ریاست جمهوری
سازمان ملی استاندارد ایران

جزوه دوره کارآموزی

میکروبیولوژی سویا برگر

شماره مدرک : ۶۲۲/۲۷/ج
تاریخ تصویب : ۱۳۹۷

تاریخ تجدید نظر:

شماره تجدیده 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 ذی‌صلاح 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)[1]،کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی(OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی(CAC)[5] 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 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، آموزش‌های اصولی و مدون در زمینه محصولات (کالا / خدمات) مشمول استاندارد اجباری از طریق برگزاری دوره‌های آموزشی می‌باشد. بخشی از این آموزش‌ها شامل کارآموزی مدیران کنترل کیفیت و کارشناسان آزمایشگاه‌های همکار سازمان می‌باشد که برگزاری این دوره‌ها از طریق استان‌ها، آزمایشگاه‌های همکار و پژوهشگاه استاندارد انجام می‌شود. 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 می‌گردد، 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 می‌فرمایید سپاسگزاریم.

محتوای دوره‌های کارآموزی

عنوان دوره کارآموزی:
میکروبیولوژی سویا برگر

گروه مخاطب:
کارشناسان ادارات کل استاندارد استان‌ها، مدیران کنترل کیفیت واحدهای تولیدی و کارشناسان آزمایشگاه های همکار

هدف از برگزاری دوره کارآموزی:
هدف از برگزاری این دوره کارآموزی آشنایی با آزمون‌های میکروبیولوژی سویا برگر بر اساس استاندارد ۹۷۱۵ می‌باشد و موارد زیر را در برمی‌گیرد:

۱-آشنایی روش‌های بهینه و جدید آزمایشگاهی
۲-یکسان سازی رویه آزمایشگاه میکروبیولوژی سویا برگر
۳-اطمینان از عملکرد صحیح آزمایشگاه ها و اعتماد به نتایج حاصله از آزمون در آزمایشگاه‌ها
۴-ارتقا سطح آگاهی و ایجاد مهارت در زمینه انجام آزمون‌های میکروبیولوژی سویا برگر
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:
ندارد

رئوس مطالب آموزشی

ردیف	رئوس مطالب	محتوای آموزشی	مدت آموزش (ساعت)		اجرا کننده		منبع/ استانداردها
			تئوری	عملی	مدرس	کارآموز	
۱	آشنایی با الزامات فنی آزمایشگاه میکروبیولوژی	آشنایی با وسایل مورد نیاز آشنایی با اصول آزمایشگاهی آشنایی با قسمت های مختلف آزمایشگاه میکروبیولوژی	۱		*		جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹
۲	آشنایی با روش تهیه محیط کشت های مورد نیاز و روش سترون سازی	روش تهیه محیط کشت مرتبط با سویا برگر و سترون کردن محیط‌ها	۰/۵	۰/۵	*	*	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹
۳	آماده‌سازی وسایل مورد نیاز و روش سترون‌سازی وسایل	روش آماده‌سازی وسایل مورد نیاز و سترون‌سازی وسایل	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 ۹۷۱۵
۵	آشنایی با شاخص‌های میکروبی و حدود مجاز آنها در سویا برگر	آشنایی با باکتریهای احتمالی موجود در سویا برگر	۱	*			جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۹۷۱۵
۶	روش آماده‌سازی نمونه در آزمایشگاه	نمونه برداری از آزمایه، توزین نمونه و تهیه سوسپانسیون اولیه و سایر رقت‌ها با استفاده از رقیق‌کننده مناسب	۰/۵	۰/۵	*	*	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۴-۸۹۲۳
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 ۹۷۱۵
۸	گرمخانه‌گذاری	گرمخانه‌گذاری در دما و زمان مناسب بر حسب باکتری‌های مورد نظر	۰/۵		*		جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۹۷۱۵

ردیف	رئوس مطالب	محتوای آموزشی	مدت آموزش (ساعت)		اجراکننده		منبع/ استانداردها
			تئوری	عملی	مدرس	کارآموز	
۹	تشخیص، شمارش کلنی ها و آزمون تاییدی	- بررسی و نحوه شمارش و محاسبه کلنی‌ها پس از گرمخانه‌گذاری - تعیین وجود یا عدم وجود باکتری‌ها - انجام آزمون‌های بیوشیمیایی مناسب جهت تایید	۱	۱	*	*	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۹۷۱۵
۱۰	ارائه گزارش آزمون	نحوه گزارش نتایج بررسی شده	۱	۱	*	*	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران۹۷۱۵
مدت دوره: دو روز							

سایر استانداردها و منابع:

استاندارد ملی ایران ۱۸۳۶: آیین کار- اصول کلی بهداشت در مواد غذایی

استاندارد ملی ایران۶۰۹۷: راهنمای کلی برای استفاده از فرآورده های پروتئین گیاهی در غذاها

استاندارد ملی ایران۲۰۸۳۴: میکروبیولوژی زنجیر مواد غذایی- روش‌های نمونه برداری برای آزمون‌های میکروب شناسی

نحوه برگزاری آزمون:

عملی	تئوری
*	*

جزوه دوره کارآموزی میکروبیولوژی سویا برگر

تهیه کننده/ تهیه کنندگان:

سودا عاملی

گروه پژوهشی/ آزمایشگاه:

میکروبیولوژی/ آزمایشگاه غلات و فرآورده های آن

به سفارش دفتر آموزش و ترویج استاندارد

منابع و مآخذ:

۱-استاندارد ملی ایران ۱۸۱۰: میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-روش جستجوی سالمونلا در مواد غذایی

