ریاست جمهوری
سازمان ملی استاندارد ایران

جزوه دوره کارآموزی

میکروبیولوژی سس مایونز و سس سالاد

شماره مدرک : ۱۳۹۸
تاریخ تصویب : ۶۲۲/۲۳/ج

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 استانداردایران به موجب بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفهٔ تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

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

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

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

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

۱- International Organization for Standardization

۲- International Electrotechnical Commission

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

۴-Contact point

۵- Codex Alimentarius Commission

پیش‌گفتار

یکی از مهمترین وظایف سازمان ملی استاندارد ایران، آموزش‌های اصولی و مدون در زمینه محصولات (کالا / خدمات) مشمول استاندارد اجباری از طریق برگزاری دوره‌های آموزشی می باشد. بخشی از این آموزش‌ها شامل کارآموزی مدیران کنترل کیفیت و کارشناسان آزمایشگاه‌های همکار سازمان می باشد که برگزاری این دوره‌ها از طریق استان‌ها، آزمایشگاه‌های همکار و پژوهشگاه استاندارد انجام می شود. برای ایجاد وحدت رویه و هماهنگی در نحوه برگزاری این دوره‌ها 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 دوره‌های 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

عنوان دوره کارآموزی:

میکروبیولوژی سس مایونز و سس سالاد

گروه مخاطب:

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

هدف از برگزاری دوره کارآموزی:

هدف از برگزاری این دوره کارآموزی آشنایی با آزمون‌های میکروبیولوژی سس مایونز و سس سالاد بر اساس استانداردهای ملی ایران ۲۹۶۵ می‌باشد و موارد زیر را در برمی‌گیرد:

۱- آشنایی روش‌های بهینه و جدید آزمایشگاهی
۲- یکسان سازی رویه آزمایشگاه میکروبیولوژی سس مایونز و سس سالاد
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 سس مایونز و سس سالاد
۵- آشنایی با الزامات فنی آزمایشگاه میکروبیولوژی بر اساس استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹

توانایی‌های آموزشی گیرندگان پس از طی دوره:

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

پیش نیاز:

جزوه آموزشی در خصوص نقاط بحرانی .....

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	۱		*		جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹
۲	آشنایی با روش تهیه محیط کشت‌های مورد نیاز و روش سترون‌سازی	روش تهیه محیط کشت مرتبط با سس مایونز و سس سالاد و اتوکلاو کردن محیط‌ها	۰/۵	۰/۵	*	*	استانداردهای ملی ایران ۲۹۶۵ و ۹۸۹۹
۳	آماده‌سازی وسایل مورد نیاز و روش سترون‌سازی وسایل	روش آماده‌سازی و سترون‌سازی وسایل مورد نیاز	۰/۵	۰/۵	*	*	استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹
۴	آشنایی با استاندارد روش آزمون	هدف و دامنه کاربرد، مواد و دستگاه‌های مورد نیاز جهت انجام آزمون	۰/۵		*		جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۲۹۶۵
۵	آشنایی با شاخص‌های میکروبی و حدود مجاز آنها در سس مایونز و سس سالاد	آشنایی با باکتریهای احتمالی موجود در سس مایونز و سس سالاد	۱		*		جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۲۹۶۵
۶	روش آماده‌سازی نمونه در آزمایشگاه	تهیه سوسپانسیون اولیه و سایر رقت‌ها با استفاده از رقیق‌کننده مناسب	۰/۵	۰/۵	*	*	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۲۹۶۵
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 ۲۹۶۵
۸	گرمخانه‌گذاری	گرمخانه‌گذاری در دما و زمان مناسب بر حسب باکتری‌های مورد نظر	۰/۵		*		جزوه آموزشی و استانداردهای ملی ایران ۲۹۶۵

ردیف	رئوس مطالب	محتوای آموزشی	مدت آموزش (ساعت)		اجراکننده		منبع/ استانداردها
			تئوری	عملی	مدرس	کارآموز	
۹	تشخیص و شمارش کلنی‌ها	بررسی و نحوه شمارش و محاسبه کلنی‌ها پس از گرمخانه‌گذاری -تعیین وجود یا عدم وجود باکتری‌ها	۱	۱	*	*	جزوه آموزشی و استانداردهای ملی ایران ۲۹۶۵
۱۰	تفسیر نتایج	نحوه تفسیر، بررسی نتایج و گزارش‌دهی	۱	۱	*		جزوه آموزشی و استانداردهای ملی ایران ۲۹۶۵
مدت دوره: دو روز							

سایر استانداردها و منابع:

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

نحوه برگزاری آزمون:

عملی	تئوری
*	*

جزوه دوره کارآموزی میکروبیولوژی سس مایونز و سس سالاد

تهیه کننده :
ساره داورزنی

گروه پژوهشی:
گروه پژوهشی میکروبیولوژی

به سفارش دفتر آموزش و ترویج استاندارد

منابع و مآخذ:

۱- استاندارد ملی ایران۲۹۶۵ : میکروبیولوژی سس مایونز و سس سالاد- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون

۲-استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹: میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – راهنمای الزامات کلی برای آزمون

۳-آزمایشگاه میکروبیولوژی عمومی- تالیف : مهرنوش تنگستانی

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

فهرست

عنوان	صفحه
آشنایی با پژوهشگاه استاندارد	ب
پیش‌گفتار	ج
محتوای دوره کارآموزی	د
جزوه کارآموزی میکروبیولوژی سس مایونز و سس سالاد	ز
مقدمه	ط
۱ هدف	۱
۲ استانداردهای ملی ایران	۱
۳ اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی	۲
۴ روش‌های آزمون میکروبیولوژی	۱۹
۵ محیط‌های کشت و محلول‌های رقیق کننده	۲۰
۶ آماده سازی نمونه	۲۰
۷ روش آزمون	۲۰
پیوست الف انواع استاندارد	۲۴
پیوست ب مفاهیم مورد استفاده در کنترل کیفیت	۲۶
پیوست پ اطلاعاتی	۲۷
پیوست ت نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌های انواع سس مایونز و سس سالاد طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۶۹۵	۳۱

مقدمه

سس، مایع غلیظی است که برای طعم و مزه دادن به انواع غذاها، سالاد یا جذاب نمودن ظاهر غذا به کار می‌رود. سس مایونز و یا سس سفید از تخم مرغ، روغن زیتون، سرکه و خردل درست می‌شود و به طور سرد مورد استفاده قرار می‌گیرد زمانی که سس به مواد غذایی اضافه می‌شود، خواص حسی ما را تغییر یا تشدید می‌نماید. کاربرد سس مایونز و انواع سس‌های سرد، به عنوان چاشنی غذا و سالاد است.

