



ریاست جمهوری  
سازمان ملی استاندارد ایران



## جزوه دوره کارآموزی میکروبیولوژی انواع چای



شماره مدرک : ۶۲۲/۱۶/ج

تاریخ تصویب : ۱۳۹۷

شماره تجدید نظر:

تاریخ تجدید نظر:

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

## به نام خدا

### آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

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

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

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

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

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

---

1- International Organization for Standardization

2- International Electrotechnical Commission

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

4-Contact point

5- Codex Alimentarius Commission

## پیشگفتار

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

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

از مدرسین گرامی و فراگیران محترم تقاضا می گردد، در صورت وجود نقطه نظرات و پیشنهادات در جهت ارتقاء کیفیت آموزشی مربوطه با شماره تلفن ۰۲۱-۸۸۸۷۹۴۶۹ تماس حاصل نموده و یا از طریق پست الکترونیکی [isiri.amozesh.qc@gmail.com](mailto: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

عنوان دوره کارآموزی:  
میکروبیولوژی انواع چای

### گروه مخاطب:

کارشناسان ادارات کل استاندارد استان‌ها، مدیران کنترل کیفیت واحدهای تولیدی و کارشناسان آزمایشگاه‌های همکار

### هدف از برگزاری دوره آموزشی:

هدف از برگزاری این دوره کارآموزی آشنایی با آزمون‌های میکروبیولوژی انواع چای بر اساس استاندارد ملی ایران ۱۷۰۷۰ می‌باشد و موارد زیر را در بر می‌گیرد:

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

### توانایی‌های آموزشی گیرندگان پس از طی دوره:

- نحوه استفاده صحیح از تجهیزات مورد نیاز در آزمایشگاه
- روش تهیه و سترون‌سازی محیط کشت‌های مورد نیاز
- روش آماده‌سازی و سترون‌سازی وسایل مورد نیاز
- روش آلودگی زدایی مواد مصرفی و وسایل
- روش اجرای آزمون طبق استاندارد
- شناسایی و شمارش باکتری‌ها

### پیش نیاز:

ندارد

## رئوس مطالب آموزشی:

منبع / استانداردها	اجراکننده		مدت آموزش (ساعت)		محتوای آموزشی	رئوس مطالب	ردیف
	کارآموز	مدرس	عملی	تئوری			
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹		*		۱	آشنایی با وسایل مورد نیاز آشنایی با اصول آزمایشگاهی آشنایی با قسمت های مختلف آزمایشگاه میکروبیولوژی	آشنایی با الزامات فنی آزمایشگاه میکروبیولوژی	۱
استانداردهای ملی ایران و ۱۷۰۷۰ ۹۸۹۹	*	*	۰/۵	۰/۵	روش تهیه محیط کشت مرتبط با چای و اتوکلاو کردن محیطها	آشنایی با روش تهیه محیط کشت های مورد نیاز و روش سترون سازی	۲
استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹	*	*	۰/۵	۰/۵	روش آماده سازی و سترون سازی وسایل مورد نیاز	آماده سازی وسایل مورد نیاز و روش سترون سازی وسایل	۳
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۱۷۰۷۰		*		۰/۵	هدف و دامنه کاربرد، مواد و دستگاه های مورد نیاز جهت انجام آزمون	آشنایی با استاندارد روش آزمون	۴
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۱۷۰۷۰		*		۱	آشنایی با باکتریهای احتمالی موجود در چای	آشنایی با شاخص های میکروبی و حدود مجاز آنها در چای	۵
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۱۷۰۷۰	*	*	۰/۵	۰/۵	تهیه سوسپانسیون اولیه و سایر رقتها با استفاده از رقیق کننده مناسب	روش آماده سازی نمونه در آزمایشگاه	۶
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۱۷۰۷۰	*	*	۱	۱	استفاده از سوسپانسیون اولیه و یا رقت های مورد نیاز در پلیت، برای شمارش استفاده از سوسپانسیون اولیه و یا رقت های مورد نیاز در لوله های دارای محیط کشت مناسب برای جستجو	روش شمارش و جستجوی باکتری ها	۷

منبع / استانداردها	اجراکننده		مدت آموزش (ساعت)		محتوای آموزشی	رئوس مطالب	ردیف
	کارآموز	مدرس	عملی	تئوری			
جزوه آموزشی و استانداردهای ملی ایران ۱۷۰۷۰		*		۰/۵	گرمخانه‌گذاری در دما و زمان مناسب بر حسب باکتری‌های مورد نظر	گرمخانه‌گذاری	۸
جزوه آموزشی و استانداردهای ملی ایران ۱۷۰۷۰	*	*	۱	۱	بررسی و نحوه شمارش و محاسبه کلنی‌ها پس از گرمخانه‌گذاری - تعیین وجود یا عدم وجود باکتری‌ها - انجام آزمون‌های بیوشیمیایی مناسب جهت تایید	تشخیص، شمارش کلنی‌ها و آزمون تاییدی	۹
استانداردهای ملی ایران ۱۷۰۷۰		*	۱	۱	نحوه گزارش نتایج بررسی شده	ارائه گزارش آزمون	۱۰
مدت دوره: ۲ روز							

#### سایر استانداردها و منابع:

- استاندارد ملی ایران ۱۸۳۶: ایین کار-اصول کلی بهداشت در مواد غذایی
- استاندارد ملی ایران ۲۰۸۳۴: میکروبیولوژی زنجیره مواد غذایی- روش‌های نمونه‌برداری برای آزمون‌های میکروب شناسی

#### نحوه برگزاری آزمون:

تئوری	عملی
*	*

## جزوه دوره کارآموزی میکروبیولوژی انواع چای

تهیه کننده / تهیه کنندگان:

معصومه اطهری نیا

گروه پژوهشی / آزمایشگاه:

گروه پژوهشی میکروبیولوژی / آزمایشگاه فرآورده‌های غلات  
به سفارش دفتر آموزش و ترویج استاندارد

منابع و مآخذ:

- ۱- استاندارد ملی ایران ۱۷۰۷۰: میکروبیولوژی چای- ویژگی ها و روشهای آزمون
- ۲- نجفی یاسوری. فاضل. میکروبیولوژی عمومی، دانشگاه گیلان،
- ۳- جاوتز. میکروب شناسی پزشکی
- ۴- یگانه، مهرداد. استاندارد و استاندارد کردن، چاپ اول، موسسه دانش پارسیان، ۱۳۸۹

## فهرست

صفحه	عنوان
ب	آشنایی با سازمان ملی استاندارد
ج	پیشگفتار
د	محتوای دوره کارآموزی
ز	جزوه آموزشی میکروبیولوژی انواع چای
و	مقدمه
۱	۱ هدف
۱	۲ استانداردهای مورد استفاده
۲	۳ انواع چای
۶	۴ اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی
۲۱	۵ روش های آزمون میکروبیولوژی
۲۱	۶ آزمون های میکروبیولوژی
۲۲	۷ نمونه برداری
۲۲	۸ روش آزمون
۲۲	۹ روش کشت
۲۳	۱۰ آزمون شمارش کلی میکروارگانیسم ها
۲۴	۱۱ آزمون شمارش کپک ها
۲۶	۱۲ آزمون جستجوی اشیشیاکلی
۲۸	۱۳ آزمون شمارش کلی فرم ها
۲۹	۱۴ آزمون شمارش آنتروکوک های روده ای
۳۱	پیوست الف انواع استانداردها
۳۳	پیوست ب مفاهیم مورد استفاده در کنترل کیفیت
۳۴	پیوست پ اطلاعاتی
۳۸	پیوست ت نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون های انواع چای طبق استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۰۷۰



## مقدمه:

چای نام یک گیاه و نوشیدنی ساخته شده از این گیاه است. چای واژه‌ای است چینی که در چین و شمال هندوستان به کار می‌رود و تقریباً با همان تلفظ وارد زبان فارسی شده است. نوشیدنی چای با دم کردن برگ‌ها، جوانه‌ها یا شاخه‌های فرآوری شده بوته چای گونه *Camellia sinensis* به مدت چند دقیقه در آب داغ درست می‌شود. فرآوری آن می‌تواند شامل اکسیداسیون، حرارت دهی، خشک‌سازی و افزودن گیاهان، گل‌ها، چاشنی‌ها و میوه‌های دیگر به آن باشد. چای یک منبع طبیعی از کافئین، تیوفیلین، تیانین و آنتی‌اکسیدان‌ها است، اما تقریباً بدون چربی، کربوهیدرات‌ها، یا پروتئین می‌باشد. چای دارای طعمی مطلوب، کمی تلخ و گس می‌باشد. انواع چای براساس نوع فرآوری خود قابل تمایز هستند. برگ‌های بوته گیاه چای، اگر به سرعت پس از چیده شدن خشک نشوند، پلاسیده و اکسیده می‌شوند.

## جزوه دوره کارآموزی میکروبیولوژی انواع چای

### ۱ هدف

هدف از تدوین این جزوه کارآموزی آشنایی با روش های میکروبیولوژی انواع چای بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۰۷۰ می باشد.

یادآوری ۱- توصیه می شود کارآموزان این دوره با الزامات آزمایشگاهی میکروبیولوژی و نیز استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۰۷۰ آشنایی داشته باشند.

یادآوری ۲- به منظور رعایت نکات ایمنی و سلامت کارکنان آزمایشگاه، توصیه می شود آزمون ها توسط افراد با تجربه، متخصص و آموزش دیده در خصوص روش های میکروبیولوژیکی انجام شود و داشتن مهارت های حرفه ای میکروبیولوژی در سطح مقدماتی الزامی است.

