ریاست جمهوری
سازمان ملی استاندارد ایران

جزوه دوره کارآموزی

میکروبیولوژی نوشیدنی‌ها-آب میوه، آب سبزی و فرآورده‌ها

شماره مدرک : ۶۲۲/۳۳ج
تاریخ تصویب :۱۳۹۸

تاریخ تجدید نظر: **شماره تجدید نظر:**

این جزوه آموزشی صرفا برای اهداف آموزشی سازمان ملی استاندارد ایران تهیه شده است و تکثیر 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 (رسمی) 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 اندازه شنا سی قانونی(OIML)[۳] ا ست و به عنوان تنها رابط[۴] کمیسیون کدکس غذایی(CAC)[۵] در ک شور فعالیت می‌کند. در تدوین اســتانداردهای ملی ایران ضــمن تــــوجه به شــرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشــور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

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

۱- International Organization for Standardization

۲- International Electrotechnical Commission

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

۴-Contact point

۵- Codex Alimentarius Commission

پیشگفتار

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

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

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

محتوای دوره کارآموزی

میکروبیولوژی نوشیدنی‌ها -آب میوه، آب سبزی و فراورده‌ها

عنوان دوره کارآموزی:

میکروبیولوژی نوشیدنی‌ها -آب میوه ، آب سبزی و فراورده‌ها

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 آب میوه‌ها، آب سبزی و فراورده‌های آنها بر اساس استانداردهای ملی ایران شمارهٔ ۳۴۱۴ می‌باشد و موارد زیر را در برمی‌گیرد:

۱- اطلاع رسانی روش‌های بهینه و جدید آزمایشگاهی
۲- یکسان سازی رویه آزمایشگاه میکروبیولوژی آب میوه‌ها، اب سبزی و فراورده‌ها
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 آب میوه‌ها، اب سبزی و فراورده‌ها
۵- آشنایی با الزامات فنی آزمایشگاه میکروبیولوژی بر اساس استاندارد ملی ایران 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

پیش نیاز:

ندارد.

رئوس مطالب آموزشی :

ردیف	رئوس مطالب	محتوای آموزشی	مدت آموزش (ساعت)		اجراکننده		منبع / استانداردها
			تئوری	عملی	مدرس	کارآموز	
۱	آشنایی با الزامات فنی آزمایشگاه میکروبیولوژی	آشنایی با وسایل مورد نیاز آشنایی با اصول آزمایشگاهی آشنایی با قسمت‌های مختلف آزمایشگاه میکروبیولوژی	۰/۵	۰/۵	*		جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹
۲	آشنایی با روش تهیه محیط کشت‌های مورد نیاز و روش سترون‌سازی	روش تهیه محیط کشت مرتبط با میکروبیولوژی نوشیدنی ها -آب میوه و فراوردههای آنها	۰/۵	۰/۵	*	*	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شمارهٔ۹۸۹۹
۳	آماده‌سازی وسایل مورد نیاز و روش سترون‌سازی وسایل	روش آماده‌سازی وسایل مورد نیاز و سترون‌سازی وسایل	۰/۵	۰/۵	*	*	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹
۴	آشنایی با استاندارد روش آزمون	هدف و دامنه کاربرد، مواد و دستگاه‌های مورد نیاز جهت انجام آزمون	۰/۵	۰/۵	*		جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۴۱۴
۵	آشنایی با شاخص‌های میکروبی و حدود مجاز آنها در نوشیدنی ها - آب میوه و فراوردههای آنها	آشنایی با میکرو ارگانیسمهای نوشیدنی ها -آب میوه ، آب سبزی و فراوردها	۱	۱			جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۴۱۴
۶	روش آماده‌سازی نمونه در آزمایشگاه	نمونه برداری از آزمایه ، توزین نمونه و تهیه سوسپانسیون اولیه و سایر رقت‌ها با استفاده از رقیق‌کننده مناسب	۰/۵	۰/۵	*	*	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۴۱۴
۷	روش شمارش و جستجوی باکتری‌ها	استفاده از سوسپانسیون اولیه و یا رقت‌های مورد نیاز در پلیت، برای شمارش استفاده از سوسپانسیون اولیه و یا رقت‌های مورد نیاز در لوله‌های حاوی محیط کشت مناسب برای جستجو	۱	۱	*	*	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۴۱۴

ردیف مدرس	رئوس مطالب کارآموز	محتوای آموزشی	مدت آموزش (ساعت)		اجراکننده		منبع / استانداردها
			تئوری	عملی	مدرس	کارآموز	
۸	گرمخانه‌گذاری	گرمخانه‌گذاری در دما و زمان مناسب بر حسب باکتری‌های مورد نظر	۰/۵		*		جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۴۱۴
۹	تشخیص، شمارش کلنی ها و آزمون تاییدی	بررسی و نحوه شمارش و محاسبه کلنی‌ها پس از گرمخانه‌گذاری تعیین وجود یا عدم وجود باکتری‌ها	۱	۰/۵	*	*	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۴۱۴
۱۰	ارائه گزارش آزمون	نحوه گزارش نتایج بررسی شده	۰/۵	۰/۵	*	*	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹
مدت دوره کارآموزی: دو روز							

سایر استانداردها و منابع:

۱- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۸۳۷، نوشیدنی‌های میوه‌ای (بدون گاز) –ویژگی ها

۲- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۶۸۷، آبمیوه مخلوط-ویژگی ها و روش‌های آزمون

۳- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴۷۲۱، شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک مزوفیل به روش شمارش پرگنه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در مواد غذائی

۴- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۶۰۰، نوشیدنی‌ها –کاهش و پیشگیری از آلودگی پاتولین در آب سیب و فراوردههای آن - آئین کار

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

۶- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۴۳۴۵، آب میوه‌ها- نکتارهای میوه و نوشیدنی‌های میوه‌ای گازدار-ویژگی‌ها و روش‌های آزمون

۷- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۴۳۴۵، آب میوه ها- نکتارهای میوه و نوشیدنی‌های میوه‌ای گازدار-ویژگی‌ها و روش‌های آزمون

۸- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۰۸۳۴، میکروبیولوژی زنجیره مواد غذایی –روش‌های نمونه برداری برای آزمون های میکروب شناسی

نحوه برگزاری آزمون:

عملی	تئوری
*	*

جزوه دوره کارآموزی میکروبیولوژی نوشیدنی‌ها-آب میوه‌ها آب سبزی و فراوردها

تهیه کننده/ تهیه کنندگان:

شهپر مقدمی

گروه پژوهشی/ آزمایشگاه:

گروه پژوهشی میکروبیولوژی/آزمایشگاه نوشیدنی‌ها- آب میوه آب سبزی و فراورده‌ها

به سفارش دفتر آموزش و ترویج استاندارد

منابع و مآخذ:

۱-استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۴۱۴، نوشیدنی‌ها -آب میوه ، آب سبزی و فراورده‌های آنها - ویژگی‌ها و روش-های آزمون میکروبیولوژی

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

۳-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 فراورده ها به جز شیر ، گوشت، ماهی و فراورده های آنها

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

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

۶- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۱۰۸۹۹، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش جامع برای شمارش کپک‌ها و مخمرها – قسمت اول – روش شمارش کلنی در فرآورده های با فعالیت آبی بیشتر از ۰/۹۵

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

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

۹-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

فهرست

عنوان	صفحه
آشنایی با سازمان ملی استاندارد	ب
پیشگفتار	ج
محتوای دوره کار آموزی	د
جزوه دوره کار آموزی	ح
مقدمه	ی
۱ هدف	۱
۲ استانداردهای ملی ایران	۱
۳ اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی	۲
۴ نمونه برداری	۲۸
۵ روش‌های آزمون میکروبیولوژی	۲۹
۶ اصول آزمون	۲۹
۷ محیط‌های کشت و رقیق کننده‌ها	۳۰
۸ روش اجرای آزمون	۳۰
۹ بیان نتایج	۵۷
پیوست الف- انواع استاندارد	۵۹
پیوست ب – انواع استاندارد	۶۰
پیوست پ- مفاهیم مورد استفاده در کنترل	۶۲
پیوست ت - (اطلاعاتی)	۶۳
پیوست ث - نقایص بحرانی ، عمده و جزئی آزمون‌های میکروبیولوژی انواع آب‌میوه و آب‌سبزی تغلیظ شده (کنسانتره)، پوره، پالپ و تکه‌های میوه و سبزیجات در بسته‌بندی‌های آسپتیک و غیر آسپتیک طبق استاندارد ملی ایران شماره‌های ۶۳۳۲و ۱۹۳۳۶	۶۶

مقدمه:

آب میوه‌ها و آب سبزی‌ها یک منبع غنی از مواد مغذی مختلف و ترکیبات زیست فعال مانند فیبر، قندها، اسید های ارگانیک، فسفات، ویتامین‌ها، و همچنین رنگ‌ها، طعم‌دهنده‌ها و آنتی‌اکسیدان-ها، مواد معدنی چون روی، سلنیوم، انواع ویتامین‌های B۴، B۶، C، E، A و بتاکاروتن و آب فراوان می‌باشند آب‌میوه و آب سبزی‌ها از فشردن میوه و سبزی‌ها و یا خیساندن آن بدون استفاده از حرارت و یا حلال تهیه می‌شود. در تولید آب میوه برای افزایش قوام و نیز خواص تغذیه‌ای و بهبود احساس دهانی و طعم از استابیلایزرهایی مانند: پکتین، CMC، زانتان، و سایر استابیلایزر استفاده می‌کنند. آب میوه‌ها به دلیل دارا بودن مقادیر زیادی اسیدهای آلی مانند: اسید مالیک[۱] و اسید سیتریک[۲]، دارای pH پایین هستند. pH آب میوه‌های مختلف از ۲/۴ تا ۴/۲ متفاوت است. پایین بودن pH این فراوردهها و بالابودن غلظت قندهای قابل تخمیر، باعث انتخابی شدن محیط آنها برای رشد گروه خاصی از میکروارگانیسم‌های مقاوم به اسید شده است.

مهمترین میکروارگانیسم‌های عامل فساد آب میوه‌ها، مخمرها مانند: *کاندیدا*[۳] و *تورولا پسیس*[۴] هستند. مخمرها با تجزیه اسیدهای الی و تخمیر مواد قندی تولید استالدئید، الکل، دی‌اکسید کربن و مواد دیگری می‌کنند که باعث ایجاد طعم نامناسب در فراورده می‌شود.

رشد کپک‌ها به‌دلیل پایین بودن قابلیت اکسیداسیون و احیای این فراوردهها تا زمان سالم بودن بسته بندی محدود است. اگر چه اسپور برخی از این کپک‌های مقاوم به‌حرارت مانند: *بایسوکلامیس فولوا*[۵] پس از پاستوریزاسیون نیز در فراورده باقی می‌ماند.

از مهمترین باکتری‌های اسید لاکتیک، *لاکتوباسیلوس‌ها*[۶]، *استرپتو کوک‌لاکتیس*[۷]، *لوکونوستوک‌ها*[۸] می‌باشند. که به‌عنوان عامل فساد در آب میوها محسوب می‌شوند البته در صورت حفاظت شده می‌توانند فعالیت پروبیوتیکی داشته باشند .

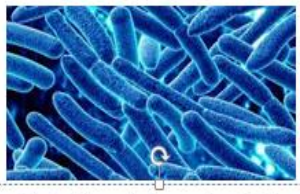
باکتری‌های اسیدلاکتیک، شامل: جنس‌های *استرپتوکوکوس لوکونستک*، *پدیوکوکوس* و *لاکتوباسیلوس* می‌باشند. گونه‌های هموفرمنتتیو[۹] مانند: لاکتوباسیلوس آرابینوزوز[۱۰] و لیشمانی[۱۱] و *میکروباکتریوم*[۱۲] از قند موجود در محیط، اسید لاکتیک تولید می‌کنند.

۱- Malic
۲- Citric
۳- *Candida*
۴- *Torulopsis*
۵- *Byssochlamys fulva*
۶- *Lactobacillaceae*
۷- *Streptococcus lactis*
۸- *Leuconostoc SPP*
۹- Homo fermentative
۱۰- *Lactobacillus arabinosus*
۱۱ - *leishmanii*
۱۲ - *Microbacterium*

در حالی که انواع هترو فرمنتتیو[1] مانند: لوکونوستوک مزنتروئیدس[2] ،*لاکتو باسیلوس برویس*[3]، از قند موجود در محیط، علاوه بر اسید لاکتیک، اسید استیک، اتانل، گازکربنیک و به‌مقدار ناچیز سایر ترکیبات را تولید می‌کنند.

باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB)

باکتری‌های اسید لاکتیک LAB، باکتری‌های گرم مثبت، غیر متحرک، فاقد اسپور، کاتالاز منفی، سیتوکروم اکسیداز منفی و ایندول منفی هستند و ژلاتین را ذوب نمی-کنند. باکتری‌های اسیدلاکتیک متابولیسم تخمیری دارند و اساسا ساکارولیتیک هستند و اسیدلاکتیک محصول نهایی حاصل از تخمیر کربوهیدرات است . با پیشرفت علم بیولوژی مولکولی، روش‌های ژنتیکی به‌طور روز افزونی برای مطالعه مشابهت‌های ژنتیکی موجود بین گروه‌های باکتری‌های مختلف استفاده می‌گردد. این تکنیک‌ها باعث ایجاد تغییرات مهمی در طبقه باکتری‌های اسیدلاکتیک شده است. باکتری‌های اسید لاکتیک LAB به‌دو گروه، هتروفرمنتتیو و هموفرمنتتیو تقسیم می‌شوند.



شکل ۱- باکتری‌های اسید لاکتیک

برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک LAB می‌توانند در نوشابه‌های حاوی آب میوه رشد کنند. این باکتری‌ها نیز به اسید بنزوئیک[4] و اسید سوربیک[5] مقاوم هستند. بسته به‌گونه‌ها و شرایط رشد، کاتابولیسم قند می‌تواند منجر به تشکیل اسیدلاکتیک، اتانول، استات، سوکسینات شود. اسید فسفریک به‌عنوان نشانگر فساد LAB در آب سیب معرفی شده است. متابولیت‌های LAB موجب از بین رفتن کربنات در نوشیدنی‌های گازدار می‌شود. بعضی از سویه‌ها دی‌استیل تولید می‌کنند و موجب تولید طعم و بوی کره‌ای می‌شوند. *لاکتو باسیلوس مزانتریدیس*[6] و *ویسلاکانفیوس*[7] قادر به تولید پلیمرهای خارج سلولی متشکل از فروکتوز یا گلوکز و تشکیل بیوفیلم در سطوح تکنولوژی هستند.

۱- Hetero Ferementative

۲- *Leuconostoc mesenteroides*

۳- *Lactobacillus brevis*

۴- benzoic acid

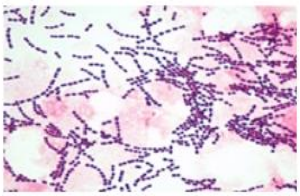
۵- Sorbic acid

۶- *Lactobacillus.mesenteroides*

۷- *Weissella* confuse(*Lactobacillus* confuse)

استرپتوکوک‌های لاکتیک

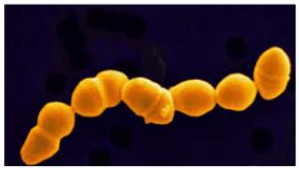
باکتری‌های بیضی شکل می‌باشند که به‌صورت دوتایی با زنجیر کوتاه مشاهده می‌شوند. بهترین درجه حرارت رشد ۳۰°C است و حداکثر تا ۴۰ °C حرارت رشد می‌کنند این باکتری‌ها گرم مثبت هوازی اختیاری یا میکروآئروفیل هستند.کاتالاز و اکسیداز منفی هستند. که به شرایط اسیدی به-طور نسبی مقاوم هستند.کربوهیدرات‌ها را تخمیر و اسید تولید می‌کنند ولی گاز ایجاد نمی‌کنند. برخی از باکتری‌های اسیدلاکتیک قادر به‌توقف رشد باکتری‌های نامطلوب هستند و می‌توان از آنها به عنوان کشت حفاظتی در مقابله با آنتروباکتریاسه‌های سرماگرا، *لیستریامونوسایتوژنز*[۷] *استافیلوکوکوس اورئوس*[۸]، *بروکوتریکس ترموسفاکتا*[۹] و *سالمونلا* در برخی فراورده‌ها استفاده کرد. تولید اسیداستیک، اسیدلاکتیک، کاهشpH، رقابت در مصرف مواد غذائی، تولید هیدروژن پراکسید، تولید آنتی‌بیوتیک[۱۰] از مکانیسم‌های ممانعت از رشد میکرو ارگانیسم‌های بیماریزای فوق است.



