیز استفاده می‌شود. داغ شدن بیش از حد المنت‌ها، به علت کم آبی بن ماری، موجب آسیب رساندن به دستگاه می‌شود، باید به حداقل حجم آب مورد نیاز جهت حفظ کارکرد مطلوب دستگاه توجه گردد. نگهداری محیط کشت جامد سترون ذوب شده، گرمخانه‌گذاری محیط کشت تلقیح شده در یک دمای ثابت، کاربرد اصلی این دستگاه می‌باشد.

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

۲- Water bath

۳- Bain marie



شکل ۲- انواع حمام مایع با دمای ثابت

شمارشگر کلنی^۱

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



شکل ۳- شمارشگر

اتوکلاو^۲

اتوکلاو برای استریل کردن ابزار پزشکی و آزمایشگاهی در فشار و دمای بالا و با استفاده از بخار آب کار برد دارد این دستگاه قادر است بخار آب اشباع شده با حرارت 121°C را ایجاد کند این درجه حرارت در شرایط بخار ایجاد شده می‌تواند موجب تخریب ساختمان میکروب‌ها و اسپور آنها شده و تقریباً باعث نابودی تمام میکروارگانیسم‌های شناخته شده شود. بر اساس استاندارد در دمای 121°C ابزارآلات باید حداقل به مدت زمان ۱۵ min تحت فرآیند استریلیزاسیون قرار گیرند کل مدت زمان کار دستگاه اتوکلاو از فشار دادن دکمه (شروع کار)^۳ تا پایان کار سیستم، مجموع سه زمان (زمان اولیه)^۴، (زمان استریلیزاسیون)^۵ و (زمان خشک شدن)^۶ است. بررسی دما و زمان اتوکلاو با اندیکاتورهای شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی انجام می‌شود.

۱- Colony counter

۲- Autoclave

۳- Start

۴- Preheating Time

۵- Sterilization Time

۶- Drying Time



شکل ۴- اتوکلاو و تعدادی از اندیکاتورهای شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی

اندیکاتورهای شیمیایی : به صورت نوارهای اتوکلاو (چسب اتو کلاو) TST^۱ که سه عامل زمان، بخار و دما را کنترل می کند.

یا بسته های پزشکی هستند که وقتی به دمای معینی رسیدند، تغییر رنگ می دهند.

اندیکاتور بیولوژی : شامل اسپور باکتری های مقاوم به حرارت، مانند ژئوباسیلوس استئروترموفیلوس^۲ است.

اندیکاتور فیزیکی : از آلیاژهایی تشکیل شده اند که در دمای مورد نظر ذوب می شوند.

میکروسکوپ^۳

میکروسکوپ یکی از وسایل آزمایشگاهی اصلی در آزمایشگاه زیست شناسی است. از دو واژه یونانی میکرو به معنی کوچک و سکوپ، به معنی دیدن، گرفته شده است. اصول کلی در تمامی انواع میکروسکوپ ها بر اساس عبور نور با طول موج های متفاوت از چندین عدسی محدب می باشد که هرچقدر طول موج نور به کار رفته در میکروسکوپ مزبور کوتاه تر باشد قدرت تفکیک و یا جداکنندگی آن میکروسکوپ بیشتر است. میکروسکوپ ها به طور کلی به دو دسته میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی تقسیم می شوند. میکروسکوپ های نوری به منظور سنجش و مشاهده سلول ها با بزرگنمایی نسبتاً کم و میکروسکوپ های الکترونی برای مشاهده سلول ها و ساختارهای سلولی با بزرگنمایی بسیار زیاد مورد استفاده قرار می گیرند. سه تعریف مهم در کاربرد میکروسکوپ وجود دارد.

۱- Time, Steam, Temperature

۲- *Geobacillus stearothermophilus*

۳- Microscopes



شکل ۵- میکروسکوپ نوری

- **بزرگنمایی:** به نسبت اندازه تصویر نمونه، به اندازه واقعی آن گفته می‌شود. در همه میکروسکوپ‌ها از عدسی‌ها برای بزرگنمایی تصویر استفاده می‌شود.
- **قدرت تفکیک:** توانایی تشخیص بین دو شیء نزدیک به هم به صورت دو شیء متمایز و شده بستگی دارد. با کاهش طول موج، قدرت تفکیک افزایش می‌یابد.
- **کنتراست:** به تفاوت بین بخش‌های مختلف یک نمونه می‌گویند مثلاً یک اندامک تیره‌تر از اندامک دیگر دیده شود. انواع مختلفی از میکروسکوپ‌ها شامل: استریو میکروسکوپ^۱ میکروسکوپ اینورت^۲، میکروسکوپ فلورسنت^۳، میکروسکوپ دوچشمی^۴ می‌باشند

انکوباتور^۵ (اتو)

انکوباتور شامل اتاقک عایق بندی شده است که برای کشت و رشد دادن نمونه‌های زنده مانند: سلول‌ها یا میکروب‌ها به کار می‌رود. این دستگاه دارای قابلیت نگهداری دمایی ثابت و توزیعی یکنواخت دما با حداکثر خطای مجاز در مقدار نوسانات دمایی تعیین شده در روش‌های آزمون است. که درجه حرارت مناسب رشد، تکثیر و تشکیل کلنی را فراهم می‌کند. در انواع انکوباتورهای آزمایشگاهی (معمولی، شیکردار، یخچالدار، و مجهز به سیستم تزریق CO₂) در آزمایشگاه‌های میکرو بیولوژی و بیولوژی سلولی کاربرد اساسی دارد.

۱ - دارای بزرگنمایی ۵۰ برابر و قابلیت نصب دوربین می‌باشد و در بررسی اجزا و موجوداتی که دارای بعد و حجم می‌باشند.
 ۲ - این دستگاه دارای قابلیت فاز کنتراست و نصب دوربین عکاسی و فیلمبرداری می‌باشد و در بررسی نحوه حرکت، تولید مثل، شناسایی، شمارش زئو و فیتو پلانکتون‌ها و سایر میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌گردد.
 ۳ - جهت بررسی و مشاهده اجزا و اندامک‌هایی از سلول و میکروارگانیسم‌هایی که با رنگ فلورسنت رنگ آمیزی شده باشند، استفاده می‌گردد. این دستگاه دارای قابلیت عکس برداری از نمونه‌ها و ثبت اطلاعات نیز می‌باشد.
 ۴ - این دستگاه میکروسکوپ دوچشمی نوری است دارای عدسی‌های ۵، 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.



شکل ۶- انکوباتور (اتو)

فور^۱ یا آون

فور یا آون دستگاهی است که قابلیت تنظیم در دما 300°C را دارد و برای استریل یا خشک کردن وسایل شیشه‌ای و یا فلزی که در محیط‌های آزمایشگاهی کاربرد دارند. عمل استریل و خشک کردن وسایل فلزی تمیز شده بر اساس استاندارد در دمای $(170 \pm 10)^{\circ}\text{C}$ (از زمان رسیدن به دمای 70°C) به وسیله حرارت خشک به مدت زمان حداقل ۱h انجام می‌شود. با بالا بردن تدریجی دمای داخل آون، رطوبت موجود در وسایل شیشه‌ای تبخیر و در نتیجه سبب حذف هر نوع فعالیت زیستی خواهد شد. پیش از سترون‌سازی، همه وسایل فلزی و شیشه‌ای را تمیز کرده، سپس در آون قرار دهید. پس از سترون‌سازی، به‌منظور پیشگیری از شکستن وسایل شیشه‌ای بهتر است پیش از خارج کردن از آون، آن‌ها را خنک کنید.

توصیه می‌شود:

- از قرار دادن مواد قابل اشتعال و آتش‌زا در داخل و اطراف آون دوری شود.
- از قرار دادن محلول‌های اسیدی و یا ایجاد بخارات خورنده در درون آون جلوگیری شود. این کار سبب از بین رفتن سطح درونی آون خواهد شد.
- به دلیل عایق بودن دستگاه، چند ساعت طول می‌کشد تا اشیاء داخل دستگاه آون خنک شود، مگر آن که مجهز به فن باشد. پس از سترون‌سازی، به‌منظور پیشگیری از شکستن وسایل شیشه‌ای درب آون را باز نکنید تا اتاقک، ظروف و مواد داخل آن تا دمای حدود 60°C خنک شوند. اگر هوای سرد ناگهان وارد دستگاه شود ممکن است ظروف شیشه‌ای ترک بخورند.
- کنترل کیفیت و عملکرد دستگاه آون الزامی است. و با آزمون شیمیایی و آزمون بیولوژیک انجام می‌شود.

آزمون شیمیایی: استفاده از ویال شیشه‌ای Browne و مشاهده تغییر رنگ مناسب از قرمز به سبز. از این ویال در هر سری کاری استفاده می‌شود.

۱- Oven

آزمون بیولوژیک: استفاده از نوار کاغذی دارای اسپور باسیلوس سوبتیلیس^۱، واریته نایجر ATCC ۹۳۷۲ و یا اسپور باسیلوس آتروفئوس^۲ به طور هفتگی توصیه می‌شود.