۲-استاندارد ملی ایران ۲۹۴۶: میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش جستجو و شمارش اشریشیاکلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی

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

۴-استاندارد ملی ایران۶۰۹۷ : راهنمای کلی برای استفاده از فرآورده های پروتئین گیاهی در غذاها

۵-استاندارد ملی ایران شماره۳-۶۸۰۶: میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-شمارش استافیلوکوکوسهای کواگولاز مثبت (استافیلوکوکوس ارئوس و سایر گونه ها)

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

۷-استاندارد ملی ایران ۴-۸۹۲۳: میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون میکروبی- قسمت ۴- مقررات ویژه برای آماده سازی فراورده ها به جز شیر، گوشت، ماهی و فراورده های آنها

۸- استاندارد ملی ایران ۹۷۱۵: سویا برگر- ویژگی ها و روش های آزمون

۹-استاندارد ملی ایران۱-۱۰۸۹۹: میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -روش جامع برای شمارش کپک ها و مخمرها-قسمت اول -روش شمارش کلنی در فرآورده های با فعالیت آبی (a_W) بیشتر از ۰/۹۵

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

۱۱- تنگستانی، مهرنوش، آزمایشگاه میکروبیولوژی عمومی
۱۲-یگانه، مهرداد، استاندارد و استاندارد کردن، چاپ اول، موسسه دانش پارسیان، ۱۳۸۹
۱۳- میرزایی، حبیب اله. سویا در صنایع غذایی، انتشارات علم کشاورزی ایران
14. Veterinary Microbiology and Microbial Disease by: P.J.Quinn , B.K. Markey
Translated by: Dr. T. Zahraei Salehi, Dr. J. Shayegh

فهرست

عنوان	صفحه
آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران	ب
پیشگفتار	ج
محتوای دوره کارآموزی	د
مقدمه	ی
۱ هدف	۱
۲ استانداردهای ملی ایران	۱
۳ اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی	۲
۴ نمونه برداری	۲۷
۵ روش‌های آزمون میکروبیولوژی در سویا برگر	۲۸
۶ خصوصیات میکرواورگانیسم‌ها	۲۸
۷ اصطلاحات و تعاریف	۳۰
۸ اصول آزمون	۳۱
۹ محیط‌های کشت و رقیق کننده‌ها	۳۱
۱۰ روش اجرای آزمون	۳۳
۱۱ بیان نتایج	۵۱
پیوست الف - انواع استاندارد	۵۳
پیوست ب- مفاهیم مورد استفاده در کنترل کیفیت	۵۵
پیوست پ- اطلاعاتی	۵۶
پیوست ت- نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌های میکروبیولوژی سویا برگر- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون طبق استاندارد ملی ایران شماره ۹۷۱۵	۵۹

مقدمه

امروزه استفاده از محصولات سویا در صنایع غذایی روز به روز در حال افزایش است و تولید جهانی محصولات سویا نزدیک به ۲۳۰ میلیون تن در سال است. این جایگاه توسط سویا و محصولات آن، ارزش بالایی است که دارد به ویژه ار نظر پروتئین ها و اسیدهای آمینه‌ای که دارد.

سویا با نام علمی Glycine max گیاهی است از تیره نخود (لگومینوز) که به صورت بوته‌ای استوار و با شاخ برگ زیاد رشد می‌کند. ریشه سویا مستقیم و با انشعاب زیاد است. اما در شرایط ایران ریشه در عمق ۳۰ سانتی‌متر خاک پراکنده است. روی ریشه سویا نوعی باکتری همزیست بنام Rhizobium japonicum مشاهده می‌شود.

شکل ۱- گیاه سویا

نیام و دانه آن (لوبیا) غذای میلیون‌ها نفر را فراهم می‌کنند و در تهیه مواد شیمیایی نقش عمده دارند. سویا احتمالاً حاصل اهلی‌سازی گیاهی وحشی در شرق آسیا است. روغن استخراج شده از دانه‌های سویا یکی از مهم‌ترین انواع روغنها است. این روغن حاوی اسید لینولئیک بسیار بالایی است و به همین دلیل از آن نمی‌توان برای تهیه روغن سرخ کردنی استفاده کرد. دانه سویا از لحاظ اسید آمینه میتونین نسبت به کنجد فقیر است اما از لحاظ اسید آمینه لیزین در سطح بالایی قرار دارد سویا بیش از سایر دانه‌ها به پروتئین حیوانی شباهت دارد. روغن سویا ۴۹ درصد اسیدلینولئیک و ۲۵ درصد اسیداولئیک دارد. میزان پروتئین دانه سویا بسیار بیشتر از سایر دانه‌های روغنی است. ارقام زیر نشان دهنده تفاوت عمده سویا با سایر دانه‌های روغنی به لحاظ میزان روغن و پروتئین است. میزان پروتئین سویا ۳۰-۵۰ درصد، کلزا ۱۸-۲۵ درصد، آفتابگردان ۱۵-۲۵ درصد، کنجد ۱۹-۲۵ درصد، بادام زمینی۲۵-۳۵ درصد می‌باشد. میزان روغن در سویا ۱۸-۲۵ درصد، کلزا ۴۰-۵۰ درصد، آفتابگردان ۲۵-۵۰ درصد، کنجد ۲۵-۴۵ درصد، بادام زمینی ۴۵-۶۵ درصد می‌باشد. همان طور که ملاحظه می‌شود میزان پروتئین سویا دو برابر سایر دانه‌های روغنی است و البته درصد روغن آن نیز از سایر دانه‌های روغنی رایج کمتر است. وجود پروتئین زیاد سبب شده است که کنجاله روغن کشیده شده آن برای تغذیه انسان بسیار مناسب باشد.