شکل ۲- استرپتوکوک‌های لاکتیک

لوکونوستوک‌ها

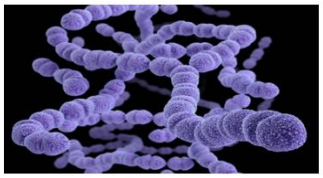
باکتری‌های گرم مثبت، بی‌حرکت بدون اسپور، کاتالاز منفی و بی‌هوازی اختیاری و شبیه لاکتوکوکسی‌ها هستند. معمولا به‌صورت دوتایی و به شکل زنجیره‌ای کوتاه دیده می‌شوند، گاهی به‌شکل میله‌ای کوچک نیز دیده می‌شوند و از آنجایی که آنها می‌توانند در محیط کشت روگوزا آگار رشد کنند، گاهی در صورت حضورشان در نمونه، با لاکتوباسیل‌ها اشتباه گرفته می‌شود. برخلاف لاکتوکوکسی‌ها، لوکونوستوک‌ها از آرژنین آمونیاک تولید نمی‌کنند و اسید لاکتیک نوع D تولید می‌کنند. این باکتری‌ها نیز به‌اسید بنزوئیک و اسید سوربیک مقاوم هستند. گلوکز را تخمیر کرده و اسیدلاکتیک، گاز کربنیک .و اتانول ایجاد می‌کنند. درجه حرارت مناسب رشد آنها ۳۰°C تا ۲۰ °C است . کلنی‌های لوکونوستوک کمتر از ۱mm قطر دارند، گرد و سفید خاکستری، صاف با قوام نرم می‌باشند. برخی از لوکوستوک‌ها ممکن است کلنی‌های بزرگ لزج تشکیل دهند که از رشد سایر کلنی‌ها ممانعت کنند.



شکل ۳-لوکونوستوک

لاکتوکوکوس[۱]

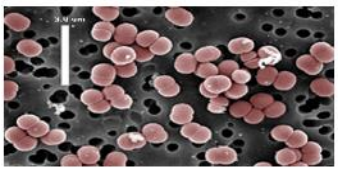
لاکتوکوک‌ها، گروهی از باکتری‌های اسیدلاکتیک هستند که قبلاً در گروه N۱ از استرپتوکوک‌ها (طبقه بندی لنسفیلد) قرار داشتند. آن‌ها هوموفرمنتور (جور تخمیر) می‌باشند یعنی فقط یک محصول به نام اسیدلاکتیک به‌طور عمده یا خاص از تخمیر گلوکز تولید می‌کنند. با تغییر شرایط محیط کشت مانندpH، غلظت گلوکز و مواد غذایی می‌توان این ویژگی را تغییر داد. لاکتوکوک‌ها، کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی و غیر متحرکی هستند، که به شکل تک، جفت یا زنجیره‌ای دیده می‌شوند. لاکتوکوک‌ها گونه‌هایی دارند که می‌توانند در دمای ۷۰C یا پایین‌تر رشد کنند. لاکتوکوک‌لاکتیس مهم‌ترین گونه است.



شکل ۴- لاکتوکوکوس

پدیوکوکوس

در بررسی میکروسکوپی فاز کنتراست، کروی با آرایش دوتایی یا چهارتایی می‌باشند. کاتالاز منفی، اندول منفی، بی هوازی اختیاری و از تخمیر گلوکز اسید تولید می‌کنند. مقاوم به‌ونکومایسین و در شرایط بی‌هوازی کلنی‌های گرد، محدب و غیر شفاف، به‌رنگ سفید دارای سطح براق با آرایش دوتایی و چهارتایی تشکیل می‌دهند.



شکل ۵- پدیوکوکوس

باکتری‌های اسپوردار مقاوم به‌حرارت و اسید (TAB)

۱- *Lactococcus*

باکتری‌های تشکیل دهنده اسپور از جنس باسیلوس[۱] و *کلستریدیوم*[۲] معمولا در نوشابه‌های اسیدی مهار می‌شوند. با این وجود، اسپور آنها می‌تواند زنده بماند. یکی دیگر از باکتری‌های اسپور سازنده، خانواده *آلیسایکلو باسیلوس*[۳] است که اغلب با موجب فساد آب میوه، لیموناد، آب‌ایزوتونیک، می‌شود. *آلیسایکلو باسیلوس اسیدو ترستریس*[۴]، مختص آلودگی مواد اولیه است.

باکتری‌های اسید استیک[۵](AAB)

باکتری‌های اسیداستیک گروهی از باکتری‌های گرم منفی، و از تخمیر، اسیداستیک تولید می‌کنند دارای ۱۰ جنس در خانواده *استو باکتریاسه*[۶] هستند باکتری‌های استیک اسید (AAB) به‌شدت هوازی هستند و به‌حداقل اکسیژن برای رشد نیاز دارند. (AAB) باکتری‌های مقاوم به‌اسید و درpH (۸ تا ۳) رشد می‌کنند و استالدئید و یا کتون‌ها را تولید می‌کنند بسیاری از (AAB) به‌مواد نگهدارنده (بنزوات، سوربیت‌ها و دی‌متیل کربنات[۷]) مقاوم هستند معمولاً در موارد نقص در بسته‌بندی 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 و بیوفیلم کند. باکتری‌های اسید لاکتیک نسبت به‌حرارت پاستوریزاسیون حساس هستند. آب میوه‌ها علاوه بر تخمیر الکلی، دستخوش دیگر تغییرات ناشی از میکروارگانیسم ها نیر می‌شوند. به‌عنوان مثال:*لاکتو باسیلوس پاستورانیوم* اسیدمالیک را به‌اسیدهای‌لاکتیک[۸]، اسیدسوکسینیک[۹]، اسیدکوئینیک[۱۰] تبدیل می‌کند و اسیدسیتریک[۱۱]را به‌اسیدلاکتیک و اسیداستیک تبدیل می‌کند. تولید رسوب و کشدار شدن آب میوه‌ها، نیز معمولا توسط: لوکونوستوک مزنتروئیدس، لاکتوباسیلوس برویس[۱۲]، لاکتوباسیلوس *پلانتاریوم*[۱۳] و استرپتوکوکوس[۱۴] انجام می‌شود.

۲- *Bacillus*
۳- *Clostridium*
۴- *Alicyclobacillus*
۵- *A. acidoterrestris*
۱- Acetic acid bacteria (AAB)
۲- Acetobacteraceae
۳- Dimethyl carbonate
۴- Lactic
۵- Succinic
۶- Quinic
۷- Citric
۸- *Lactobacillus brevis*
۹- *Lactobacillus plantarum*
۱۰- Streptococci

جزوه دوره کارآموزی میکروبیولوژی نوشیدنی‌ها - آب میوه، آب سبزی و فراورده‌ها

۱ هدف

هدف از تدوین این جزوه آموزشی آشنایی با روش‌های آزمون میکروبیولوژی آب میوه، آب سبزی و نوشیدنی‌های بدون گاز ساده و مخلوط، نکتارهای میوه، نوشیدنی‌های میوه‌ای بدون گاز، بر اساس استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۴۱۴ می‌باشد.

یادآوری ۱- توصیه می‌شود کارآموزان این دوره با الزامات آزمایشگاهی میکروبیولوژی و نیز استانداردهای ملی ایران شماره‌های۳۴۱۴ و ۹۸۹۹ آشنایی داشته باشند.

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

۲ استانداردهای ملی ایران

استانداردهای ملی ایران مرتبط با آزمون میکروبیولوژی آب میوه، آب سبزی و نوشیدنی‌های بدون گاز به‌شرح جدول ۱ می‌باشند.

جدول ۱- لیست استانداردهای میکروبیولوژی آب میوه‌ها و نوشیدنی‌های بدون گاز

ردیف	عنوان استاندارد	شماره استاندارد
۱	نوشیدنی‌ها- آب‌میوه، آب سبزی و فراوردها –ویژگی‌ها و روش‌های آزمون	۳۴۱۴
۲	میکروبیولوژی خوراک انسان و دام-راهنمای آماده‌سازی و تولید محیط‌های کشت	۸۶۶۳
۳	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- راهنمای الزامات کلی برای آزمون	۹۸۹۹
۴	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - آماده سازی آزمایه-سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی- قسمت اول -مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری	۸۹۲۳-۱
۵	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش جامع برای شمارش کلی فرم‌ها – روش شمارش کلنی	۹۲۶۳
۶	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش جامع برای شمارش باکتری‌های بی‌هوازی احیا کننده سولفیت	۹۴۳۲
۷	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش شمارش کپک‌ها و مخمرها – قسمت اول: روش شمارش کپک‌ها و مخمرها – روش شمارش کلنی در فراورده-های با فعالیت آبی (aw) مساوی یا بیشتر از ۰/۹۵	۱۰۸۹۹-۱
۸	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش جامع برای شناسایی و شمارش کلیفرم‌ها – روش بیشترین تعداد احتمالی(MPN)	۱۱۱۶۶
۹	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -شمارش گونه‌های احتمالی باسیلوس-های اسپوردار پروبیوتیک	۱۲۱۰۵

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 ا صول و قواعد مربوط به‌ایمنی فرد آزمایش کننده بوده و برخی نیز به‌ایمنی محیط و ابزار آزمایشگاه مربوط می‌باشد.

۳-۱ فضای آزمایشگاه

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

۳-۱- ۱ فضای مربوط به‌نمونه وآزمون

باتوجه به‌شرایط خوب آزمایشگاهی داشتن فضاهای جداگانه برای بخش‌های زیرلازم است:

- دریافت و انبارش نمونه‌ها؛
- آماده‌سازی نمونه‌ها خصوصاً برای مواد خام (مانند : فراورده‌های 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 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	میکروسکوپ
۴	فور
۵	دستگاه اتوکلاو
۶	pH متر
۷	وسایل و ظروف شیشه‌ای آزمایشگاهی
۸	انکوباتور
۹	شمارشگر کلنی
۱۰	سیستم فیلتراسیون

ترازوی آزمایشگاهی

دستگاهی است که برای توزین اجسام یا مایعات، با دقت بالا و حساسیت بالا به‌کار می‌رود آزمایشگاه‌ها با توجه به‌نیازشان ترازوهایی با دقت g ۰/۱، g ۰/۰۱، g ۰/۰۰۱، g ۰/۰۰۰۱ و g ۰/۰۰۰۰۱ استفاده می‌کنند. ترازوهای آزمایشگاهی با دقت mg ۱ و دقت بالاتر، 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[1] شوند. تا به‌درستی کار انجام دهند. گذشت زمان، فرسودگی، جا به‌جایی ترازو و حوادث غیرقابل پیش بینی، باعث می‌شوند تا قابلیت ردیابی نتایج آن‌ها زیر سؤال

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

رفتـه و نیازمنـد تاییـد مجـدد باشـند. کـالیبره کـردن بایـد در مـدت زمـان‌هـای معینـی انجـام شـود، گـاهی لازم اسـت چنـد بـار در سـال یـا گـاهی بـر اسـاس ضـرورت یـک یـا دو بـار در مـاه، انجام گیرد. برای کـالیبره کـردن تـرازوی دیجیتـال نیـاز بـه‌یـک سـنگ کـالیبره اسـتاندارد وجـود دارد کـه معمـولا بـر اسـاس ظرفیـت تـرازو دیجیتـال انتخـاب مـی‌شـود. نحـوه کـالیبره کـردن در تمـام ترازوهـای دیجیتـالی یکسـان اسـت و فقـط سـنگ کـالیبره متفـاوت اسـت کالیبراسـیون بایـد طبـق دسـتورالعمل سـازنده بـا وزنـه‌هـای اسـتاندارد انجـام گیـرد بـا ایـن روش ارزیـابی‌هـای دقیق‌تر و قابـل اطمینـان هسـتند و درصـد خطـا بسـیار کـم اسـت بـرای تجهیـزات کـالیبره شـده گواهی کالیبراسیون صادر شده و ضمیمه دستگاه می‌گردد.

شکل۶- ترازوی آزمایشگاهی

حمام مایع[1] (بن ماری[2])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 بن ماری، موجب آسیب رساندن به‌دستگاه می‌شود، باید به‌حداقل حجم آب مورد نیاز جهت حفظ کارکرد مطلوب دستگاه توجه گردد.

کاربرد اصلی این دستگاه در آزمایشگاه میکروبیولوژی به‌شرح زیراست:

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

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

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

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

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

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

.

۱- Water bath

۲- Bain marie

شکل۷-انواع حمام مایع با دمای ثابت

میکروسکوپ [۱]

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 میکروسکوپ-ها بر اساس عبور نور با طول موج‌های متفاوت از چندین عدسی محدب می‌باشد که هرچقدر طول موج نور به‌کار رفته در میکروسکوپ مزبور کوتاه‌تر باشد قدرت تفکیک و یا جداکنندگی آن میکروسکوپ بیشتر است. میکروسکوپ‌ها به‌طور کلی به‌دو دسته میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی تقسیم می‌شوند. میکروسکوپ های نوری به‌منظور سنجش و مشاهده سلول‌ها با بزرگنمایی نسبتا کم و میکروسکوپ‌های الکترونی برای مشاهده سلول‌ها و ساختارهای سلولی با بزرگنمایی بسیار زیاد مورد استفاده قرار می‌گیرند. سه تعریف مهم در کاربرد میکروسکوپ وجود دارد.

- **بزرگنمایی :** به‌نسبت اندازه تصویر نمونه، به‌اندازه واقعی آن گفته می‌شود. در همه میکروسکوپ‌ها از عدسی‌ها برای بزرگنمایی تصویر استفاده می‌شود. .
- **قدرت تفکیک :** توانایی تشخیص بین دو شیء نزدیک به‌هم به‌صورت دو شیء متمایز و جدا را قدرت تفکیک می‌گویند.قدرت تفکیک به‌کیفیت عدسی‌ها و طول موج نور تابیده شده بستگی دارد. با کاهش طول موج، قدرت تفکیک افزایش می‌یابد .
- **کنتراست :** به‌تفاوت بین بخش‌های مختلف یک نمونه می‌گویند. مثلا یک اندامک تیره‌تر از اندامک دیگر دیده شود.

۱- Microscopes

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

شکل ۸-میکروسکوپ

فور[5] یا آون

فور یا آون دستگاهی است که قابلیت تنظیم در دمای ۳۰۰ °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 ۱۷۰ ±۱۰°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، به منظور پیشگیری از شکستن وسایل شیشه‌ای درب آون را باز نکنید تا اتاقک، ظروف و مواد داخل آن تا دمای

---

۱ –دارای بزرگنمایی۵۰ 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 ، ۱۰۰ و قابلیت فاز کنتراست و نصب دوربین عکسبرداری می‌باشد که برای مشاهده معمولی و نمونه‌هایی که رنگ‌آمیزی نشده‌اند مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۵- Oven

حـدودC°۶۰ خنـک شـوند. اگـر هـوای سـرد ناگهـان وارد دسـتگاه شـود ممکـن اسـت ظـروف 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.

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.

شکل۹- فور یا آون

اتوکلاو[۳]

اتـوکلاو بـرای اسـتریل کـردن ابـزار پزشـکی و آزمایشـگاهی در فشـار و دمـای بـالا و بـا اسـتفاده از بخار آب کاربرد دارد این دسـتگاه قـادر اسـت بخـار آب اشـباع شـده بـا حـرارت C° ۱۲۱ را ایجـاد کنـد این درجـه حـرارت در شـرایط بخـار ایجـاد شـده مـی‌توانـد موجـب تخریـب سـاختمان میکـروب‌هـا و اسـپور آنهـا شـده و تقریبـا باعـث نـابودی تمـام میکروارگانیسـم‌هـای شـناخته شـده شـود. بـر اسـاس اسـتاندارد در دمـای C° ۱۲۱ ابـزارآلات بایـد حـداقل بـه‌مـدتmin ۱۵، تحـت فرآینـد استریلیزاسـیون قرار گیرند کـل مـدت زمـان کـار دسـتگاه اتـوکلاو از فشـار دادن دکمـه (شـروع کـار)[۴] تـا پایـان کـار سیسـتم، مجمـوع سـه زمـان (زمـان اولیـه)[۵]، (زمـان استریلیزاسـیون) [۶] و (زمـان خشـک شـدن) [۷]است.بررسی دما و زمان اتوکلاو با اندیکاتورهای شیمیایی، فیزیکی و بیولوژی انجام می‌شود.