شکل ۷- فور یا آون

pH متر^۳

وسیله‌ای الکترونیکی است که جهت سنجش میزان pH (میزان اسیدی یا بازی بودن ماده) به کار می‌رود. (اندازه گیری غلظت یون هیدروژن H⁺ را با استفاده از الکتروود حساس به یون H⁺) این ابزار دارای الکترودهای خاصی است که با قرار دادن در محلول، عدد pH را روی صفحه نمایشگر خود نمایش می‌دهد. این دستگاه متشکل از دو بخش اصلی یعنی میله کاوشگر^۴ و اندازه‌گیر^۵ است. میله کاوشگر pH محلول را تبدیل به سیگنال الکتریکی کرده و اندازه‌گیر آن را تحلیل و میزان pH را نمایش می‌دهد. انتهای کاوشگر از غشاء شیشه‌ای و حباب مانند است که نسبت به یون‌ها حساس می‌باشد و رأس الکتروود داخلی در داخل آن قرار دارد. بخش داخلی و بیرونی محفظه حاوی KCl و HCl یک دهم مولار (محلول رفرانس) است. قبل از شروع کار با pH متر ابتدا باید مطمئن شوید که میله کاوشگر در محلول نگهدارنده یا محلول با pH = ۴ نگهداری شده است. در غیر این صورت ممکن است pH متر در تعیین pH محلول مورد مطالعه دچار خطا شود. لذا میله کاوشگر را به مدت زمان ۲ h در آب مقطر نگهداری کنید و سپس آن را در محلول نگهدارنده قرار دهید. کاوشگر را به وسیله آب مقطر بشویید. برای تنظیم^۶ pH متر، الکتروود را در محلول pH=۷ قرار داده، حداقل ۳۰ sec زمان بدهید تا عدد ثابتی را نشان دهد. سپس آن را روی عدد ۷ تنظیم کنید (pH متر عدد ۷ را نشان دهد) دوباره الکتروود را با آب مقطر بشویید و آن را در محلول pH=۷ قرار دهید. اجازه دهید اندازه گیر عدد ثابتی را نشان دهد. آن را روی عدد ۴ تنظیم کنید (pH متر عدد ۴ را نشان دهد). حالا pH متر شما تنظیم شده و آماده اندازه گیری pH محلول‌های مورد آزمایش است. قبل از قرار دادن اندازه گیر در محلول مورد آزمایش آن را دوباره با آب مقطر بشویید.

۱- *Bacillus subtilis*

۲- *Bacillus atrophaeus*

۳- pH meter

۴- probe

۵- meter

۶- calibration



شکل ۸- pH متر

وسایل و ظروف شیشه‌ای آزمایشگاهی

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



شکل ۹- وسایل و ظروف شیشه‌ای آزمایشگاهی

تجهیزات کشت در شرایط اتمسفری تغییر یافته

تجهیزات کشت در شرایط اتمسفری تغییر یافته ممکن است یک جار غیر قابل نفوذ یا هر وسیله مناسب دیگری باشد که قادر به ایجاد و حفظ شرایط اتمسفری تغییر یافته (مانند: شرایط بی‌هوایی) در طی مدت گرمخانه گذاری محیط کشت، باشد.

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



شکل ۱۰- تجهیزات کشت در شرایط اتمسفری تغییر یافته

۳-۴ استریلیزاسیون

استریلیزاسیون یا سترون‌سازی به معنای از بین بردن تمامی اشکال زنده در یا روی یک محیط آماده است. این اشکال مختلف شامل سلول‌های زنده باکتری‌ها و اسپور قارچ‌ها و... می‌باشد. روش‌های رایج سترون کردن عبارتند از:

- **روش حرارتی** : در آزمایشگاه میکروبیولوژی برای استریلیزاسیون محیط‌های کشت و وسایل مورد نیاز روش حرارتی به دو صورت خشک (با استفاده از فور) و مرطوب (با استفاده از اتوکلاو) از تاثیر گرما و فشار بخار آب برای کشتن میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود. برای تشخیص بین مواد سترون شده و سترون نشده می‌توان از نشانگرهای سترون‌سازی استفاده کرد. نشانگرهای بیولوژیک به صورت مختلف نواری، ویال یا آمپول کوچک موجود هستند. عملکرد سترون‌سازی را می‌توان با استفاده از اندیکاتورهای شیمیایی و اندیکاتورهای بیولوژیک ارزیابی کرد. در پایش بیولوژیک، از اسپورهای *باسیلوس سوبتیلیس*^۱ و *باسیلوس استئاروترموفیلس*^۲ استفاده می‌شود.
- **روش شیمیایی** : به وسیله مواد ضد عفونی کننده مانند: آب اکسیژنه و انجام واکنش‌های شیمیایی (مانند: رادیکال‌های آزاد) برای سترون کردن استفاده می‌شود.
- **روش پرتودهی** : به وسیله تابش پرتوهای ایکس و گاما نیز می‌توان برای سترون کردن مواد بیولوژیک، داروها، گاز، باند، نخ‌های کات گوت و لوازم یک‌بار مصرف استفاده کرد.
- **روش فیلتراسیون** : معمولاً برای سترون‌سازی مایعات استفاده می‌شود و شامل عبور دادن مایع از فیلترهای مخصوص می‌باشد.

۳-۵ محیط کشت

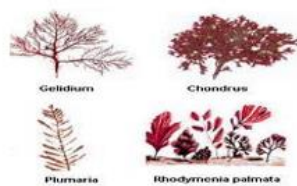
کشت و تکثیر باکتری‌ها در محیط‌های مصنوعی از مهمترین روش‌های تشخیصی در باکتری شناسی است. برای کشت موفق باید شرایط مناسب برای رشد باکتری فراهم گردد. از جمله این شرایط مواد غذایی و مغذی، حرارت، رطوبت کافی، مواد آلی و معدنی pH مناسب، حضور یا عدم حضور اکسیژن می‌باشد. بیشتر محیط‌های کشت که در پلیت مصرف می‌شوند، محیط‌های کشت عمومی هستند که اساساً برای تهیه مواد غذایی لازم جهت رشد باکتری ساخته شده‌اند. بعضی مواقع این محیط‌های کشت عمومی را با اضافه کردن اجزای مغذی که موجب افزایش سریع رشد ارگانیسم‌های سخت رشد می‌شوند، غنی می‌کنند. ماهیت این مواد مغذی چنان است که نمی‌توان آنها را همراه با محیط اصلی سترون کرد، بلکه باید بعد از اتوکلاو شدن محیط بطور سترون این مواد اضافه شوند. نمونه‌هایی از این مواد مغذی عبارتند از: شیر بدون چربی، خون گوسفند، زرده تخم مرغ و

۱- *Bacillus subtilis*

۲- *Bacillus. Stearothermophilus*

۳-۵-۱ اجزای تشکیل دهنده محیط کشت

محیط کشت فرمولاسیونی است از مواد، به صورت مایع، نیمه جامد یا جامد، که دارای اجزای تشکیل دهنده خاص بوده و به منظور تکثیر میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. آگار به عنوان عامل سفت کننده در محیط کشت‌های جامد و نیمه جامد کار برد دارد. آگار ترکیبی است پلی ساکاریدی که از دیواره سلولی برخی از گونه‌های جلبک^۱ قرمز (از جنس گراسیلاریا^۲ و جیلیدیوم^۳) استخراج میشود. آگار برای میکروارگانیسم‌ها ارزش غذایی ندارد و هیچ میکروارگانیسمی نمی‌تواند آنرا هضم کند. نقطه ذوب آن ۹۵ °C و با رسیدن دمای آن به حدود ۴۳ °C شبکه ای ایجاد می‌کند که سبب جامد شدن محیط می‌شود. محیط‌های کشت جامد معمولاً دارای ۱۵ g/L- ۱۳ g/L آگار هستند.



شکل ۱۱- گونه های از جلبک دریایی جنس جیلیدیوم

- تمام محیط کشت‌ها باید دارای مواد غذایی ضروری برای رشد میکروب‌ها باشند .
 - pH محیط کشت باید در حد معین قبل از استفاده برای کشت تنظیم شود.
 - ظروف مورد استفاده برای تهیه محیط‌های کشت باید کاملاً تمیز و عاری از مواد خارجی باشند
 - آب مقطر مورد استفاده باید صحیح تهیه شود .
 - درجه حرارت استریل کردن محیط کشت، باید متناسب با نوع مواد مغذی محیط کشت در نظر گرفته شود. درجه‌های بالا باعث از بین رفتن برخی از مواد شیمیایی موجود در محیط کشت می‌شوند.
- محیط‌های کشت و معرف‌های مورد استفاده در آزمون باید مناسب برای اهداف آزمون‌های میکروبیولوژی و دارای کیفیت آزمایشگاهی بوده، همچنین باید عاری از مواد سمی یا مهارکننده میکروارگانیسم‌های آزمون باشند. برای بهبود تکثیرپذیری توصیه می‌شود محیط کشت‌های تجارتي مورد استفاده قرار گیرد. چنانچه محیط‌های کشت به صورت آماده در بازار در دسترس باشند، آنها را مطابق با دستورالعمل سازنده تهیه کنید. برای هر محیط کشت و معرف، بهتر است یک محدودیت زمانی برای استفاده تعیین شود. برای کنترل عملکرد و تضمین کیفیت محیط‌های کشت به استاندارد ملی ایران شماره ۸۶۶۳ مراجعه کنید.

۱- Algae

۲- Gracilari

۳- Gelidium

۳-۵-۲ آب

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

۳-۵-۳ ویژگی محیط کشت

- تمام محیط کشت‌ها باید دارای مواد غذایی ضروری برای رشد میکروب‌ها باشند .
- pH محیط کشت باید در حد معین قبل از استفاده برای کشت تنظیم شود.
- ظروف مورد استفاده برای تهیه محیط‌های کشت باید کاملاً تمیز و عاری از مواد خارجی باشند
- درجه حرارت استریل کردن محیط کشت، باید متناسب با نوع مواد مغذی محیط کشت در نظر گرفته شود. درجه‌های بالا باعث از بین رفتن برخی از مواد شیمیایی موجود در محیط کشت می‌شوند.

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

۳-۵-۴ طبقه بندی محیط کشت

محیط کشت را از جنبه‌های مختلف طبقه بندی می‌کنند:

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

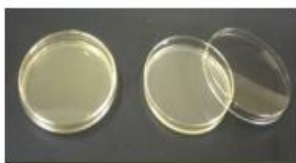
۳-۵-۴-۲ طبقه بندی محیط کشت بر اساس قوام فیزیکی

۳-۵-۴-۳-۱ محیط کشت جامد^۱

محیط های جامد به‌علت دارا بودن آگار در ترکیب خود به‌صورت جامد بوده و متناسب با میکروارگانیسم‌ها و آزمایش‌های مورد نظر می‌توان آنها را در لوله، ظروف پتری (پلیت) و یا ظروف دیگر مورد استفاده قرار داد

۱- Solid media

تشکیل کلنی، تولید پیگمانت، خصوصیات خاص هر کلنی، تشخیص انواع باکتری‌ها، دیدن منطقه همولیز، دلیل به‌کارگیری محیط جامد است .