### ۲ استانداردهای مورد استفاده

شماره استانداردها	عنوان استاندارد
۹۸۹۹	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - راهنمای الزامات کلی برای آزمون
۸۹۲۳-۱	آماده سازی آزمایش-سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمونهای میکروبیولوژی-قسمت اول - مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری
۸۹۲۳-۴	آماده سازی آزمایش، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون میکروبیولوژی - قسمت چهارم : مقررات ویژه برای آماده سازی محصولاتی به غیر از شیر، گوشت، ماهی و فرآورده های آن
۱۷۰۷۰	میکروبیولوژی چای - ویژگی ها و روش های آزمون
۵۲۷۲-۱	روش جامع برای شمارش کلی میکروارگانیزم ها در ۳۰ درجه سلسیوس
۲۹۴۶	روش جستجو و شمارش اشیشیاکلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی
۱۰۸۹۹-۳	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -روش شمارش کپک ها و مخمرها-قسمت ۳- روش شمارش کلنی در فرآورده های با فعالیت آبی (aw) مساوی یا کمتر از ۰/۶۰
۲۱۹۸	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -جستجو، شناسایی و شمارش انتروکوک های روده ای در مواد غذایی
۹۲۶۳	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -روش جامع برای شمارش کلیفرم ها- روش شمارش کلنی

### ۳ انواع چای

#### ۱-۳ چای سیاه

فرآورده‌ای است که تنها از جوانه‌ها، برگ‌ها و ساقه‌های ترد و جوان رقم‌های از بوته چای با نام علمی *Camellia sinensis (Linnaeus) O.Kuntze* بدست می‌آید و با بهره‌گیری از شیوه‌های پذیرفته شده چای‌سازی که پایه آن براساس انجام فرآیند پلاس، مالش، اکسیداسیون و خشک کردن است، بدست می‌آید.



شکل ۱- چای سیاه

#### ۲-۳ چای سبز

چای سبز از جوانه‌ها، برگ‌ها و ساقه‌های ترد و جوان رقم‌های از بوته چای با نام علمی *Camellia sinensis (Linnaeus) O.Kuntze* تهیه می‌شود. تفاوت میان چای سبز و سیاه در روش فرآوری می‌باشد. در تهیه این چای پس از برگ چینی ابتدا شاخساره‌های چای را در معرض گرما قرار می‌دهند. این عمل به دو روش بخار دادن و یا روش برشته کردن انجام می‌شود. در این عمل آنزیم‌های داخل برگ غیرفعال شده و در نتیجه اکسیداسیون اتفاق نمی‌افتد.



شکل ۲- چای سبز

### ۳-۳ چای اولانگ

نوعی از چای است که برگ آن پس از پلاس و مالش، به میزان کمی اکسید شده و سپس خشک می‌شود. این چای از نظر درجه اکسیداسیون بین چای سبز و سیاه قرار می‌گیرد.



شکل ۳- چای اولانگ

### ۴-۳ چای سفید

این نوع از چای در اصل از غنچه و جوانه‌های رقم‌های از بوته چای با نام علمی *Camellia sinensis (Linnaeus) O.Kuntze* تهیه می‌شود. قبل از اینکه برگ چای باز شود، غنچه آن را که یک غلاف کرک‌دار نقره‌ای دارد، می‌چینند و آن را در دمای کم و دور از آفتاب (سایه) خشک می‌کنند. تفاوت میان چای سفید، سیاه و سبز در روش فرآوری آن‌ها می‌باشد. چای سفید کمترین میزان فرآوری را نسبت به سایر انواع چای طی نموده است.



شکل ۴ - چای سفید

### ۳-۵ چای کیسه‌ای

نوعی از چای می‌باشد که از قرار گرفتن یکی از انواع چای (سیاه، سبز، اولانگ و یا سفید) در درون کاغذ صافی مخصوص کیسه تهیه می‌شود.



شکل ۵ - چای کیسه‌ای



شکل ۶- انواع چای

#### ۴ اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

در آزمایشگاه میکروبیولوژی رعایت اصول اولیه الزامی است. بخشی از این اصول و قواعد مربوط به ایمنی فرد آزمایش کننده بوده و برخی نیز به ایمنی محیط و تجهیزات آزمایشگاه مربوط می باشد.

#### ۴-۱ فضای آزمایشگاه

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

#### ۴-۱-۱ فضای مربوط به نمونه و آزمون

- با توجه به شرایط خوب آزمایشگاهی داشتن فضاهای جداگانه برای بخش های زیر لازم است:
- دریافت و انبارش نمونه ها ؛
  - آماده سازی نمونه ها به خصوص برای مواد خام (مانند فرآورده های پودری حاوی تعداد زیاد میکروارگانیسم ها)؛
  - آزمون نمونه ها (از سوسپانسیون اولیه) شامل گرمخانه گذاری میکروارگانیسم ها ؛
  - آزمون میکروارگانیسم ها ی بیماریزای احتمالی ؛
  - نگهداری سویه مرجع و سایر سویه ها ؛
  - آماده سازی و سترون سازی محیط های کشت و وسایل ؛
  - انبارش محیط های کشت و واکنشگرها ؛
  - آزمون سترونی مواد غذایی ؛
  - آلودگی زدایی ؛
  - شستشو و تمیز کردن وسایل شیشه ای و سایر تجهیزات ؛
  - انبارش مواد شیمیایی مخاطره آمیز، ترجیحاً نگهداری در کابینت ها، قفسه ها، اتاقها.

#### ۴-۱-۲ فضای عمومی

فضاهای جداگانه برای موارد زیر توصیه می شود:

- ورودی، راهرو، راه پله و آسانسور ؛
- فضای اداری (مانند دبیرخانه، دفتر کار و اتاق مستندسازی) ؛
- رخت کن و سرویس های بهداشتی ؛
- اتاق بایگانی ؛
- انبار؛
- اتاق استراحت.

#### ۲-۴ بهداشت کارکنان

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

- از لباس و کفش مخصوص در محیط آزمایشگاه استفاده کنید؛
  - ناخن‌ها را تمیز و ترجیحاً کوتاه نگه دارید؛
  - هنگام کار در آزمایشگاه از صحبت کردن خودداری کنید؛
  - از خوردن و آشامیدن در آزمایشگاه خودداری کنید؛
  - کشیدن پی‌پت با دهان ممنوع می‌باشد.
- پیش از شروع کار و پس از انجام آزمون باید سطح میز با محلول ضدعفونی‌کننده مناسب ضدعفونی شود.

#### ۳-۴ تجهیزات

توصیه می‌شود مطابق با شرایط خوب آزمایشگاهی، کلیه وسایل و تجهیزات تمیز و در محل مناسب نگهداری شوند. پیش از استفاده بهتر است وسایل از نظر داشتن شرایط لازم برای کار تصدیق و در صورت لزوم در مدت استفاده، عملکرد آن پایش شود.

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

جدول ۱- لیست تجهیزات مورد نیاز در آزمایشگاه میکروبیولوژی

نام تجهیزات	ردیف
انواع ظروف شیشه ای آزمایشگاهی	۱
دستگاه فور	۲
دستگاه اتوکلاو	۳
دستگاه انکوباتور	۴
دستگاه بن ماری	۵
دستگاه شمارشگر کلنی	۶
میکروسکوپ	۷
pH متر	۸
همگن‌کننده، خردکن و مخلوط کن	۹
ترازو	۱۰



## وسایل شیشه‌ای



شکل ۷- وسایل شیشه‌ای

وسایل شیشه‌ای شامل انواع پی‌پت، ارلن، ظروف شیشه‌ای در پیچ‌دار، انواع لوله آزمایش، پتری دیش می‌باشد.

## فور یا آون



شکل ۸- فور یا آون

آون اتاقکی است که قابلیت تثبیت دمای  $160^{\circ}\text{C}$  تا  $180^{\circ}\text{C}$  را برای از بین بردن میکروارگانیسم‌ها به وسیلهٔ حرارت خشک دارد. وقتی شرایط دمایی برقرار شد، روند سترون سازی باید برای حداقل یک ساعت در دمای  $170^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  یا ترکیب معادلی از دما / زمان ادامه یابد. آون فقط برای سترون‌سازی تجهیزات مقاوم به حرارت خشک مانند وسایل فلزی و شیشه‌ای استفاده می‌شود. از آون برای سترون‌سازی وسایل لاستیکی و پلاستیکی استفاده نکنید. پیش از سترون‌سازی، همه وسایل فلزی و شیشه‌ای را تمیز کنید و در آون قرار دهید. پس از سترون‌سازی، به منظور پیشگیری از شکستن وسایل شیشه‌ای بهتر است پیش از خارج کردن از آون، آن‌ها را خنک کنید.

## اتوکلاو



شکل ۹- اتوکلاو

وسیله است که توسط آن کلیه وسایل آزمایشگاهی و محیط‌های کشت قبل از استفاده و محیط‌های کشت میکروبی و غیره توسط حرارت مرطوب، سترون می‌شوند. این دستگاه قادر است بخار آب اشباع شده را با حرارت  $3^{\circ}\text{C} \pm 121^{\circ}\text{C}$  ایجاد نماید که این درجه حرارت در شرایط بخار ایجاد شده می‌تواند موجب تخریب ساختمان میکروب‌ها و هاگ آنها شده و تقریباً باعث نابودی تمام میکروارگانیسم‌های شناخته شده شود. اتوکلاوهای آزمایشگاه میکروبیولوژی اغلب روی فشار ۱۵ پوند تنظیم شده‌اند که در این فشار بخار آب دمای آن به  $3^{\circ}\text{C} \pm 121^{\circ}\text{C}$  می‌رسد. این دستگاه طوری تنظیم شده است که بعد از رسیدن به این فشار بخار و درجه حرارت بلافاصله وارد مرحله سترون کردن می‌شود و مدت ۱۵ دقیقه به همان حالت باقی می‌ماند. قبل از شروع مرحله سترون کردن ابتدا مدتی شیر خروج هوا را باز می‌کنیم تا هوای داخل دستگاه تخلیه شده و بخار آب تمام سطوح و منافذ را بپوشاند و عمل استریلیزاسیون کامل انجام گیرد.