انـدیکاتورهای شـیمیایی : بـه صـورت نوارهـای اتـوکلاو (چسـب اتـو کـلاو) TST [۸] کـه سـه عامـل زمان، بخـار و دمـا را کنتـرل مـی‌کنـد. یـا بسـته هـای پزشـکی هسـتند کـه وقتـی بـه دمـای معینـی رسیدند تغییر رنگ می‌دهند.

۱- Bacillus subtilis

۲ -Bacillus atrophaeus

۳- Autoclave

۴- Start

۵- Preheating Time

۶- Sterilization Time

۷- Drying Time

۸- Time, Steam,Tempreture

انـــدیکاتور بیولـــوژی : شـــامل اســـپور بـــاکتری‌هـــای مقـــاوم بـــه حـــرارت، ماننـــد *ژئوباســـیلوس استئاروترموفیلوس*[1] است.

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

شکل۱۰-اتوکلاو و تعدادی از اندیکاتورهای شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی

شمارشگر کلنی[2]

ایـن دسـتگاه بـرای شـمارش کلنـی بـاکتری‌هـا، بـه‌صـورت دیجیتـال کـاربرد دارد. معمـولا دارای صـفحه مـدرج بـرای سـهولت در شـمارش، عدسـی بـا قـدرت بزرگنمـایی ۸ برابـر و ثبـت در حافظـه در هنگـام قطع برق می‌باشد.

شکل۱۱ – شمارش‌گر کلنی

pH متر[3]

وسیله‌ای الکترونیکی اسـت کـه جهـت سـنجش میـزانpH (میـزان اسـیدی یـا بـازی بـودن مـاده) بـه‌کـار مـی‌رود. (انـدازه گیـری غلظـت یـون هیـدروژنH + را بـا اسـتفاده از الکتـرود حسـاس بـه‌یـونH +) ایـن ابـزار دارای الکترودهـای خاصـی اسـت کـه بـا قـرار دادن در محلـول، عـدد pH را روی صـفحه نمایشـگر خود نمایش می‌دهد. این دسـتگاه متشـکل از دو بخـش اصـلی یعنـی میلـه کاوشـگر [4]و انـدازه‌گیـر[5] اسـت. میله کاوشگرpH محلـول را تبـدیل بـه‌سـیگنال الکتریکـی کـرده و انـدازه‌گیـر آن را تحلیـل و میـزان pH را نمـایش مـی‌دهـد. انتهـای کاوشـگر از غشـاء شیشـه‌ای و حبـاب ماننـد اسـت کـه نسـبت بـه یونها حسـاس مـی‌باشـد و رأس الکتـرود داخلـی در داخـل آن قـراردارد. بخـش داخلـی و بیرونـی محفظـه حاوی KCl و HCl یک دهـم مـولار(محلـول رفـرانس) اسـت. قبـل از شـروع کـار بـا pH متـر ابتـدا بایـد

۱- *Geobacillus stearothermophilus*

۲- Colony counter

۳- pH meter

۴- probe

۵-meter

مطمئن شوید که میله کاوشگر در محلول نگهدارنده یا محلول با pH= ۴ نگهداری شده است. در غیر این صورت ممکن است pH متر در تعیین pH محلول مورد مطالعه دچار خطا شود. لذا میله کاوشگر را به‌مدت زمانh ۲در آب مقطر نگهداری کنید و سپس آن را در محلول نگهدارنده قرار دهید. کاوشگر را به‌وسیله آب مقطر بشویید. برای تنظیم[۱] pH متر، الکترود را در محلول pH=۷ قرار داده، حداقلsec ۳۰ زمان بدهید تا عدد ثابتی را نشان دهد. سپس آن را روی عدد ۷ تنظیم کنید(pH متر عدد ۷ را نشان دهد). دوباره الکترود را با آب مقطر بشویید و آن را در محلولpH=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 محلول های مورد آزمایش است. قبل از قرار دادن اندازه‌گیر در محلول مورد آزمایش آن را دوباره با آب مقطر بشویید.

شکل ۱۲-pH متر

انکوباتور[۲](اتو)

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

شکل ۱۳- انکوباتور

وسایل و ظروف شیشه‌ای آزمایشگاهی

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

۱- calibration

۲- Incubator

شکل۱۴- وسایل و ظروف شیشه‌ای آزمایشگاهی

۳-۴ استریلیزاسیون

استریلیزاسیون یا سترون‌سازی به‌معنای از بین بردن تمامی اشکال زنده در یا روی یک محیط آماده است. این اشکال مختلف شامل سلول‌های زنده باکتری‌ها و اسپور قارچ‌ها و... می‌باشد.

روش‌های رایج سترون کردن عبارتند از:

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

۳-۵ محیط کشت

کشت و تکثیر باکتری‌ها در محیط‌های مصنوعی از مهمترین روش‌های تشخیصی در باکتری شناسی است. برای کشت موفق باید شرایط مناسب برای رشد باکتری فراهم گردد. از جمله این شرایط مواد غذایی و مغذی، حرارت، رطوبت کافی، مواد آلی، مواد معدنی، pH مناسب، حضور یا عدم حضور اکسیژن می‌باشد. بیشتر محیط‌های کشت که در پلیت مصرف می‌شوند، محیط‌های کشت عمومی هستند که برای تهیه مواد غذایی لازم جهت رشد باکتری ساخته شده‌اند. محیط‌های کشت عمومی را با اضافه کردن اجزای مغذی که موجب افزایش سریع رشد ارگانیسم‌های سخت رشد می‌شوند، غنی می‌کنند. ماهیت مواد مغذی چنان است که نمی-توان

۱- Bacillus *subtilis*

۲- Bacillus. *Stearothermophilus*

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 ....

۳-۵-۱ اجزای تشکیل دهنده محیط کشت

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

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 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 در دار و ساخته شده از مواد بی اثر مانند: شیشه خنثی، پلی‌اتیلن و غیره نگهداری شود. و همچنین توصیه می‌شود، آب مقطر تولید شده هر چه زودتر استفاده شود.

۳-۵-۳ ویژگی محیط کشت

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

۱-Algae

۲-Gracilari

۳-Gelidium

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

۳-۵-۴ طبقه بندی محیط کشت

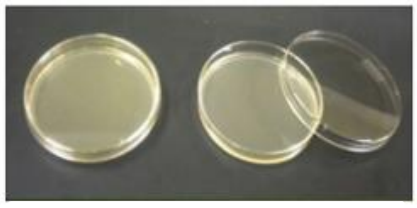
محیط کشت را از جنبه‌های مختلف طبقه بندی می‌کنند:

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

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

۳-۵-۴-۲-۱ محیط کشت جامد[۱]

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



شکل ۱۵- محیط کشت آگاردار

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

الف کشت شیب دار[۲]

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

۱-Solid media

۲- Slant media

شکل ۱۶- محیط کشت شیبدار

ب کشت‌های عمقی[1]

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

پ کشت در داخل محیط جامد[2]

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

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

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

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

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

۳-۵-۴-۲-۳ محیط کشت نیمه جامد[4]

محیط‌های نیمه جامد نیز وجود دارد.که میزان آگار آن نسبت به‌محیط‌های جامد کمتر است (۰/۲٪تا۰/۵٪). مانند:" SIM"این نوع محیط‌های کشت برای مشاهده حرکت باکتری‌ها استفاده می‌شود. به‌محیط کشت جامد ریخته شده در لوله یا بطری کوچک، که هنگام جامد شدن، به حالت شیبدار نگهداری می‌شوند "اسلنت" گفته می‌شود چنانچه محیط کشت در ته‌ظروف ریخته شود به‌آن "بات" گفته می‌شود.

۱- Stab Cultures

۲-Shake Cultures

۳-Liquid or broth media

۴- Semi Solid media

شکل ۱۷- محیط کشت نیمه جامد

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

۳-۵-۴-۳-۱ محیط کشت انتقالی[۱]

محیط کشتی است که به‌منظور نگهداری و حفظ قابلیت زیستی میکروارگانیسم‌ها در ضمن به‌حداقل رساندن تغییر در شمارش در دوره زمانی بین 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 غنی‌کننده نیز به‌کار رود برای مثال" آب پپتونه بافری"

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

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

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

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

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

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

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

۳-۵-۴-۳-۴-۳ محیط کشت جداکننده[۶]

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

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

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

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

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

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

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

۱-Pre- enrichmen medium

۲-Enrichmen medium

۳-Selective enrichment medium

۴-Rappaport-Vassiliadis (RV)

۵-Non- selective enrichment medium

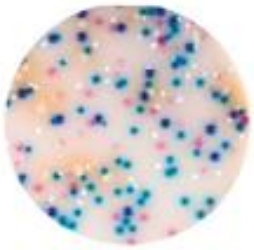
۶-Selective isolation medium

۷-Selective enrichment medium

۸- Non-selective isolation medium

۹- Chromogenic selective culture medium

۱۰- Fluorogenic selective culture medium



شکل ۱۸- محیط کشت کروموژنیک / فلوروژنیک

۳-۵-۴-۳-۴-۷ محیط کشت افتراقی[۱]

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

۳-۵-۴-۳-۴-۸ محیط کشت شناسایی [۲]

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

۳-۵-۴-۳-۴-۹ محیط کشت شمارش [۴]

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

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

۳-۵-۴-۳-۴-۱۰ محیط کشت تاییدی [۷]

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

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

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

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

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

محیط کشتی است که در دسته بندی‌های متعدد قرار می‌گیرد. مانند: "بلاد آگار[۱]"که یک محیط بازیابی ا ست، می‌تواند به‌عنوان محیط ک شت جداکننده و همچنین محیط ک شت افتراقی برای رد یابی همولیز به‌کار رود. و یا "بافر پپتون واتر" که یک رقیق کننده است می‌تواند یک محیط کشت پیش غنی کننده نیز باشد.

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 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.

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

۱- Blood agar

۲- Tryptic Soy Agar(TSA)

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

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

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

۳-۶ آماده سازی و استریلیزاسیون محیط‌های کشت در آزمایشگاه

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

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

آلودگی میکروبی آب از cfu/mL 10^2 بیشتر نباشد و طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵۲۷۱ پایش شود.

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

۳-۶-۲ pH

pH محیط کشت را با استفاده از pH متر اندازه گیری کنید در صورت لزوم، قبل از سترون‌سازی تنظیم شود، به‌این ترتیب که pH محیط کشت پس از سترون‌سازی و رسیدن دما به 25^oC، در محدوده مورد نظر ۰/۲± واحد اندازه گیری باشد، مگر اینکه مقادیر دیگری توصیه شده باشد.pH معمولاً با استفاده از محلول سدیم هیدروکسید با غلظت تقریبی: ۴۰g/L یا هیدروکلریک اسید انجام می‌شود. اگر تنظیم pH پس از سترن‌سازی انجام شود، باید از محلول‌های سترون استفاده شود.

۳-۶-۳ توزیع

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

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

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

۳-۶-۴ سترون سازی

محیط‌های کشت تهیه شده را در روز آماده‌سازی سترون کنید. سترون‌سازی محیط‌های کشت و معرف‌ها معمولاً با استفاده از حرارت مرطوب با استفاده از اتوکلاو یا فیلتراسیون انجام می‌شود.
بعضی از محیط‌های کشت به‌سترون‌سازی با اتوکلاو نیاز ندارند، ولی می‌توان آنها را با دمای جوش سترون نمود. برای مثال: محیط‌های کشت آنتروباکتریاسه‌ها که حاوی برلیانت گرین بوده و بخصوص به حرارت و نور حساس هستند و بهتر است به‌سرعت پس از جوشیدن سرد شده و در برابر نور شدید محافظت شوند. همچنین، بعضی از معرف‌ها را نیز می‌توان بدون سترون‌سازی مورد استفاده قرار داد. در همه موارد طبق دستورالعمل‌های تولیدکننده یا استانداردهای مناسب انجام دهید. پس از سترون کردن، محیط‌ها را در شرایطی که از تغییر ترکیبات جلوگیری کند، نگهداری کنید برای مثال: از نور و خشک شدن محافظت کنید. اگر محیط کشت بلافاصله استفاده نشوده یا شرایط دیگری در استاندارد خاصی مشخص نشده باشد، در یخچال در دمای ۳°C ± ۵°C نگهداری کنید.
اگر محیط‌های کشت در یخچال نگهداری شود معمولاً توصیه می‌شود مدت زمان نگهداری برای پلیت‌ها از دو تا چهار هفته و برای بطری‌های بسته شده و لوله‌ها سه تا شش ماه بیشتر نشود. برای ذوب مجدد، محیط‌های کشت را به‌وسیله قرار دادن آن در حمام آب جوش و یا هر فرآیند دیگری که همان نتیجه را دهد، ذوب کنید (مانند: قرار دادن در بخار اتوکلاو) محیط کشت ذوب شده، در حمام آب گرم با دمای تنظیم شده، با دمای ۴۷°C تا ۵۰°C، خنک کنید.

۳-۶-۵ افزودن مکمل‌ها

مکمل‌هایی که حساس به‌حرارت هستند، باید بعد از اینکه دمای محیط به‌کمتر از ۵۰°C رسید، به‌محیط اضافه شوند. مکمل سترون شده باید قبل از افزودن به‌محیط آگاردار به دمای اتاق برسد. افزودن مکمل‌های مایع سرد ممکن است سبب بسته شدن آگار یا تشکیل پرک‌های شفاف شود و از توزیع مناسب جلوگیری کند. مکمل‌ها را در محیط کشت به‌آرامی و کامل مخلوط کرده و 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 پتری دیش‌ها بریزید تا حداقل ضخامت آن ۳ mm گردد. برای مثال: در ظروف با قطر ۲۰mm، معمولا ۱۸ mL تا ۲۰mL محیط کشت آگاردار کافی است یا مقداری که در استانداردهای

مربوط بیان شـــده اســـت.اگر پلیت‌ها باید نگهداری شـــوند، یا زمان گرمخانه‌گذاری آنها بیش از h ۷۲ به‌طول می‌انجامد، یا دمای گرمخانه‌گذاری بیش از °C ۴۰ است، محیط کشت بیشتری ممکن است در پتری دیش‌ها ریخته شود. پلیت‌ها را به‌صورت در بسته روی یک سطح افقی و خنک قرار دهید تا آگار سرد شده و ببندد.

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

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

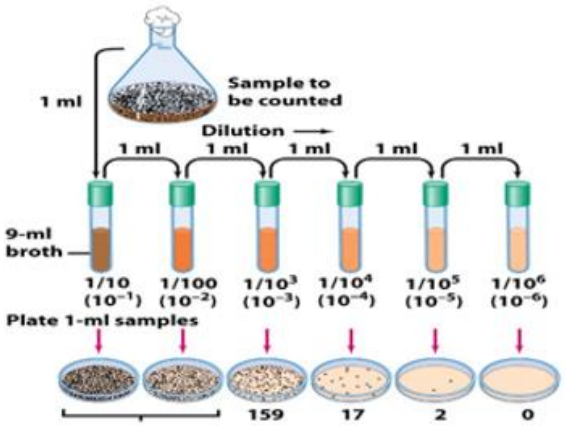
۳-۷ آماده سازی نمونه

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

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

یادآوری- بـرای تهیـه سوسپانسـیون فـراورده‌هـای اسـیدی، pH را نزدیـک خنثـی و برابـر بـا ۷/۰±۰/۵ تنظـیم کنیـد. از آب پپتونـه بـافری و بـرای بیشـتر فراوردههـای بـا pH بیشـتر یـا برابـر ۴/۵ اسـتفاده کنیـد. بـرای فراوردههـای اسـیدی‌تـر (بیشـتر یـا برابـر ۳/۵) مـی‌تـوان pH را بـا اسـتفاده از آب پپتونـه بـافری بـا غلظـت دو برابـر تنظـیم کـرد، چنانچـه ایـن فراورده‌ها برای اولین با آزمـون مـی‌شـوند بهتـر اسـت pH آنهـا بررسـی شـود تـا اطمینـان حاصـل شـود کـه بـه‌دامنـه مـورد نظر رسیده‌اند.