شکل ۱۲- محیط کشت آکاردار

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

الف کشت‌های عمقی^۱

با این روش می‌توان میکروارگانیسم را بطور خطی توسط فیلدوپلاتین نوک حلقه‌ای (لوپ) در سطح محیط جامد کشت داد.

ب کشت در داخل محیط جامد^۲

به‌لوله‌های آزمایش محتوی محیط کشت جامد پس از ذوب شدن که تا 45°C سرد شده است. باکتری مورد نظر را تلقیح کرده و لوله را بین دست‌ها تکان می‌دهند تا باکتری‌ها کاملاً با محیط کشت مخلوط شوند، سپس لوله آزمایش را به‌طور عمودی قرار می‌دهند تا محیط بسته شود.

پ کشت شیب دار^۳

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



شکل ۱۳- محیط کشت شیب‌دار

۳-۲-۴-۵-۲ محیط کشت نیمه جامد^۴

محیط‌های نیمه جامد نیز وجود دارد. که میزان آگار آن نسبت به محیط‌های جامد کمتر است ($0.5-0.2\%$ درصد). مانند: "SIM" این نوع محیط‌های کشت برای مشاهده حرکت باکتری‌ها استفاده

-
- ۱- Stab Cultures
 - ۲- Shake Cultures
 - ۳- Slant media
 - ۴- Semi Solid media

می‌شود. به محیط کشت جامد ریخته شده در لوله یا بطری کوچک، که هنگام جامد شدن، به حالت شیبدار نگهداری می‌شوند "اسلنت" گفته می‌شود چنانچه محیط کشت در ته ظروف ریخته شود به آن "بات" گفته می‌شود.



شکل ۱۴- محیط کشت نیمه جامد

۳-۲-۴-۵-۳ محیط کشت مایع یا آبگوشتی^۱

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

یادآوری ۱- در بعضی موارد ذرات جامد به محیط کشت مایع اضافه می‌شود، مانند محیط کشت "کوکد میت"

یادآوری ۲- محیط کشت مایع در لوله‌ها، ارلن‌ها، یا بطری‌ها به طور معمول "براث" نامیده می‌شوند.

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

۱-۳-۴-۵-۳ محیط کشت انتقالی^۲

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

۲-۳-۴-۵-۳ محیط کشت نگهداری کننده^۴

محیط کشتی است که به منظور نگهداری و حفظ قابلیت زیستی میکروارگانیسم‌ها در یک دوره زمانی طولانی طراحی شده، تا از آنها در برابر اثرات نامطلوبی که ممکن است در طی ذخیره‌سازی طولانی مدت به وجود آید محافظت کرده و پس از این مدت، به آنها قدرت بازیابی دهد.

مانند: "محیط کشت دورستاگ"^۵، اسلپ‌های "نوترینت آگار"^۶

۱- Liquid or broth media

۲- Transport medium

۳- Stuart or amies transport medium

۴- Preservation medium

۵- Dorset agar medium

۶- Nutrient medium

۳-۵-۴-۳ محیط کشت بازیابی^۱

محیط کشتی است که به میکروارگانیسم‌های آسیب دیده و تحت تنش امکان ترمیم و بازیابی می‌دهد تا رشد طبیعی را به دست آورند، ولی لزوماً باعث تکثیر آنها نمی‌شوند.

مانند " آب پپتونه بافری"^۲

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

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

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

۳-۵-۴-۱ محیط کشت غنی کننده انتخابی^۵

محیط کشت غنی کننده‌ای است که به میکروارگانیسم‌های خاص امکان رشد می‌دهد و به‌واسطه یک ماده مهار کننده، رشد تمام میکروارگانیسم‌ها بجز میکروارگانیسم مورد نظر را کاملاً یا تا حدودی مهار می‌کند. مانند: محیط کشت "پیتون سوی راپاپورت- واسیلادیس"^۶

۳-۵-۴-۲ محیط کشت غنی کننده غیر انتخابی^۷

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

۳-۵-۴-۳ محیط کشت جداکننده^۸

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

۳-۵-۴-۴ محیط کشت جداکننده انتخابی^۹

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

۳-۵-۴-۵ محیط کشت جداکننده غیر انتخابی^{۱۰}

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

-
- ۱- Resuscitation medium
 - ۲- Buffered peptone water
 - ۳- Pre- enrichment medium
 - ۴- Enrichment medium
 - ۵- Selective enrichment medium
 - ۶- Rappaport-Vassiliadis (RV)
 - ۷- Non- selective enrichment medium
 - ۸- Selective isolation medium
 - ۹- Selective enrichment medium
 - ۱۰- Non-selective isolation medium

۳-۵-۴-۳-۶ محیط کشت انتخابی کروموژنیک^۱ / فلوروژنیک^۲

محیط کشت کروموژنیک / فلوروژنیک دارای ترکیبات انتخابی است که همه یا بخشی از فلور همراه با میکروارگانیسم های هدف در نمونه را مهار می کند و منجر به تقویت رد یابی دقیق می شود مانند: "TBX آگار"، "MUG/EC"

۳-۵-۴-۳-۷ محیط کشت افتراقی^۳

محیط کشتی است که مشخصات و خصوصیت فیزیولوژیک یا بیوشیمیایی میکروارگانیسم ها را به منظور شناسایی فراهم می کند. مانند: "ترجیتول^۷" و "TTC، TBX"

۳-۵-۴-۳-۸ محیط کشت شناسایی^۴

محیط کشت با قدرت تشخیصی بالا برای ایجاد یک واکنش تشخیصی خاص که نیاز به استفاده از محیط کشت های تاییدی ندارد. مانند "بایل اسکولین آزاید^۵"

۳-۵-۴-۳-۹ محیط کشت شمارش^۶

محیط کشت انتخابی یا غیر انتخابی که برای شمارش میکروارگانیسم ها به کار می رود. مانند: "برد پارکر^۷" "یست اکسترکت آگار^۸"

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

۳-۵-۴-۳-۱۰ محیط کشت تاییدی^۹

محیط کشتی است که برای شناسایی یا تعیین هویت مشخصات میکروارگانیسم ها پس از یک مرحله بازیابی مقدماتی و/با غنی سازی و/یا جداسازی، بکار گرفته می شود مانند: "کلینگر آبرون آگار^{۱۰}"

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

محیط کشت انتقالی، محیط کشت رقیق کننده یا محیط کشت دارای ترکیبات خنثی کننده ای است که برای غیرفعال کردن عوامل در سطح و/یا ضد عفونی کننده یا سایر عوامل میکروبی کش به کار می رود.

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

-
- ۱- Chromogenic selective culture medium
 - ۲- Fluorogenic selective culture medium
 - ۳- Differential medium
 - ۴- Identification medium
 - ۵- Bile Esculin Azide Agar (Enterococcus Selective Agar)
 - ۶- Enumeration medium
 - ۷- Baird-Parker Agar
 - ۸- Yeast Extract Agar
 - ۹- Confirmation medium
 - ۱۰- Kligler Iron Agar (KIA)
 - ۱۱- Medium containing neutralisers

محیط کشتی است که در دسته بندی‌های متعدد قرار می‌گیرد. مانند: "بلاد آگار"^۱ که یک محیط بازیابی است، می‌تواند به‌عنوان محیط کشت جداکننده و همچنین محیط کشت افتراقی برای رد یابی همولیز بکار رود. و یا "بافر پپتون واتر" که یک رقیق کننده است می‌تواند یک محیط کشت پیش‌غنی کننده نیز باشد.

۳-۵-۴-۳-۴-۱۳ محیط کشت مرجع

محیط کشت غیر انتخابی مانند: "تریپتون سوی آگار"^۲ که برای ارزیابی مقایسه‌ای کنترل عملکرد محیط کشت به‌کار می‌رود.

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

۳-۵-۴-۴-۱-۴-۱ محیط کشت آماده مصرف

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

۳-۵-۴-۴-۲-۴-۲ محیط کشت کامل شده

محیط کشتی است که برای تلقیح آماده باشد.

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

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

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

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

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

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

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

۳-۶-۳ آماده سازی و استریلیزاسیون محیط‌های کشت در آزمایشگاه

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

۱- Blood agar

۲- Tryptic Soy Agar(TSA)

با رعایت دستور العمل تولید کننده، و با توجه به نشانه 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 به حجم برسانید. آلودگی میکروبی آب از cfu 10^2 در هر میلی لیتر بیشتر نباشد و طبق استاندارد ملی ایران شماره ۵۲۷۱ پایش شود.

هدایت الکتریکی^۱ آب استفاده شده برای تهیه محیط کشت نباید بیشتر از ۲۵ میکروزیمنس^۲ باشد و طبق استاندارد ملی ایران شماره ۸۰۹۷ پایش شود.

۳-۶-۲ pH

pH محیط کشت را با استفاده از pH متر اندازه گیری کنید در صورت لزوم، قبل از سترون سازی تنظیم شود، به این ترتیب که pH محیط کشت پس از سترون سازی و رسیدن دما به $25^{\circ}C$ ، باید در محدوده مورد نظر ± 0.2 واحد اندازه گیری باشد، مگر اینکه مقادیر دیگری توصیه شده باشد. pH معمولاً با استفاده از محلول سدیم هیدروکسید با غلظت تقریبی: $40g/l$ یا هیدروکلریک اسید انجام می‌شود. اگر تنظیم pH پس از سترون سازی انجام شود، باید از محلول‌های سترون استفاده شود.