## انکوباتور



شکل ۱۰- انکوباتور

انکوباتور شامل اتافک عایق‌بندی شده با قابلیت نگهداری دمای ثابت و توزیع یکنواخت دما با حداکثر خطای مجاز در مقدار نوسانات دمایی تعیین شده در روش آزمون است. دستگاهی است که درجه حرارت مناسب رشد، تکثیر و تشکیل کلنی را فراهم می‌کند.

### حمام مایع با دمای ثابت



شکل ۱۱- حمام مایع با دمای ثابت

حمام با دمای ثابت که با یک مایع (مانند آب، اتیلن گلیکول) پر می‌شود و دارای در یا بدون در یا ملحقات دیگر برای محدود کردن تبخیر است و به منظور تثبیت دمای مشخص استفاده می‌شود. کاربرد اصلی این دستگاه به شرح زیر است:

- 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).

### شمارشگر کلنی



شکل ۱۲- شمارشگر کلنی

### میکروسکوپ



شکل ۱۳- میکروسکوپ نوری

انواع مختلفی از میکروسکوپها شامل: یک چشمی، دو چشمی، با دوربین یا تجهیزات فلورسنس و یک منبع نوری داخلی یا خارجی، وجود دارد.

### pH متر



شکل ۱۴- pH متر

pH متر برای اندازه‌گیری اختلاف پتانسیل در یک دمای معین بین الکترود سنجش و الکترود مرجع یا قرار دادن هر دو الکترود داخل فرآورده به کار می‌رود. قابلیت اندازه‌گیری باید با دقت  $0.05$  واحد pH باشد.

## همگن‌کننده، خردکن و مخلوط‌کن



شکل ۱۵- همگن‌کننده، خردکن و مخلوط‌کن

این تجهیزات برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه از فرآورده‌های مورد آزمون استفاده می‌شود. وسایلی که ممکن است به کار رود عبارت است از:

- الف- مخلوط‌کن ضربه‌ای (استومیکر) با کیسه‌های سترون و در صورت امکان مجهز به وسیله تنظیم‌کننده سرعت و زمان؛
- ب- مخلوط‌کن چرخشی
- ت - مخلوط‌کن ارتعاشی؛
- ث- سایر سیستم‌های مخلوط کردن با کارایی مشابه.

## ترازو



شکل ۱۶- ترازو

وسيله‌ای برای توزین با دقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ در آزمایشگاه می‌باشد. ترازوهای با دقت بالا بعلت ظرافت و حساسیت باید از جریان هوا دور نگه داشته شده و در یک جای مسطح و محکم قرار داده شوند و جای آن حتما باید تراز باشد.

#### ۴-۴ استریلیزاسیون

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

روش‌های رایج سترون کردن عبارتند از:

۱. روش حرارتی به وسیله دستگاه‌های مانند اتوکلاو و فور که در این روش از تاثیر گرما و فشار بخار آب برای کشتن میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود.

۲. روش شیمیایی به وسیله مواد ضد عفونی کننده مانند آب اکسیژنه و انجام واکنش‌های شیمیایی (مانند رادیکالهای آزاد) برای سترون کردن استفاده می‌شود.

۳. روش پرتو دهی به وسیله تابش پرتو گاما، پرتو ایکس و پرتو فرابنفش.

۴. روش فیلتراسیون برای مایعات استفاده شده و شامل عبور دادن مایع از فیلترهای مخصوص می‌باشد.

در آزمایشگاه میکروبیولوژی برای استریلیزاسیون محیط‌های کشت و وسایل مورد نیاز روش حرارتی به دو صورت خشک (با استفاده از فور) و مرطوب (با استفاده از اتوکلاو) انجام می‌شود. برای تشخیص بین مواد سترون شده و سترون نشده می‌توان از نشانگرهای سترون‌سازی استفاده کرد.

#### ۴-۵ آب

برای آماده‌سازی محیط‌های کشت، فقط از آب خالص یعنی آب مقطر، آب بدون املاح، آب یون زدایی شده یا تولید شده با استفاده از اسمز معکوس یا کیفیتی معادل استفاده می‌شود که عاری از موادی مانند مهارکننده یا عامل موثر رشد میکروارگانیسم‌ها در شرایط آزمون، برای مثال اثر کلراید، اثر آمونیاک و اثر یون‌های فلزات می‌باشد.

آب خالص باید در ظروفی که بطور محکم بسته شده نگهداری شود و از مواد بی اثر (شیشه خنثی، پلی اتیلن و غیره) که عاری از تمام مواد مهارکننده است ساخته شده باشد. همچنین توصیه می‌شود آب تولید شده هر چه زودتر استفاده شود.

#### ۴-۶ محیط کشت

کشت و تکثیر باکتری‌ها در محیط‌های مصنوعی از مهمترین روش‌های تشخیصی در باکتری‌شناسی است. برای کشت موفق باید شرایط مناسب برای رشد باکتری فراهم گردد. از جمله این شرایط مواد غذایی، حرارت، رطوبت کافی، نمک، pH مناسب، حضور یا عدم حضور اکسیژن می‌باشد.

از آنجا که میکروب یک موجود تک سلولی بوده، قادر است کلیه اعمال حیاتی خود را مستقلاً انجام دهد بدون آنکه نیاز به سلول دیگری داشته باشد. این اصل بیانگر آن است که میکروبها هم احتیاج به غذا و آب و مواد آلی و معدنی دارند. محیطی مغذی که دارای کلیه احتیاجات یک میکروب اعم از مواد غذایی و عناصر و غیره باشد که موجب رشد میکروب شود را اصطلاحاً محیط کشت می‌گویند.

بعضی مواقع محیط‌های کشت را با اضافه کردن اجزای مغذی که موجب افزایش سریع رشد ارگانیسم‌های سخت رشد می‌شوند، غنی می‌کنند. ماهیت این مواد مغذی چنان است که نمی‌توان آنها را همراه با محیط اصلی سترون کرد، بلکه باید بعد از اتوکلاو شدن محیط، بطور سترون این مواد اضافه شوند. نمونه‌هایی از این مواد مغذی عبارتند از: شیر بی چربی، خون گوسفند، زرده تخم مرغ و ...

#### ۴-۶-۱ محیط‌های متداول در کشت میکروبی

برای مطالعه میکروارگانیسم‌ها باید بطریقی آنها را بر روی محیط‌های کشت مناسب از نظر شرایط فیزیکی و شیمیایی کشت داد. مطالعه زیاد درباره میکروارگانیسم‌ها و نحوه زندگی آنها باعث شده که تاکنون انواع زیادی از محیط‌های کشت با ترکیبات متفاوت به طور مصنوعی برای استفاده در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی تهیه شود. هرچند انواع این محیط‌های کشت زیاد می‌باشند، با این وجود در مواردی برای کشت نوع بخصوصی از یک میکروارگانیسم باید از یک نوع محیط کشت بخصوص با ترکیبات مشخص استفاده شود. بطور کلی محیط‌های کشت باید دارای مشخصات معینی باشند و هنگام تهیه و استفاده از محیط‌های کشت باید به نکات زیر توجه شود:

- تمام محیط‌های کشت باید واجد مواد غذایی ضروری برای رشد میکروب‌ها باشند.
- pH محیط کشت باید در حد معین قبل از استفاده برای کشت تنظیم شود.
- ظروف مورد استفاده برای تهیه محیط‌های کشت باید کاملاً تمیز و عاری از مواد خارجی باشند.
- آب مقطر مورد استفاده باید به روش صحیح تهیه شود.
- درجه حرارتی که برای استریل کردن محیط کشت مصرف می‌شود باید نسبت به نوع مواد غذایی مربوط در محیط کشت در نظر گرفته شود. درجات بالا باعث از بین رفتن برخی از مواد شیمیایی موجود در محیط کشت می‌شوند.

محیط‌های کشت و معرف‌های مورد استفاده در آزمون باید دارای کیفیت آزمایشگاهی بوده و یا برای اهداف میکروبیولوژی مناسب باشند. آنها باید عاری از مواد سمی یا مهارکننده ارگانیسم‌های آزمون باشند. برای بهبود تکثیرپذیری توصیه می‌شود که مواد بدون آب قابل دسترس تجارتهای برای آماده‌سازی محیط‌های کشت مورد استفاده قرار دهید. چنانچه محیط‌های کشت به صورت آماده در بازار در دسترس باشند، آنها را مطابق با دستورالعمل سازنده تهیه کنید. دستورالعمل سازنده برای آماده‌سازی این فرآورده‌ها بهتر است با دقت دنبال شود.

برای هر محیط کشت و معرف، بهتر است یک محدودیت زمانی برای استفاده تعیین شود. برای کنترل عملکرد و تضمین کیفیت محیط‌های کشت به استاندارد ملی ایران ۸۶۶۳ مراجعه کنید.

#### ۴-۶-۱-۱ انواع تقسیم بندی محیط‌های کشت

محیط‌های کشت را از جنبه‌های مختلف تقسیم بندی می کنند:

##### ۱- تقسیم بندی بر اساس میزان آگار

آگار یک نوع آلگ دریایی می باشد که بر خلاف ژلاتین می‌تواند حرارت  $37^{\circ}\text{C}$  را که برای رشد تمام باکتری‌های بیماری‌زای انسان مناسب است را تحمل نماید و هیچ میکروبی نمی‌تواند آنرا ذوب و هضم نماید. آگار ساختمان پلی‌ساکاریدی دارد که بوسیله یکسری از جلبک‌های دریایی ساخته می‌شود. نقطه ذوب آن  $95^{\circ}\text{C}$  و نقطه انجماد آن حدود  $43^{\circ}\text{C}$  است. محیط‌های جامد که دارای ۱۵-۱۳ گرم آگار در لیتر محیط هستند.