برای رقت‌های ۱۰ برابر، mL ۹ یا mL ۹۰ از محلول‌های رقیق کننده را به‌ارلن یا لوله‌های سترون اضافه کنید با انتقال یک حجم نمونه به ۹ حجم محلول رقیق کننده، رقت‌های ۱۰ برابر را تهیه کنید. سوسپانسیون اولیه را کاملا مخلوط کنید. برای تهیه رقت‌های دهدهی بعدی، mL ۱ از سوسپانسیون اولیه را، با استفاده از پی‌پت سترون به mL ۹ محلول رقیق کننده سترون که دمای مناسبی دارند، منتقل کنید و با استفاده از یک همزن مکانیکی به‌مدت زمان sec ۵ تـا ۳sec مخلوط کنید. رقت بدست آمده$^{-۲}$۱۰ می‌باشد.



شکل۱۹- سوسپانسیون اولیه و رقتهای متوالی

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

۳-۷-۱ روش‌های کشت در میکروبیولوژی

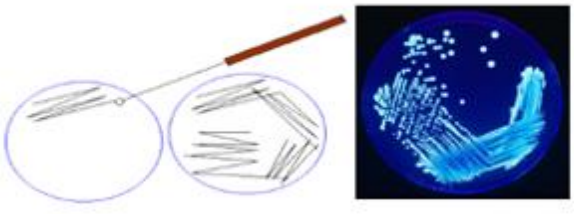
کشت در پلیت به‌سه روش قابل انجام است.

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

۳-۷-۱-۱ کشت خطی

در این روش از محیط پیش ریخته استفاده می شود. به‌این ترتیب که ابتدا به‌وسیله یک حلقه کشت سترون شده مقداری از کلنی باکتری را برداشته و آن را روی سطح محیط پیش ریخته بصورت خط‌های موازی و در چند جهت‌کشیده می‌شود. در کشت‌های خطی برای بدست آوردن کلنی‌های تک، پلیت را به ۴ قسمت تقسیم 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 می شود. 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.

در مورد محیط‌های کشت باکتریایی که به صورت 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.



شکل۲۰- کشت خطی

۱- Streaking plate
۲- Surface plate
۳- Pour plate

۳-۷-۱-۲ کشت سطحی

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

همچنین در غذاهای خشک شده، غذاهای یخزده و منجمد، که ممکن است دارای میکروارگانیسم-های حساس به‌گرما باشند یا فراورده‌هایی که دارای باکتری‌های هوازی اجباری هستند که احتمال دارد قست معنی‌داری از فلور کل را تشکیل دهند (مانند: گونه‌های سودو موناس[۳]) و فرآورده‌هایی که داری ذرات کوچکی هستند که تشخیص آنها از کلنی‌های تشکیل شده در کشت آمیخته به-سختی انجام می‌شود، همچنین فراورده‌هایی که رنگ شدید آنها باعث جلوگیری از تشخیص کلنی در کشت آمیخته می‌شود، فراورده‌هایی 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 بین۰/۱ 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.

یاد آوری – تعداد کل کلنی‌های قابل شمارش، به‌اندازه کلنی‌ها بستگی دارد و برای کلنی‌های بزرگتر تعداد کلنی-ها 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. معمولا۰/۱ mL از آزمایه (فراورده‌های مایع) و یا ۰/۱ mL از سوسپانسیون اولیه (سایر فراورده‌ها) 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.

۱-Heat-sensitive organisms

۲-Psychrotrophic

۳-Pseudomonas spp.

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 بی مورد رطوبت می‌شود.

پ- درجه حرارت و زمان خشک شدن را به‌گونه‌ای انتخاب کنید که احتمال آلودگی تا حد ممکن پاین نگه دا شته شود. و درجه حرارت اثر سوئی روی کیفیت محیط کشت ندا شته با شد. زمان خشک شدن به‌میزان بخار آب سطح محیط کشت درون پلیت‌ها بستگی دارد.

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

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

خشک کردن پلیت را تا زمان ناپدید شدن قطرات در سطح آگار یا روی در پلیت ادامه دهید بیش از آن خشک کردن را ادامه ندهید همچنین می‌توانید پلیت‌ها را در اتاقک ایمنی با جریان هوای لایه‌ای در دمای محیط برای مدت۳۰ min تا۶۰ min، یا به‌مدت یک شب به صورت در بسته در درجه حرارت محیط خشک کنید. همچنین می‌توانید پس از ریختن محیط کشت در پلیت در صورت تجمع حباب هوا، آنها را با شعله دادن سطح محیط حذف کنید. اینکار باعث سترون شدن سطح محیط کشت هم می‌شود.

شکل۲۱- کشت خطی

۳-۷-۱-۳ کشت آمیخته یا پورپلیت

در روش کشت آمیخته، حجم آزمونه و یا رقتی از نمونه بسته به‌اندازه پلیت و حجم محیط کشت مورد استفاده بین ۰/۱ mL تا ۵ mL است. رقت را باید به‌گونه‌ای انتخاب کرد که تعداد مورد انتظار کلنی‌های تیپیک تشکیل شده روی پلیت‌هایی با قطر ۹۰mm تا ۱۰۰mm بین۱۰ تا۱۵۰ کلنی باشد. تعداد کل کلنی‌های تیپیک و غیر تیپیک روی پلیت باید کمتر از ۳۰۰ کلنی باشد.

۱-Laminsr-flow safety cabinet

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

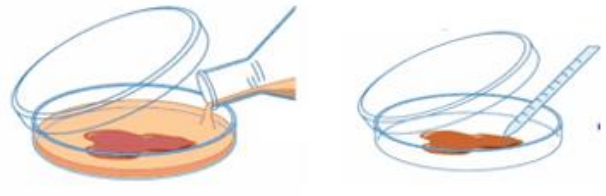
محیط کشت مورد استفاده را در حمام آب جوش ذوب کنید از سایر فرآیندهای مناسب مانند: قرار دادن در جریان بخار آزاد اتوکلاو و یا ماکروویو و سایر فرآیندهای مناسب که ترکیب دما و زمان آن برای آماده سازی محیط کشت، صحه گذاری شده است نیز می‌توانید استفاده کنید از حرارت دادن زیاد محیط کشت خودداری کنید و آن را به‌محض ذوب شدن ار حمام خارج کنید و محیط کشت ذوب شده را درحمام آب با دمای ۴۵ °C قرار داده تا دمای آن به ۴۵ °C برسد پس از تهیه و آماده سازی پلیت‌ها و دقت‌های لازم، آزمونه را کاملا مخلوط و در پلیت‌ها تقسیم کنید.

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

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

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

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



شکل۲۲- کشت پور پلیت

۳-۷-۳-۱ کشت‌های دو لایه

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

۳-۸ رنگ آمیزی

۳-۸-۱ رنگ آمیزی گرم

۳-۸-۱-۱ 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 ۱، صبر کنید تا رنگ در دیواره سلولی میکروب‌ها نفوذ کند.

۳-۸-۱-۳ مرحله شستشو:

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

۳-۸-۱-۴ مرحله اضافه کردن محلول ید:

با چند قطره از محلول ید[۱] روی گسترش را پوشانیده و به‌مدت زمان min۱ صبر کنید.

۳-۸-۱-۵ مرحله شستشو:

پس از سپری شدن مدت زمان min۱، در حالیکه لام را به‌صورت مایل نگهداشته‌اید با استفاده از آب مقطر به‌آرامی به‌مدت چند ثانیه سطح روی گسترش را شستشو دهید.

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

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

۳-۸-۱-۷ رنگ آمیزی با محلول سافرانین:

در این مرحله سطح لام را با محلول سافرانین را با رنگ ثانویه یعنی سافرانین، به‌مدت زمانsec ۱۰ 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:

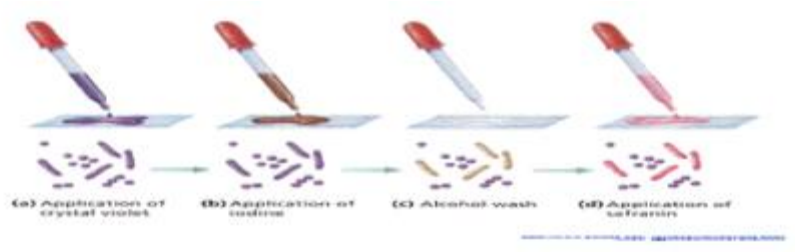
۱-میله ای (باسیل) گرم مثبت ۲- میله‌ای گرم منفی ۳- کوکوس (گرد) گرم مثبت ۴- کوکوس گرم منفی ۵- باکتری‌های بدون واکنش به‌رنگ آمیزی گرم.

یادآوری نکات مهم:

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

۱- Iodine

- اگر گسترش ضخیم باشد هنگام مرحله بی رنگ شدن، ممکن است مانند یک گسترش معمولی رنگ نشود و این مسئله باعث خطا در تشخیص شما در گرم منفی یا مثبت بودن باکتری خواهد شد.
- غلظت درست و تازه بودن رنگ‌ها هم در رنگ آمیزی موثر است .
- رنگ بری بیش از حد ممکن است باعث پاره شدن جدار باکتری‌های گرم مثبت شده در نتیجه این باکتری‌ها رنگ کریستال ویوله خود را از دست داده و رنگ ثانویه را جذب می‌کنند و 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.



شکل۲۳- مراحل رنگ آمیزی

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 روئیت 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 به‌بخار شدن کرد شعله را کنار ببرید همین که تبخیر متوقف شد دو بار کار را تکرار کنید و نگذارید رنگ بجوشد. مدت

۳min تـا ۵min بـه‌ترتیـب ذکـر شـده عمـل کنیـد و اگـر مالاشـیت گـرین کـاملا از روی لام تبخیـر شـد دوباره مقداری رنـگ بـه‌لام اضـافه کنیـد. بگذاریـد لام سـرد شـود تـا از شکسـتن آن جلـوگیری شـود. بـه موازات سرد شدن لام به‌اضافه کردن رنگ ادامه دهید زیرا رنگ هنوز در حال تبخیر است.

۳-۸-۲-۳ مرحله شستشو:

رنـگ اضـافی روی لام را خـالی کـرده در حالیکـه لام را بـه‌صـورت مایـل نگهداشـته‌ایـد بـا اسـتفاده از آب مقطر به‌آرامی به‌مدت۳۰ sec سطح روی گسترش را شستشو دهید.

۳-۸-۲-۴ رنگ آمیزی با سافرانین:

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

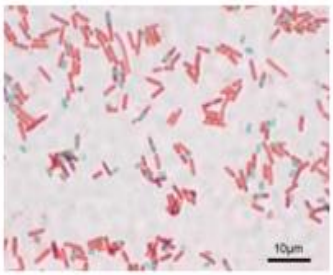
۳-۸-۲-۵ مرحله شستشو:

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

۳-۸-۲-۶ مشاهده و تفسیر:

در مشـاهده میکروسـکوپی لام رنـگ آمیـزی شـده، اسـپورها گـرد بیضـی بـه‌رنـگ سـبز مشـاهده می-شوند. و سلول‌های رویشی، قرمز دیده می‌شوند.

چون هاگ پوشـش مقـاومی اسـت کـه در برابـر نفـوذ رنـگ مقاومـت مـی‌کنـد بنـابر ایـن در رنـگ‌آمیـزی معمـولی مـی‌تـوان اسـپورها را بـه‌صـورت ناحیـه رنـگ نشـده در داخـل سـلول رویشـی (بـاکتری مولـد) مشاهده نمود. اگـر تعـداد اسـپورها موجـود کـم باشـد و یـا اگـر از داخـل بـاکتری مولـد خـارج شـده و در گستره بـه‌صـورت پراکنـده باشـند، اغلـب توسـط رنـگ-آمیـزی سـاده و یـا گـرم قابـل مشـاهده نخواهنـد بود.



شکل۲۴- اسپور

۴ نمونه برداری

نمونه‌هایی که به‌آزمایشـگاه ارسـال می‌شـود، 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 ر شد میکروارگانیسم‌ها در آن وجود ندا شته با شد. همچنین، در صورت عدم مطابقت نمونه با مندرجات نامه، نقص در بسته بندی، کافی نبودن مقدار نمونه، مشاهده آثار ظاهری ر شد میکروبی، شرایط نامناسب حمل به‌آزمایشگاه، نامناسب بودن درجه حرارت نمونه ها، سپری شدن تاریخ مصرف، عدم وجود اســـتاندارد میکروبی، قابلیت انجام آزمون میکروبیولوژی را دارا نبوده و به‌ارســـال کننده عودت داده می‌شـــود.برای کســـب آگاهی‌های بیش‌تر از شـــرایط کلی نمونه برداری و نگه‌داری نمونه، به‌منظور انجام آزمون‌های میکروبیولوژی، به‌استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۰۸۳۴، مراجعه کنید.

۵ روش‌های آزمون میکروبیولوژی

روش‌های آزمون میکروبیولوژی آب میوه، آب سبزی و نوشیدنی‌های بدون گاز در جدول شماره ۳ آورده شده است.

جدول۳- روش آزمون میکروبیولوژی آب میوه، آب سبزی و نوشیدنی‌های میوه‌ای بدون گاز

ردیف	نوع میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	باکتری‌های مقاوم به‌اسید	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۴۱۴
۲	باکتری‌های اسید لاکتیک	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴۷۲۱
۳	کره – شیرهای تخمیری و پنیر تازه – شمارش میکروارگانیسم‌های آلوده کننده– روش شمارش کلی در ۳۰ درجه سلسیوس	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۲۴۸
۴	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش جامع برای شمارش کلی فرم‌ها – روش شمارش کلنی	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۲۶۳
۵	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش جامع برای شمارش باکتری‌های بی‌هوازی احیا کننده سولفیت	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ۹۴۳۲
۶	کپک و مخمر	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۱۰۸۹۹
۷	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - شمارش گونه‌های احتمالی باسیلوس‌های اسپور-دارپروبیوتیک	طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ۱۲۱۰۵

۵ -۱ اصول آزمون

الف- شمارش

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

۶ محیط‌های کشت و رقیق‌کننده‌ها

دستورالعمل‌های کلی برای تهیه محلول‌های رقیق‌کننده و محیط‌های کشت در استانداردهای ملی ایران شماره‌های ۱،۳۴۱۴-۸۹۲۳، ۴-۸۹۲۳ و۹۸۹۹ تعیین شده است.

جدول ۴ –فهرست محیط‌های کشت

ردیف	نام مواد
۱	Plate Count Agar (PCA)
۲	Orange Serum Agar (OSA)
۳	Rogosa and Sharpe (MRS)
۴	Dichloran-rose Bengal-Chloramphenicol-Agar (DRBC)
۵	Crystal Violet neutral Red Bile Lactose Agar (VRBL)
۶	Brillian green lactose bile broth
۷	Iron Sulphite Agar (ISA)
۸	Saline peptone solation/ Ringer۱/۴ / Phosphate buffer solution / Bromocresol purple
۹	Trypticase soy agar or tryptone soya agar (TSA)
۱۰	Dextrose tryptone Purple Bromocresol Agar (DTA)

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 فراوردهها مراحل زیر را انجام دهید.

- 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.
- برای تهیه آزمونه حداقل از دو بسته آزمایه استفاده کنید.
- از عبور دادن ظروف باد کرده از روی شعله خودداری کنید.
- محتویات بطری در بسته را به‌وسیله تکان دادن و وارونه کردن آن به‌طور کامل مخلوط کنید .