جزوه دوره کارآموزی میکروبیولوژی سس مایونز و سس سالاد

۱ هدف

هدف از تدوین این جزوه کارآموزی آشنایی با روش‌های آزمون میکروبیولوژی سس مایونز و سس سالاد بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۲۹۶۵ می‌باشد.

یادآوری۱- توصیه می‌شود کارآموزان این دوره با الزامات آزمایشگاهی میکروبیولوژی و نیز استاندارد ملی ایران شماره ۲۹۶۵، ۱۰۸۹۹، ۸۶۶۳ و ۲۹۴۶ آشنایی داشته باشند.

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

۲ استانداردهای ملی ایران

استانداردهای ملی ایران در ارتباط با آزمون‌های میکروبیولوژی سس مایونز و سس سالاد به شرح ذیل می‌باشند:

جدول ۱- لیست استانداردهای میکروبیولوژی سس مایونز و سس سالاد

ردیف	عنوان استاندارد	شماره استاندارد
۱	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش جستجو و شمارش اشریشیاکلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی	۲۹۴۶
۲	میکروبیولوژی زنجیره غذایی -روش جامع برای شمارش میکروارگانیسم‌ها-قسمت ۱- شمارش کلنی در ۳۰درجه سانتی گراد با استفاده از روش کشت آمیخته	۵۲۷۲-۱
۳	میکروبیولوژی مواد غذایی ،خوراک دام و آب -آماده سازی ،ساخت ،ذخیره سازی و آزمون عملکرد محیط‌های کشت	۸۶۶۳
۴	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -روش جامع برای شمارش کپک‌ها و مخمرها- قسمت اول -روش شمارش کلنی در فرآورده‌های با فعالیت آبی (a_w) بیشتر یا کمتر از ۰/۹۵	۱۰۸۹۹

۳ اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

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

۳-۱ فضای آزمایشگاه

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

۳-۱- ۱ فضای مربوط به نمونه و آزمون

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

- دریافت و انبارش نمونه‌ها
- آماده‌سازی نمونه‌ها به خصوصاً برای مواد خام (مانند: فرآورده‌های پودری حاوی تعداد زیاد میکروارگانیسم‌ها)
- آزمون نمونه‌ها (ازسوسپانسیون اولیه) شامل گرمخانه‌گذاری میکروارگانیسم‌ها
- آزمون میکروارگانیسم‌های بیماریزای احتمالی
- نگهداری سویه مرجع و سایر سویه‌ها
- آماده‌سازی و سترون‌سازی محیط‌های کشت و وسایل
- انبارش محیط‌های کشت و واکنشگرها
- آزمون سترونی موادغذایی
- 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 وآسانسور
- فضای اداری (مانند دبیرخانه، دفترکار و اتاق مستندسازی)
- رختکن و سرویسهای بهداشتی
- اتاق بایگانی
- انبار
- اتاق استراحت

۳-۲ بهداشت کارکنان

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

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

۳-۳ وسایل و تجهیزات

توصیه می‌شود مطابق با شرایط خوب آزمایشگاهی، کلیه‌ی 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 طی استفاده، عملکرد آن پایش شود.

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

جدول ۲- لیست تجهیزات مورد نیاز

ردیف	نام تجهیزات
۱	انواع ظروف شیشه‌ای آزمایشگاهی
۲	اتوکلاو
۳	انکوباتور
۴	بن ماری
۵	ترازو
۶	شمارش گر کلنی
۷	فور
۸	همگن کننده، خردکن و مخلوط کن
۹	میکروسکوپ
۱۰	pH متر

وسایل شیشه‌ای

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

شکل۱ - وسایل شیشه‌ای

فور یا آون

آون اتاقکی است که قابلیت ثبیت دمای ۱۶۰°C تا ۱۸۰°C را برای از بین بردن میکروارگانیسم‌ها به وسیلهٔ حرارت خشک دارد. آون فقط برای سترون‌سازی تجهیزات مقاوم به حرارت خشک مانند وسایل فلزی و شیشه‌ای استفاده می‌شود. از آون برای سترون سازی وسایل لاستیکی و پلاستیکی استفاده نشود. پیش از سترون سازی، همه وسایل فلزی وشیشه‌ای را تمیزکنید و در آون قرار دهید. روند سترون‌سازی باید برای حداقل 1h دردمای$^{\circ}C$ ۱۰± ۱۷۰$^{\circ}C$ یا ترکیب معادلی از دما/ زمان ادامه یابد.

پس از سترون‌سازی، به منظور پیشگیری از شکستن وسایل شیشه‌ای بهتراست پیش از خارج کردن از آون، آن‌ها را خنک کنید.

شکل۲ - فور یا آون

اتوکلاو

این دستگاه قادر است بخار آب اشباع شده را با حرارت **۱۲۱°C** ایجاد نماید که این درجه حرارت در شرایط بخار ایجاد شده می‌تواند موجب تخریب ساختمان میکروب‌ها و هاگ آنها شده و تقریبا باعث نابودی تمام میکروارگانیسم‌های شناخته شده شود. اتوکلاو برای استریل کردن ابزار پزشکی و آزمایشگاهی در فشار و دمای بالا و با استفاده از بخار آب کار برد دارد. بر اساس استاندارد، در دمای ۱۲۱ $^{\circ}C$ ، ابزارآلات باید حداقل به مدت ۱۵ دقیقه، تحت فرآیند استریلیزاسیون قرار می گیرند کل

مـدت زمـان کـار دسـتگاه اتـوکلاو از فشـار دادن دکمـه (شـروع کـار)[۱] تـا پایـان کـار سیسـتم، مجمـوع سـه زمان (زمان اولیه)[۲]، (زمان استریلیزاسیون) [۳] و (زمان خشک شدن)[۴] است.