محیط های کشت به سه صورت زیر می‌باشند :

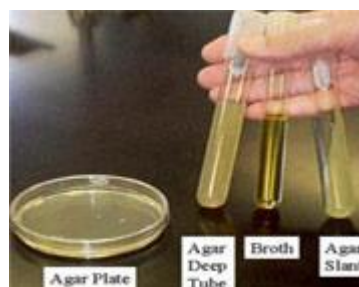
محیط کشت مایع یا آبگوشتی (liquid or broth media)

محیط کشت جامد (solid media)

محیط کشت نیمه جامد (semi solid media)



شکل ۱۸- محیط کشت مایع



شکل ۱۷- محیط کشت نیمه جامد و جامد

- محیط کشت مایع: این محیط کشت به صورت مایع می باشد مانند : نوترینت براث و مولر هینتون براث (در این نوع محیط‌های کشت که به صورت سوسپانسیون هستند حرکت دیده نمی‌شود). محیط‌های مایع معمولاً فاقد آگار هستند یا مقدار آگار آنها بسیار کم است. مثلاً حدود (۰.۲٪)
- محیط کشت جامد: این محیط کشت دارای آگار می‌باشد (به نام آگار هم خوانده می‌شود) مانند نوترینت آگار و مولر هینتون آگار



دلیل بکارگیری محیط جامد، تشخیص باکتری‌ها به وسیله :

- تشکیل کلنی
  - تولید پیگمانت
  - خصوصیات خاص هر کلنی
  - تشخیص انواع باکتری‌ها که چند نوع باکتری در نمونه میکروبی وجود دارد.
  - موکوئیدی بودن باکتری
  - دیدن منطقه همولیز .
- محیط کشت نیمه جامد: مقدار آگار آن‌ها نسبت به محیط جامد کمتر است ( ۱ تا ۵٪ آگار دارند). این نوع محیط‌های کشت زمانی استفاده می‌شوند که لازم باشد حرکت باکتری‌ها را مشاهده کرد.

## ۲- تقسیم بندی بر اساس نوع کاربرد محیط کشت

- محیط‌های کشت باکتری را از نظر نوع مواد تشکیل دهنده و از نظر کاربرد به چهار دسته تقسیم می‌شوند:
- محیط کشت پایه (Basic Media) :
- این محیط کمترین مقدار مواد غذایی برای رشد باکتری‌ها را دارد. مبنای تهیه انواع و اقسام محیط‌های کشت می‌باشد. اکثر انواع باکتری‌ها در آن رشد می‌کنند زیرا فاقد ماده ضد میکرب است. مانند محیط نوترینت آگار، نوترینت براث.
- محیط کشت غنی‌کننده (Enrichment Media) :
- محیط مقوی بوده که دارای مواد تغذیه‌ای زیادی نظیر ویتامین‌ها، لیپیدها، اسیدهای آمینه برای رشد باکتری است. بنابراین تعداد زیادی از باکتری‌ها روی آن بخوبی رشد می‌کنند. مانند شکلات آگار، بلاد آگار
- محیط کشت افتراقی (Differential Media) :
- محیط کشت تشخیصی بوده که کلنی باکتری‌های مختلف روی آن کاملاً از همدیگر متمایز می‌گردد. مانند محیط Mac، E.M.B. این محیط‌ها دارای املاح صفراوی، قند و معرف شیمیایی هستند که باکتری‌های لاکتوز مثبت بر روی آنها کلنی‌های صورتی رنگ و باکتری‌های لاکتوز منفی نظیر سالمونلا، شیگلا بر روی این محیط‌ها کلنی‌های سفید رنگ تشکیل می‌دهند. از محیط‌های افتراقی دیگر محیط TSI، سیمون سترات را می‌توان نام برد. این محیط‌ها برای رشد باکتری‌های گرم منفی روده‌ای (انتروباکتریاسه) مناسب هستند. وجود املاح صفراوی در این محیط مانع از رشد باکتری‌های گرم مثبت در محیط می‌شوند.
- محیط کشت اختصاصی (Special Media) :

این محیطها برای رشد باکتری‌های خاصی مناسب هستند. از این محیطها برای ایزوله کردن نوع خاصی از باکتری در یک مخلوط میکربی استفاده می‌شود. مانند محیط SS آگار که برای جدا کردن سالمونلا و شیگلا بکار می‌رود یا مانیتول سالت آگار که برای تشخیص گونه بیماریزای استافیلوکوکوس اورئوس استفاده می‌شود.

- محیط کشت انتخابی ( Selective Media ) :

محیط‌هایی وجود دارند که دارای یک ماده مهارکننده رشد می‌باشند این مواد رشد تمام ارگانیسیم‌ها بجز ارگانیسیم مورد نظر را مهار می‌کنند. از آنجائی که این محیط‌ها برای ارگانیسیم مورد نظر انتخاب شده‌اند و برای سایر ارگانیسیم‌ها مضر می‌باشند آنها را محیط‌های انتخابی می‌نامند. مثالی از این نوع محیط‌ها، محیط کشت فنیل اتیل الکل آگار است که از رشد باسیل‌های گرم منفی هوازی و بی‌هوازی اختیاری ممانعت بعمل آورده و به ارگانیسیم‌های گرم مثبت اجازه رشد می‌دهد.

#### ۴-۶-۲ آماده سازی و استریلیزاسیون محیط‌های کشت

مطابق دستورالعمل سازنده مقدار لازم از محیط کشت که بصورت پودری می‌باشد را برداشته و با مقدار توصیه شده آب مقطر در داخل ارلن مخلوط کنید سپس در صورت لزوم همراه با گرم کردن، سریعاً یکنواخت کنید. pH را با استفاده از pH متر اندازه‌گیری کنید و باید در صورت لزوم، قبل از سترون‌سازی تنظیم شود، به این ترتیب پس از سترون‌سازی و رسیدن دما به  $25^{\circ}\text{C}$ ، pH محیط کشت باید در محدوده مورد نظر  $\pm 0.2$  واحد pH باشد، مگر اینکه مقادیر دیگری توصیه شده باشد. تنظیم pH معمولاً با استفاده از محلول سدیم هیدروکسید با غلظت تقریبی  $40 \text{ g/l}$  ( $[\text{c}(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}]$ ) یا هیدروکلریک اسید رقیق شده با غلظت تقریبی  $36.5 \text{ g/l}$  ( $[\text{c}(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}]$ ) انجام می‌شود. اگر تنظیم pH پس از سترون‌سازی انجام شود، باید از محلول‌های سترون استفاده شود. جهت کسب اطلاعات بیشتر به استاندارد ملی ایران ۱۱۰۶۸ مراجعه کنید.

محیط کشت را در ظروف مناسب توزیع کنید بطوری که مطمئن شوید فضای کافی مناسب برای جلوگیری از سر رفتن محیط در طی فرآیند سرد کردن بعد از عملیات حرارتی بوسیله اتوکلاو یا ذوب مجدد، یا از لبریز شدن بعد از اضافه کردن مکمل‌ها وجود دارد.

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 به سترون‌سازی با اتوکلاو نیاز ندارند، ولی می‌توان آنها را با دمای جوش سترون نمود. برای مثال محیط‌های کشت آنتروباکتریاسه‌ها که دارای برلیانت گرین بوده و بخصوص به حرارت و نور حساس هستند و بهتر است به سرعت پس از جوشیدن سرد شده و در برابر نور شدید محافظت شوند. همچنین، بعضی از معرف‌ها را نیز می‌توان بدون سترون‌سازی مورد استفاده قرار داد. در همه موارد طبق دستورالعمل‌های سازنده 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 نشود یا شرایط دیگری در استاندارد خاصی مشخص نشده باشد، در یخچال در دمای  $3^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  نگهداری کنید. اگر محیطهای کشت در یخچال نگهداری شود معمولاً توصیه می شود 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 به وسیله قرار دادن آن در حمام آب جوش و یا هر فرایند 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، به دمای  $47^{\circ}\text{C}$  تا  $50^{\circ}\text{C}$ ، خنک کنید.

#### - افزودن مکمل‌ها

مکمل‌هایی که حساس به حرارت هستند، باید بعد از اینکه دمای محیط به کمتر از  $50^{\circ}\text{C}$  رسید، به محیط کشت اضافه شوند. مکمل سترون شده باید قبل از افزودن به محیط 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. طبق دستورالعمل تولیدکننده عمل کنید. همه مکمل‌ها را در محیط کشت به آرامی و کامل مخلوط کرده و به سرعت در ظروف نهایی تقسیم کنید.

#### - آماده‌سازی محیطهای کشت جامد در پتری دیش‌ها

محیط کشت آگاردار ذوب شده را در پتری‌دیش‌ها بریزید تا حداقل ضخامت آن 3 mm گردد ( برای مثال در ظروف با قطر 90mm، معمولاً 18ml تا 20ml محیط کشت آگاردار کافی است) یا مقداری که در استانداردهای مربوطه بیان شده است. اگر پلیت‌ها باید نگهداری شوند، یا زمان گرمخانه‌گذاری آنها بیش از 72 h بطول می‌انجامد، یا دمای گرمخانه‌گذاری بیش از  $40^{\circ}\text{C}$  است، محیط کشت بیشتری ممکن است در پتری دیش‌ها ریخته شود. پلیت‌ها را به صورت در بسته روی یک سطح افقی و خنک قرار دهید تا آگار سرد شده و ببندد.

#### ۴-۷ روش‌های کشت در میکروبیولوژی

کشت در پلیت به سه روش زیر قابل انجام است .