۱-Easy open

۷-۲ کشت میکروبی

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

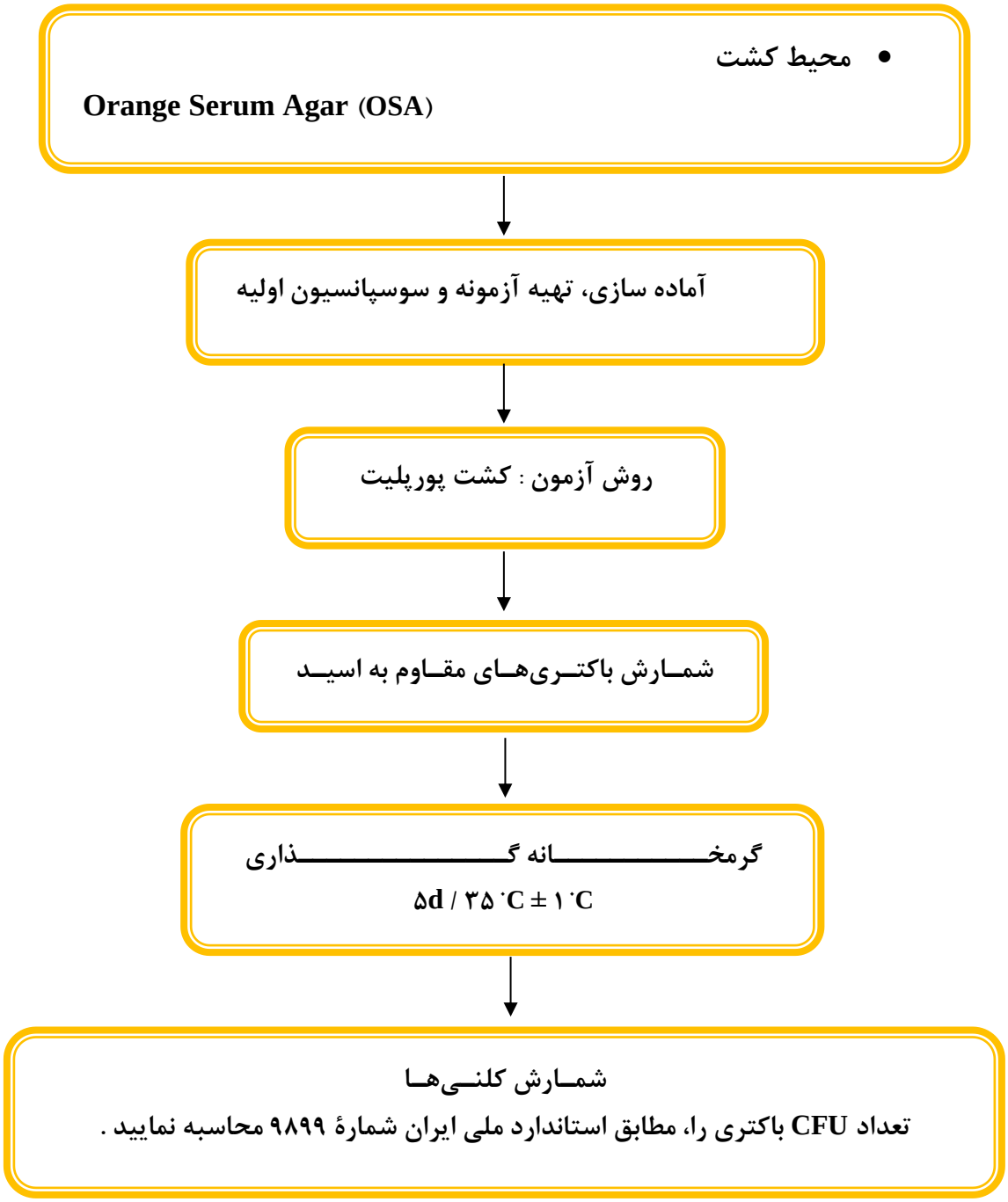
۷-۳ گرمخانه گذاری

بسته به‌نوع میکروارگانیسم مورد بررسی دمای گرمخانه و مدت زمان گرمخانه گذاری متفاوت است که در ادامه، برای هریک از میکروارگانیسم‌ها که در این فرآورده آزمون می شوند بیان شده است.

۴-۷ باکتری‌های مقاوم به‌اسید

۱-۴-۷ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۴۱۴، میکروبیولوژی نوشیدنی‌ها-آب میوه و فراورده‌های آن- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون

باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، هوازی و کم هوازی هستند که در pH =۲ تا pH =۴ به‌خوبی رشد و تکثیر می‌کنند.



۷-۵ باکتری های اسید لاکتیک

۷-۵-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴۷۲۱، شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک مزوفیل به‌روش شمارش پرگنه در ۳۰ درجه سلسیوس در مواد غذائی

باکتری‌های گرم مثبت، هوازی اختیاری، بی‌هوازی مطلق یا میکروآئروفیل و کاتالاز منفی هستند که به اسید مقاوم می‌باشند. این باکتری‌ها با تخمیر مواد قندی و تولید اسید لاکتیک، اسید استیک و دی‌اکسیدکربن، سبب فساد فراورده‌های غذایی اسیدی می‌شوند.از مهمترین باکتری‌های اسید لاکتیک، لاکتوباسیلوس‌ها، استرپتوکوک‌لاکتیس و لوکونوستوک‌ها می‌باشند.

لاکتوباسیلوس‌ها، بی‌حرکت، بدون کپسول و بدون اسپور می‌باشند و معمولا بیماری‌زا نیستند. حرارت ۶۰ °C را به‌مدت ۰/۵ h تحمل می‌کنند. در محیط‌های معمولی رشد آنها کند است pH مناسب برای رشد مناسب ۶ تا ۵/۵ است. وجود قند، عصاره مخمر در محیط کشت ضروری است.

- **محیط کشت**

Man Rogosa and SharpAgar (MRSA)

↓

آماده سازی، تهیه آزمونه و سوسپانسیون اولیه

↓

روش آزمون : کشت پورپلیت

↓

شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک مزوفیل

↓

گرمخانه گذاری

۷۲h ± ۳ h/۳۰ °C

↓

شمارش کلنی‌ها

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

۷-۶ شمـــــارش کلـــیفـــــرم‌هـــا

۷-۶-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۲۶۳، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش جامع برای شمارش کلیفرم‌ها – روش شمارش کلنی

این روش در مواردی که انتظار می‌رود تعداد کلنی‌های مورد شمارش بیش از ۱۰۰cfu/mL یا ۱۰۰cfu/g از آزمایه باشد، توصیه می‌شود.

کلیفرم‌ها گروهی از باکتری‌های خانوادهٔ آنتروباکتریاسه هستند گرم منفی، باسیل، متحرک، هوازی، بی‌هوازی اختیاری که در دمای ۳۰ °Cیا ۳۷ °C روی محیط کشت کریستال ویوله دارای قرمز خنثی، نمک های صفراوی، لاکتوز و آگار(VRBL)، کلنی‌های مشخص تشکیل می‌دهند و در آزمون تاییدی با تخمیر لاکتوز تولید گاز می‌کنند. این روش ارائه شده بسیار دقیق تر از سایر روش‌های ارائه شده برای شمارش کلی فرم‌ها است و در مواردی که تعداد کلیفرم‌ها در نمونه زیاد است ارجح داده می‌شود. با کار برد این روش حدود ۹۰٪ از سویه‌های خاص سیتروباکتر، انتروباکتر و کلبسیلا قابل جدا سازی است.

محیط کشت

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

- **روش انجام آزمون (شمارش)**

آماده سازی، تهیه آزمونه و سوسپانسیون اولیه و رقت

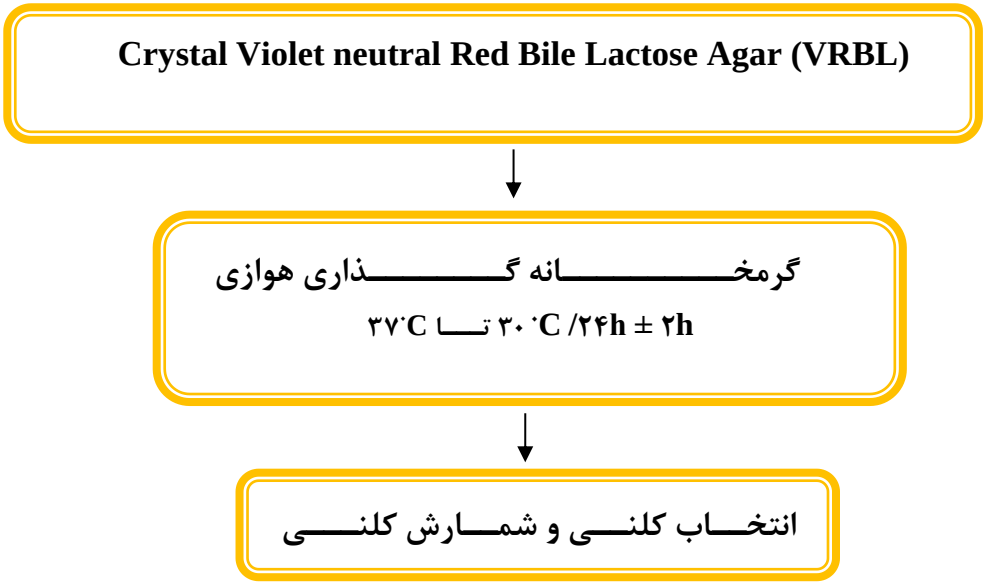
- برای هریک از فراورده‌های مایع و / یا رقت انتخاب شده، دو پلیت آماده کنید.
- استفاده از پیپت سترون مقدا ۱mL از فرآورده مایع یا رقت مناسب را در مرکز هر پلیت بریزید.
- برای هر رقت از پیپیت جداگانه استفاده کنید.

کشت پور پلیت

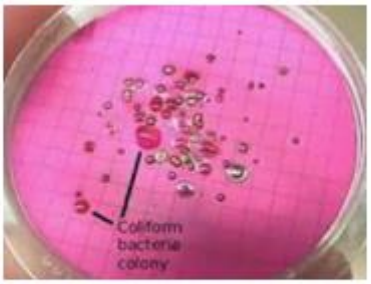
کنترل سترونی محیط کشت را با یک پلیت شاهد که فقط دارای ۱۵ mL محیط کشت است، تهیه کنید.

- مدت زمان بین تهیه سوسپانسیون اولیه تا هنگام ریختن محیط کشت در پلیت‌ها نباید از مدت زمان۱۵min، بیشتر شود.

- پس از بسته شدن کامل محیط کشت مجددا حدود۴ mL از محیط کشتVRBL با دمای۴۴ °C تا۴۷ °C را روی آن بریزید. سپس پلیت‌ها را روی سطح افقی و خنک قرار دهید تا بندد.



- **خصوصیات کلنی کلیفرم‌های شاخص**
- قرمز ارغوانی با قطر حداقل۰٫۵ mm گاهی با هاله مایل به‌قرمز ناشی از رسوب صفرا



شکل ۲۵- کلنی کلیفرم‌ها

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

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

آزمون تاییدی

↓

انتقال ۵ کلنـــی مشـــکوک به ۵ لولـــه محیط کشـــت
Brillian green lactose bile broth

شکل ۲۶- Brillian green lactose bile broth

گرمخـــــــــانه گـــــــــذاری لولـــــــــه‌ها
۳۰ °C / ۲۴h ± ۲h یـــــا ۳۷ °C / ۲۴h ± ۲h

↓

مشاهده حباب های گاز در لوله دورهام
Brillian green lactose bile broth

↓

شمارش کلنی‌ها

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

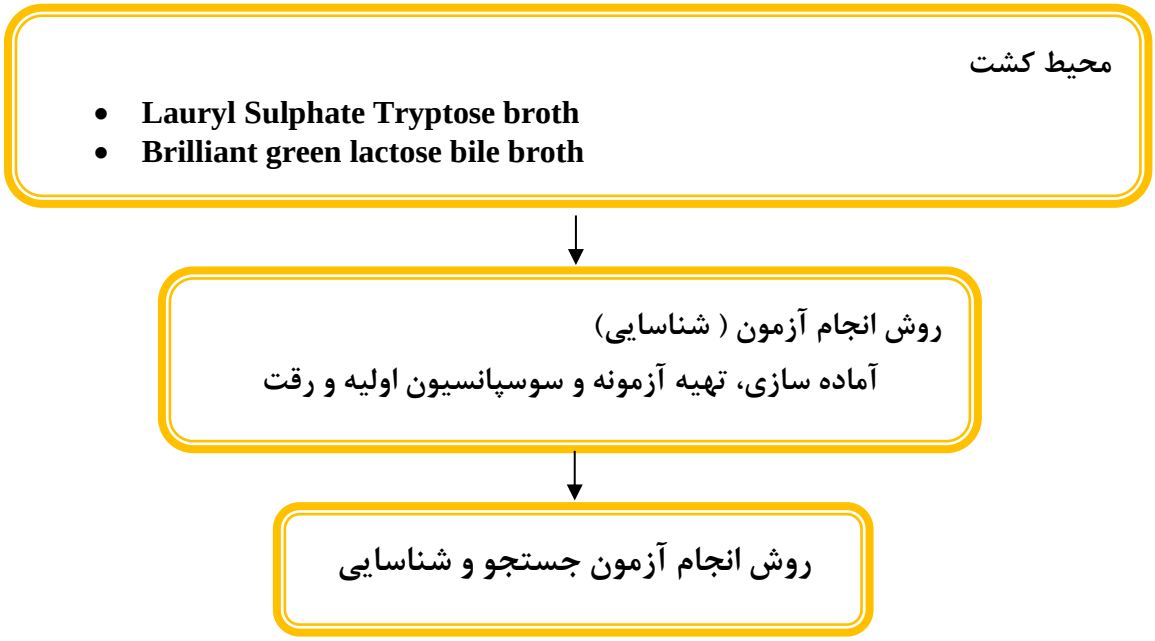
همچنین کلنی‌های تایید شده نیز در شمارش منظور شوند.

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

۷-۶ شناسایی و شمارش کلیفرم‌ها

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

شمارش با روش بیشترین تعداد احتمالی(MPN) در محیط کشت مایع بعد از گرمخانه‌گذاری، در دمای ۳۰ °C ±۱ °C یا ۳۷ °C ±۱ °C انجام می‌شود. همچنین کار برد این استاندارد به متغیرهای زیادی بستگی دارد



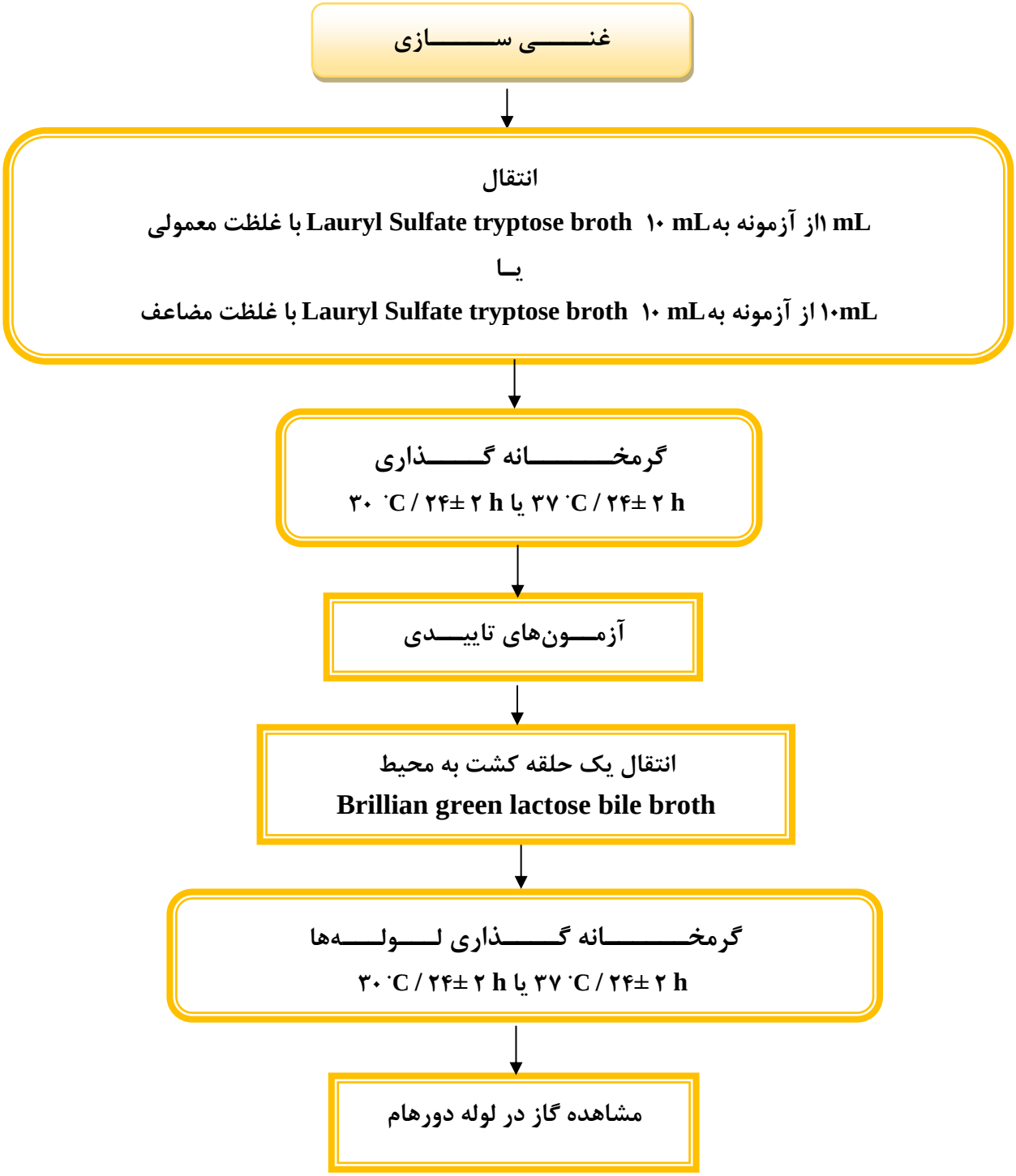
-بسته به‌حد جستجوی مورد نیاز، مقدار XmL از آزمایه را در مورد فراورده‌های مایع، یا مقدار XmL از سوسپانسیون اولیه را در مورد سایر فرآورده‌ها، به‌داخل یک لوله دارای mL ۱۰ از محیط کشت غنی کننده انتخابی منتقل کنید.