شکل ۳- اتوکلاو

انکوباتور

انکوباتور شامل اتاقک عایق بندی شده است که برای کشت و رشد دادن نمونه‌های زنده مانند سلول‌ها یا میکروب ها به کار می‌رود. این دستگاه دارای قابلیت نگهداری دمایی ثابت و توزیعی یکنواخت دما با حداکثر خطای مجاز در مقدار نوسانات دمایی تعیین شده در روش‌های آزمون است. که درجه حرارت مناسب رشد، تکثیر و تشکیل کلنی را فراهم می‌کند و در انواع انکوباتورهای آزمایشگاهی (معمولی، شیکردار، یخچال دار، CO۲دار) در ازمایشگاه‌های میکرو بیولوژی و بیولوژی سلولی کاربرد اساسی دارد.

شکل ۴- انکوباتور

---

۱ - Start

۲ - Preheating Time

۳ - Sterilization Time

۴ - Drying Time

میکروسکوپ

از دو واژه یونانی میکرو به معنی کوچک و سکوپ، به معنی دیدن، گرفته شده است. اصول کلی در تمامی انواع میکروسکوپ‌ها بر اساس عبور نور با طول موج‌های متفاوت از چندین عدسی محدب می‌باشد که هرچقدر طول موج نور به کار رفته در میکروسکوپ مزبور کوتاه‌تر باشد قدرت تفکیک و یا جداکنندگی آن میکروسکوپ بیشتر است**.** انواع مختلفی از میکروسکوپ‌ها شامل **:** یک چشمی ، دو چشمی، با دوربین یا تجهیزات فلورسنس و یک منبع نوری داخلی یا خارجی، وجود دارد.

حمام مایع (بن ماری) با دمای ثابت

این وسیله به منظور انجام تست‌های سرولوژیک، آگلوتیناسیون، بیوشیمی، تست‌های دارویی و انجام مراحل انکوباسیون صنعتی، به منظور تثبیت دمای مشخص استفاده این دستگاه دارای یک مخزن آب می‌باشد که ممکن است بر روی مخزن فوق درپوشی تعبیه شده باشد. معمولاً در پوش‌ها زاویه‌دار و حدود ۳۰ درجه بوده (برای اینکه بخارات به داخل لوله‌هایی که در دستگاه قرار می‌گیرد نریزد). حرارت آب دستگاه بوسیله یک ترموستات قابل تنظیم است. نوع جوش این دستگاه درجه حرارتی تا حدود ۱۰۰ درجه را دارا بوده قابل تنظیم در دماهای مختلف می باشد. بهتر است که برای جلوگیری از رسوب املاح بر روی المنت از آب مقطر اگر چه در تعداد معدودی از آن‌ها از روغن نیز استفاده می‌شود.

کاربرد اصلی این دستگاه در آزمایشگاه میکروبیولوژی به شرح زیراست:

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

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

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

ت- به منظور گرم کردن معرف‌ها و ذوب کردن نمونه‌ها نیز استفاده می‌شود.

شکل ۵- حمام مایع با دمای ثابت

شمارشگرکلنی

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

شکل ۶- شمارشگر

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 ۰/۰۵ واحد pH باشد.

شکل۷- pH متر

همگن کننده، خردکن و مخلوط کن

این تجهیزات برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه از فرآورده‌های مورد آزمون استفاده می‌شود.

وسایلی که ممکن است به کار رود عبارت است از :

- مخلوط‌کن ضربه‌ای (استومکر) با کیسه‌های سترون و در صورت امکان مجهز به وسیله‌ی تنظیم‌کننده‌ی سرعت و زمان
- مخلوط کن چرخشی
- مخلوط کن ارتعاشی
- سایر سیستمهای مخلوط کردن با کارایی مشابه

شکل ۸- همگن‌کننده، خردکن و مخلوط کن

ترازو

وسیله‌ای برای توزین با دقت‌های ۰/۱ و۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ 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.

شکل ۹- ترازو

۳-۴ استریلیزاسیون

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

روشهای رایج سترون کردن عبارتند از:

الف) 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.

ب) روش شیمیایی: به وسیله مواد ضدعفونی کننده مانند آب اکسیژنه و انجام واکنشهای شیمیایی (مانند رادیکالهای آزاد) برای سترون کردن استفاده می‌شود.

پ) روش پرتودهی: به وسیله تابش پرتو گاما، پرتو ایکس و پرتو فرابنفش.

ت) 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.

۳-۵ 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 می شود 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.

شکل ۱۰- دستگاه دیونایزر

۳-۶ 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، 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 حاوی کلیه احتیاجات یک میکروب اعم از مواد غذایی و عناصر و غیره باشد که موجب رشد آن میکروب شود را اصطلاحاً محیط کشت می‌گویند.

بیشتر محیطهای کشت که در پلیت مصرف می شوند، محیطهای کشت عمومی هستند که اساساً برای تهیه مواد غذایی لازم جهت رشد باکتری ساخته شده‌اند. بعضی مواقع این محیطهای کشت عمومی را با اضافه کردن اجزای مغذی که موجب افزایش سریع رشد ارگانیسمهای سخت رشد می شوند، غنی می‌کنند. ماهیت این مواد مغذی چنان است که نمی توان 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 گو سفند، زرده تخم مرغ.

۳-۶-۱ 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 درباره‌ی 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، 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 محیط کشتها 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 محیط کشتها باید کاملا تمیز و عاری از مواد خارجی باشند.
- آب مقطر مورد استفاده باید بطریقه صحیح تهیه شود.
- درجه حرارتی که برای استریل کردن محیط کشت مصرف می شود 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 مناسب برای اهداف آزمون‌های میکروبیولوژی و دارای کیفیت آزمایشگاهی بوده، همچنین باید عاری از مواد سمی یا مهارکننده ارگانیسم‌های آزمون باشند. برای بهبود تکثیرپذیری توصیه می‌شود که مواد بدون آب قابل دسترس تجارتی 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 آماده سازی 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.