۳-۶-۳ توزیع

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

۳-۶-۴ سترون سازی

محیط‌های کشت تهیه شده را در روز آماده سازی سترون کنید. سترون سازی محیط‌های کشت و معرف‌ها معمولاً با استفاده از حرارت مرطوب با استفاده از اتوکلاو یا فیلتراسیون انجام می‌شود. بعضی از محیط‌های کشت به سترون سازی با اتوکلاو نیاز ندارند، ولی می‌توان آنها را با دمای جوش سترون نمود. برای مثال: محیط‌های کشت آنتروباکتریاسه‌ها که حاوی برلیانت گرین بوده و بخصوص به حرارت و نور حساس هستند و بهتر است به سرعت پس از جوشیدن سرد شده و در برابر نور شدید محافظت شوند. همچنین، بعضی از معرف‌ها را نیز می‌توان بدون سترون سازی مورد استفاده قرار داد. در همه موارد طبق دستورالعمل‌های تولیدکننده یا استانداردهای مناسب انجام دهید. پس از سترون کردن، محیط‌ها را در شرایطی که از تغییر ترکیبات جلوگیری کند، نگهداری کنید برای مثال: از نور و خشک شدن محافظت کنید. اگر محیط کشت

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 $\mu Siemens/cm$ نشان داده می‌شود.

بلافاصله استفاده نشود یا شرایط دیگری در استاندارد خاصی مشخص نشده باشد، در یخچال در دمای 3°C $\pm 5^{\circ}\text{C}$ نگهداری کنید. اگر محیط‌های کشت در یخچال نگهداری شود معمولاً توصیه می‌شود مدت زمان نگهداری برای پلیت‌ها از دو تا چهار هفته و برای بطری‌های بسته شده و لوله‌ها سه تا شش ماه بیشتر نشود. برای ذوب مجدد، محیط‌های کشت را به‌وسیله قرار دادن آن در حمام آب جوش و یا هر فرآیند دیگری که همان نتیجه را دهد، ذوب کنید (مانند: قرار دادن در بخار اتوکلاو) محیط کشت ذوب شده، در حمام آب گرم با دمای تنظیم شده، با دمای 47°C تا 50°C ، خنک کنید.

۳-۶-۵ افزودن مکمل‌ها

مکمل‌هایی که حساس به حرارت هستند، باید بعد از اینکه دمای محیط به کمتر از 50°C رسید، به محیط اضافه شوند. مکمل سترون شده باید قبل از افزودن به محیط آگاردار مای اتاق برسد. افزودن مکمل‌های مایع سرد ممکن است سبب بسته شدن آگار یا تشکیل پرک‌های شفاف شود و از توزیع مناسب جلوگیری کند. مکمل‌ها را در محیط کشت به آرامی و کامل مخلوط کرده و به سرعت در ظروف نهایی تقسیم کنید. در هر صورت طبق دستورالعمل تولیدکننده عمل کنید.

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

محیط کشت آگاردار ذوب شده را در پلیت دیش‌ها بریزید تا حداقل ضخامت آن 3 mm گردد. برای مثال: در ظروف با قطر 20 mm ، معمولاً $(18\text{ تا }20)\text{ mL}$ محیط کشت آگاردار کافی است یا مقداری که در استانداردهای مربوطه بیان شده است. اگر پلیت‌ها باید نگهداری شوند، یا زمان گرمخانه‌گذاری آنها بیش از 72 h به طول می‌انجامد، یا دمای گرمخانه‌گذاری بیش از 40°C است، محیط کشت بیشتری ممکن است در پلیت دیش‌ها ریخته شود. پلیت‌ها را به صورت در بسته روی یک سطح افقی و خنک قرار دهید تا آگار سرد شده و ببندد.

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

شرایط نگهداری، تاریخ انقضاء و توصیه‌های دیگر مربوط به محیط کشت و پلیت‌های آگاردار آماده شده تجارتي بهتر است طبق دستورالعمل تولیدکننده باشد.

۳-۷ آماده سازی نمونه

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

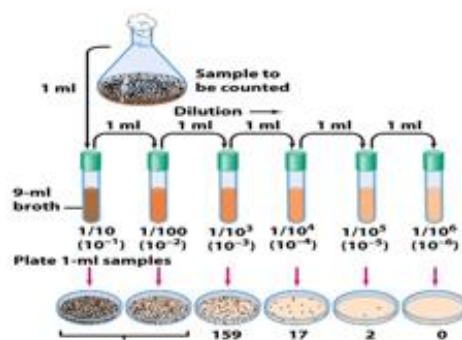
برای آزمون شمارش، رقت‌های دهدهی را با رعایت شرایط اسپتیک تهیه کنید.

یادآوری- برای تهیه سوسپانسیون فرآورده‌های اسیدی، pH را نزدیک خنثی و برابر با 7.0 ± 0.5 تنظیم کنید.

از آب‌پتونه بافری و برای بیشتر فرآورده‌های با pH بیشتر یا برابر $4/5$ استفاده کنید. برای فرآورده‌های اسیدی‌تر (بیشتر یا برابر $3/5$) می‌توان pH را با استفاده از آب پتونه بافری با غلظت دو برابر تنظیم کرد، چنانچه این

فرآورده‌ها برای اولین با آزمون می‌شوند بهتر است pH آنها بررسی شود تا اطمینان حاصل شود که به دامنه مورد نظر رسیده‌اند.

برای رقت‌های ۱۰ برابر، ۹mL یا ۹۰mL از محلول‌های رقیق کننده را به ارلن یا لوله‌های سترون اضافه کنید با انتقال یک حجم نمونه به ۹ حجم محلول رقیق کننده، رقت‌های ۱۰ برابر را تهیه کنید. سوسپانسیون اولیه را کاملاً مخلوط کنید. برای تهیه رقت‌های دهدهی بعدی، ۱mL از سوسپانسیون اولیه را، با استفاده از پی‌پت سترون به ۹mL محلول رقیق کننده سترون که دمای مناسبی دارند، منتقل کنید. و با استفاده از یک همزن مکانیکی به مدت زمان ۵sec تا ۳sec مخلوط کنید. رقت بدست آمده 10^{-2} می‌باشد.



شکل ۱۵- سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها اعشاری بعدی

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

۳-۷-۱ روش‌های کشت در میکروبیولوژی

کشت در پلیت به سه روش قابل انجام است.

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

۳-۷-۱-۱ کشت سطحی

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

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

همچنین در غذاهای خشک شده، غذاهای یخ‌زده و منجمد، که ممکن است دارای میکروارگانیسم‌های حساس به گرما باشند یا فرآورده‌هایی که دارای باکتری‌های هوازی اجباری هستند که احتمال دارد قسمت معنی داری از فلور کل را تشکیل دهند (مانند: گونه‌های سودو مونا^۳) و فرآورده‌هایی که داری ذرات کوچکی هستند که تشخیص آنها از کلنی‌های تشکیل شده در کشت آمیخته به‌سختی انجام می‌شود، همچنین فرآورده‌هایی که رنگ شدید آنها باعث جلوگیری از تشخیص کلنی در کشت آمیخته می‌شود، فرآورده‌هایی که برای تشخیص بین انواع مختلف کلنی به‌عنوان قسمتی از ارزیابی کمیت غذا مورد نیاز است و بالاخره برای کشت 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 پلیت‌هایی با قطر ۹۰mm تا ۱۰۰mm، حجم آزمونه و یا رقتی از آن باید بین ۰/۱ mL تا ۰/۵ mL باشد. رقت را باید به‌گونه‌ای انتخاب کرد که در آن تعداد مورد انتظار کلنی‌های تشکیل شده بین ۱۰ تا ۱۵۰ کلنی تیپیک باشد. تعداد کل کلنی‌های تیپیک و غیر تیپیک روی پلیت باید کمتر از ۲۰۰ کلنی باشد.

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

پلیت‌های دارای حدود ۱۵ml محیط کشت را آماده و نشانه گذاری کنید و در صورت لزوم سطح محیط کشت پیش از استفاده خشک می‌شود. معمولاً ۰/۱ mL از آزمایه (فرآورده‌های مایع) و یا ۰/۱ mL از سو سپازسیون اولیه (سایر فرآورده‌ها) در سطح محیط جامد از پیش ریخته تلقیح شده و توسط میله پخش کننده یا وسایل مکانیکی سترون روی سطح پخش می‌شود. و بعد از جذب ماده تلقیحی، پلیت‌ها 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 به نکات زیر مهم است.

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

۱- Heat-sensitive organisms

۲- Psychrotrophic

۳- Pseudomonas spp.

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

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

ت- چنانچه برای خشک شدن کردن پلیت‌ها از اتاقک با جریان هوای لایه‌ای^۱ استفاده نمی‌کنید، برای پیشگیری از آلودگی پلیت‌ها، سطح محیط کشت را پایین قرار دهید.

ث- در عمل پلیت‌ها را با قرار دادن در دمای تا ۲۵ °C تا ۵۰ °C به گونه‌ای که سطح آگار پلیت‌ها به طرف پایین باشد و در پلیت نیمه باز باشد، خشک می‌شود.

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



شکل ۱۶- کشت سطحی

۳-۷-۱-۲ کشت آمیخته یا پورپلیت

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

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

^۱-Laminsr-flow safety cabinet

محیط کشت مورد استفاده را در حمام آب جوش ذوب کنید از سایر فرآیندهای مناسب مانند: قرار دادن در جریان بخار آزاد اتوکلاو و یا ماکروویو و سایر فرآیندهای مناسب که ترکیب دما و زمان آن برای آماده سازی محیط کشت، صحه گذاری شده است نیز می‌توانید استفاده کنید از حرارت دادن زیاد محیط کشت خودداری کنید و آن را به محض ذوب شدن از حمام خارج کنید و محیط کشت ذوب شده را در حمام آب با دمای 45°C قرار داده تا دمای آن به 45°C برسد پس از تهیه و آماده سازی پلیت‌ها و دقت‌های لازم، آزمون را کاملاً مخلوط و در پلیت‌ها تقسیم کنید.