-اگر mL ۱۰ > x > mL ۱ باشد (مقدار متغیر باید بزرگتر از ۱ و کوچکتر از ۱۰باشد) از محیط کشت غنی کننده انتخابی با غلظت دو برابر استفاده کنید.

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

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

- روش جستجو و شناسایی



شکل۲۷- گاز در لوله درهام

در صورت عدم مشاهده گاز یا کدورت، گرمخانه‌گذاری را در دمای ۳۷ °C به‌مدت زمان۲h±۲۴h دیگر ادامه دهید.

- **تفسیر نتایج مثبت :**
  - نمونه از نظر وجود کلیفرم، مثبت است.

- **مشاهده میکروسکوپی:**
  - کلیفرم‌ها، گرم منفی و به‌اشکال میله‌ای شکل دیده می‌شود.

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

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

روش انجام آزمون شمارش

آماده سازی، تهیه آزمونه و سوسپانسیون اولیه و رقت

غنی سازی انتخابی

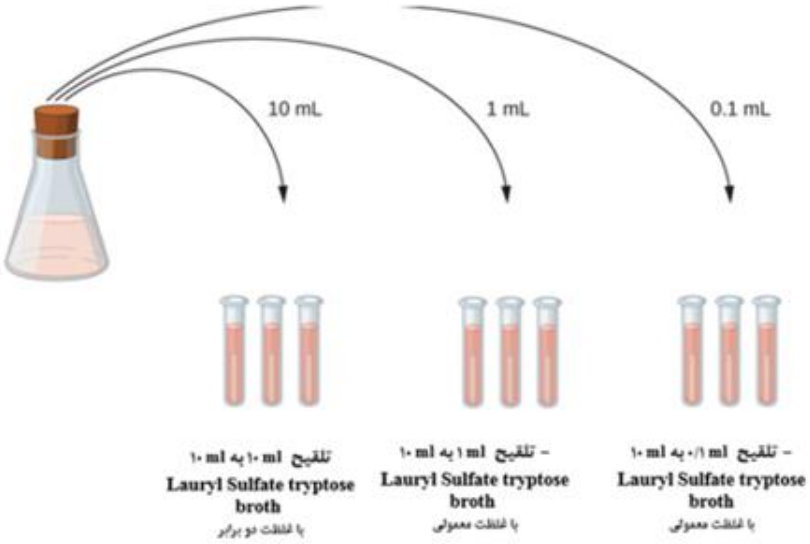
- سه لوله آزمایش بزرگ دارای۱۰mL محیط کشت غنی کننده انتخابی با غلظت دو برابر را انتخاب کنید به‌هریک به‌وسیله پی‌پت سترون ۱۰mL از نمونه مورد آزمایش چنانچه مایع

باشد، و یا ۱۰mLاز سوسپانسیون اولیه را در مورد سایر فرآورده‌ها اضافه کنید. این آزمونه برابر با یک گرم نمونه در هر لوله می‌باشد.

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

- سه لوله آزمایش دیگر دارای۱۰mL محیط کشت غنی کننده با غلظت معمولی را انتخاب کنید به‌هریک به وسیله پی‌پت سترون۱ mL از رقت‌های بعدی بدست آمده مانند: ۰/۰۱ ، ۰/۰۰۱ را اضافه کنید.
  - به‌کمک مخلوط‌کن مناسب ماده کشت داده شده را با محیط به‌خوبی مخلوط کنید.

    برای تهیه رقت‌های دهدهی، هر بار از یک پی‌پت سترون جدید استفاده کنید.



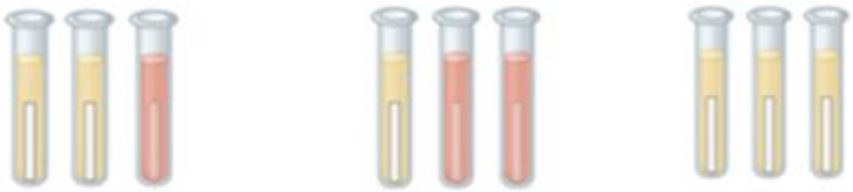
شکل ۲۸- تلقیح از سوسپانسیون اولیه

گرمخـــــــــانه گـــــــــذاری

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

لوله‌ها را از نظر تولید گاز یا کدورت بررسی کنید.

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



شکل ۲۹- Lauryl Sulphate Tryptose broth
بعد از گرمخانه‌گذاری

- چنانچه فرآورده در ته لوله محیط کشت چسبیده باشد و پس از ۴۸h دوره گرمخانه‌گذاری، کدورت بدون گاز ایجاد شود، آزمون تاییدی را انجام دهید.

آزمون تاییدی

↓

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

شکل ۳۰- Brilliant green lactose bile broth

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

در صورت عدم مشاهده گاز یا کدورت، گرمخانه‌گذاری را در دمای ۳۰°C یـا ۳۷°C به‌مدت زمان۲h ± ۲۴h دیگر ادامه دهید.

مشاهده گاز در لوله دورهام
(مثبت)

- **تفسیر نتایج**

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

- **تعیین مقادیر MPN**:

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

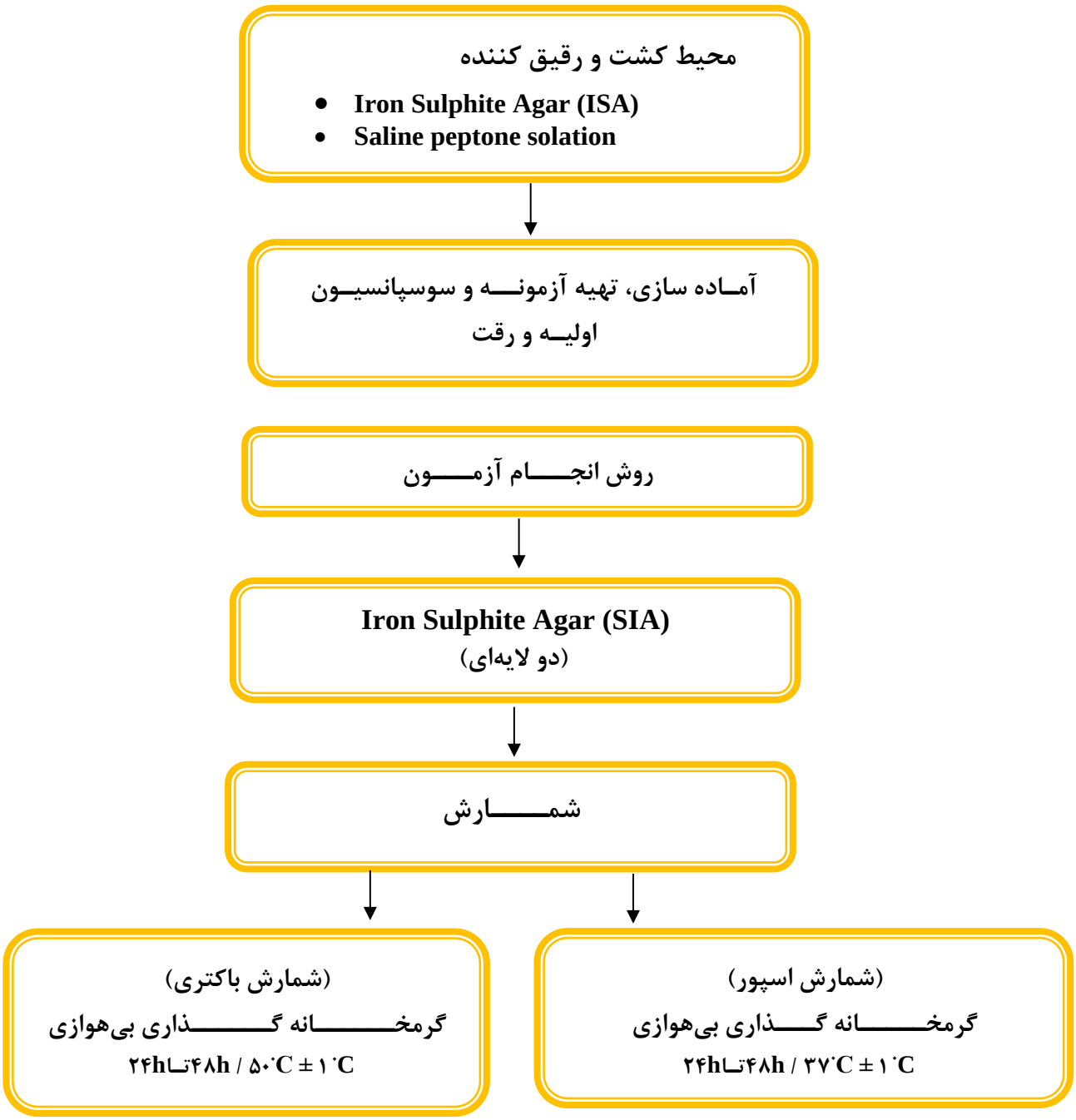
یادآوری- با استفاده از روش MPN مقادیر متفاوتی از نتایج ممکن است حاصل شود نتایج این روش، باید با احتیاط استفاده شود.

۷-۲۶ شمارش باکتری‌های بی‌هوازی احیا کننده سولفیت[۱]

۷-۲۶-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۴۳۲، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – روش جامع برای شمارش باکتری‌های بی‌هوازی احیا کننده سولفیت

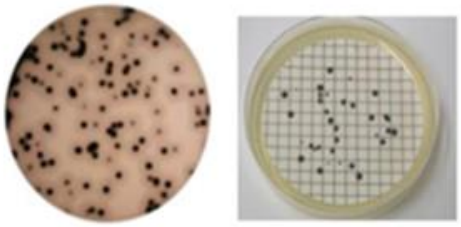
باکتری های احیا کننده سولفیت گروهی ناهمگون از نظر تاکسونومی هستند به‌این معنا که انواع اشکال و اندازه‌ها در بین اعضای این گروه دیده می‌شوند. برخی از این باکتری‌ها کوکسی شکل و برخی باسیل اند. برخی توانایی تولید اندوسپور دارند درحالی که بسیاری چنین توانایی را ندارند. در واقع هر باکتری که بتواند فرآیند احیای گوگرد اکسید شده به‌انواع احیا شده را انجام دهد بدون در نظر گرفتن قرابت تاکسونومیکی (یعنی اینکه به‌چه خانواده یا جنس باکتریایی تعلق دارد) در این گروه بررسی می‌شود. تمامی اعضای این گروه تنها در شرایط بی‌هوازی می‌توانند زندگی و فعالیت کنند بنابر این جزو باکتری‌های بی‌هوازی اجباری یا بی‌هوازی مطلق هستند. این باکتری‌ها برای رشد خود علاوه بر شرایط بی‌هوازی کامل نیاز به‌وجود سولفات یا سایر اشکال اکسید شده گوگرد و مواد آلی نیز هستند. کلستریدیوم‌ها باسیل‌های گرم مثبت، بی‌هوازی و اسپوردار هستند. می‌توانند سولفیت را در شرایط بی‌هوازی احیا کنند. بعضی ساکارولیتیک‌اند و از قندها، اسید و گاز تولید می‌کنند و بسیاری از آنها هم پروتئولیتیک هستند. این گروه باکتری‌ها فاقد آنزیم‌های سیتوکروم و سیتوکروم اکسیداز بوده و در نتیجه کاتالاز منفی می‌باشند. اغلب فاقد کپسول‌اند و متحرک می‌باشند. و به‌اکسیژن حساس می‌باشند و علت حساسیت آن‌ها به‌اکسیژن، مربوط به‌خود فلاوپروتئین‌ها است که اکسیژن را احیا کرده و تبدیل به‌مواد سمی برای باکتری می‌کنند. این باکتری‌ها فاقد آنزیم‌های خاصی مثل کاتالاز (که پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند)، پرکسیداز (که به‌واسطه آن $NADH + H_2O_2$ به NADو O_2 تبدیل می‌شوند) و سوپراکسید دیسموتاز (که به‌واسطه آن سوپراکسید به پراکسید هیدروژن تبدیل می-شود) هستند. این آنزیم‌ها سمیت پراکسید و رادیکال‌های آزاد اکسیژن را که طی متابولیسم در حضور اکسیژن تولید شداند را برطرف می‌کنند.

۱-Sulfate Reducing Bacteria (SRB)



کلنـی‌هـای سـیاه در محـیط کشـت کـه احتمـالا دارای هالـه سـیاه در محـیط کشـت هسـتند و نشـان دهنده حضـور بـاکتری‌هـای بـی‌هـوازی احیـا کننـده سـولفیت مـی‌باشـند را شـمارش کنیـد .سـیاه شـدن غیـر اختصاصـی و منتشـر شـدن در محـیط کشـت مخصوصـا هنگـامی کـه بـه‌جـای پلیـت از لولـه‌هـای کشت استفاده می‌شود، ممکن اسـت اتفـاق بیافتـد ایـن حالـت بـر اثـر رشـد بـاکتری‌هـای بـی‌هـوازی کـه فقط هیدرژن تولید می‌کنند و قادر بـه‌تولیـد هیـدرژن سـولفید نمـی‌باشـند اتفـاق مـی‌افتـد کـه مـی‌توانـد سبب احیای سولفیت و در نتیجه سیاه شدن کل محیط کشت گردند.

شکل ۳۱- شکل میکروسکوپی کلستریدیوم



شکل۳۲-کلنی های کلستریدیوم

۷-۱۳ باکترهای غیرلاکتیکی، مخمرها و کپک‌ها

۷-۱۳-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۲۴۸، کره – شیرهای تخمیری و پنیر تازه – شمارش میکروارگانیسم‌های آلوده کننده– روش شمارش کلی در ۳۰ درجه سلسیوس

محیط کشت

محیط کشت اختصاصی با ترکیبات: پپتون از کازئین، پپتون از ژلاتین، کلرید سدیم، آگار.

آماده سازی، تهیه آزمونه و سوسپانسیون اولیه و رقت

↓

روش انجام آزمون

↓

کشت سطحی در پلیت‌های از پیش ریخته

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

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

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

یادآوری– برای پخش کردن روی محیط کشت، می‌توان از یک پخش کننده برای پلیت‌های تلقیح شده با رقت‌های متوالی استفاده نمود، به‌شرطی که پخش کردن از رقت‌های بالاتر شروع شود.

↓

گرمخانه گذاری

۷۲ h ±۲h /۳۰ °C

- پس از پایان‌گذاری با استفاده از دستگاه کلنی‌شمار، کلنی‌ها را شمارش کنید. پلیت‌هایی را شمارش کنید که تعداد کلنی میکروارگانیسم‌های آلوده کننده بیشتر از ۱۵۰ کلنی نباشد.

- کلنی‌های سرسوزنی یا خیلی ریز که از لحاظ خصوصیات ظاهری شبیه میکروارگانیسم‌های آلوده کننده نیستند، شمارش نمی‌شوند.