آنالیز کیفی دانه سویا در ۳ طبقه کلی انجام می گیرد:

۱) نقص ها (Defects)

۲) از نظر محل نگهداری و فاکتورهای نگهداری (shipment and storage factor)

۳) فاکتورهای مرتبط با استفاده نهایی (End use related factor)

نوع دانه های سویا و کاربرد های آن

دانه های سویا با توجه به اندازه آنها کاربردهای متفاوتی دارند. دانه سویای با اندازه بزرگ برای تولید محصولات سویا شیر و توفو[1] کاربرد دارد، که این دانه‌ها دارای خصوصیات زیر می‌باشند:

- محتوای پروتئین بالا
- میزان لیپواکسیژناز و روغن کم

می توان اینگونه تحلیل کرد که مبارزه و کیفیت بالای سویا شیر تحت تاثیر میزان پروتئین بالا و میزان روغن کم آن است و مزه سویا شیر و محصولات آن تحت تاثیر قندهای محلول در دانه است که مرغوب ترین سویا شیر دارای کربوهیدرات وسوکروز بالا، رافینوز کم است.

فرآورده‌های سویا

با بهره گیری از تکنولوژی مدرن، بشر امکان تولید انواع مختلف فرآورده های سویا را با طعم‌های متفاوت دارد. به طور کلی محصولات سویا را می‌توان به دو دسته محصولات تخمیری و غیر تخمیری تقسیم کرد. محصولات تخمیری مانند سس سویا، تمپه، خمیر سویا یا میسو، توفو و شیر سویا و غیر تخمیری مثل آجیل سویا و سویا برگر هستند.

شکل۲- فرآورده‌های سویا

برگرهای بدون گوشت[2]

عبارت است از فرآورده‌ای مشابه برگرهای گوشتی که در آن بجای گوشت ترکیباتی مانند: سبزی‌ها و یا سویا می‌باشد که همراه با روغن گیاهی و ادویه‌ها و دیگر ترکیبات غیر گوشتی که به وسیله دستگاه مکانیکی مخلوط گردیده و به شکل گرد یا دایره‌ای شکل در بسته بندی‌های مجاز و به صورت منجمد عرضه می‌گردد.

1- Tofu
2- Meatless burger

سویا برگر

از جمله فرآورده‌های بدون گوشت پروتئینی متعلق به طبقه بندی مواد غذایی و جزء ردۀ برگرهای سبزی و محصولی با میزان چربی اشباع و کلسترول پایین که در آن از سویا به عنوان مادۀ اصلی استفاده می‌شود و سایر مواد شامل: پنیر، روغن گیاهی، آب، ادویه، سبزی‌های مختلف و افزودنی‌های معطر و مجاز به آن اضافه می شوند و سپس بوسیله دستگاه مکانیکی مخلوط و به شکل گرد یا دایره ای شکل به صورت منجمد بسته بندی و عرضه می‌گردد. امروزه فراورده های پروتئینی مورد استفاده اقشار مختلف قرار می‌گیرد. با توجه به اینکه گروهی از مصرف کنندگان بـه دلایـل تغذیـه ای و اقتصـادی ممکن است نیازمند استفاده از پروتئین های غیر گوشتی باشند، به این منظور کوشش های فراوانـی بـرای تولید فرآورده های با منشاء پروتئین گیاهی و غیره صورت گرفته است. این فرآورده‌ها می توانند بخشـی از نیازهای تغذیه‌ای مصرف کنندگان را تامین نماید.

جزوه دوره کارآموزی میکروبیولوژی سویا برگر

۱ هدف

هدف از تدوین این جزوه کارآموزی آشنایی با روش‌های آزمون میکروبیولوژی سویا برگر، بر اساس استانداردهای ملی ایران شماره های ۹۷۱۵ می‌باشد.

یادآوری ۱- توصیه می‌شود کارآموزان این دوره با الزامات کلی و راهنما برای آزمون‌های میکروبیولوژی براساس استاندارد ملی ایران به شماره ۹۸۹۹ و نیز استاندارد ۹۷۱۵ 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 مرتبط

استانداردهای ملی ایران مرتبط با آزمون میکروبیولوژی با آزمون سویا برگر، به شرح جدول ۱ می‌باشند:

جدول ۱- لیست استانداردهای میکروبیولوژی سویا برگر

ردیف	عنوان استاندارد	شماره استاندارد
۱	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام_ روش جستجوی سالمونلا در مواد غذایی	۱۸۱۰
۲	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام_ روش جستجو و شمارش اشریشیاکلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی	۲۹۴۶
۳	میکروبیولوژی زنجیره غذایی_ روش جامع برای شمارش میکروارگانیسم‌ها- قسمت ۱- شمارش کلنی در ۳۰ درجه سلسیوس با استفاده از روش کشت آمیخته	۵۲۷۲-۱
۴	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام_ روش شناسایی و شمارش استافیلوکوک‌های کوآگولاز مثبت در مواد غذایی	۶۸۰۶ -۳
۵	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون میکروبی_ قسمت ۴- مقررات ویژه برای آماده سازی فراورده‌ها به جز شیر، گوشت، ماهی و فراورده‌های آنها	۸۹۲۳ -۴
۶	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش جامع برای شمارش کپک‌ها و مخمرها_ قسمت اول _ روش شمارش کلنی در فرآورده های با فعالیت آبی (a_w) بیشتر از ۰/۹۵	۱۰۸۹۹-۱

۳ اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

با ورود به آزمایشگاه میکروبیولوژی و آغاز کار در این محیط لازم است یکسری اصول اولیه مورد توجه قـرار گیرد. بخشی از این اصول و قواعد مربوط به ایمنی فرد آزمایش کننده بوده و برخی نیز به ایمنـی محـیط 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 زیر لازم است:

- دریافت وانبارش نمونه‌ها
- آماده‌سازی نمونه‌ها به خصوص برای مواد خام (مانند فرآورده‌های پودری حاوی تعداد زیاد میکروارگانیسم‌ها)
- آزمون نمونه ها (ازسوسپانسیون اولیه) شامل گرمخانه‌گذاری میکروارگانیسم‌ها
- آزمون میکروارگانیسمهای بیماریزای احتمالی
- نگهداری سویه مرجع و سایرسویه‌ها
- آماده‌سازی وسترون‌سازی محیط‌های کشت و وسایل
- انبارش محیط‌های کشت و واکنشگرها
- آزمون سترونی موادغذایی
- آلودگی زدایی
- شستشو و تمیزکردن وسایل شیشه‌ای و سایر تجهیزات
- انبارش مواد شیمیایی مخاطره آمیز، ترجیحاً نگهداری درکابینت‌ها، قفسه‌ها، اتاقها

۳-۱-۲ فضای عمومی

فضاهای جداگانه برای موارد زیر توصیه می شود:

- 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، محیط های کشت و خطر عفونت کارکنان اقدامات بهداشتی زیر باید انجام شود:

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

۳-۳ وسایل و تجهیزات

توصیه می‌شود مطابق با شرایط خوب آزمایشگاهی، کلیه ی وسایل و تجهیزات تمیز و درمحل مناسب نگهداری شوند. پیش از استفاده بهتر است وسایل از نظر داشتن شرایط لازم برای کار تصدیق شود و درصورت 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 شیشه ای 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.

شکل۳ - وسایل شیشه‌ای

فور[1] 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 وقتی شرایط دمایی برقرار شد، روند سترون سازی باید برای حداقل یک ساعت در دمای ۱۷۰°C ± ۱°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 نشود. پیش از سترون‌سازی، همه وسایل فلزی و شیشه‌ای را تمیزکنید و در آون قرار دهید.پس ازسترون‌سازی، به منظور پیشگیری ازشکستن وسایل شیشه‌ای بهتر است پیش از خارج کردن از آون، آن‌ها را خنک کنید.

شکل۴ - فور یا آون

۱ - Four

اتوکلاو

اتو کلاو برای استریل کردن ابزار پزشکی و آزمایشگاهی در فشار و دمای بالا و با استفاده از بخار آب کار برد دارد. این دستگاه قادر است بخار آب اشباع شده 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.

شکل ۵- اتوکلاو

انکوباتور[۱](اتو)

انکوباتور شامل اتاقک عایق بندی شده با قابلیت نگهداری دمای ثابت و توزیعی 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. در انواع انکوباتورهای آزمایشگاهی (معمولی، شیکردار، یخچالدار، CO_2دار) در آزمایشگاه‌های میکرو بیولوژی و بیولوژی سلولی کاربرد اساسی دارد.

شکل ۶- انواع انکوباتور

۱ - Incubator

میکروسکوپ [۱]

میکروسکوپ یکی از وسایل آزمایشگاهی اصلی در آزمایشگاه زیست شناسی است. از دو واژه یونانی میکرو به معنی کوچک و سکوپ، به معنی دیدن، گرفته شده است. اصول کلی در تمامی انواع میکروسکوپ ها بر اساس عبور نور با طول 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 میکروسکوپ ها شامل: استریو میکروسکوپ[۲]، میکروسکوپ اینورت[۳]، میکروسکوپ فلورسنت[۴]، میکروسکوپ دوچشمی[۵] می‌باشد.

شکل۷- میکروسکوپ نوری

حمام مایع[۶] (بن ماری[۷]) بادمای 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

---

۱ - Microscopes

۲ –دارای بزرگنمایی ۵۰ برابر و قابلیت نصب دوربین می‌باشد و در بررسی اجزا و موجوداتی که دارای بعد و حجم می‌باشند.

۳ - این دستگاه دارای قابلیت فازکنتراست و نصب دوربین عکاسی و فیلمبرداری می‌باشد و در بررسی نحوه حرکت، تولید مثل، شناسایی، شمارش زئو و فیتو پلانکتون‌ها و سایر میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌گردد.

۴ - جهت بررسی و مشاهده اجزا و اندامک هایی از سلول و میکروارگانیسم‌هایی که با رنگ فلورسنت رنگ آمیزی شده باشند، استفاده می‌گردد. این دستگاه دارای قابلیت عکس برداری از نمونه ها و ثبت اطلاعات نیز می‌باشد.

۵ - این دستگاه میکروسکوپ دوچشمی نوری است دارای عدسی های۵، ۱۰، ۲۰،۴۰ و ۱۰۰ و قابلیت فاز کنتراست و نصب دوربین عکسبرداری می باشد که برای مشاهده معمولی و نمونه هایی که رنگ آمیزی نشده اند مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۶ - Water bath

۷ - Bain **marie**

تنظیم در دماهای مختلف میباشد. 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 ۸- انواع حمام مایع با دمای ثابت

شمارشگر کلنی

شکل ۹- شمارش گر

pH متر

pH متر برای اندازه‌گیری اختلاف پتانسیل در یک دمای معین بین الکترودسنجش و الکترود مرجع یا قرار

دادن هردو الکترود داخل فرآورده به کار می‌رود. قابلیت اندازه‌گیری باید با دقت ۰/۰۵ واحد pH باشد.