۳-۶-۱-۱ انواع تقسیم بندی محیط‌های کشت

محیط‌های کشت را از جنبه‌های مختلف تقسیم بندی می‌کنند:

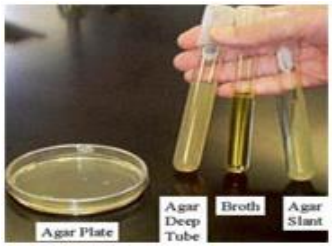
۱) تقسیم بندی بر اساس میزان آگار

آگار یک نوع آلگ دریایی می‌باشد که بر خلاف ژلاتین می‌تواند حرارت ۳۷° 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 پلی ساکاریدی دارد که بوسیله یکسری از جلبکهای دریایی ساخته می‌شود. نقطه ذوب آن°C ۹۵ و نقطه انجماد آن حدود ۴۳° C است. محیط‌های جامد که دارای ۱۵-۱۳ گرم آگار در لیتر محیط هستند.

محیط‌های کشت به سه صورت زیر می‌باشند:

- محیط کشت مایع یا آبگوشت (liquid or broth media)

- محیط کشت جامد (solid media)
- محیط کشت نیمه جامد (semi solid media)



شکل ۱۱- انواع محیط کشت

محیط کشت مایع: این محیط کشت به صورت مایع می‌باشد، 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 آگارشان بسیار کم است (حدود ٪۰/۲).

محیط کشت جامد: این محیط کشت حاوی آگار می‌باشد (به نام آگار هم خوانده می‌شود) مانند: نوترینت 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) این نوع محیط‌های کشت زمانی استفاده می‌شوند که بخواهیم 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 می‌کنند:

- محیط کشت پایه (Basic Media)

این محیط کمترین مقدار مواد غذایی برای رشد باکتریها را دارد و 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 غنی کننده (Enrichment Media)

محیط مقوی بوده که دارای مواد تغذیه ای زیادی نظیر ویتامین‌ها، لیپیدها، اسیدهای آمینه برای رشد باکتری است. بنابراین تعداد زیادی از باکتریها روی آن بخوبی رشد می کنند، مانند: شکلات آگار، بلادآگار

- محیط کشت افتراقی (Media Differential)

محیط کشت تشخیصی بوده که کلنی باکتریهای مختلف روی آن کاملاً از همدیگر متمایز می‌گردد، مانند: محیط EMB، MAC این محیطها دارای املاح صفراوی، قند و معرف شیمیایی هستند که باکتری‌های لاکتوز مثبت برروی آنها کلنی‌های صورتی رنگ و باکتریهای لاکتوز منفی نظیر سالمونلا، شیگلا بر روی این محیط‌ها کلنی های سفید رنگ تشکیل می‌دهند. از محیطهای افتراقی دیگر محیط TSI، سیمون سیترات را می‌توان نام برد. این محیط‌ها برای رشد باکتریهای گرم منفی روده‌ای (انتروباکتریاسه) مناسب هستند. چون وجود املاح صفراوی در محیط مانع از رشد باکتریهای گرم مثبت در محیط می‌شوند.

- محیط کشت اختصاصی (Special Media)

این محیطها برای رشد باکتریهای خاصی مناسب‌اند. از این محیطها برای ایزوله نوع خاصی از باکتری در یک مخلوط میکروبی 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 مهار کننده رشد می‌باشند، این مواد رشد تمام ارگانیسم‌ها بجز ارگانیسم مورد نظر را مهار می‌کنند. از آنجائیکه این محیط‌ها جهت ارگانیسم مورد نظر انتخاب شده‌اند و برای سایر ارگانیسم‌ها 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 بی هوازی اختیاری ممانعت بعمل آورده و به ارگانیسم‌های گرم مثبت اجازه رشد می‌دهد.

۳-۶-۲ آماده سازی و استریلیزاسیون محیط‌های کشت

مطابق دستور کارخانه سازنده و با توجه به بروشور الصاقی روی آن می‌توان 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 ۲۵ºC، pH محیط کشت باید در محدوده مورد نظر ۰/۲± واحد pH باشد، مگر اینکه مقادیر دیگری توصیه شده باشد. تنظیم pH معمولاً با استفاده از محلول سدیم هیدروکسید با غلظت تقریبی ۴۰ g/l (C(NaOH) = ۱ mol/l) یا هیدروکلریک اسید رقیق شده با غلظت تقریبی ۳۶/۵ g/l (C(HCl) = ۱ mol/l) انجام می‌شود. اگر تنظیم pH پس از سترن‌سازی 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 حاوی برلیانت گرین بوده و بخصوص به حرارت و نور حساس هستند و بهتر است به سرعت پس از جوشیدن سرد شده و در برابر نور شدید محافظت شوند. همچنین، بعضی از معرف‌ها را نیز می‌توان بدون 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 نشود یا شرایط دیگری در استاندارد خاصی مشخص نشده باشد، در یخچال در دمای ۳ °C ± ۵ 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 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 ºC ۴۷ تا ºC ۵۰ خنک کنید.

۳-۶-۳ افزودن مکمل‌ها

مکمل‌هایی که حساس به حرارت هستند، باید بعد از اینکه دمای محیط به کمتر از ۵۰°C رسید، به محیط اضافه شوند. مکمل سترون شده باید قبل از افزودن به محیط آگاردار به دمای اتاق بر سد. 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.

۳-۶-۴ آماده‌سازی محیط‌های کشت جامد در پتری دیش‌ها

محیط کشت آگاردار ذوب شده را در پتری دیش‌ها بریزید تا حداقل ضخامت آن ۳ میلی متر گردد (برای مثال در ظروف با قطر میلی متر ۹۰، معمولا ۱۸ میلی لیتر تا ۲۰ میلی لیتر 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 ۷۲ ساعت به طول می‌انجامد، یا دمای گرمخانه‌گذاری بیش از ۴۰°C است، محیط کشت بیشتری ممکن است در پتری دیش‌ها ریخته شود. پلیت‌ها را به‌صورت در بسته روی یک سطح افقی و خنک قرار دهید تا آگار سرد شده و ببندد. پلیتهای آگاردار آماده شده تجارتی بهتر است طبق دستورالعمل تولیدکننده نگهداری و استفاده شود.