یادآوری ۱- محیط‌های کشت را برای مدت زمان بیشتر از ۴ h به صورت ذوب شده نگه داری نکنید

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



شکل ۱۷- کشت پورپلیت

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

به‌طور کلی برای ۱ mL تا ۲ mL آزمون مقدار ۱۵ mL تا ۲۰ mL محیط کشت سترون که حرارت آن به حدود 45°C رسیده، استفاده می‌شود. برای حجم‌های بیشتر آزمون، مقدار محیط کشت را بر همین اساس تنظیم کنید. سپس با حرکات دورانی به صورت ۸ کاملاً مخلوط می‌شود. و تا سرد شدن، روی سطح افقی قرار گرفته و محیط جامد می‌شود. پس از جامد شدن آگار، پلیت‌ها بدون تاخیر در گرمخانه قرار می‌گیرد.

۳-۷-۱-۲-۱- کشت‌های دو لایه

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

۳-۱-۷-۳ کشت خطی

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



شکل ۱۸- کشت خطی

۳-۸-۱ رنگ آمیزی

۳-۸-۱-۱ رنگ آمیزی گرم

۳-۸-۱-۱-۱ تهیه گسترش روی لام:

ابتدا از نمونه باکتری یک گسترش روی لام تهیه شود.

۳-۸-۱-۲ رنگ آمیزی با کریستال ویوله:

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

۳-۸-۱-۳ مرحله شستشو:

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

۳-۸-۱-۴ مرحله اضافه کردن محلول ید:

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

۱- Iodine

۳-۸-۱-۵ مرحله شستشو:

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

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

در حالی که لام را با زاویه ۴۵ درجه نگهدارید بعد با استفاده از محلول رنگ بر الکل - استن به سرعت آن را بی رنگ کنید. دقت کنید مرحله بی رنگ سازی بیش از اندازه نباشد. بعد از آن لام را به سرعت بشوئید. این عمل، بی رنگ شدن را متوقف خواهد کرد.

۳-۸-۱-۷ رنگ آمیزی با محلول سافرانین:

در این مرحله سطح لام را با محلول سافرانین را با رنگ ثانویه یعنی سافرانین، به مدت ۱۰ sec بپوشانید سپس رنگ اضافی را خالی کرده و با آب مقطر لام را شستشو دهید.

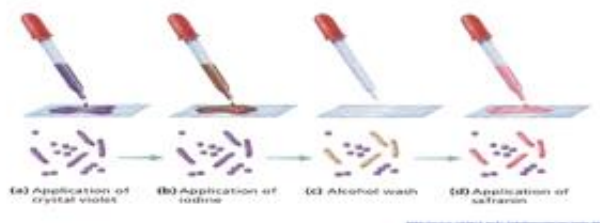
۳-۸-۱-۸ خشک کردن لام:

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

۳-۸-۱-۹ مشاهده و تفسیر

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

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



شکل ۱۹- مراحل روش رنگ آمیزی

یادآوری نکات مهم:

حرارت بیش از اندازه هنگام تثبیت گسترش باعث پاره شدن دیواره سلولی باکتری شده بنابراین باکتری گرم مثبت رنگ اولیه (کریستال ویوله) را هنگام رنگ بری از دست می‌دهد و رنگ ثانویه را جذب می‌کند و در نتیجه باکتری گرم مثبت، به صورت گرم منفی دیده می‌شود.

- اگر گسترش ضخیم باشد هنگام مرحله بی رنگ شدن، ممکن است مانند یک گسترش معمولی رنگ نشود و این مسئله باعث خطا در تشخیص شما در گرم منفی یا مثبت بودن باکتری خواهد شد.
- غلظت درست و تازه بودن رنگ‌ها هم در رنگ آمیزی موثر است .

- 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 باید h ۲۴ یا کمتر باشد. بنابر این در محیط کشت‌هایی که از عمر آنها گذشته و کهنه شده‌اند، در قابلیت نفوذ دیواره سلولی باکتری‌ها تغییراتی حاصل می‌شود که خاصیت گرم مثبت بودن را از دست می‌دهد.

۳-۸-۲ رنگ آمیزی شفر- بولتون

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

۳-۸-۱ تهیه گسترش روی لام:

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

۳-۸-۲ رنگ آمیزی با مالاشیت گرین

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

۳-۸-۳ مرحله شستشو:

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

۳-۸-۴ رنگ آمیزی با سافرانین:

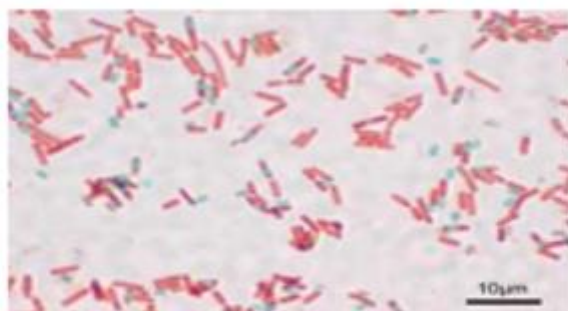
سطح گسترش میکروبی را با رنگ سافرانین به‌مدت زمان ۱ min بیوشانید.

۳-۸-۲-۵ مرحله شستشو:

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

۳-۸-۲-۶ مشاهده و تفسیر:

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



شکل ۲۰- اسپور

چون هاگ پوشش مقاومی است که در برابر نفوذ رنگ مقاومت می‌کند بنابراین این در رنگ آمیزی 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 به صورت پراکنده باشند، اغلب توسط رنگ‌آمیزی ساده و یا گرم قابل مشاهده نخواهند بود.

۴ نمونه برداری

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

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

۵ روش‌های آزمون میکروبیولوژی نوشیدنی گازدار مالت و نوشابه‌های گازدار
روش‌های میکروبیولوژی نوشیدنی گازدار مالت و نوشابه‌های گازدار در جدول زیر آورده شده است:

جدول ۳- میکروبیولوژی نوشیدنی گازدار مالت و نوشابه‌های گازدار

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

۵-۱ اصول آزمون

الف- شمارش

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

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

ب- روش جستجو (روش کیفی)

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

ب-۱ اساس روش جستجو

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

ب-۱-۱ اولین مرحله: نمونه‌ها معمولاً در یک محیط آبگوشت غنی‌کننده منتقل می‌شوند. به این ترتیب، تعداد میکروارگانیسم‌ها، بدون خطر ممانعت از رشد و تکثیر بوسیله 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 به دست آمده روی سطح محیط کشت جامد برای انجام آزمون‌های تاییدی مناسب برای شناسایی استفاده می‌شوند.

۶ محیط‌های کشت و رقیق‌کننده‌ها

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

جدول ۴ - فهرست رقیق‌کننده‌ها و محیط‌های کشت

رقیق‌کننده‌ها و محیط‌های کشت	ردیف
Plate Count Agar (PCA)	۱
Orange Serum Agar (OSA)	۲
Dichloran-rose Bengal-Chloramphenicol-Agar (DRBC)	۳

۷ روش اجرای آزمون

۷-۱ آماده سازی آزمایه

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

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

یادآوری ۱- محتویات بطری در بسته را به‌ظرف استریل منتقل کنید. در آن را ببندید و به آرامی به‌صورت حرکت چرخشی مخلوط کنید. تا گاز آن خارج شود. از دستگاه شیکر نیز می‌توان استفاده کرد .

یادآوری ۲- برای اطلاعات بیشتر در باره تهیه فرآورده‌های اسیدی قبل از آزمون برای گروه‌های خاص میکروارگانیسم‌هایی مانند اسید دوست‌ها، به‌استاندارد ملی ایران ۴-۸۹۲۳ مراجعه کنید.

یادآوری ۳- برای باز کردن در ظروفی که دارای در آسان باز شو^۱ هستند، از قسمت دیگر آن (غیر از قسمت آسان باز شو) استفاده کنید.

یادآوری ۴- برای تهیه آزمون حدافل از دو بسته نمونه استفاده کنید.

یادآوری ۵- از عبور دادن ظروف باد کرده از روی شعله خودداری کنید.

یادآوری ۶- محتویات بطری در بسته را به‌وسیله تکان دادن و وارونه کردن آن به‌طور کامل مخلوط کنید.