شکل۱۰- pH متر

همگن کننده،خردکن و مخلوط کن

این تجهیزات برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه از فرآورده‌های مورد آزمون استفاده می‌شود.
وسایلی‌که ممکن است به‌کار رود عبارت است‌از:

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

شکل ۱۱- 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 ۱۲- 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:

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

۱-***Bacillus subtilis***

۲-***Bacillus. Stearothermophilus***

۳-۵ آب

برای آماده‌سازی محیط‌های کشت، فقط از آب خالص[1] یعنی آب مقطر[2]، آب بدون املاح[3]، آب یون زدایی شده[4] یا تولید شده با استفاده از اسمز معکوس[5] 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.

شکل ۱۳- دستگاه دیونایزر

۳-۶ محیط کشت

کشت و تکثیر باکتریها در محیط های 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 می باشد.

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 می گویند.

بیشتر محیط های کشت که در پلیت مصرف می شوند، محیطهای کشت عمومی هستند که اساساً برای

1-Purified water
2- Distilled
3 -Demineralized
4- Deionized
5- Reverse osmosis

تهیه مواد غذایی لازم جهت رشد باکتری ساخته شده‌اند. بعضی مواقع این محیطهـای کشـت عمـومی را بـا 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 بایـد بعـد از اتوکلاو شدن محیط بطور سترون این مواد اضافه شوند. نمونه هایی از این مواد مغذی عبارتنـد از: شـیر بـی چربی، خون گوسفند، زرده تخم مرغ و ....

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 می باشند، در مواردی برای کشت نوع بخصوصی از یک میکروارگانیسم باید از یک نوع محیط کشت بخصوص با ترکیبات مشخص استفاده شود. بطور کلی محیط های کشت باید دارای مشخصات معینی باشند و هنگام تهیه و استفاده از محیط‌های کشت باید به نکات زیر توجه شود:

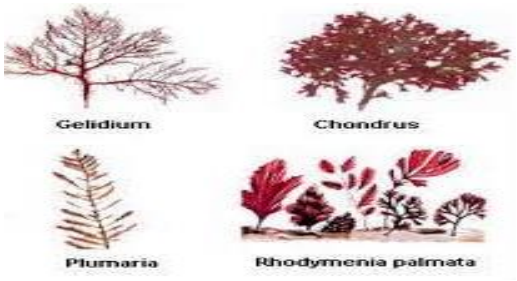
- تمام محیط کشتها باید واجد مواد غذایی ضروری برای رشد میکروبها باشند.
- pH محیط کشت باید در حد معین قبل از استفاده برای کشت تنظیم شود.
- ظروف مورد استفاده برای تهیه محیط کشتها باید کاملا تمیز و عاری از مواد خارجی باشند.
- آب مقطر مورد استفاده باید بطریقه صحیح تهیه شود.
- درجه حرارتی که برای استریل کردن 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 مـواد شـیمیایی موجـود در محیط کشت می شوند.

محیط‌های کشت و معرف‌های مورد استفاده در آزمون باید مناسب برای اهداف آزمون های 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 اجزای تشکیل دهنده محیط کشت

محیط کشت فرمولاسیونی است از مواد، به صورت مایع، نیمه جامد یا جامد، که دارای اجزای تشکیل دهنده طبیعی و/یا صناعی بوده و به منظور حمایت از تکثیر (همراه با ازدارندگی میکروارگانیسم‌های معین یا بدون باز دارندگی)، شناسایی یا حفظ قابلیت زیستی میکروارگانیسم ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. آگار به عنوان

عامل سفت کننده در محیط کشت‌های جامد و نیمه جامد کار برد دارد. آگار ترکیبی است پلی ساکاریدی که از دیواره سلولی برخی از گونه های جلبک[1] قرمز و (عمدتا از جنس *گراسیلاریا*[2] و *جیلیدیوم*[3]) استخراج می‌شود. آگاروپکتین یک پلیمر اسیدی است و از زیرواحدهای گالاکتوز به صورت دو نوع پلیمر آگارز[4] و آگاروپکتین[5] ساخته شده است. آگار برای میکروارگانیسم‌ها ارزش غذایی ندارد و هیچ میکروارگانیسمی نمی‌تواند آن را هضم کند. نقطه ذوب آن ^0C ۹۵ و با رسیدن دمای آن به حدود ^0C ۴۳ شبکه‌ای ایجاد می‌کند که سبب جامد شدن محیط می شود. محیط‌های جامد معمولاً دارای (۱۵- ۱۳) گرم بر لیتر آگار هستند.



شکل۱۴ –گونه‌های از جلبک دریایی

۳-۶-۱-۲ طبقه بندی محیط کشت بر اساس ثبات فیزیکی:

محیط های کشت را از جنبه های مختلف تقسیم بندی می‌کنند:

تقسیم بندی بر اساس میزان آگار

محیط‌هاي کشت به سه صورت زیر می‌باشند:

- محیط کشت جامد (solid media)
- محیط کشت نیمه جامد (semi solid media)
- محیط کشت مایع یا آبگوشت (liquid or broth media)

---

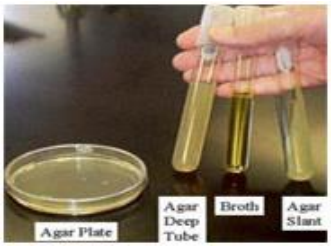
۱ -Algae

۲ -Gracilari

۳ -*Gelidium*

۴ -Agarose

۵ -Agaropectin

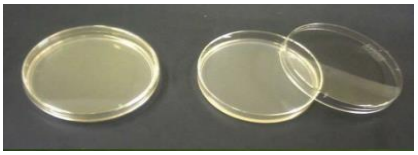


شکل ۱۵- انواع محیط کشت

محیط کشت جامد[۱]