- آزمون میکروسکوپی کلنی‌های به‌دست آمده ممکن است اطلاعاتی را در مورد منبع آلودگی به دست دهد بنابر این ثبت نوع کلنی‌های موجود (مخمر یا کپک، گونه‌های با-سیلوس خالص یا مخلوط) حائز اهمیت است .

شمارش کلنی‌ها

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

۷-۸ شمارش گونه‌های احتمالی باسیلوس‌های اسپوردار [1]پروبیوتیک

۷-۸-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ۱۲۱۰۵، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -شمارش گونه‌های احتمالی باسیلوس‌های اسپوردار پروبیوتیک

این روش آزمون برای انواع محصولات پروبیوتیک که باسیل‌های اسپوردار پروبیوتیک در آنها به‌کار رفته شده است و فرآیند حرارتی بر انها اعمال می‌شود، مانند بیسکویت، نان، کیک، کلوچه، غلات صبحانه، اسنک و فراورده‌های حجیم غلات، فراورده‌های گوشتی، آب‌میوه‌ها و نوشیدنی‌ها و انواع پودر کیک، فراورده‌های لبنی، پن‌کیک ماکارونی، ژله، شکلات، گز، کرم کاکائو، آدامس و همچنین در انواع مکمل‌های دارویی و دامی (دام وطیور و آبزیان) که این باکتری بدون طی فرایند حرارتی مورد استفاده قرار می‌گیرد، کاربرد دارد .

رقیق کننده‌ها، محیط کشت و معرف

- **Phosphate buffer solution**
- **Ringer۱/۴**
- **Dextrose tryptone Purple Bromocresol Agar (DTA-agar)**
- **Trypticase soy agar ((tryptone soya) (TSA))**

۱ -باسیلوس‌های گرم مثبت(متغیر)، اسپوردار، کاتالاز مثبت، متحرکت، هوازی اجباری یا بی‌هوازی اختیاری هستند. و در دمای بین°C ۵۵تا°C ۲۵ رشد می‌کنند. از باسیلوس‌ها مهم که دارای فعالیت پروبیوتیکی هستند گونه‌های: باسیلوس *سوبتیلیس* (*B.subtilis*)، باسیلوس*کوآگولانس* (*B.coagulans*) و باسیلوس *لیچنیفورمیس*(*B.leicheniformis*) می‌باشد.

روش آماده سازی آزمایه

آماده سازی آزمایه را طبق استانداردهای ملی ایران شماره‌های ۱-۸۹۲۳، ۴-۸۹۲۴ و ۵-۸۹۲۳ انجام دهید.

↓

آماده سازی سوسپانسیون اولیه

انتقال**۲۰ml ±۰/۲ml** یا **۱۰ml ±۰/۱ml** آزمایه + **۱۸۰ ml±۰/۲g** یا **۹۰ ml±۰/۱g به محلول رقیق کننده(PBS)و/یا Ringer**

↓

گرمخـــانه گـــــــذاری در انکوباتور شیکردار

۳۷ ˚C/ ۵۰ min تـــا ۶۰ min

یادآوری۱- انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۵۰-۱۰۰۰ دور در دقیقه، تنظیم شود.

شوک حرارتی

۱۰ min /۸۰˚C ±۲ ˚C

هشدار-در مدت زمان حرارت‌دهی، حتما نمونه را تکان داده یا از بن‌ماری شیکردار استفاده کنید. پروبیوتیک‌ها پس از مخلوط شدن، به‌سرعت تمایل به‌ته نشینی دارند. برای جلوگیری از این امر لازم است نمونه را به‌خوبی همگن کنید.

یـادآوری۱- در مـورد محصـولات قلیـایی یـا اسـیدی، اسـتفاده از رقیـق کننـده بـه‌گـونـه‌ای کـه در نهایـت پـس از افـزودن آزمایه pH سوسپانسیون به‌دست آمده ۲± ۷/۲ باشد.

یـادآوری۲- پیشـنهاد مـی‌شـود، در مـورد محصـولات کپسـوله شـده، از افزودنـی‌هـای غیـر مغـذی در رقیـق کننـده (بـه‌عنوان مثال: پلی اکسی اتیلن سوربیتان مونواولئات) یا معادل آن با درجه حرارت مناسب ۴۰ °C استفاده شود.

یادآوری۳- برحسب نوع محصول و ریزپوشانی سویه، تولید کننده‌ها می‌توانند تیمار خاصی را مشروط بر عدم استفاده از مواد مغذی در رقیق کننده، و قید این موضوع در بر چسب‌گذاری، ارائه کنند.

توصیه مهم : در مدت زمان حرارت دهی، نمونه را تکان دهید و یا از بن ماری شیکردار استفاده کنید . بی‌درنگ در آب سرد تا دمای ۴۵ °C تا ۵۰ °C آن را خنک کنید.

تهیه رقت‌های متوالی

به‌منظور برآورد مناسب تعداد سلول‌ها و دست‌یابی به‌پلیت‌های قابل شمارش توصیه می‌شود، سوسپانسیون اولیه تا حداقل رقت 10^{-6}، رقیق شود.

↓

کشت پورپلیت

↓

تلقیح ۱ml از رقت‌های مناسب

برای مثال(10^{-4}، 10^{-5}، 10^{-6})

↓

DTA-agar , Bromocresol purple / TSA-agar

بروموکروزول[1] ارغوانی به‌عنوان یک شاخص pH در تیتراسیون‌ها و رشد میکروارگانیسم‌ها عمل می‌کند دامنه تغییرات pH این معرف رنگی، از ۵٫۲ تا ۶٫۸ می‌باشد.

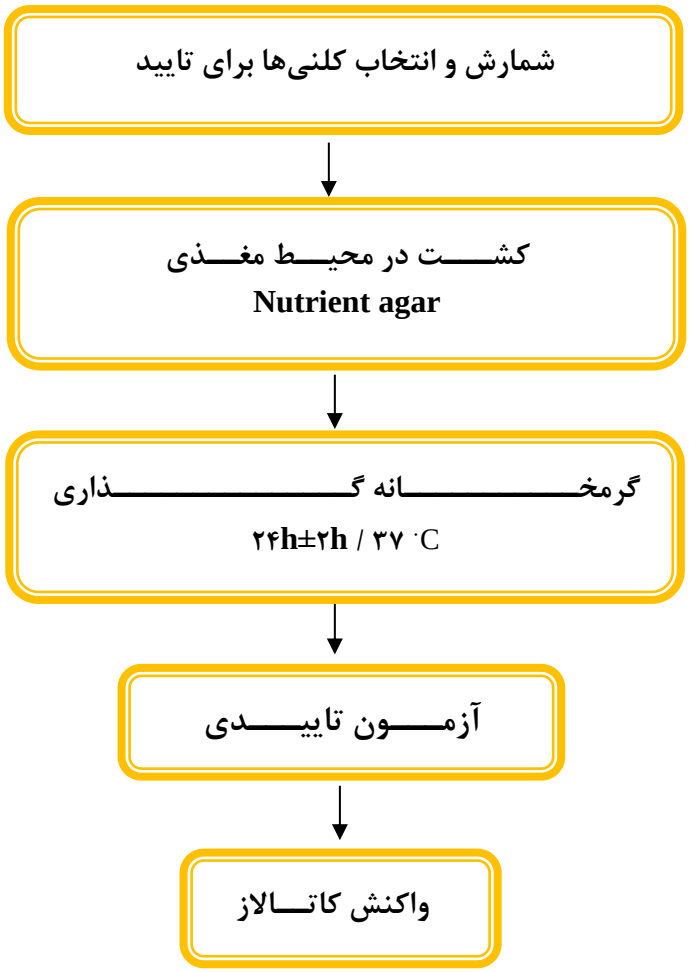
گرمخانه گذاری

۲۴ h-۴۸h /۳۷°C ±۱ °C

- **ویژگی کلنی در محیط کشت دکستروز تریپتون دارای برموکروزول ارغوانی**
  - کلنی‌های با هاله زرد رنگ

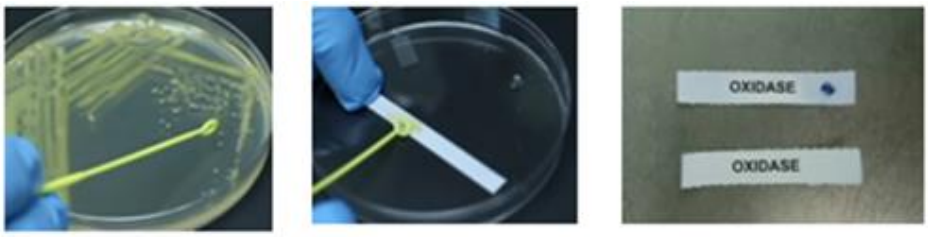
[1]- Bromocresol

- **ویژگی کلنی در محیط کشت تریپتیک سوی آگار**
  - کلنی‌های سفید تا شیری



- **تفسیر** :باسیلوس‌های اسپوردار پروبیوتیک کاتالاز مثبت می‌باشند.

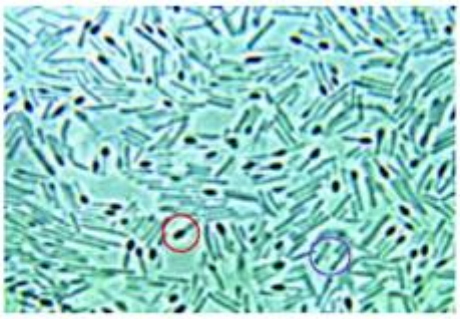
با استفاده از لوپ، قسمتی از کلنی را مطابق شکل ۳۳برداشته و بر روی یک کاغذ صافی (قطرات روی کاغذ صافی خشک شوند) در یک پلیت قرار داده آغشته به‌معرف اکسیداز قرار دهید و واکنش مثبت در مدت زمان ۱۰sec به‌صورت ایجاد رنگ سیاه مشاهده می‌گردد.



شکل۳۳ – واکنش اکسیداز

- **تفسیر :**

باسیلوس‌های اسپوردار پروبیوتیک اکسیداز منفی می‌باشند.



شکل۳۴- شکل میکروسکوپی باسیلوس کواگولانس

آزمون لستیناز

آزمون لستیناز

مشاهده کلنی با هاله رسوب‌دار در محیط کشت MYP یا PEMA، پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۰ °C به مدت زمان۱۸hتا۲۴h، نشان دهنده لستیناز مثبت است.

یادآوری – محیط کشت MYP دارای امولسون زرده تخم مرغ است و برای مشاهده کلنی صورتی رنگ که دارای آنزیم لستیناز می‌باشد، کاربرد دارد .

برای اطلاعات بیشتر در خصوص آزمون تاییدی به استاندارد ملی ایران شماره۱- ۲۳۲۴، مراجعه کنید .

- **تفسیر :**

آنزیم لستیناز، لستین را به‌فسفوریل‌کولین و یک دی‌گلیسرید تجزیه می‌کند. pH مناسب برای فعالیت این آنزیم ۷ تا ۷/۵ است همچنین یون کلسیم فعالیت این آنزیم را تشدید می‌کند. لستیناز

نـه‌تنهـا لسـتین، بلکـه فسـفولیپیـدهای دیگـر ماننـد اسـفنگومیلـین، فسـفاتیدیل‌اتـانول‌آمـین، سـفالین و ترومبوپلاستین را نیز هیدرولیز می‌کند.
باسیلوس‌های اسپوردار پروبیوتیک لستیناز منفی می‌باشند.

آزمون حرکت

- **تفسیر :**

باسیلوس‌های اسپوردار پروبیوتیک معمولا متحرکت هستند.

شمـــارش کلنـــی‌هـــا

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

۷-۶ قارچ‌ها[۱]

قارچها یوکـاریوت، هتروتـروف، غیـر فتوسـنتتیک بـوده و بـرای رشـد و تکثیـر بـه‌ترکیبـات آلـی و کـربن نیـاز دارنـد قارچهـا هـوازی و یـا بیهـوازی اختیـاری هسـتند. تولیـد مثـل آنهـا بصـورت جنسـی یـا غیـر جنسی با تشکیل اسپور، جوانـه زدن و تقسـیم سـلولی مـی‌باشـد قـارچهـا توانـایی رشـد در رطوبـت کـم و دمای پایین را دارنـد pH مناسـب بـرای بیشـتر گونـه‌هـا ۵/۶ و محـدوده pH بـرای آنهـا بـین ۲ تـا ۹ اسـت ساختار اغلب قارچها از رشته‌ها و یا ریسه‌های نخی شکل به‌نام هیف تشکیل شده است.
در قارچهای پسـت، ریسـه هـا یـا هیـف‌هـا فاقـد دیـواره عرضـی هسـتند. انشـعابات هیـف‌هـا یـا ریسـه‌هـا شبکه‌ای به نام میسیلیوم را بـه‌وجـود مـی آورنـد. شـبکه میسـیلیوم را مـی‌تـوان بـه‌صـورت کپـک بـر روی مواد آلی مختلف مشاهده کرد. آنـزیم‌هـایی کـه توسـط قـارچهـای مختلـف بـه‌وجـود مـی‌آینـد مـی‌تواننـد انواع مواد آلی را تجزیه کرده و به‌مواد سـاده‌تـری تبـدیل کننـد. قـارچهـا از لحـاظ سـاختار یاختـه‌ای جـزء یوکـاریوت‌هـا هسـتند، در اطـراف هسـته و دیگـر اجـزای یاختـه غشـای دو لایـه وجـود دارد. در اطـراف یاختـه، دیـواره‌هـای یاختـه‌ای حـاوی کیتـین قـرار مـی‌گیرنـد. قـارچهـا بـه‌کپـک‌هـا، مخمرهـا تقسـیم

[۱]-Fungi

می‌شوند. میزان رشد قارچ[1]، سطح کلنی[2]، رنگ کلنی[3]، وجود رنگدانه، مشاهده میکروسکوپی[4]دارای ارزش تشخیصی است.

۷-۶-۱ کپک‌ها[5]

کپک‌ها، قارچ‌های رشته‌ای، هوازی هستند آنها غیر فتوسنتتیک، چند سلولی، هتروتروف، هوازی، هستند. کپک‌ها تولید واحدهای میکروسکوپی بنام تال [6] می‌کنند که با تجمع آنها، جرم رشته‌ای تشکیل می‌گردد که به‌آن میسیلیوم گفته می‌شود. معمولا به‌صورت کلنی ،پروپاگول[7] یا جوانه[8] صاف یا کرکدار، اغلب با ساختار اسپورزایی یا تولید مثل رنگی در سطح محیط‌های کشت قارچی رشد می‌کنند. بهترین رشد کپک‌ها در محیط اسیدی با غلظت بالای قند می‌باشد. کلنی‌های ایجاد شده توسط کپک‌ها، به‌رنگ‌های مختلف سفید، آبی، سبز، خاکستری، و بنفش می‌باشد کلنی ممکن است به‌صورت برجسته یا فرورفته، چین دار یا مسطح، خامه‌ای با قوام بسیار محکم باشند در پاره‌ای از موارد کلنی‌ها به‌صورت کرکی شکل یا پنبه‌ای شکل می‌باشند کپک‌ها علاوه بر سطح در عمق محیط کشت نیز می‌توانند کلنی‌های گرد عدسی شکل ایجاد کنند.طبقه بندی کپک‌ها بر اساس شکل ظاهری (مورفولوژی) و تشکیل یا عدم تشکیل اسپور جنسی استوار است. وقتی شرایط برای فعالیت آن‌ها نامساعد شود فوراً ایجاد اسپور می‌کنند، اسپورها در برابر خشکی و سرما مقاوم می باشند و در فضا پراکنده می‌شوند و با مساعد شدن شرایط به‌سرعت تبدیل به‌شکل فعال می‌گردند کپک‌ها با تجزیه مواد غذایی موجب فساد مواد غذایی می‌شوند.

---

[1] - مسطح، برجسته، منظم یا غیر منظم

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

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

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

۵-Mold

۶-Hypha(Tall)

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

۸-Germ

مهمترین کپک‌های مواد غذایی از دسته *پنی‌سیلیوم*[1]، *موکور*[2]، *رایزوپوس*[3]، *فوزاریوم* [4]و *آسپرژیلوس* [5] می‌باشند. گروهی از کپک‌ها دارای اگزوتوکسین[6] هستند ترشح اگزوتوکسین کپک‌ها غالبا در حرارت بالاتر از$^{\circ}C$ ۱۰ صورت می‌گیرد.