۳- ۷روش‌های کشت در میکروبیولوژی

کشت در پلیت به سه روش قابل انجام است.

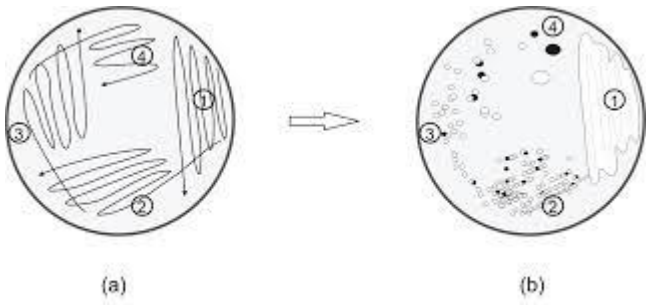
- کشت خطی
- کشت سطحی
- کشت آمیخته یاپورپلیت

۳-۷-۱ روش کشت خطی

در این روش از محیط پیش ریخته استفاده می شود. 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 کلنی‌های 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 می کشید 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 جائیکه در منطقه چهارم شما 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.



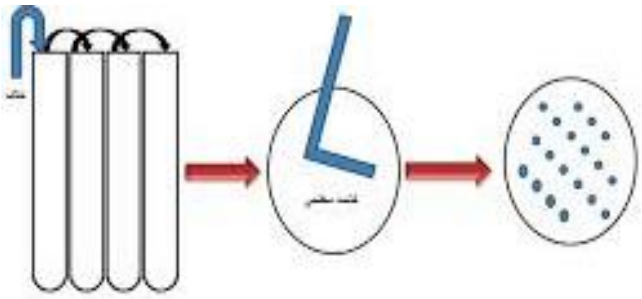
شکل ۱۲- کشت خطی

۳-۷-۲روش کشت سطحی

در این نوع کشت هم از محیط پیش ریخته استفاده می‌شود. این روش کشت بیشتر برای محیط‌های 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 می توانید کلنی‌های رشد یافته در سطح محیط کشت را مشاهده کنید توجه داشته باشید که هنگام انجام کشت سطحی باید سطح محیط خشک باشد.

چون هنگام ریختن محیط کشت بصورت پیش ریخته ممکن است بخار آب روی درب پلیت و سطح محیط جمع شود برای خشک کردن آن می‌توان، محیط‌ها را در یک گرمخانه با دمای ۵۰-۲۵ درجه سانتیگراد 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 ۱۳- کشت سطحی

۳-۷-۳ کشت آمیخته یا پورپلیت

در این روش کشت هم نیاز به تهیه سو سپانسیون از باکتری می‌باشد. یعنی باید از باکتری مورد نظر در محیط مایع رقت معینی را تهیه نموده بعد به میزان ۱ سی سی از آنرا در کف پلیت استریل ریخته سپس از محیط کشت مورد نظر که قبلا سترون شده و حرارت آن به حدود ۴۵ درجه سانتیگراد رسیده به میزان ۱۵-۲۰ سی سی به پلیت اضافه نمائید. سپس با حرکات دورانی بصورت عدد ۸ انگلیسی آنرا کاملاً مخلوط کنید. اگر نیاز بود مجدداً سطح محیط آمیخته با باکتری را با یک لایه نازکی از همان محیط کشت بپوشانید در این حالت به آن کشت دولایه هم گفته می‌شود.

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

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

که در آن

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

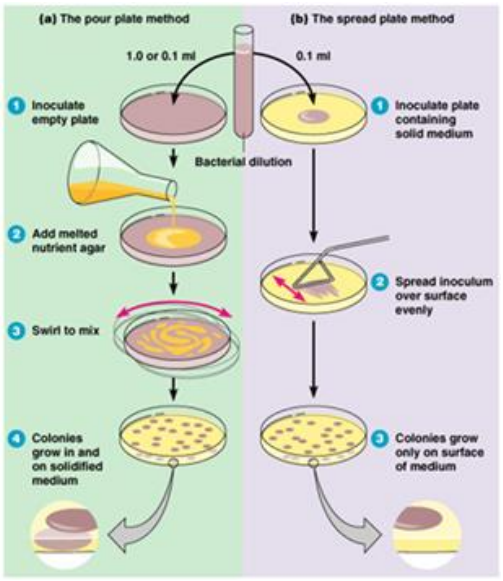
V: حجم تلقیح شده در هر ظرف پتری بر حسب میلی‌لیتر

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 بد ست آمده را تا دو رقم معنی‌دار گرد کنید و سپس تعداد میکروارگانیسم ها در گرم را به صورت عددی بین ۹٫۹ – ۱٫۰ ضربدر توانی از ۱۰ گزارش نمائید.



شکل ۱۴- انواع روش‌های کشت در پلیت

۴ روش‌های آزمون میکروبیولوژی

روش‌های آزمون میکروبیولوژی سس مایونز و سس سالاد بر اساس جدول زیر می باشد:

جدول ۳- روش‌های آزمون میکروبیولوژی سس مایونز و سس سالاد

نوع میکروارگانیسم	روش مرجع
باکتری های مقاوم به اسید	طبق استاندارد ملی ۲۹۶۵
باکتری‌های اسید لاکتیک هتروفرمنتیتیو	طبق استاندارد ملی ۲۹۶۵
اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ۲۹۴۶
کپک	طبق استاندارد ملی۱۰۸۹۹
مخمر	طبق استاندارد ملی۱۰۸۹۹

۵ محیط‌های کشت و محلول‌های رقیق کننده

دستورالعمل‌های کلی برای تهیه محلول‌های رقیق‌کننده و محیط‌های کشت در استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ تعیین شده است. محیط‌های کشت و محلول‌های رقیق کننده مورد نیاز برای انجام آزمون‌های میکروبیولوژی سس مایونز و سس سالاد در جدول زیر آورده شده است:

جدول ۴- محیط‌های کشت و محلول‌های رقیق کننده

ردیف	مواد
۱	آب پپتونه بافری
۲	MRS براث اصلاح شده
۳	ارنج سرم آگار
۴	آبگوشت لوریل سولفات
۵	EC براث
۶	آب پپتونه بدون اندول
۷	معرف اندول
۸	دی کلران-رز بنگال کلرامفنیکل آگار

۶ آماده سازی نمونه

مقداری از هر نمونه را درون بشر سترون بریزید که در نهایت ۱۵۰ تا ۲۰۰ گرم نمونه مورد آزمون داشته باشید. سپس ۱۰ گرم از آن را درون کیسه استومکر ریخته و ۹۰ میلی لیتر محلول رقیق کننده به آن بیفزایید و به مدت ۲ دقیقه در مخلوط کن ضربه ای مانند استومکر مخلوط کنید.