محیط‌های جامد به علت دارا بودن آگار در ترکیب خود به صورت جامد بوده و متناسب با میکروارگانیسم‌ها و آزمایش‌های مورد نظر می‌توان آنها را در لوله، ظروف پتری (پلیت) و یا ظروف دیگر مورد استفاده قرار داد 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



شکل۱۶ -محیط کشت آگار دار

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

الف کشت‌های عمقی[۱]

۱-Solid media

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

ب کشت در داخل محیط جامد[۲]

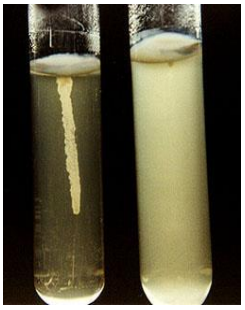
به لوله‌های آزمایش محتوی محیط کشت جامد پس از ذوب شدن که تا ^0C ۴۵ سرد شده است. باکتری مورد نظر را افزوده و لوله را بین دست‌ها تکان می‌دهند تا باکتری‌ها کاملاً با محیط کشت مخلوط شوند، سپس لوله آزمایش را به طور عمودی قرار می‌دهند تا محیط بسته شود.

پ کشت شیب دار[۳]

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

- **محیط کشت نیمه جامد[٤]**

محیط‌های نیمه جامد نیز وجود دارد.که میزان آگار آن نسبت به محیط‌های جامد کمتر است (۰/۲- ۰/۵در صد آگار دارند). مثل SIM این نوع محیط‌های کشت برای مشاهده حرکت باکتری‌ها استفاده می‌شود. به محیط کشت جامد ریخته شده در لوله یا بطری کوچک، که هنگام جامد شدن، به حالت شیبدار نگهداری می‌شوند "اسلنت" گفته می‌شود. چنانچه محیط کشت در ته ظروف ریخته شود به آن "بات" گفته می‌شود.



شکل۱۷ -محیط کشت نیمه جامد

- **محیط کشت مایع یا آبگوشتی [٥]**

۱- Stab Cultures

۲- Shake Cultures

۳ -Slant media

۴ -Semi Solid media

۵ -Liquid or broth media

محیط‌های مایع به علت نداشتن آگار در ترکیب خود به صورت جامد در نیامده و متناسب با نوع میکروارگانیسم و آزمایش‌های مورد نظر می‌توان آنها را در لوله‌های آزمایش، ارلن مایر و یا ظروف دیگر مورد استفاده قرار داد، مانند: نوترینت براث و مولر هینتون براث. محیط‌های مایع معمولاً فاقد آگار هستند یا مقدار آگارشان بسیار کم است (حدود ٪۰/۲).

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

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

شکل۱۸ -محیط کشت مایع یا آبگوشتی

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 آگارشان بسیار کم است (حدود ٪۰/۲).

۳-۶-۱-۳ طبقه بندی محیط کشت بر اساس کاربرد

محیط های کشت باکتری را از نظر نوع مواد تشکیل دهنده و از نظر کاربرد به چهار دسته تقسیم می‌کنند:

- **محیط کشت انتقالی**[۱]

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

- **محیط کشت نگه‌داری کننده** [۳]

محیط کشتی است که به منظور نگهداری و حفظ قابلیت زیستی میکروارگانیسم‌ها در یک دوره زمانی طولانی طراحی شده، تا از آنها در برابر اثرات نامطلوبی که ممکن است در طی ذخیره

۱ -Transport medium

۲ -Stuartor amiestransport medium

۳ -Preservation medium

سازی طولانی مدت به وجود آید محافظت کرده و پس از این مدت، به آنها قدرت بازیابی دهد.
مانند: "محیط کشت دورستاگ[۱]"، اسلوپ‌های : نوترینت آگار[۲]"

- **محیط کشت باز یابی [۳]**

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

مانند" آب پپتونه بافری[۴]"

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

- **محیط کشت پیش غنی کننده[۵] و غنی کننده [۶]**

محیط مقوی بوده که دارای مواد تغذیه‌ای زیادی نظیر ویتامین‌ها، لیپیدها، اسیدهای آمینه برای رشد میکروارگانیسم است. بنابراین تعداد زیادی از باکتریها روی آن بخوبی رشد می کنند، مانند: شکلات آگار، بلادآگار، تریپتون سوی براث

- **محیط کشت غنی کننده انتخابی[۷]**

این محیط به میکروارگانیسم‌های خاص امکان رشد می‌دهد و به واسطه یک ماده مهار کننده، رشد تمام میکروارگانیسم‌ها بجز میکروارگانیسم مورد نظر را کاملا یا تا حدودی مهار می‌کنند. مانند: محیط کشت پپتون سوی را پاپورت- واسیلادیس[۸]

- **محیط کشت غنی کننده غیر انتخابی (محیط کشت پایه)[۹]**

این محیط کمترین مقدار مواد غذایی برای رشد باکتریها را دارد و مبنای تهیه انواع و اقسام محیطهای کشت می باشد. این محیط به طیف وسیعی از میکرو ارگانیسم‌ها امکان رشد می‌دهد زیرا فاقد ماده ضد میکرب است، مانند: محیط نوترینت آگار، نوترینت براث، برین هارت اینفیوژن براث

- **محیط کشت جداکننده[۱]**

---

۱ -Dorset agar
۲ -Nutrient medium
۳ -Resuscitation medium
۴-Buffered peptone water
۵ -Pre- enrichmen medium
۶ -Enrichmen medium
۷ -Reference medium
۸ -***Rappaport-Vassiliadis*** (RV)
۹ -Basic Media

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

- **محیط کشت جداکننده انتخابی [۲]**

محیط کشتی که به میکرو ارگانیسم خاص و هدف امکان رشد میدهد و از رشد سایر میکروارگانیسم‌ها بطور کامل یا قسمتی جلوگیری می کند. 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 شده اند و برای سایر ارگانیسم‌ها مضر می‌باشند آنها را محیط‌های انتخابی می‌نامند. مثالی از این نوع محیط ها، XLD آگار ، 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.