۱- کشت خطی

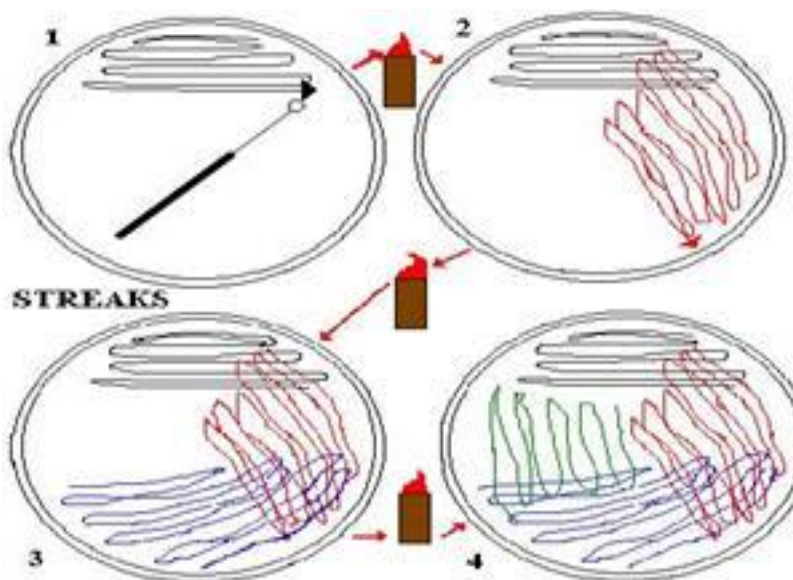
۲- کشت سطحی

۳- کشت آمیخته یا پورپلیت

## روش کشت خطی

در این روش از محیط پیش ریخته استفاده می‌شود. به این ترتیب که ابتدا بوسیله یک حلقه کشت سترون شده مقداری از کلنی باکتری را برداشته و آنرا روی سطح محیط پیش ریخته بصورت خطهای موازی و در چند جهت می‌کشید. در کشتهای خطی برای بدست آوردن کلنی های تک می‌توانید پلیت را به ۴ قسمت تقسیم کنید بعد در قسمت اول ابتدا نوک حلقه کشت را که محتوی کلنی باکتری است را بصورت خطهای موازی کشیده و بعد خطوط را در منطقه دوم از انتهای خط انتهایی منطقه اول در جهت دیگر ادامه می‌دهید و در منطقه سوم و چهارم هم به همین صورت عمل می‌کنید. خصوصیت این روش این است که وقتی خطوط موازی را روی سطح محیط می‌کشید به ترتیب از تراکم باکتری‌ها کاسته می‌شود و به انتهای خط که می‌رسید تراکم باکتری کمتر است و در منطقه دیگر وقتی از انتهای خط منطقه قبلی استفاده می‌کنید در واقع تراکم بسیار کمتر از تراکم باکتریها در ابتدا می‌باشد و در نتیجه در مناطق دیگر هم به ترتیب از تعداد باکتری‌ها کاسته می‌شود تا جایی که در منطقه چهارم می‌توانید کلنی‌های تکی داشته باشید که کلنی خالص نامیده می‌شود.

در مورد محیطهای کشت باکتریایی که بصورت مایع می‌باشند برای انجام کشت خطی روی محیط پیش ریخته فقط یکبار حلقه کشت را داخل محیط محتوی باکتری کرده و یک حلقه کشت از آن بردارید سپس آنرا روی محیط پیش ریخته قرار داده و بصورت خطوط موازی آنرا در چند جهت بکشید و یا مراحل فوق را روی آن انجام دهید.



شکل ۱۹- روش انجام کشت خطی

## کشت سطحی

در این نوع کشت هم از محیط پیش ریخته استفاده می‌شود.

این روش کشت بیشتر برای محیط‌های کشت مایع میکروبی کاربرد دارد. برای اینکار ابتدا یک رقت معینی از محیط مایع تهیه نمائید. سپس با استفاده از پیپت سترون مقدار مشخصی از آن رقت را برداشته و در سطح محیط جامد پیش ریخته توسط میله پخش کننده یا توک حلقه کشت پخش نمائید. و بعد از گرمخانه‌گذاری می‌توانید کلنی‌های رشد یافته در سطح محیط کشت را مشاهده کنید توجه داشته باشید که هنگام انجام کشت سطحی باید سطح محیط خشک باشد.

هنگام ریختن محیط کشت بصورت پیش ریخته ممکن است بخار آب روی درب پلیت و سطح محیط جمع شود برای خشک کردن آن می‌توان محیط‌های کشت را در یک گرمخانه با دمای  $50^{\circ}\text{C}$  تا  $25^{\circ}\text{C}$  قرار داده و خشک نمود. به این ترتیب که درب پلیت را برداشته و قسمت محتوی محیط کشت را وارونه روی لبه درب قرار دهید تا قطرات رطوبت حذف گردد.

همچنین می‌توانید پس از ریختن محیط کشت در پلیت در صورت تجمع حباب هوا، آنها را با شعله دادن سطح محیط حذف نمائید. اینکار باعث سترون شدن سطح محیط کشت هم می‌شود.



شکل ۲۰- روش انجام کشت سطحی

## کشت آمیخته یا پورپلیت

در این روش کشت هم نیاز به تهیه سوسپانسیون از باکتری می‌باشد. یعنی باید از باکتری مورد نظر در محیط مایع رقت معینی را تهیه نموده بعد به میزان ۱ ml از آنرا در کف پلیت استریل ریخته سپس از محیط کشت مورد نظر که قبلا سترون شده و حرارت آن به حدود  $45^{\circ}\text{C}$  رسیده به میزان ۱۸ ml تا ۲۰ ml به پلیت اضافه

نمائید. سپس با حرکات دورانی بصورت عدد ۸ انگلیسی آنرا کاملا مخلوط کنید. اگر نیاز بود مجددا سطح محیط آمیخته با باکتری را با یک لایه نازکی از همان محیط کشت بپوشانید در این حالت به آن کشت دولایه هم گفته می شود.

### ۵ روش های آزمون میکروبیولوژی

روش های آزمون میکروبیولوژی انواع چای بر اساس جدول زیر می باشد.

جدول ۲- روش آزمون میکروبیولوژی انواع چای

ردیف	نوع میکروارگانیسم ها	روش مرجع
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم ها	طبق استاندارد ملی ۵۲۷۲-۱
۲	کپک	طبق استاندارد ملی ۱۰۸۹۹-۳
۳	کلی فرمها	طبق استاندارد ملی ۱۱۱۶۶ و ۹۲۶۳
۴	اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ۲۹۴۶
۵	آنتروکوکوس های روده ای	طبق استاندارد ملی ۲۱۹۸

### ۶ آزمون های میکروبیولوژی

۱-۶ محیط های کشت مورد استفاده

جدول ۳- محیط های کشت مورد استفاده

ردیف	نام فارسی	نام انگلیسی
۱	پلیت کانت آگار	PCA ( plate count Agar )
۲	ویولت رد بایل گلوکز آگار	VRBG ( Violet red bile glucose agar )
۳	آبگوشت لوریل سولفات تریپتوز	LS ( Lauryl Sulfate tryptose broth
۴	آبگوشت اشریشیاکلی	EC ( E.C Broth )
۵	آب پپتونه بدون اندول	TW ( Peptone water indol free)
۶	عصاره مخمر-دکستروز - کلرامفنیکل	YGC ( Yeast extract dextrose Chloramphenicol)
۷	بروموکروزول پرپل آزاید برات	BPB ( Bromocresol purple broth
۸	KF آگار	KF(Kenner Fecal Agar)

## ۶-۲ محلول های رقیق کننده

به منظور تجدیدپذیری در نتایج حاصله، توصیه می شود که برای تهیه محلول رقیق کننده از مواد تشکیل دهنده پایه خشک یا ترکیب کامل خشک استفاده شود و آماده سازی آن مطابق با دستورالعمل سازنده انجام شود. مواد شیمیایی باید از کیفیت مطلوب برخوردار بوده و برای آزمایش های میکروبیولوژی مناسب باشند. محلول های رقیق کننده برای کاربرد کلی شامل موارد زیر می باشد:

- محلول پپتون نمکی

- آب پپتونه بافری

محلول های رقیق کننده را در حجم های لازم برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه درلوله، ارلن یا بطری با ظرفیت مناسب تقسیم کنید. در لوله ها، ارلن ها یا بطری ها را بسته و سپس آن را در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت زمان ۱۵ دقیقه سترون کنید.

## ۷ نمونه برداری

نمونه برداری باید در شرایط بهداشتی و به روشی انجام شود که نمونه هایی که به آزمایشگاه تحویل داده می شود نماینده واقعی کل نمونه بوده و علاوه براین در طی حمل و نقل و نگهداری، تا زمان انجام آزمون صدمه ندیده و / یا تغییری در آن ایجاد نشده باشد. همچنین نمونه ها باید در ظروف تمیز، خشک، سترون و در شرایط آسپتیک جمع آوری شده و در شرایطی نگهداری شوند که امکان رشد میکروارگانیسم ها وجود نداشته باشد. پس از نمونه برداری فرآورده باید در شرایط مناسب به آزمایشگاه منتقل شود و تا هنگام انجام آزمایش نیز در آزمایشگاه در شرایط مناسب نگهداری شود. نمونه های جمع آوری شده باید در صورت امکان در همان روز نمونه برداری، مورد آزمون قرار گیرد.

## ۸ روش آزمون

### ۸-۱ آماده سازی نمونه

آماده سازی نمونه باید براساس استاندارد ۴-۸۹۲۳ انجام شود. قبل از همگن سازی نمونه ها، آنها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار دهید. سوسپانسیون اولیه باید در کمتر از ۳ دقیقه بعد از آماده سازی برای پیش گیری از ته نشینی آن، استفاده شود. توصیه می شود برای آماده سازی از کیسه های صافی دار همگن ساز ضربه ای استفاده کنید.