۷ روش‌های آزمون

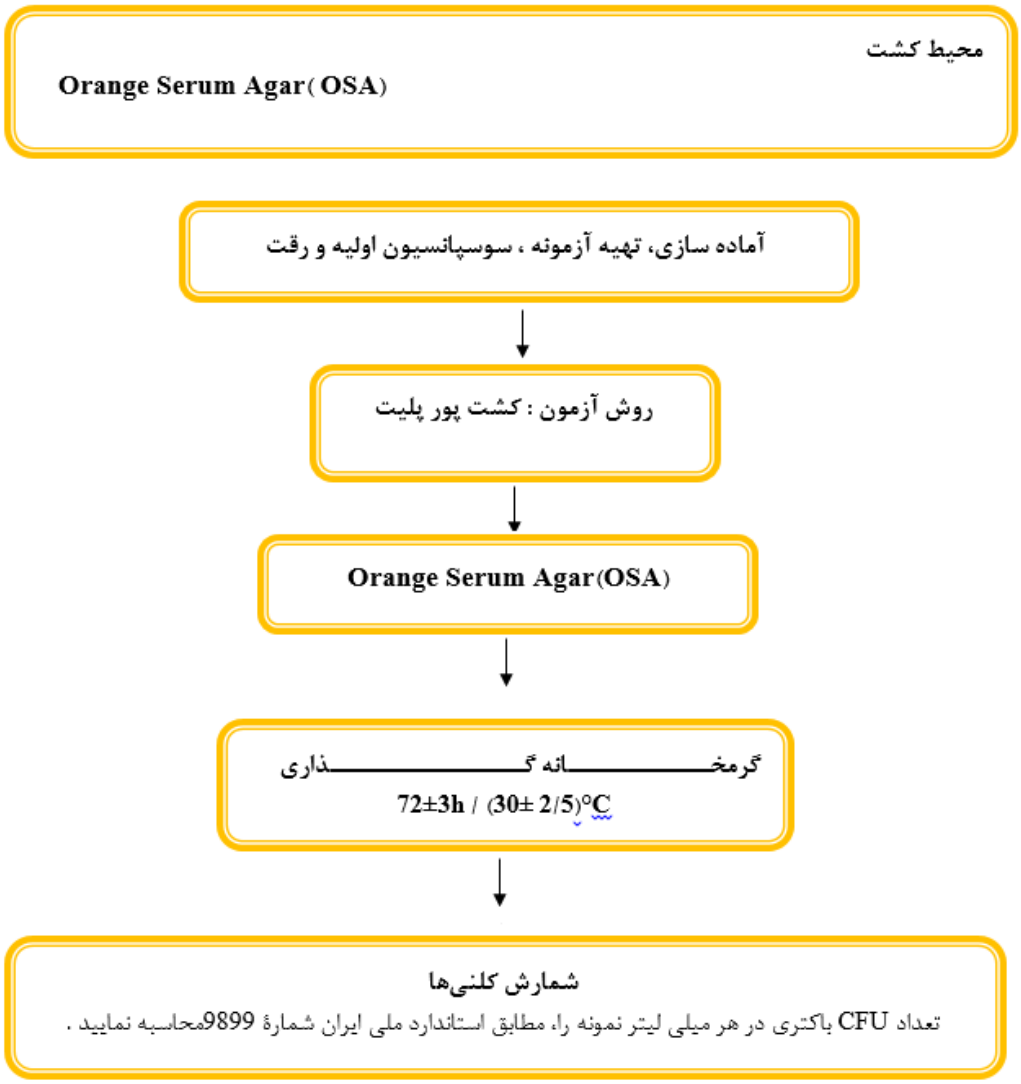
۷-۱ نمونه‌برداری

نمونه‌برداری 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 ونقل و نگهداری، تا زمان انجام آزمون صـدمه 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 ر شد میکروارگانیـ سم ها وجود ندا شته با شد. پس از نمونه‌برداری فرآورده باید درشرایط مناسب به آزمایشگاه منتقل شود و تا هنگام انجام آزمایش نیز در آزمایشگاه

در شرایط منا سب نگهداری شود. نمونه های جمع آوری شده باید در صورت امکان در همان روز نمونه برداری، مورد آزمون قرار گیرد.

۷-۲ شمارش باکتری های مقاوم به اسید

با یک پیپت سترون ۲ میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه (۱۰ گرم نمونه در ۹۰ میلی لیتر محلول رقیق کننده) را به دو پتری دیش ســترون (به هر پتری دیش یک میلی لیتر) اضــافه کنید و برای ســایر رقت‌های اعشــاری با استفاده از پیپت سترون دیگر به همین ترتیب عمل نمایید. سپس به مقدار منا سب از محیط کشت اورنج سرم آگار OSA را پس از رسیدن به دمای ۴۵ درجه سلسیوس به پلیت‌های محتوی نمونه اضافه کرده و با چرخاندن بر روی سطح افقی به خوبی مخلوط کنید و پس از جامد شدن به صورت وارونه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت زمان ۳ تا ۵ روز گرمخانه گذاری کنید. سپس همه کلنی های رشد یافته در پلیت را شمارش کنید. (تهیه رقت مطابق استاندارد ۸۹۲۳-۱)