- **محیط کشت جداکننده غیر انتخابی [۳]**

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

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

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

- **محیط کشت افتراقی[۶]**

محیط کشت تشخیصی بوده که برای تعیین مشخصات و خصوصیت فیزیولوژیک یا بیوشیمیایی میکروارگانیسم‌ها را به منظور شناسایی فراهم می‌کند. محیط کشت تشخیصی بوده که کلنی باکتریهای مختلف روی آن کاملاً از همدیگر متمایز می گردد، 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 محیط ها کلنی‌های سفید رنگ تشکیل می دهند. از محیطهای افتراقی دیگر محیط TSI، سیمون سیترات را می‌توان نام برد. این محیط‌ها برای رشد

---

۱ -Selective isolation medium

۲ -Selective isolation medium

۳ -Selective isolation medium

۴ -Chromogenic

۵ -Fluorogenic

۶ -Media Differential

باکتریهای گرم منفی روده‌ای (انتروباکتریاسه) مناسب هستند. چون وجود املاح صفراوی در محیط مانع از رشد باکتریهای گرم مثبت در محیط می شوند.

- **محیط کشت شناسایی** [۱]

محیط کشت با قدرت تشخیصی بالا که نیاز به استفاده از محیط کشت‌های تاییدی ندارد. مانند "بایل اسکولین آزاید[۲] "

- **محیط کشت شمارش** [۳]

محیط کشت انتخابی/غیر انتخابی که بیشتر برای شمارش میکروارگانیسم‌ها بکار می‌رود. برد پارکر[۴]"ایبست اکسترکت آگار [۵]"

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

- **محیط کشت تاییدی** [۶]

محیط کشتی است که برای شناسایی یا تعیین هویت مشخصات میکروارگانیسم‌ها پس از یک مرحله بازیابی مقدماتی و/یا غنی سازی و/یا جداسازی، بکار گرفته می‌شود مانند :"کلینگر آیرون آگار [۷]"

- **محیط کشت دارای ترکیبات خنثی کننده** [۸]

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

- **محیط کشت با موارد استفاده متعدد**

محیط کشت با کار برد بیشتر مانند: "بلاد آگار[۹]"که یک محیط بازیابی، جداکننده ، افتراقی برای رد یابی همولیز بکار می‌رود .

- **محیط کشت مرجع**

محیط کشت غیر انتخابی مانند:"تریپتون سوی آگار[۱۰]"که برای ارزیابی مقایسه‌ای کنترل عملکرد محیط

---

۱ -Identification medum

۲ - ***Bile Esculin Azide Agar*** (*Enterococcu*s Selective Agar)

۳ -Enumeration medium

۴ -***Baird-Parker Agar***

۵ -***Yeast Extract Agar***

۶ -Confirmation medium

۷ -Kligler_Iron_Agar_(KIA)

۸ -Medium containing nutralisers

۹ -Blood agar

۱۰-Tryptic Soy Agar(TSA)

کشت بکار می‌رود.

۳-۶-۲ آماده سازی و استریلیزاسیون محیط‌های کشت

۳-۶-۲-۱ آماده سازی صحیح محیط کشت یکی از مراحل اصلی برای تضمین کیفیت نتایج آزمون میکروبیولوژی است با رعایت شرایط خوب ساخت و دستور العمل تولید کننده، و با توجه به شناسه آن می‌توان مقدار لازم از محیط کشت (پودر خشک) را با دقت توزین کنید.

۳-۶-۲-۲ آب مقطر

برای آماده سازی محیط کشت، از آب خالص (مقطر) آب بدون املاح، آب یون زدایی شده با استفاده از اسمز معکوس یا کیفیتی معادل آن باشد در داخل ارلن مخلوط کنید سپس در صورت لزوم همراه با گرم کردن، سریعاً یکنواخت کنید.

آلودگی میکروبی آب از 10^2 *cfu* در هر میلی لیتر بیشتر نباشد و طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵۲۷۱ پایش شود.

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

۳-۶-۲-۳ pH

pH محیط کشت را با استفاده از pH متر اندازه گیری کنید در صورت لزوم، قبل از سترون‌سازی تنظیم شود، به این ترتیب که pH محیط کشت پس از سترون‌سازی و رسیدن دما به ۲۵°C، باید در محدوده مورد نظر ۰/۲± واحد اندازه گیری باشد، مگر اینکه مقادیر دیگری توصیه شده باشد.

pH معمولاً با استفاده از محلول سدیم هیدروکسید با غلظت تقریبی: ۴۰g/l (1 mol/l) یا هیدروکلریک اسید انجام می‌شود. اگر تنظیمpH پس از سترن‌سازی انجام شود، باید از محلول‌های سترون استفاده شود.

۳-۶-۲-۴ توزیع

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

۳-۶-۲-۵ سترون سازی

---

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

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

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 *آنتروباکتریاسه*‌ها 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 سترون سازی را طبق دستورالعمل‌های تولیدکننده یا استانداردهای مناسب انجام دهید.