## ۹ روش کشت

### ۹-۱ کشت آمیخته (Pour plate)

این روش براساس مخلوط کردن حجم معینی از نمونه و یا رقتی از آن به محیط کشت ذوب شده می باشد. پس از گرمخانه گذاری کلنی‌ها روی سطح محیط و یا درون آن شمارش می‌شود. حجم برداشت شده بطور معمول ۱ میلی‌لیتر می‌باشد. محیط کشت باید پس از ذوب شدن در حمام بخار آب در دمای  $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  قرارداده شود. حجم معین از رقت مورد آزمون را بردارید، برای زدودن مایع اضافی چسبیده به قسمت خارجی پی‌پت، نوک پی‌پت را به کناره لوله تماس دهید. در پلیت را فقط به اندازه ای که پی‌پت وارد آن شود باز کنید و سپس محتویات آن را داخل پلیت خالی کنید. پس از ریختن حجم مورد نظر نمونه در پلیت بلافاصله محیط کشت به آن اضافه می‌شود و پس از چندبار حرکت دورانی نمونه را به محیط کشت مخلوط نمایید. پلیت را در یک سطح افقی و صاف قرار دهید تا سرد شود و سپس در دمای مناسب گرمخانه‌گذاری نمایید.

### ۹-۲ گرمخانه‌گذاری و شمارش

با استفاده از رابطه زیر تعداد میکروارگانیسم‌های موجود در آزمایش (N) بر حسب میانگین تعداد شمارش شده از دو رقت متوالی را محاسبه کنید:

$$N = \frac{\sum C}{v(n_1 + 0.1n_2)d}$$

که در آن

$\sum C$ : مجموع پرگنه‌های شمارش شده بر روی تمام ظروف پتری مورد نظر

v: حجم تلقیح شده در هر ظرف پتری بر حسب میلی‌لیتر

$n_1$ : تعداد ظروف پتری شمارش شده در اولین رقت مورد نظر (یعنی رقتی که حاوی غلظت بیشتر نمونه باشد)

$n_2$ : تعداد ظروف پتری شمارش شده در دومین رقت مورد نظر (یعنی رقتی که حاوی غلظت کمتر نمونه باشد)

d: ضریب رقت برحسب اولین رقت مورد نظر

عدد بدست آمده را تا دو رقم معنی‌دار گرد کنید و سپس تعداد میکروارگانیسم‌ها در گرم را به صورت عددی بین  $10^9 - 10^7$  ضربدر توانی از ۱۰ گزارش نمایید.

انواع چای اغلب به علت رطوبت کم، کمتر مورد تهاجم میکروبی قرار می‌گیرند. در صورتی که بار میکروبی اولیه فرآورده، ترکیب فیزیکی، شیمیایی، روش فرآیند، بسته‌بندی و نگهداری این فرآورده‌ها نامناسب باشد، امکان رشد میکروارگانیسم‌ها را در آنها فراهم می‌سازد که ممکن است با فساد و یا کاهش کیفیت همراه باشد.



## ۱۰ آزمون شمارش کلی میکروارگانیسم ها

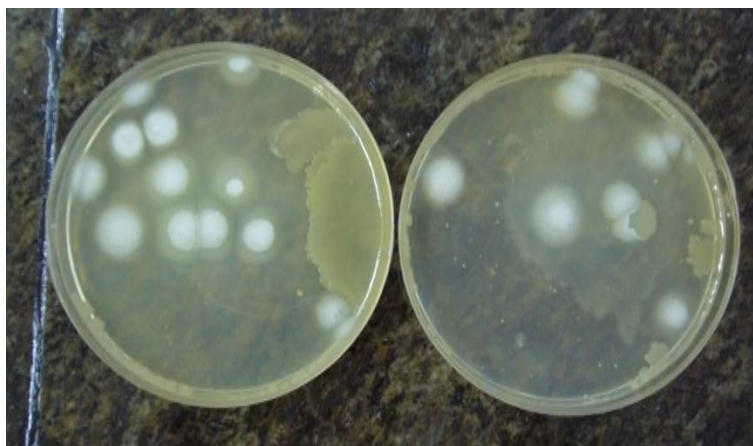
این ویژگی بیانگر رعایت بهداشت در تولید و نیز چگونگی وضعیت بهداشتی مواد اولیه بکار رفته در فرآورده می باشد. از آنجا که دمای گرمخانه گذاری در این ویژگی  $30^{\circ}\text{C}$  می باشد و محیط کشت بکار رفته نیز یک محیط عمومی است. لذا در برگیرنده طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها بوده و می تواند شاخصی از کیفیت میکروبی فرآورده باشد.

### ۱۰-۱ محیط کشت

محیط کشت مورد استفاده پلیت کانت آگار (Plate count agar) می باشد.

### ۱۰-۲ روش آزمون

با یک پیپت سترون به طور جداگانه یک میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه را به طور جداگانه به دو پتری سترون اضافه کنید. سپس به مقدار مناسب از محیط کشت PCA به پلیت های محتوی نمونه اضافه کرده و با چرخاندن بر روی سطح افقی به خوبی مخلوط کنید و پلیت های آماده شده را پس از بستن محیط کشت به صورت وارونه در دسته های کمتر از شش تایی و با فاصله معین از یکدیگر، سقف و دیواره های گرمخانه به مدت  $72\text{ h} \pm 3\text{ h}$  در دمای  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  گرمخانه گذاری کنید. بعد از پایان زمان گرمخانه گذاری تمامی کلنی های موجود در پلیت ها از جمله کلنی های سر سوزنی را در نور ملایم شمارش و طبق فرمول ذکر شده محاسبه کنید. برای به دست آوردن نتیجه قابل قبول، پلیت های با دورقت متوالی که حداقل ۱۵ و حداکثر ۳۰۰ کلنی داشته باشند باید شمارش شوند.



شکل ۲۱- کلنی های میکروارگانیسم ها در محیط کشت PCA

## ۱۱ آزمون شمارش کپک

کپک‌ها را با ظاهری کرکدار و پنبه‌ای شکل که گاهی اوقات رنگی هستند همه می‌شناسند. معمولاً غذاهای کپک زده قابل خوردن نیستند. با اینکه کپک‌ها در فساد بسیاری از غذاها دخالت دارند بعضی از انواع آنها در ساخت یا ترکیب تعدادی از غذاها به عنوان مثال بعضی پنیرها مفید می‌باشد علاوه بر آن کپک‌ها می‌توانند موادی را که در بعضی غذاها استفاده می‌گردند، تولید نمایند مانند آمیلاز که در تهیه نان و اسید سیتریک که در تهیه نوشابه‌های غیرالکلی بکاربرده می‌شوند. کپک‌ها می‌توانند باعث ایجاد اشکالاتی شوند:

- سنتز متابولیت‌های سمی (مایکوتوکسین)
  - مقاومت در برابر گرما، انجماد، آنتی بیوتیک و تشعشعات
  - قدرت تغییر ماهیت مواد نامطلوب جهت رشد باکتریهای بیماریزا که در ماده غذایی وجود دارند.
- این میکروارگانیسم گاهی باعث ایجاد بو و طعم نامطبوع و تغییر رنگ در سطح مواد غذایی می‌گردند. این میکروارگانیسم‌ها در محیط زندگی اطراف ما به طور گسترده‌ای پراکنده می‌باشند و می‌توان آنها را به عنوان قسمتی از فلور طبیعی یک ماده غذایی، وسایل و تجهیزات مورد استفاده در صنایع غذایی که به طور کامل و کافی به سازی نشده‌اند و یا به عنوان آلوده‌کننده‌های ناشی از هوا پیدا کرد.
- از آنجا که رشد این میکروارگانیسم‌ها کند بوده و دارای قدرت رقابتی کمی می‌باشند لذا رشد آنها در و یا بر سطح آن دسته از مواد غذایی صورت می‌گیرد که دارای شرایط زیست مناسب برای باکتری‌ها نیستند به همین دلیل برای کشت این میکروارگانیسم‌ها از محیط‌های حاوی آنتی بیوتیک استفاده می‌شود تا مشکلات ناشی از رشد باکتری‌ها کاهش یابد.

### ۱-۱۱ محیط کشت

محیط کشت مورد استفاده برای شمارش کپک‌ها YGC می‌باشد.

### ۲-۱۱ روش آزمون

با یک پی پت سترون به طور جداگانه یک میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه را به طور جداگانه به دو پتری سترون اضافه کنید. سپس به مقدار مناسب از محیط کشت YGC به پلیت‌های محتوی نمونه اضافه کرده و با چرخاندن بر روی سطح افقی به خوبی مخلوط کنید و بعد از بستن مخلوط، پلیت‌ها را به طور واژگون به مدت ۵ روز در دمای  $1 \pm 25^{\circ}\text{C}$  گرمخانه گذاری کنید. بعد از سپری شدن زمان مورد نظر کلنی‌های موجود را شمارش و طبق فرمول ذکر شده محاسبه کنید.



شکل ۲۲- کلنی های کپک

## ۱۲ آزمون جستجوی اشريشياکلی

اشريشياکلی یکی از اولين باسیل‌های روده‌ای است که شرح و کشت داده شده است و ساکن طبیعی روده انسان و حیوانات می‌باشد. این باسیل تخمیر کننده لاکتوز می‌باشد و انتشار وسیعی داشته و در سراسر دنیا در روده انسان و حیوانات خونگرم و خونسرد یافت می‌شود. به همین دلیل از آنها به‌عنوان معرف آلودگی آب با مدفوع استفاده می‌کنند. این باکتری مدت‌ها جزو باکتری‌های همسفره غیر بیماریزا محسوب می‌شد ولی امروزه نقش آن به‌عنوان فرصت طلب و عامل مولد عفونت مورد قبول همگان قرار گرفته است.

این باکتری بر روی محیط‌های غذایی عادی رشد فراوان داشته و رشد در میدان حرارتی ۴۶-۱۰ درجه سلسیوس با حرارت میانه ۳۷ درجه سلسیوس انجام می‌گیرد. انواع قندها از جمله لاکتوز را به سرعت تخمیر کرده، اسید و گاز تولید می‌کند.