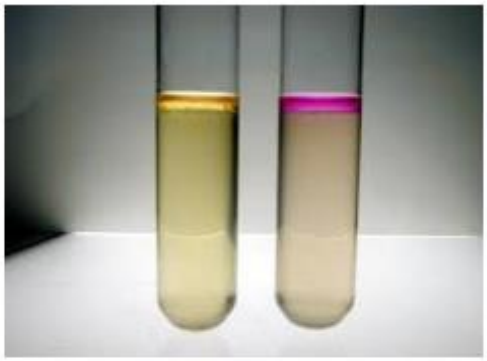
۳-۷ باکتری‌های اسید لاکتیک هتروفرمنتیتیو

با یک پیپت سترون ۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه (۱۰ گرم نمونه در ۹۰ میلی لیتر محلول رقیق کننده) را بردا شته و به دو لوله (به هر لوله ۰/۱ میلی لیتر) حاوی محیط کشت MRS اضافه کنید . لوله‌ها را در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری کنید. مشاهده گاز در لوله دورهام و یا حباب‌های چسبنده آن در سطح لوله حاوی محیط کشت و تغییر رنگ این محیط از سبز به زرد که نشان دهنده تولید اسید است، مثبت بودن این آزمون را مشخص می کند.

۷-۴ اشریشیاکلی

برای انجام آزمون ابتدا یک میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه را به ۹ میلی لیتر محیط لوریل سولفات با غلظت معمولی و یا ۱۰ میلی لیتر را به ۱۰ میلی لیتر از لوریل سولفات با غلظت مضاعف اضافه کنید .لوله‌های تلقیح شده را در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت قرار دهید در صورت مشاهده کدورت و یا گاز از این لوله به لوله حاوی محیط کشت EC تلقیح کنید و در حمام آب گرم در ۴۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری کنید و در صورت مشاهده گاز توسط حلقه کشت به محیط آب پپتونه تلقیح کنید و در دمای ۴۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری کنید.سپس معرف اندول به آب پپتونه اضافه کنید و خوب مخلوط نمایید و پس از یک دقیقه از نظر تولید اندول بررسی کنید .

چنانچه حلقه قرمز رنگ که نشان دهنده تولید اندول است تشکیل شود اشریشیا مثبت است و در غیر این صورت منفی است.



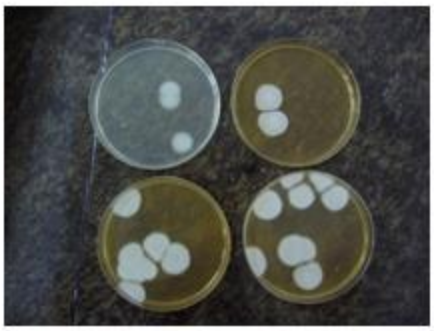
شکل ۱۵- اشریشیاکلی مثبت

۷-۵ کپک و مخمر

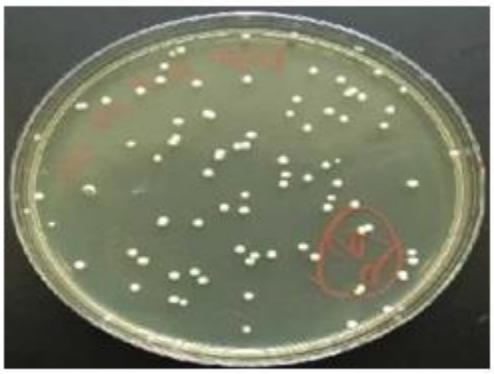
کپک میکروارگانیسم رشته‌ای، هوازی مزوفیل و معمولا به شکل کلنی کلنی، جوانه صاف یا کرک دار، اغلب با ساختار اسپورزایی یا تولید مثلی رنگی، در سطح محیط‌های کشت قارچی رشد می کنند.

با استفاده از پیپت سترون مقدار یک دهم میلی لیتر از آزمایه را به پلیت حاوی محیط کشت DRBC انتقال دهید و با پیپت‌های سترون دیگر به همین ترتیب از رقت‌های اعشاری به محیط کشت منتقل کنید. به کمک پخش کننده سترون مایعات تلقیحی را روی سطح محیط کشت پخش کنید تا مایعات بطور کامل جذب شود.پلیت‌ها را به صورت هوازی با درپوش بالا و ایستاده در گرمخانه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ روز گرمخانه گذاری کنید.

پلیت‌های کمتر از ۱۵۰ کلنی را برای شمارش انتخاب کنید و کلنی‌های مخمر و کپک را جداگانه شمارش کنید.