۷-۲ کشت میکروبی

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

۷-۲-۱ گرمخانه گذاری

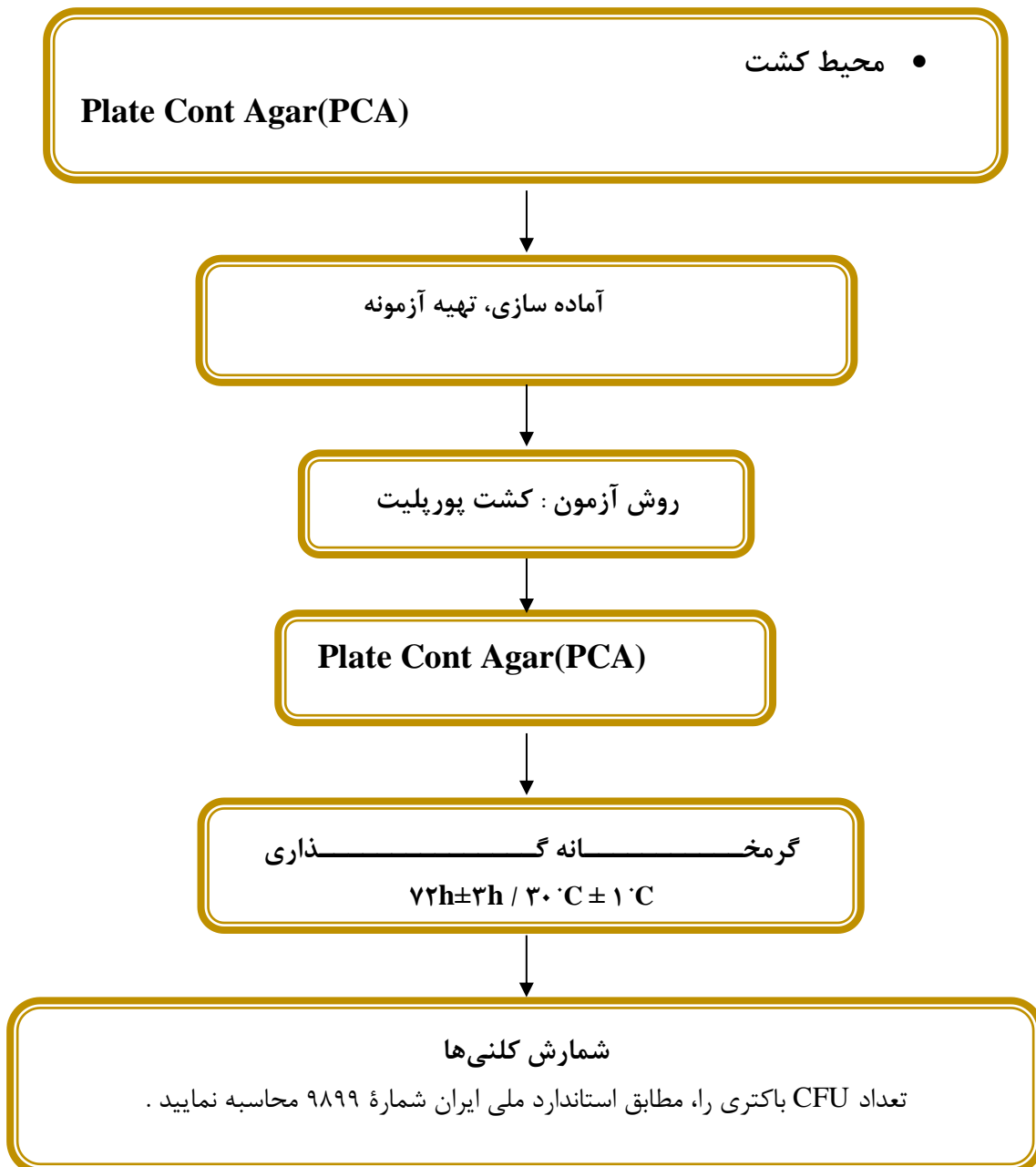
بسته به‌نوع میکروارگانیسم مورد بررسی دمای گرمخانه و مدت زمان گرمخانه گذاری متفاوت است که در ادامه، برای هر یک از میکروارگانیسم‌ها که در این فرآورده آزمون می‌شوند، نوشته شده است.

۱-Easy open

۳-۷ میکروارگانیسم‌های هوازی

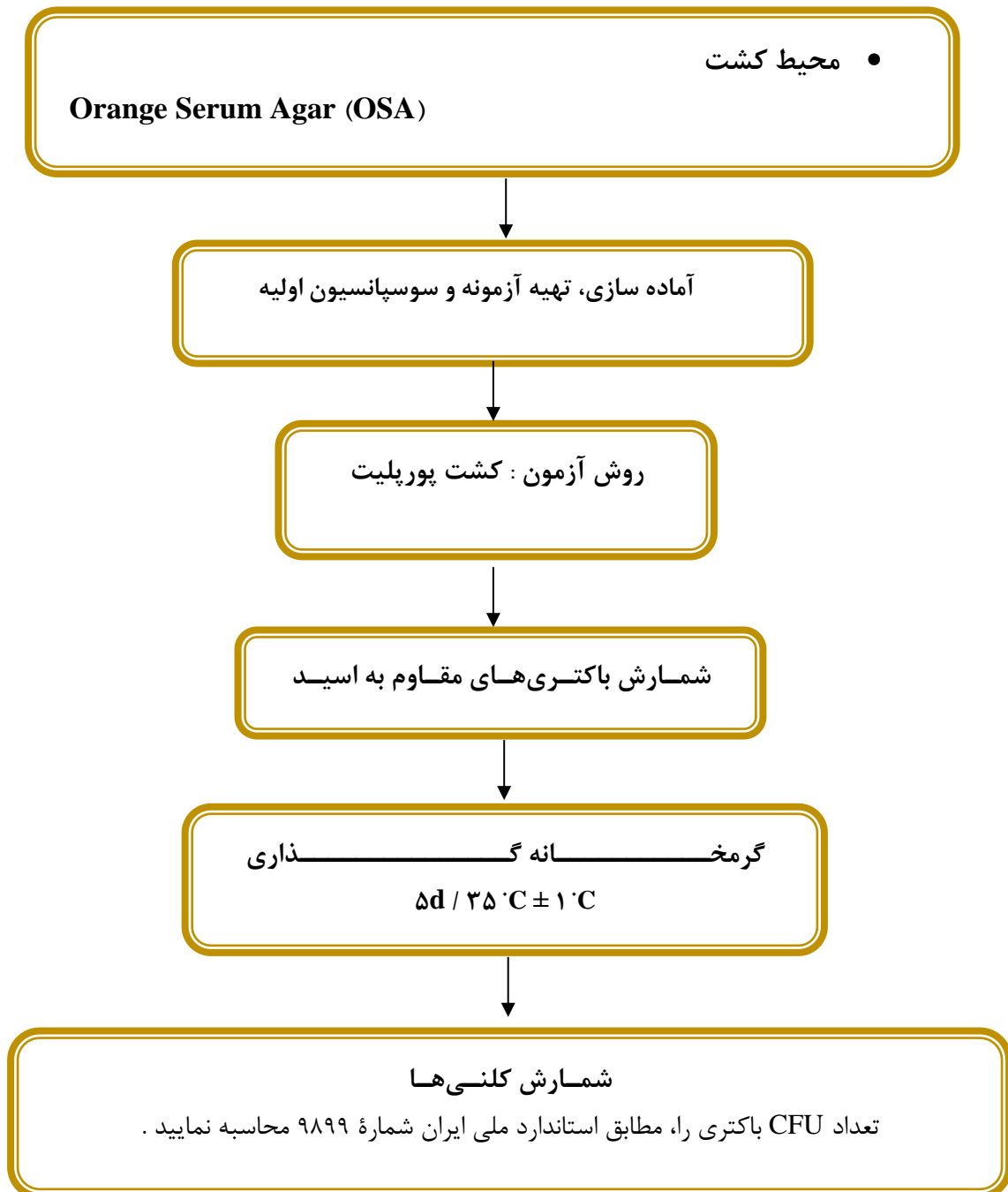
۱-۳-۷ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۵۲۷۲ میکروبیولوژی زنجیره غذایی - روش جامع برای شمارش میکروارگانیسم‌ها - قسمت ۱ - شمارش کلنی در ۳۰ درجه سلسیوس با استفاده از روش کشت آمیخته

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



۴-۷ باکتری های مقاوم به اسید

۱-۴-۷ استاندارد ملی ایران شماره ۳۸۴۵، ویژگی ها و روش های آزمون میکروبیولوژی نوشابه های گازدار تمامی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی، هوازی و کم هوازی که در محیط کشت با pH=۲ تا pH=۵، بعد از گرمخانه گذاری در دمای ۳۰ °C، قابلیت رشد و تکثیر داشته و در محیط کشت جامد مانند orange serum agar تشکیل کلنی می دهند.



۷-۵ قارچ‌ها^۱

قارچ‌ها یوکاریوت، هتروتروف، غیر فتوسنتتیک بوده و برای رشد و تکثیر به ترکیبات آلی و کربن نیاز دارند قارچ‌ها هوازای و یا بی‌هوازی اختیاری هستند. تولید مثل آنها به صورت جنسی یا غیر جنسی با تشکیل اسپور، جوانه زدن و تقسیم سلولی می‌باشد قارچ‌ها توانایی رشد در رطوبت کم و دمای پایین را دارند pH مناسب برای بیشتر گونه‌ها ۵/۶ و محدوده pH برای آنها بین ۲ تا ۹ است ساختار اغلب قارچ‌ها از رشته‌ها و یا ریشه‌های نخی شکل به نام هیف تشکیل شده است. در قارچ‌های پست، ریشه‌ها یا هیف‌ها فاقد دیواره عرضی هستند. انشعابات هیف‌ها یا ریشه‌ها شبکه‌ای به نام میسلیوم را به وجود می‌آورند. شبکه میسلیوم را می‌توان به صورت کپک بر روی مواد آلی مختلف مشاهده کرد. آنزیم‌هایی که توسط قارچ‌های مختلف به وجود می‌آیند می‌توانند انواع مواد آلی را تجزیه کرده و به مواد ساده‌تری تبدیل کنند. قارچ‌ها از لحاظ ساختار یاخته‌ای جزء یوکاریوت‌ها هستند، در اطراف هسته و دیگر اجزای یاخته غشای دو لایه وجود دارد. در اطراف یاخته، دیواره‌های یاخته‌ای حاوی کیتین قرار می‌گیرند. قارچ‌ها به کپک‌ها، مخمرها تقسیم می‌شوند. میزان رشد قارچ، سطح کلنی، رنگ کلنی^۲، وجود رنگدانه، مشاهده میکروسکوپی^۳ دارای ارزش تشخیصی است.

۷-۵-۱ کپک‌ها^۴

کپک‌ها، قارچ‌های رشته‌ای، هوازای هستند آنها چند سلولی، هتروتروف، هوازای، هستند. کپک‌ها تولید واحدهای میکروسکوپی بنام تال^۵ می‌کنند که با تجمع آنها، جرم رشته‌ای تشکیل می‌گردد که به آن میسلیوم گفته می‌شود. معمولاً به صورت کلنی^۶ یا جوانه^۷ صاف یا کرک‌دار، اغلب با ساختار اسپورزایی یا تولید مثل رنگی در سطح محیط‌های کشت قارچی رشد می‌کنند. بهترین رشد کپک‌ها در محیط اسیدی با غلظت بالای قند می‌باشد. کلنی‌های ایجاد شده توسط کپک‌ها، به رنگ‌های مختلف سفید، آبی، سبز، خاکستری، و بنفش می‌باشد کلنی ممکن است بصورت برجسته یا فرورفته، چین‌دار یا مسطح، خامه‌ای با قوام بسیار محکم باشند در پاره‌ای از موارد کلنی‌ها به صورت کرکی شکل یا پنبه‌ای شکل می‌باشند

۱- Fungi

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

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

۴- Mold

۵- Hypha(Tall)

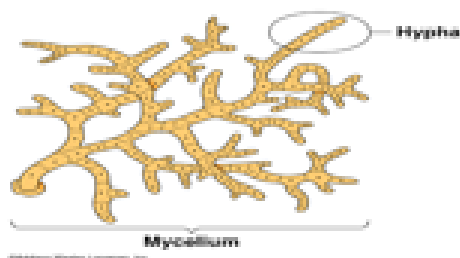
۶- به موجودات زنده مانند سلول رویشی، گروه سلول‌ها، اسپور، خوشه‌های اسپوریا قطعه‌ای از یک میسلیوم قارچی گفته می‌شود که قادر به رشد در محیط کشت مغذی می‌باشد.