زیستگاه این میکروارگانیسم بطور طبیعی خاک و نیز در سطح و یا داخل ظروف و وسایل تهیه مواد غذایی که خوب تمیز نشده است می‌باشد. آلودگی مواد غذایی با این باکتری از طریق دست آلوده، خاک، آب، مدفوع و حشرات امکان‌پذیر است. از آنجا که شناسایی اشريشياکلی در مقایسه با سایر باکتریهای مدفوعی آسانتر است از این باکتری به‌عنوان شاخص جهت تشخیص آلودگی مدفوعی در آب و غذا استفاده می‌شود.

اشريشيا به خانواده آنتروباكترياسه تعلق داشته و باسیل‌های کوتاه میله‌ای شکل (کوکوباسیل) و گرم منفی هستند.

### ۱-۱۲ محیط کشت

محیط کشت مورد استفاده جهت جستجوی اشريشياکلی آبگوشت لوریل سولفات تریپتوز Lauryl Sulfate tryptose broth با غلظت مضاعف می‌باشد.

### ۲-۱۲ روش جستجوی اشريشياکلی

جستجوی اشريشياکلی به معنی تعیین وجود یا عدم وجود این باکتری در مقدار مشخصی از فرآورده، می‌باشد. برای این منظور مقدار ۱۰ ml از سوسپانسیون اولیه تهیه شده را در ۱۰ ml از محیط کشت لوریل

سولفات تریپتوز برات با غلظت مضاعف ( $LS^+$ ) دارای لوله درهام بوسیله یک پی پت سترون بریزید. لوله آزمایش تلقیح شده را در دمای  $37^{\circ}C$  به مدت زمان  $24 h \pm 2 h$  گرمخانه گذاری کنید. پس از سپری شدن مدت زمان گرمخانه گذاری لوله را از لحاظ تولید گاز یا کدورت بررسی کنید. در صورت وجود گاز آزمون تاییدی را جهت



مشخص کردن باکتری اشیریشیاکلی انجام دهید.

شکل ۲۳- تشکیل گاز و وجود کدورت در لوله های LS

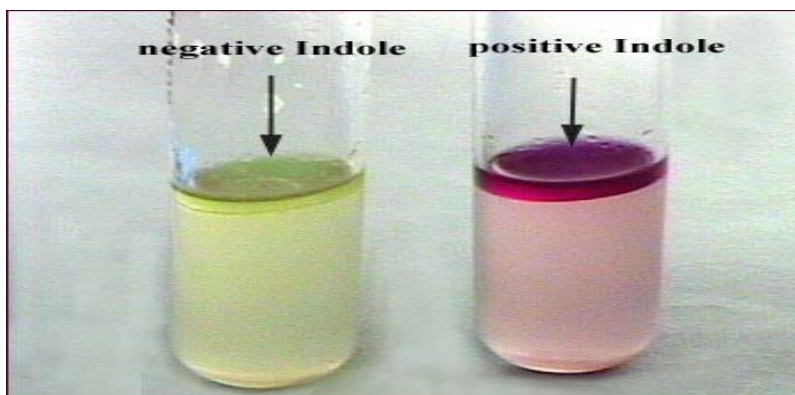
### ۳-۱۲ آزمون تاییدی

#### ۱-۳-۱۲ محیط کشت

جهت آزمون تاییدی اشیریشیاکلی از محیط کشت های آبگوشت اشیریشیاکلی (EC Broth) و آب پیتونه (Peptone water) استفاده می شود.

### ۲-۳-۱۲ روش آزمون تاییدی اشیریشیاکلی

از لوله مشکوک به اشیریشیاکلی یک الی دو قطره به داخل محیط های مذکور ریخته و به مدت  $24 h$  تا  $48 h$  در دمای  $44^{\circ}C$  گرمخانه گذاری کنید. وجود گاز در محیط EC و تشکیل حلقه ارغوانی در محیط کشت TW هر دو با هم نشانه وجود باکتری اشیریشیاکلی در ماده غذایی می باشد. لازم به ذکر است که جهت تشکیل حلقه ارغوانی از یک الی دو قطره معرف کواکس استفاده می شود.



شکل ۲۴- تشکیل حلقه اندول در محیط کشت TW

### ۱۳ آزمون شمارش کلی فرم

کلی فرم ها باکتری های میله ای کوتاه، هوازی و بی هوازی اختیاری، گرم منفی و غیر اسپورزا هستند که لاکتوز را همراه با تولید گاز تخمیر می کنند. اشیشیاکلی و انتروباکتر آئروژنز از مهمترین گونه های کلی فرم ها هستند. حدود ۲۰ گونه در این گروه قرار می گیرند. گروه کلی فرم های مدفوعی قادر هستند در صورت افزایش دما  $44/5^{\circ}\text{C}$  تا  $45^{\circ}\text{C}$  رشد کنند. هدف اصلی از انجام آزمون ها در دمای بالای اینکوباسیون، جدا کردن کلی فرم های مدفوعی از غیر مدفوعی است.

اهمیت کلی فرم ها در فساد مواد غذایی به دلیل داشتن ویژگی های زیر است:

- توانایی رشد در سوبستراهای مختلف و استفاده از تعداد زیادی از کربوهیدراتها و سایر ترکیبات آلی به عنوان منبع انرژی و توانایی استفاده از تعداد زیادی از ترکیبات از ته ساده به عنوان منبع انرژی
- توانایی سنتز اکثر ویتامین های مورد نیاز خود
- توانایی رشد در محدوده وسیعی از درجه حرارت (از کمتر از  $10^{\circ}\text{C}$  تا حدود  $46^{\circ}\text{C}$ )
- توانایی تولید مقدار زیادی اسید و گاز از قندها
- توانایی تولید طعم های نامطلوب
- توانایی تولید مواد لزج یا حالت طنابی در مواد غذایی توسط انتروباکتر آئروژنز

### ۱۳-۱ محیط کشت

محیط کشت مورد استفاده برای شمارش کلی فرم ها کریستال ویوله دارای قرمز خنثی، نمک های صفرای، لاکتوز و آگار (VRBL) می باشد.

### ۱۳-۲ روش آزمون

با استفاده از پی پت سترون یک میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه را به طور جداگانه به هر یک از دو پلیت منتقل کنید. سپس به هریک از دو پلیت حدود ۱۵ میلی لیتر از محیط کشت VRBL را افزوده و کاملاً مخلوط کنید. زمان لازم بین تلقیح و افزون محیط کشت نباید از ۱۵ دقیقه بیشتر باشد. به علت متحرک بودن باسیل های کلی فرم از دولایه محیط کشت استفاده می گردد بدین صورت که پس از ریختن محیط کشت به داخل پلیت و بستن لایه اول، لایه دوم به آن اضافه می شود. پس از بستن لایه دوم پلیت ها به صورت وارونه به مدت ۴۸ h در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  گرمخانه گذاری می شود. پس از سپری شدن مدت زمان مورد نظر تمامی کلنی های صورتی رنگ دوکی شکل شمارش می شوند.



شکل ۲۵- کلنی های کلی فرم

#### ۱۴ آزمون شمارش آنتروکوک‌های روده‌ای

انتروکوک‌ها، کوکسی‌های گرم مثبت بوده که به صورت جفت (دییلوکوک) یا زنجیره‌های کوتاه دیده می‌شوند. تمایز آنتروکوک‌ها از استرپتوکوک‌ها از روی ویژگی‌های ظاهری، بسیار مشکل است. دو گونه مهم همزیست از آنتروکوک در روده انسان عبارتند از: آنتروکوک فکالیس (۹۰٪ تا ۹۵٪) و آنتروکوک فاسیوم (۵٪ تا ۱۰٪). سایر گونه‌های آنتروکوک که به ندرت ایجاد بیماری می‌کنند، بی‌هوازی اختیاری هستند و اسپور تولید نمی‌کنند. آن‌ها گستره بزرگی از شرایط محیطی را تحمل می‌نمایند: دمای ۱۰°C تا ۴۰°C، pH از ۴ تا ۱۰ و غلظت‌های بالای کلرید سدیم. آنتروکوک‌ها بر روی آگار خوندار گوسفندی، همولیز گاما ایجاد می‌کنند. اعضای جنس آنتروکوک تا سال ۱۹۸۴ همراه با استرپتوکوک‌های گروه D طبقه بندی می‌شدند. آنالیز ژنومی آنتروکوک‌ها نشان داد که آن‌ها، جنس متفاوتی از استرپتوکوک‌های D هستند. مهمترین عفونت‌های ایجاد شده توسط آنتروکوک‌ها عبارتند از: عفونت‌های مجرای ادراری، باکتریمی، اندوکاردیت و مننژیت. از دیدگاه پزشکی، آنتروکوک‌ها از نظر مقاومت آنتی بیوتیکی ذاتی اهمیت دارند. برخی از آنتروکوک‌ها بطور ذاتی به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام (پنی سیلین، سفالوسپورین‌ها و کارباپنم) و آمینوگلوکوزیدها مقاوم هستند. در دو دهه گذشته، سویه‌های آنتروکوکی مقاوم به وانکومایسین (VRE) در بیماران بستری در بیمارستان‌ها افزایش یافته‌اند. برای درمان سویه‌های مقاوم به وانکومایسین، از آنتی بیوتیک‌هایی مانند کوئینوپریستین/دالفوپریستین (سینرسید) یا تیگسیکلین استفاده می‌شود.

#### ۱۴-۱ محیط کشت

محیط کشت مورد استفاده برای جستجوی آنتروکوک‌های روده‌ای بروموکروزول پرپل برات BPB می باشد.

#### ۱۴-۲ روش آزمون

جستجوی آنتروکوک‌های روده‌ای به معنی تعیین وجود یا عدم وجود این باکتری در مقدار مشخصی از فرآورده، می باشد. برای این منظور مقدار ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اولیه تهیه شده را در ۱۰ ml از محیط کشت

بروموکروزول پرپل برات انتقال دهید. لوله آزمایش تلقیح شده را در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت زمان ۲۴h تا ۴۸ h گرمخانه گذاری کنید. پس از سپری شدن مدت زمان گرمخانه گذاری لوله را از لحاظ تغییر رنگ محیط کشت بررسی کنید. در صورت تغییر رنگ محیط کشت به رنگ زرد آزمون تاییدی را جهت مشخص کردن آنتروکوک روده‌ای انجام دهید.