۷-۶-۲ مخمرها [7]

مخمرها یکی از گروه‌های قارچ‌های فاقد رشته هستند به‌همین دلیل تک سلولی می‌باشند و بوسیله جوانه زدن تکثیر پیدا می‌کنند مخمرها پروتئولیتیک نیستند و در کارخانجات تخمیر صنعتی، نانوایی، کارخانجات تقطیر به‌کار می‌روند این میکروارگانسیم‌ها تحت شرایط بی‌هوازی، قند را متابولیزه می‌کند و تولید الکل و به‌میزان کمی تولید سلول جدید می‌کند در شرایط هوازی تولید سلول بیشتری می‌کند و الکل تولید نمی‌شود کلنی‌های مخمرها خامه‌ای با قوام بسیار نرم است غالباً تک یاخته هستند و ایجاد میسلیوم‌های کاذب می‌کنند.تولید مثل غیرجنسی آن‌ها اغلب به‌صورت جوانه زدن و در برخی بصورت تقسیم دوتائی می‌باشد. بیشتر گونه‌های آن تخمیرکننده و غیربیماری‌زا هستند.

۷-۶-۳ شمارش کپک و مخمر

۷-۶-۳-۱ 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 فراورده‌های با فعالیت آبی(a_w)[8] بیشتر از ۰/۹۵

۱-Penicillium

۲-Mucor

۳-Rhizopus

۴-Fusarium

۵-Aspergillus

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

۷-Yeast

۸-(Water activity) فعالیت آبی معیاری است از آب قابل استفاده برای رشد میکروارگانیسم‌های درون مواد غذایی و عبارت است از نسبت فشار بخار آب غذا به‌فشار بخار آب خالص در شرایط مساوی از نظر فشار و دما.

محیط کشت

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

تهیه محیط کشت:

- **دی‌کلران رز بنگال کلرام فنیکل آگار**

محیط کشت دی‌کلران رز بنگال کلرام فنیکل آگار را طبق دستورالعمل سازنده آماده کنید.pH محیط را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون شدن، برابر۵/۶ ±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 زمان 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 به‌مقدار ۱mL به ازاء هر۱L محیط کشت توصیه می‌شود.

- افزودن اختیاری عناصر کمیاب:

کپک‌ها برای نمایش خصوصیات کامل ریخت شناسی به‌ویژه رنگدانه‌های خود نیاز به‌عناصر کمیاب دارند که ممکن است در محیط DRBC موجود نباشد 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 یک ۱ mL به‌ازاء هر ۱ L محیط کشت، پیش از سترون کردن به‌آن بیفزایید.

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

- افزودن اختیاری کلرو سیکلین هیدرو کلراید

برای جلو گیری از رشد بیش از حد باکتری‌ها، افزودن کلرامفنیکل و کلرو تتراسیکلین توصیه می‌شود. محیط پایه رادر حجم ۵۰ mg/L تهیه کنید و در حجم‌های۱۰۰mL توزیع و سترون کنید. محلول ٪ ۰/۱ کلرو تترا سیکلین هیدرو کلراید در آب مقطر را به صورت تازه 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. (۱ mL به ازا هر ۱ L محیط کشت توصیه می‌شود.

- افزودن اختیاری ترجیتول:

به‌منظور 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.

آزمون عملکرد برای تضمین کیفیت محیط کشت

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

آماده سازی، تهیه آزمونه و سوسپانسیون اولیه و رقت

- ✓ به‌دلیل رسوب سریع اسپورها در پی‌پت، پس از پر کردن پی‌پت‌ها با سوسپانسیون اولیه یا رقت‌ها ،آن را به‌صورت افقی نگه‌دارید . برای جلوگیری از رسوب ذرات دارای میکروارگانیسم، سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها را به‌هم بزنید.

- ✓ روش کشت سطحی به‌دلیل بر قراری حداکثر تماس سلول‌ها با اکسیژن هوا و نیز پیشگیری از هر گونه مخاطره ناشی از غیر فعال شدن 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

↓

با استفاده از پی‌پت سترون مقدار ۰/۱mL از آزمایه (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 پی‌پت سترون دیگر مقدار ۰/۱mL از اولین رقت اعشاری (فرآورده مایع)، یا ۰/۱mL از رقت 10^{-2} (سایر فرآورده‌ها) را به یک پلیت دیگر دارای محیط کشت DRBC تلقیح کنید.

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

Dichloran-rose Bengal-Chloramphenicol-Agar(DRBC)

↓

گرمخانه گذاری

۳d-۵d / ۲۵ °C

- پلیت‌ها را به‌صورت 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 *زیرومایسیزبیسپوروس*[1] وجود داشته باشد، پلیت‌ها را به‌مدت زمان d ۱۰ گرمخانه‌گذاری کنید.
- توصیه می‌شود که پلیت‌ها، در یک کیسه پلاستیکی در باز قرار داده شوند تا از انتشار کپک‌ها از داخل پلیت ها سبب آلودگی انکوباتور نشود.

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

شمارش کلنی‌ها

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

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

روش آزمون

↓

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

↓

Dichloran-rose Bengal-Chloramphenicol-Agar (DRBC)

↓

گرمخـــــــــــانه گـــــــــــذاری

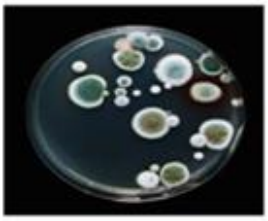
۳d-۳d /۲۵°C

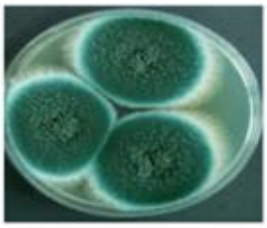
✓ به‌منظور افزایش به‌منظور افزایش رطوبت داخل انکوباتور، یک بشر آب مقطر داخل آن قرار دهید. گرمخانه‌گذاری بیشتر از d ۵ بستگی به‌دما و میزان رشد دارد.

۱-Xeromyces bisporus

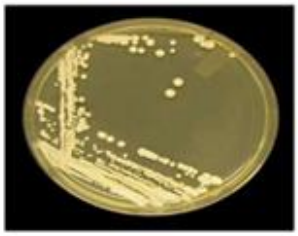
✓ در صورتی که انتظار دارید تعداد زیادی میکروارگانیسم مورد شمارش قرار گیرند، برای دستیابی به‌شمارش کلنی‌ها، رقت‌های بیشتری را کشت دهید.

- **ویژگی‌های کلنی مخمر**
  - گرد
  - مات یا درخشان، معمولا دارای پیرامون منظم و با تحدب کم یا زیاد





شکل۳۵- کلنی کپک‌ها



شکل ۳۶- کلنی مخمرها

شمارش کلنی‌ها

تعداد CFU کپک و مخمر را در هر میلی‌لیتر نمونه را، مطابق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹محاسبه کنید.

۸ بیان نتیجه آزمون

۸-۱ شمارش

تعداد N میکروارگانیسم های موجود در نمونهٔ

S را با استفاده از پارامترهای زیر محاسبه کنید:

m میانگین حسابی[۱] به‌دست 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 فرمول های ۱ ، ۲ و ۳ تعداد میکروارگانیسم های موجود در نمونه را محاسبه کنید:

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

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

۱- Arithmetic mean

۲- Weighted mean

$$N = \frac{\overline{x_c}}{(V \times d)} \qquad (۳)$$

که در این فرمول‌ها،

m میانگین حسابی به دست آمده از دو پلیت ،

V حجم ماده تلقیحی به‌هر پلیت، به‌میلی لیتر ،

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

c تعداد کلنی های شمارش شده روی یک پلیت ،

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

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

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 معنی‌دار گرد کنید.

۸-۲ صحه‌گذاری

۸-۲-۱ صحه‌گذاری شمارش

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

پیوست الف

استانداردهای مرتبط با میکروبیولوژی آب میوه، آب سبزی و فراورده‌های آنها

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 آزمون های میکروبیولوژی مواد غذایی توجه به‌نکات زیر حائز اهمیت است:

- فقط میکروارگانیسمهای موجود در نمونه جداسازی یا شمارش شوند؛
- میکروارگانیسمهای فوق باعث آلودگی محیط نشوند.

به‌منظور دستیابی به‌موارد فوق باید تا حد امکان به‌بهداشت فردی توجه شود و روش‌هایی که از آلودگی های خارجی پیشگیری می‌کند به‌کار رود.

در این استاندارد برای اقدامات احتیاطی در طول آزمون، مثالهای کمّی ارائه می‌شود. بنابر این داشتن اطلاعات کلی در زمینه روش‌های میکروبیولوژی و میکروارگانیسم‌ها ضروری است. همچنین انجام آزمون-ها و شمارش میکروارگانیسم‌ها به‌روش صحیح داری اهمیت است.

از آن جایی که دستکاری نمونه‌ها هنگام آزمون، ممکن است به طور ناخواسته سبب آلودگی متقاطع شود، آزمون کننده باید صحت نتایج روش های خود را تصدیق کند. انجام اقدامات احتیاطی خاص نه تنها به-دلائل بهداشتی بلکه برای حصول اطمینان از تجدیدی پذیری خوب نتایج ضروری است. تعیین اقدامات احتیاطی در همه شرایط امکان پذیر نیست، ولی این استاندارد حداقل اقدامات اصلی را که باید هنگام آماده سازی، سترون سازی و انبارش محیط‌های کشت و تجهیزات در نظر گرفته شود، تعیین می‌کند.

الف ۲ - استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۶۰۰، نوشیدنی ها -کاهش و پیشگیری از آلودگی پاتولین در آب سیب و فراوردههای آن - آئین کار

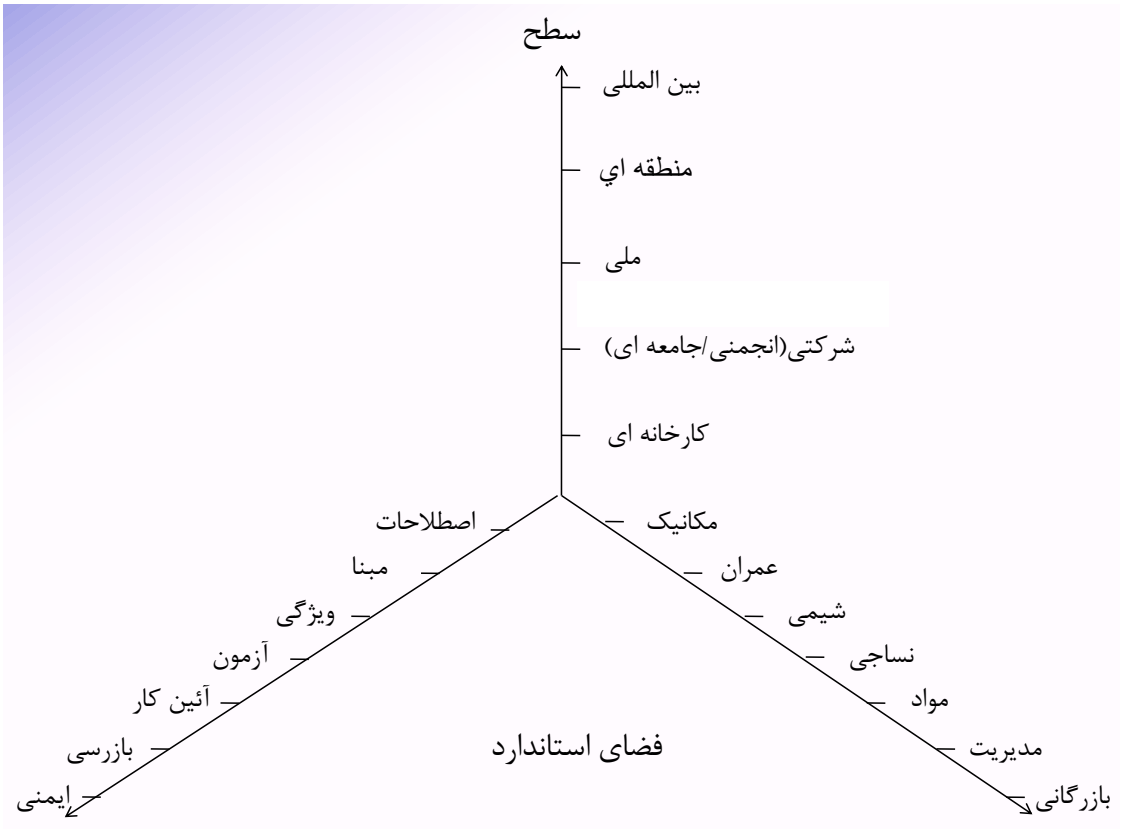
این استاندارد راهنمایی است که با در نظر گرفتن نیازهای خاص صنعت تولید آب سیب تهیه شده و رهنمودهای مربوط به‌راهکارهای خوب ساخت(GMP) را برای این فراورده ارائه می‌دهد. این راهنما توصیه‌های سازمانی و عملی در زمینه کشاورزی و عوامل تاثیرگذار بر کیفیت فراورده را ارائه می‌دهد

الف ۳ - استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۴۷۲۳، آب میوه و آب میوه تغلیظ شده و نکتار میوه-آئین کار بهداشتی تولید

این استاندارد با در نظر گرفتن نیازهای خاص صنعت آب میوه و آب میوه تغلیظ شده و نکتار میوه‌ها تهیه شده و رهنمودهای مربوط به‌راهکارهای خوب ساخت(GMP) را برای فراوردههای 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 آب میوه و آب میوه تغلیظ شده و نکتار نوشته شده است و دستیابی به فرآورده‌ای منطبق با ویژگی‌های خاص را امکان پذیر می‌سازد.

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 می توان آن‌ها را به‌صورت زیر تقسیم بندی کرد:

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

ب- استانداردهای ملی (مانند ISIRI, BS, BIS ASTM , و ...)، این گونه استانداردها به‌وسیله سازمان استاندارد در یک کشور که به‌عنوان مقام ذی صلاحی برای این کار شناخته شده است، تهیه می شود. در تدوین این استانداردها تمامی افراد ذی نفع از قبیل تولید کنندگان، مصرف کنندگان، اعضای مراکز علمی و فنی، مراکز تجاری کارشناسان مرتبط از سازمان ها یا مراکز دولتی و امثال آن شرکت دارند.

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

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

ب-۳- جنبه استاندارد

در راستای رشد و تکامل دانش بشری جنبه‌های مختلف استاندارد نیز گسترش یافته و 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 ...)

ب-۴- اجرای استاندارد

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

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

ب- 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)

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

پ-۴- بازرسی (Inspection)

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

پ-۵-درستی (Accuracy)

نزدیکی نتیجه اندازه‌گیری یک کمیت با مقدار واقعی آن کمیت است.

پ-۶- دقت (Precision)

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

پ-۷- تجدید پذیری (Reproducibility)

نزدیکی میزان مقادیر بدست آمده از 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 می نماید.

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

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

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

برای اطلاع از وظایف ، قوانین، تخلفات ، تنبیهات و سایر موارد مهم، 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 ۱۱۹/۵۰/د)، نواقص موجود در کالاهای تولید شده به‌سه دسته به‌شرح زیر تقسیم می گردند:

ت-۲-۱-۱ نقص بحرانی:

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

ت-۲-۱-۳ نقص جزئی:

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

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

در صورتی که در نتایج آزمون فرآورده نمونه برداری شده ، هریک از نواقص فوق مشاهده شوند، امتیاز منفی 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 به‌صورت 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 به۹۰ 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 می کند.

ت-۳-۳ در مورد کالاهای مشمول استاندارد اجباری، در صورتیکه امتیاز منفی یک گزارش نتیجه آزمون و یا جمع امتیازات منفی نتایج چند آزمون به ۱۲۰ رسید، اداره کل استاندارد استان مربوط، علاوه بر اخطار کتبی، برای جمع آوری کالای مغایر با استاندارد ملی با شماره سری ساخت مربوط موضوع را 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 انواع آب میوه، نکتارهای میوه، نوشیدنی‌های میوه‌ای بدون گازطبق استاندارد ملی ایران شماره ۳۴۱۴

ردیف	شرح آزمون	درجه اهمیت
۱	باکتری‌های مقاوم به‌اسید	عمده
۲	باکتری های اسید لاکتیک	عمده
۳	کپک و مخمر	عمده