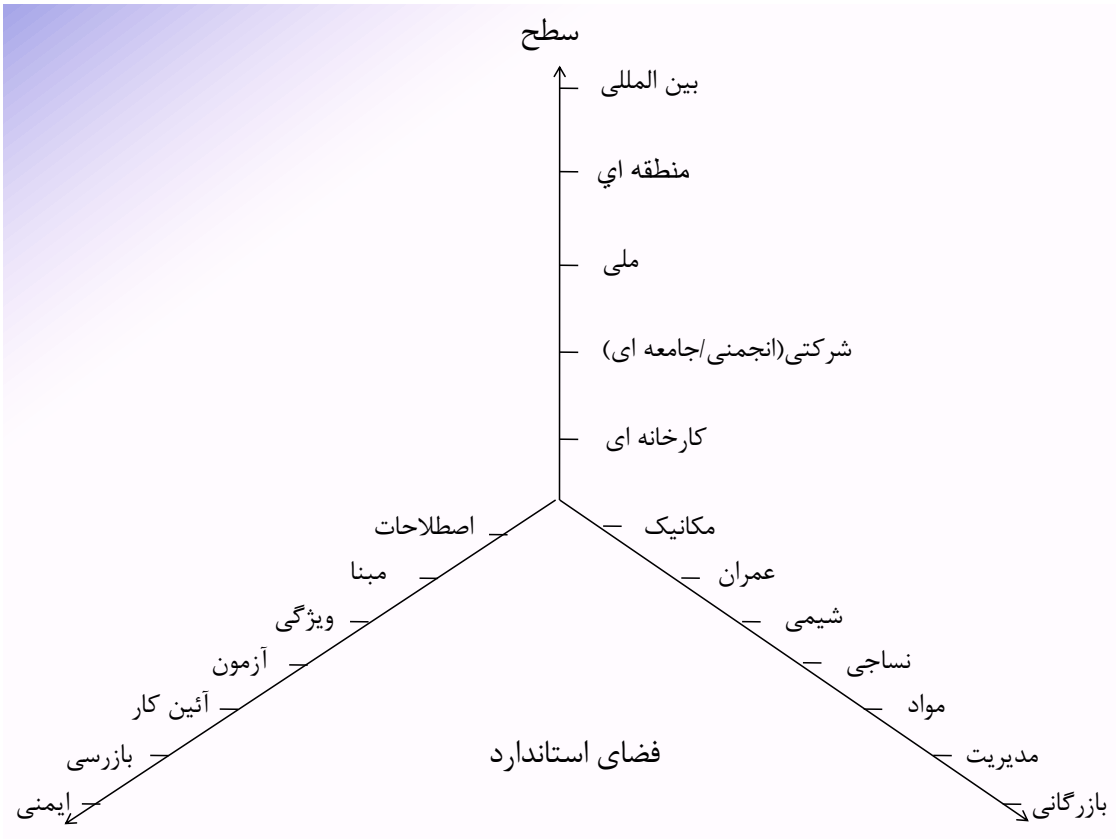
شکل ۱۶- کلنی های کپک



شکل ۱۷- کلنی های مخمر

پیوست الف
انواع استاندارد

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



الف -۲ سطح استاندارد

استانداردها دارای سه سطح کلی می باشند که می توان آن‌ها 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 کارخانه‌ای ضمن بررسی شرایط داخلی کارخانه باید شرایط و عوامل خارجی از قبیل مواد اولیه و منابع تهیه آن، چگونگی تهیه تجهیزات، بازاریابی و رقابت، نیاز مشتری و امثال آن باید مورد نوجه 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 سازمان‌ها یا مراکز دولتی و امثال آن شرکت دارند.

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

ت- استانداردهای بین المللی (ISO)، هدف از تدوین استانداردهای بین المللی حفظ و نگهداری پیشرفت‌های فنی در یک سطح معین در تمام دنیا و طرح و ارائه تکنولوژی‌های 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 جنبه‌های مختلف استاندارد نیز گسترش یافته و می تواند موضوعات مختلفی را شامل شود.

الف- استانداردهای ویژگی

ب- استانداردهای روش آزمون

پ- استانداردهای آیین کار

ت- استانداردهای ایمنی

ث- واژه نامه

ت- سایر استانداردها (شامل 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 می‌باشد.

www.isiri.org

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)

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

ب -۴- بازرسی (Inspection)

مجموع بررسی‌ها، اندازه گیری و آزمون‌هایی است که جهت مقایسه مشخصات مواد محصولات نیمه ساخته و محصولات تمام شده با مشخصات فنی یا استانداردها انجام می گیرد.

ب -۵-درستی (Accuracy)

نزدیکی نتیجه اندازه گیری یک کمیت با مقدار واقعی آن کمیت است.

ب -۶- دقت (Precision)

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

ب -۷- تجدید پذیری (Reproducibility)

نزدیکی میزان مقادیر بدست آمده از آزمون‌ها بر روی یک نمونه است در شرایطی که روش، آزمایش کننده، تجهیزات ، محل و شرایط و زمان متفاوت باشد.

ب -۸- تکرار پذیری (Repeatability)

نزدیکی مقدار نتایج اصل از یک آزمایش در شرایطی است که شرایط 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

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 به صورت کتبی ماهیانه (حداکثر تا پایان هفته اول ماه بعد) به اداره کل استاندارد استان (با امضاء مدیر کنترل کیفیت و مدیر عامل کارخانه) ارسال نماید.

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

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

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

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

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

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

پ-۲-۱-۱ نقص بحرانی:

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

پ-۲-۱-۲ نقص عمده:

نقصی است متفاوت با نقص بحرانی که فقدانی را به وجود آورده یا به نحو قابل ملاحظه ای امکان استفاده از کالای مورد نظر را برای منظور خاص، کاهش می دهد.

پ-۲-۱-۳ نقص جزئی:

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

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

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

جدول ۱- امتیازات منفی نواقص موجود در فرآورده

نوع نقص	امتیاز منفی
بحرانی	۳۰
عمده	۱۵
جزئی	۵

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

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

پ-۳-۱ در صورتیکه جمع امتیاز منفی یک گزارش نتیجه آزمون یا جمع امتیازات منفی نتایج چند آزمون به ۶۰ رسید، اداره کل استاندارد استان مربوط به واحد بصورت کتبی اخطار داده و در مورد واحدهای مشمول استاندارد اجباری برای جمع آوری کالای مغایر با استاندارد ملی با شماره سری ساخت مربوط موضوع را به کمیسیون ماده ۱۹ ضوابط اجرایی استانداردهای اجباری و تشویقی و طرز به کار بستن علایم آنها ارجاع 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 می نماید. همچنین در صورتیکه امتیاز منفی مذکور ناشی از حداقل نتایج آزمون دو نمونه برداری مختلف بوده و حداقل ۳۰ امتیاز از جمع امتیازات منفی گزارش نتیجه آزمون آخر به واسطه نقایص عمده و بحرانی باشد، نسبت به تشکیل کمیته علائم برای تعلیق پروانه کاربرد علامت استاندارد اجباری و یا ابطال پروانه کاربرد علامت استاندارد تشویقی اقدام می کند. در صورت تعلیق یا ابطال پروانه، آن اداره کل واحد مربوط را ملزم به عدم تولید (در ارتباط با استانداردهای اجباری) و یا عدم عرضه کالا با علامت استاندارد ایران (در ارتباط با استانداردهای تشویقی) نموده و مراتب را به ادارات کل استاندارد سایر استانها منعکس می کند.

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

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

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

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

پیوست ت

نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌های انواع سس مایونز و سس سالاد طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۶۹۵

ردیف	شرح آزمون	درجه اهمیت
۱	باکتری های مقاوم به اسید	عمده
۲	باکتری‌های اسید لاکتیک هتروفرمنتیتیو	بحرانی
۳	اشریشیاکلی	بحرانی
۶	کپک	عمده
۷	مخمر	عمده