#### ۳-۱۴ آزمون تائیدی

#### ۱-۳-۱۴ محیط کشت

جهت آزمون تائیدی آنتروکوک روده‌ای از محیط کشت KF آگار استفاده می‌شود.

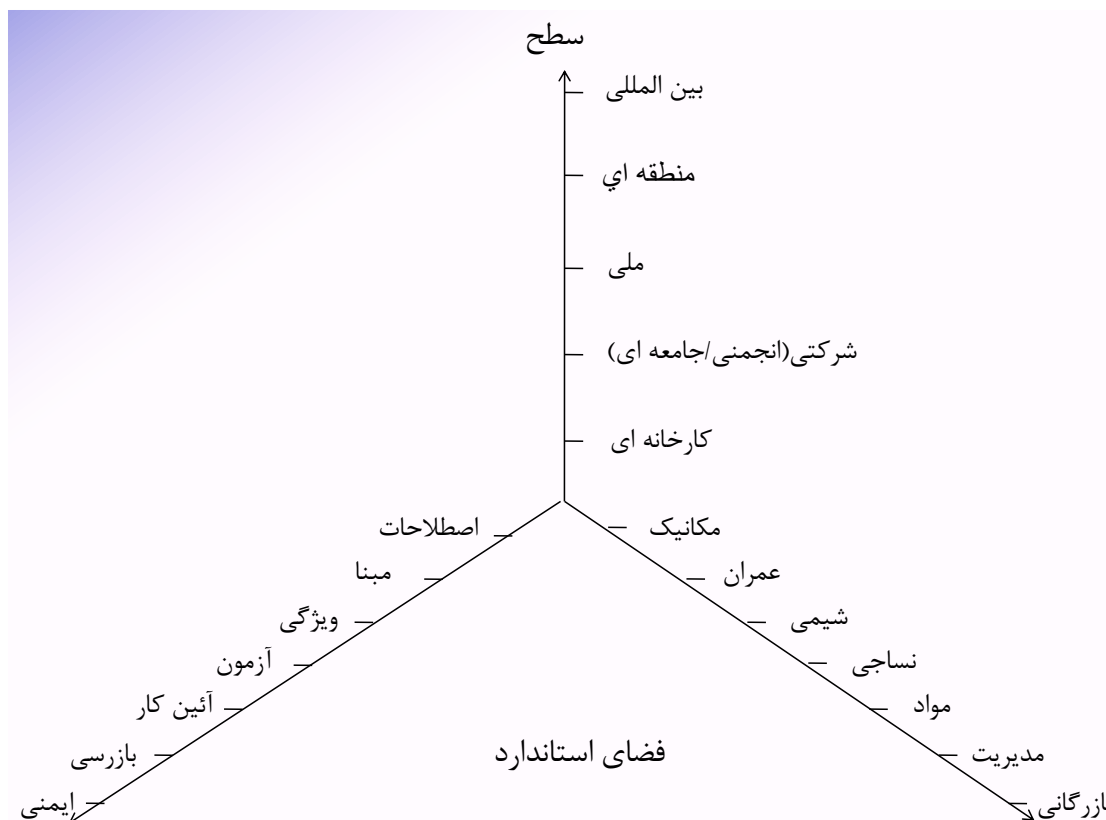
#### ۲-۳-۱۴ روش آزمون تائیدی

از لوله مشکوک روی محیط کشت KF که به صورت پیش ریخته می‌باشد، کشت خطی دهید. پلیت‌ها را در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ h تا ۴۸ h گرمخانه گذاری کنید. پس از سپری شدن مدت زمان گرمخانه گذاری پلیت‌ها را از نظر وجود کلنی‌های صورتی، قرمز، ارغوانی به صورت برجسته بررسی کنید. اگر چنین کلنی‌هایی مشاهده شد، آن را به عنوان آنتروکوک‌های روده‌ای جهت آزمون‌های تاییدی انتخاب کنید. روی کلنی‌های مشاهده شده آزمون‌های تاییدی هیدرولیز اسکولین را انجام دهید. به این منظور کلنی‌های انتخاب شده را روی محیط کشت صفر اسکولین کشت دهید و در دمای  $44^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  به مدت دو ساعت گرمخانه گذاری کنید. آنتروکوک‌های روده‌ای اسکولین را در مدت دو ساعت هیدرولیز کرده و کلنی‌هایی به رنگ خرمایی تا سیاه رنگ ایجاد می‌کنند.

## پیوست الف

### انواع استاندارد

الف-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.



### الف-۲ سطح استاندارد

استانداردها دارای سه سطح کلی می باشند که می توان آن ها را به صورت زیر تقسیم بندی کرد:

الف- استانداردهای کارخانه ای، این گونه استانداردها توسط کارخانجات و به منظور 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. در برخی مواقع کارخانجات، شرکتها یا تشکیلاتی که در یک زمینه خاص فعالیت می کنند از طریق یک جامعه یا انجمن استانداردهای موسوم به استانداردهای شرکتی یا جامعه ای را تدوین می کنند تا در امور مربوط مورد استفاده قرار گیرد.



ب- استانداردهای ملی (مانند ISIRI, BS, BIS ASTM, و ...)، این گونه استانداردها به وسیله سازمان استاندارد در یک کشور که به عنوان 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 به تدوین استانداردهای منطقه ای نمایند.

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

### الف-۳- جنبه استاندارد

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

الف- استاندارد های ویژگی

ب- استاندارد های روش آزمون

پ- استانداردهای آیین کار

ت- استانداردهای ایمنی

ث- واژه نامه

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

### الف-۴- اجرای استاندارد

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

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

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

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

[www.isiri.gov.ir](http://www.isiri.gov.ir)

## پیوست ب

### مفاهیم مورد استفاده در کنترل کیفیت

- ب-۱- نمونه (Sample)
- یک یا چندین قلم، قطعه یا واحد که از یک جامعه یا مجموعه یا محموله انتخاب می شوند را نمونه گویند.
- ب-۲- حجم نمونه (Sample Size)
- مقدار مواد یا تعداد اقلام یا واحدهای تشکیل دهنده یک نمونه را، حجم نمونه گویند.
- ب-۳- نمونه برداری (Sampling)
- رویه ای است که بر طبق آن از جامعه یا محموله مورد بررسی بخش یا بخش های کوچکی انتخاب می شود تا بر اساس نتایج حاصل از بازرسی آن ها بتوان در مورد کل جامعه یا محموله قضاوت کرد.
- ب-۴- بازرسی (Inspection)
- مجموع بررسی ها، اندازه گیری و آزمون هایی است که جهت مقایسه مشخصات مواد محصولات نیمه ساخته و محصولات تمام شده با مشخصات فنی یا استانداردها انجام می گیرد.
- ب-۵- درستی (Accuracy)
- نزدیکی نتیجه اندازه گیری یک کمیت با مقدار واقعی آن کمیت است.
- ب-۶- دقت (Precision)
- نزدیکی بین جواب های تکراری حاصل از چند آزمایش بر روی یک نمونه است.
- ب-۷- تجدید پذیری (Reproducibility)
- نزدیکی میزان مقادیر بدست آمده از آزمون ها بر روی یک نمونه است در شرایطی که روش، آزمایش کننده، تجهیزات، محل و شرایط و زمان متفاوت باشد.
- ب-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.
- ب-۹- رواداری (Tolerance)
- حداکثر میزان انحراف قابل قبول برای یک کالا از اندازه خود ( حداکثر خطای قابل قبول در یک اندازه گیری)

## پیوست پ اطلاعاتی

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

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

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

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

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

برای اطلاع از وظایف ، قوانین، تخلفات ، تنبیهات و سایر موارد مهم، به آخرین و جدیدترین "آیین نامه تایید صلاحیت علمی و فنی مدیران کنترل کیفیت" موجود در سایت سازمان ملی استاندارد [WWW.ISIRI.GOV.IR](http://WWW.ISIRI.GOV.IR) مراجعه شود.

### پ-۲ خلاصه ای از دستورالعمل نحوه تذکر، اخطار، تعلیق و ابطال پروانه کاربرد علامت استاندارد ایران به

علت عدم تداوم انطباق فرآورده با استاندارد مربوطه

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



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

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

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

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

پ-۳-۳ در مورد کالاهای مشمول استاندارد اجباری، در صورتیکه امتیاز منفی یک گزارش نتیجه آزمون و یا جمع امتیازات منفی نتایج چند آزمون به ۱۲۰ رسید، اداره کل استاندارد استان مربوط، علاوه بر اخطار کتبی، برای جمع آوری کالای مغایر با استاندارد ملی با شماره سری ساخت مربوط موضوع را به کمیسیون ماده ۱۹ ارجاع می‌نماید. همچنین در صورتیکه امتیاز منفی مذکور ناشی از حداقل نتایج آزمون سه نمونه برداری مختلف بوده و حداقل ۳۰ امتیاز از جمع امتیازات منفی گزارش نتیجه آزمون آخر به واسطه نقایص عمده و بحرانی باشد،

نسبت به تشکیل کمیته علایم برای ابطال پروانه کاربرد علامت استاندارد اجباری اقدام نموده و در صورت ابطال پروانه، موضوع را از طریق روابط عمومی به اطلاع عموم می‌رساند.

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

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

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

## پیوست ت

نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌های انواع چای طبق استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۰۷۰

ردیف	شرح آزمون	درجه اهمیت
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	عمده
۲	کلیفرم‌ها	بحرانی
۳	اشریشیاکلی	بحرانی
۴	کپک	عمده
۵	آنتروکوکوس‌های روده‌ای	بحرانی