۷- Germ

کپک‌ها علاوه بر سطح در عمق محیط کشت نیز می‌توانند کلنی‌های گرد عدسی شکل ایجاد کنند. طبقه بندی کپک‌ها بر اساس شکل ظاهری (مورفولوژی) و تشکیل یا عدم تشکیل اسپور جنسی استوار است. وقتی شرایط برای فعالیت آن‌ها نامساعد شود فوراً ایجاد اسپور می‌کنند، اسپورها در برابر خشکی و سرما مقاوم می‌باشند و در فضا پراکنده می‌شوند و با مساعد شدن شرایط به سرعت تبدیل به شکل فعال می‌گردند کپک‌ها با تجزیه مواد غذایی موجب فساد مواد غذایی می‌شوند. مهمترین کپک‌های مواد غذایی از دسته پنی‌سیلیوم^۱، موکور^۲، رایزوپوس^۳، فوزاریوم^۴ و آسپرژیلوس^۵ می‌باشند. گروهی از کپک‌ها دارای آگزوتوکسین^۶ هستند ترشح آگزوتوکسین کپک‌ها غالباً در حرارت بالاتر از ۱۰°C صورت می‌گیرد.

۷-۵-۲ مخمرها^۷

مخمرها یکی از گروه‌های قارچ‌های فاقد رشته هستند به همین دلیل تک سلولی می‌باشند و بوسیله جوانه زدن تکثیر پیدا می‌کنند مخمرها در کارخانجات تخمیر صنعتی، نانوازی، کارخانجات تقطیر به کار می‌روند این ارگانیزم تحت شرایط بی‌هوازی، قند را متابولیزه می‌کند و تولید الکل و به میزان کمی تولید سلول جدید می‌کند در شرایط هوازی تولید سلول بیشتری می‌کند و الکل تولید نمی‌شود کلنی‌های مخمرها خامه‌ای با قوام بسیار نرم است غالباً تک یاخته هستند و ایجاد میسلیم‌های کاذب می‌کنند. تولید مثل غیرجنسی آن‌ها اغلب بصورت جوانه زدن و در برخی به صورت تقسیم دوتائی می‌باشد. بیشتر گونه‌های آن تخمیرکننده و غیر بیماری‌زا هستند.



شکل ۲۱- هیف و میسلیم در مخمر

۱- Penicillium

۲- Mucor

۳- Rhizopus

۴- Fusarium

۵- Aspergillus

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

۷- Yeast

۳-۵-۷ شمارش کپک و مخمر

۱-۳-۵-۷ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۱۰۸۹۹، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جامع برای شمارش کپک‌ها و مخمرها - قسمت اول: روش شمارش کلنی در فرآورده‌های با فعالیت آبی (a_w)^۱ بیشتر از ۰/۹۵

محیط کشت

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

تهیه محیط کشت:

- **دی کلران رزبنگال کلرامفنیکل آگار**

محیط کشت دی کلران رزبنگال کلرامفنیکل آگار را طبق دستورالعمل سازنده آماده کنید. pH محیط را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون شدن، برابر 0.2 ± 0.6 شود. ۱۰ mL از محلول ۱٪ کلرامفنیکل در اتانل را به محیط پایه اضافه کنید و مخلوط کنید. محیط کشت را در اتوکلاو با دمای $121 \pm 1^\circ C$ به مدت زمان ۱۵ min دقیقه سترون نمایید و در مقادیر ۱۵ mL در پتری دیش توزیع کنید. به منظور پیشگیری از رشد بیش از حد کپک‌های خانواده موکوراسه روی سطح پلیت‌ها، افزودن ترجیتول به مقدار ۱ mL به ازاء هر ۱ L محیط کشت توصیه می‌شود.

- افزودن اختیاری عناصر کمیاب:

کپک‌ها برای نمایش خصوصیات کامل ریخت شناسی به ویژه رنگدانه‌های خود نیاز به عناصر کمیاب دارند که ممکن است در محیط DRBC موجود نباشد برای شناسایی کپک‌ها و مخمرها در این محیط کشت، محلول $SO_4 \cdot Zn, 7H_2O$ ۱٪ و $SO_4 \cdot Cu, 5H_2O$ ۰/۵٪ را به مقدار یک mL به ازاء هر ۱ L محیط کشت، پیش از سترون کردن به آن بیفزایید.

- افزودن اختیاری ترجیتول:

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

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

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

- افزودن اختیاری کلرو سیکلین هیدرو کلراید

برای جلوگیری از رشد بیش از حد باکتری‌ها، افزودن کلرامفنیکل و کلرو تتراسیکلین توصیه می‌شود. محیط پایه را با 50 mg/L تهیه کنید و در حجم‌های 100 mL توزیع و سترون کنید. محلول 0.1% کلرو تتراسیکلین هیدرو کلراید در آب مقطر را به صورت تازه تهیه کنید و توسط صافی غشایی سترون کنید. بلافاصله پیش از استفاده، 5 mL از این محلول را در شرایط سترون به 100 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. (1 mL به ازاء هر 1 L محیط کشت توصیه می‌شود.)

آزمون عملکرد برای تضمین کیفیت محیط کشت

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

آماده سازی، تهیه نمونه و سوسپانسیون اولیه و رقت

✓ به دلیل رسوب سریع اسپورها در پی‌پت، پس از پر کردن پی‌پت‌ها با سوسپانسیون اولیه یا رقت‌ها، آن را به صورت افقی نگه دارید. برای جلوگیری از رسوب ذرات دارای میکروارگانیسم، سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها را به هم بزنید.

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

روش آزمون کشت سطحی

تلقیح از رقت‌های مناسب روی سطح پلیت‌های از پیش ریخته

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

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

Dichloran-rose Bengal-Chloramphenicol-Agar(DRBC)

- ✓ پلیت‌ها را به صورت هوازی، با درپوش بالا و ایستاده در انکوباتور قرار دهید.
- در صورت لزوم، پلیت‌ها را برای مدت زمان یک تا دو روز در معرض نور غیر مستقیم روز قرار دهید .
- ✓ اگر احتمال حضور زیرومایسیسیپوروس^۱ وجود داشته باشد، پلیت‌ها را به مدت زمان ۱۰d گرمخانه‌گذاری کنید.
- ✓ تو صیه می شود که پلیت‌ها، در یک کیسه پلاستیکی در باز قرار داده شوند تا از انتشار کپک‌ها از داخل پلیت‌ها سبب آلودگی انکوباتور نشود.

گرمخانه‌گذاری

۳ d تا ۵d / ۵ °C ± ۰/۵ °C

۱- Xeromyces bisporus

- ✓ اسپورهای کپک‌ها به راحتی در هوا پخش می‌شوند لذا، پلیت‌ها را با احتیاط جابجا 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.

شمارش کلنی‌ها

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

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

روش آزمون

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

Dichloran-rose Bengal-Chloramphenicol-Agar(DRBC)

گرمخانه گذاری

۳ d تا ۵ d / ۲۵°C ± ۰/۵°C

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

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

• ویژگی‌های کلنی مخمرها

گرد
درخشان

معمولا دارای پیرامون منظم و با تحدب کم یا زیاد



شکل ۲۳- کلنی‌های مخمرها



شکل ۲۲- کلنی‌های کپک‌ها

شمارش کلنی‌ها

تعداد CFU قارچ‌ها را در هر میلی لیتر نمونه را، مطابق استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ محاسبه کنید.

۸ بیان نتیجه آزمون

۱-۸ شمارش

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

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

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

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

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

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

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

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

که در این فرمول‌ها،

۱- Arithmetic mean

۲- Weighted mean

m میانگین حسابی به دست آمده از دو پلیت ،
 V حجم ماده تلقیحی به هر پلیت، به میلی لیتر ،
 d ضریب رقت مربوط به رقت آماده شده برای تهیه سوسپانسیون اولیه یا برای اولین رقت مورد استفاده
 برای شمارش ،
 c تعداد کلنی های شمارش شده روی یک پلیت ،
 \bar{x}_c میانگین ارزیابی شده شمارش کلنی ها، از دو رقت متوالی می باشد و با استفاده از فرمول (۴) محاسبه
 می شود :

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

که در آن :

$\sum c$ مجموع کلنی های شمارش شده از تمام پلیت های حاصل از دو رقت متوالی می باشد،
 n_1 تعداد پلیت های شمارش شده برای سوسپانسیون اولیه (یا اولین رقت شمارش شده) می باشد،
 n_2 تعداد پلیت های شمارش شده برای رقت ۱ به ۱۰ از سوسپانسیون اولیه (یا دومین رقت شمارش شده)
 می باشد.
 نتیجه را تا دو رقم معنی دار گرد کنید.

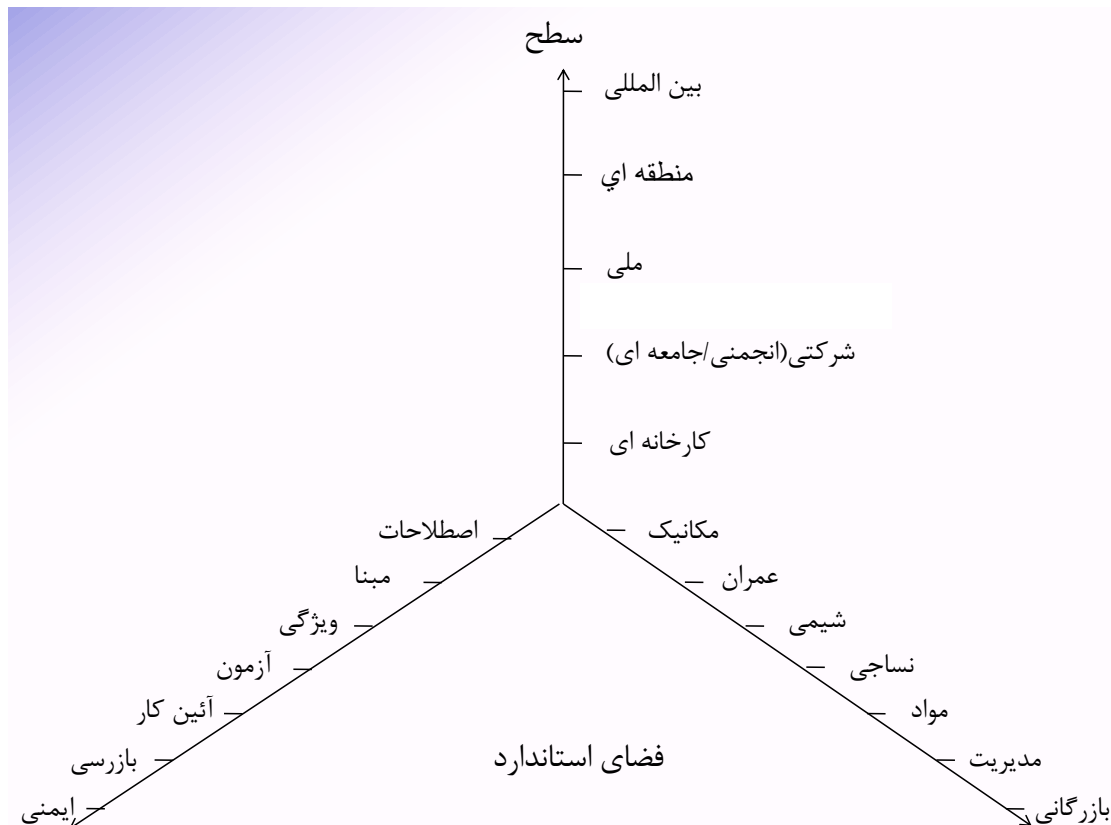
۸-۳ صحه گذاری

۸-۳-۱ صحه گذاری شمارش

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

پیوست الف انواع استاندارد

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



الف-۲ سطح استاندارد

استانداردها دارای سه سطح کلی می‌باشند که می‌توان آن‌ها را به‌صورت زیر تقسیم بندی کرد:
الف- استانداردهای کارخانه‌ای، این گونه استانداردها توسط کارخانجات و به‌منظور استفاده در همان واحد تدوین می‌شود. در تدوین استاندارد کارخانه‌ای ضمن برر سی شرایط داخلی کارخانه باید شرایط و عوامل خارجی از قبیل مواد اولیه و منابع تهیه آن، چگونگی تهیه تجهیزات، بازاریابی و رقابت، نیاز مشتری و امثال آن باید مورد توجه قرار گیرد.

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

تدوین این استانداردها تمامی افراد ذی نفع از قبیل تولید کنندگان، مصرف کنندگان، اعضای مراکز علمی و فنی، مراکز تجاری کارشناسان مرتبط از سازمان‌ها یا مراکز 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 به تدوین استانداردهای منطقه ای نمایند.

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

الف-۳- جنبه استاندارد

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

الف- استاندارد های ویژگی

ب- استاندارد های روش آزمون

پ- استانداردهای آیین کار

ت- استانداردهای ایمنی

ث- واژه نامه

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

الف-۴- اجرای استاندارد

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

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

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

متن کامل استانداردهای ملی ایران از طریق سایت سازمان ملی استاندارد ایران به آدرس زیر و لینک «استانداردهای ملی» در دسترس می باشد.

www.isiri.gov.ir

پیوست ب

مفاهیم مورد استفاده در کنترل کیفیت

- ب-۱- نمونه (**Sample**)
یک یا چندین قلم، قطعه یا واحد که از یک جامعه یا مجموعه یا محموله انتخاب می‌شوند را نمونه گویند.
- ب-۲- حجم نمونه (**Sample Size**)
مقدار مواد یا تعداد اقلام یا واحدهای تشکیل دهنده یک نمونه را، حجم نمونه گویند.
- ب-۳- نمونه برداری (**Sampling**)
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.
- ب-۴- بازرسی (**Inspection**)
مجموع بررسی‌ها، اندازه‌گیری و آزمون‌هایی است که جهت مقایسه مشخصات مواد محصولات نیمه ساخته و محصولات تمام شده با مشخصات فنی یا استانداردها انجام می‌گیرد.
- ب-۵- درستی (**Accuracy**)
نزدیکی نتیجه اندازه‌گیری یک کمیت با مقدار واقعی آن کمیت است.
- ب-۶- دقت (**Precision**)
نزدیکی بین جواب‌های تکراری حاصل از چند آزمایش بر روی یک نمونه است.
- ب-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.
- ب-۸- تکرار پذیری (**Repeatability**)
نزدیکی مقدار نتایج اصل از یک آزمایش در شرایطی است که شرایط اندازه‌گیری، تجهیزات، آزمایش کننده و محل همگی یکسان باشد.
- ب-۹- رواداری (**Tolerance**)
حداکثر میزان انحراف قابل قبول برای یک کالا از اندازه خود (حداکثر خطای قابل قبول در یک اندازه گیری)

پیوست پ (اطلاعاتی)

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

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

مدیر کنترل کیفیت واحد تولیدی طبق آیین نامه مذکور، علاوه بر انجام وظایف خود از جمله حضور تمام وقت در یک نوبت کاری و بازرسی، کنترل و نظارت کامل بر مواد اولیه، شرایط فرآورده حین ساخت، محصول نهایی و شرایط نگهداری در کلیه مراحل تولید و یا خدمت و سایر وظایف و موارد ذکر شده، موظف است نتایج آزمون نمونه های تولید شده در کارخانه را روزانه ثبت نموده و به صورت کتبی ماهیانه (حداکثر تا پایان هفته اول ماه بعد) به اداره کل استاندارد استان (با امضاء مدیر کنترل کیفیت و مدیر عامل کارخانه) ارسال نماید. عدم انجام هر یک از وظایف مدیر کنترل کیفیت و تخطی شغلی و قانونی او طبق آیین نامه ذکر شده می تواند منجر به اعمال تنبیهاتی به ترتیب شامل: تذکر شفاهی به عنوان کمترین و **ابطال دایم پروانه** به عنوان بیشترین، برای مدیر کنترل کیفی اجرا شود.

یادآوری می گردد در صورت تعلیق یا لغو پروانه تایید صلاحیت مدیر کنترل کیفیت واحد مربوطه، موظف است ظرف مدت یک هفته نسبت به معرفی فرد جایگزین اقدام و اداره کل نیز موظف است نسبت به احراز شرایط فرد معرفی شده و تأیید صلاحیت وی اقدام نماید. برای اطلاع از وظایف، قوانین، تخلفات، تنبیهات و سایر موارد مهم، به آخرین و جدیدترین "آیین نامه تایید صلاحیت علمی و فنی مدیران کنترل کیفیت" موجود در سایت سازمان ملی استاندارد www.isiri.gov.ir، مراجعه شود.

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

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

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

پ-۲-۱-۱-۱ 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 به وجود آورد.

پ-۲-۱-۲ نقص عمده:

نقصی است متفاوت با نقص بحرانی که فقدان را به وجود آورده یا به نحو قابل ملاحظه‌ای امکان استفاده از کالای مورد نظر را برای منظور خاص، کاهش می‌دهد.

پ-۲-۱-۳ نقص جزئی:

نقصی است جدا از نقایص بحرانی و عمده که امکان استفاده از محصول مورد نظر را برای منظور خاص کاهش نمی‌دهد یا آنکه اختلاف آن با مشخصات فنی به‌میزانی است که کارایی آن کالا را چندان کاهش نمی‌دهد. نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌ها به پیوست می‌باشد.

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

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

جدول ۱- امتیازات منفی نواقص موجود در فرآورده

نوع نقص	امتیاز منفی
بحرانی	۳۰
عمده	۱۵
جزئی	۵

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

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

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

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

پ-۳-۳ در مورد کالاهای مشمول استاندارد اجباری، در صورتیکه امتیاز منفی یک گزارش نتیجه آزمون و یا جمع امتیازات منفی نتایج چند آزمون به ۱۲۰ رسید، اداره کل استاندارد استان مربوط، علاوه بر اخطار کتبی، برای جمع آوری کالای مغایر با استاندارد ملی با شماره سری ساخت مربوط موضوع را به کمیسیون ماده ۱۹ ارجاع می نماید. همچنین در صورتیکه امتیاز منفی مذکور ناشی از حداقل نتایج آزمون سه نمونه برداری مختلف بوده و حداقل ۳۰ امتیاز از جمع امتیازات منفی گزارش نتیجه آزمون آخر به واسطه نقایص عمده و بحرانی باشد، نسبت به تشکیل کمیته علایم برای ابطال پروانه کاربرد علامت استاندارد اجباری اقدام نموده و در صورت ابطال پروانه، موضوع را از طریق روابط عمومی به اطلاع عموم می رساند.

یادآوری ۱- رفع تعلیق و تجدید پروانه کاربرد علامت استاندارد ایران، در صورت رفع کلیه نقایص و انطباق با موازین استاندارد ملی مربوط و احراز کلیه شرایط مندرج در دستورالعملهای مرتبط صورت می گیرد.

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

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

پیوست ت

نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌های میکروبیولوژی نوشیدنی گازدار مالت و نوشابه‌های گازدار طبق استاندارد

ملی ایران شماره‌های ۳۸۴۵ و ۶۳۰۷

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