پس از سترون کردن، محیط‌ها را در شرایطی که از تغییر ترکیبات جلوگیری کند، نگهداری کنید برای مثال از نور و خشک شدن محافظت کنید. اگر محیط کشت بلافاصله استفاده نشوده یا شرایط دیگری در استاندارد خاصی مشخص نشده باشد، در یخچال در دمای $^{\circ}C$(۳± 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 $^{\circ}C$(۴۷ تا۵۰)، خنک کنید.

۳-۶-۲-۶ افزودن مکمل‌ها

مکمل‌هایی که حساس به حرارت هستند، باید بعد از اینکه دمای محیط به کمتر از $۵۰^{\circ}C$ رسید، به محیط 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.

۳-۶-۲-۷ آماده سازی محیط های 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 متر۹۰، 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 $۴۰^{\circ}C$ 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.

۳-۶-۲-۸ نگهداری و مدت زمان نگه داری محیط کشت آماده شده

شرایط نگه داری، تاریخ انقضاء و توصیه‌های دیگر مربوط به محیط کشت و پلیت‌های آگاردار آماده شده تجارتی بهتر است طبق دستورالعمل تولیدکننده نگهداری و استفاده شود.

۳- ۷روش های کشت در میکروبیولوژی

کشت در پلیت به سه روش قابل انجام است.

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

۳-۷-۱ روش کشت خطی

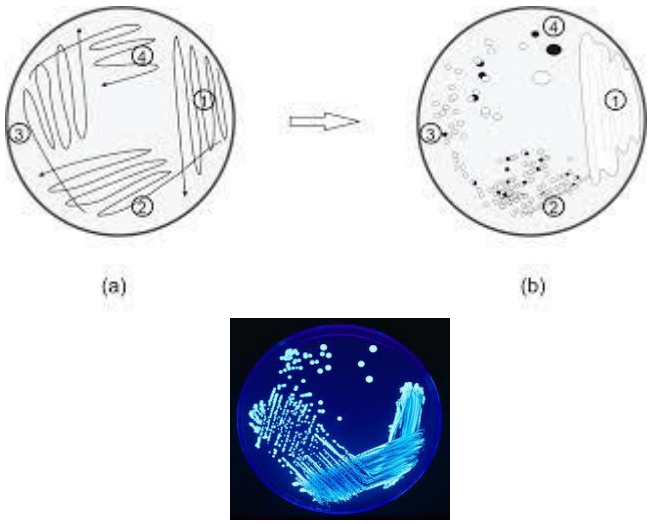
در این روش از محیط پیش ریخته استفاده می شود. به این ترتیب که ابتدا بوسیله یک حلقه کشت سترون شده مقداری از کلنی باکتری را برداشته و آنرا روی سطح محیط پیش ریخته بصورت خطهای موازی و در چند جهت می‌کشید. در کشتهای خطی برای بدست آوردن کلنی‌های تک می‌توانید پلیت را به ۴ قسمت تقسیم کنید، بعد در قسمت اول ابتدا 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 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 می باشد 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.

---

[۱] -***Streak plate***

[۲] -Surface plating technique

[۳] -Pour plating technique



شکل ۱۹- کشت خطی

۳-۷-۲روش کشت سطحی

این روش کشت اغلب برای شمارش میکروارگانیسم‌هایی است که قابلیت رشد و تشکیل کلنی در سطح محیط کشت جامد را دارند و فراورده‌های مورد مصرف انسان و خوراک دام، نمونه های محیطی و همچنین در مورد فراورده‌هایی که دارای میکروار گانیسم‌های حساس به گرما[۱] هستند و احتمال دارد قسمت معنی داری از فلور کل را تشکیل دهند (مانند: ارگانیسم‌های سرماگرا [۲]) در غذاهای یخزده و منجمد، غذاهای خشک شده، غذاهای دیگری که ممکن است دارای ارگانیسم‌های حساس به گرما باشند، فراورده‌هایی که دارای باکتری‌های هوازی اجباری هستند که احتمال دارد قست معنی داری از فلور کل را تشکیل دهند (مانند: گونه‌های *سودوموناس*[۳]) و فراوردهایی که داری ذرات کوچکی هستند که تشخیص آنها از کلنی‌های تشکیل شده در کشت آمیخته به سختی انجام می‌شود، فرآورده‌هایی که رنگ شدید آنها باعث جلوگیری از تشخیص کلنی در کشت آمیخته می‌شود، فرآورده‌هایی که برای تشخیص بین انواع مختلف کلنی به عنوان قسمتی از ارزیابی کمیت غذا مورد نیاز است، به کار می‌رود در این نوع کشت، از محیط پیش ریخته استفاده می‌شود. برای اینکار ابتدا یک رقت معینی از محیط مایع تهیه کنید. 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.

---

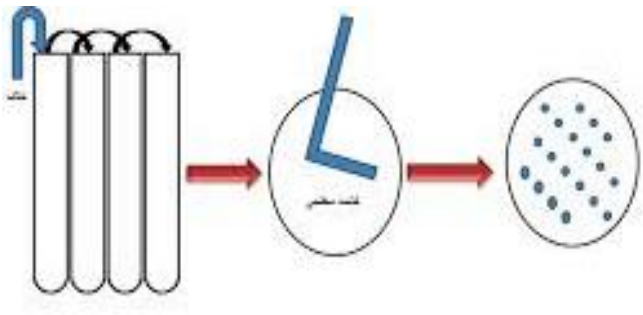
۱ -Heat-sensitive organisms

۲ -Psychrotrophic

۳ -*Pseudomonas spp.*

چون هنگام ریختن محیط کشت بصورت پیش ریخته ممکن است بخار آب روی درب پلیت و سطح محیط جمع شود برای خشک کردن آن می توان محیط‌های کشت را در یک گرمخانه با دمای ^{o}C (۵۰تا ۲۵) 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.

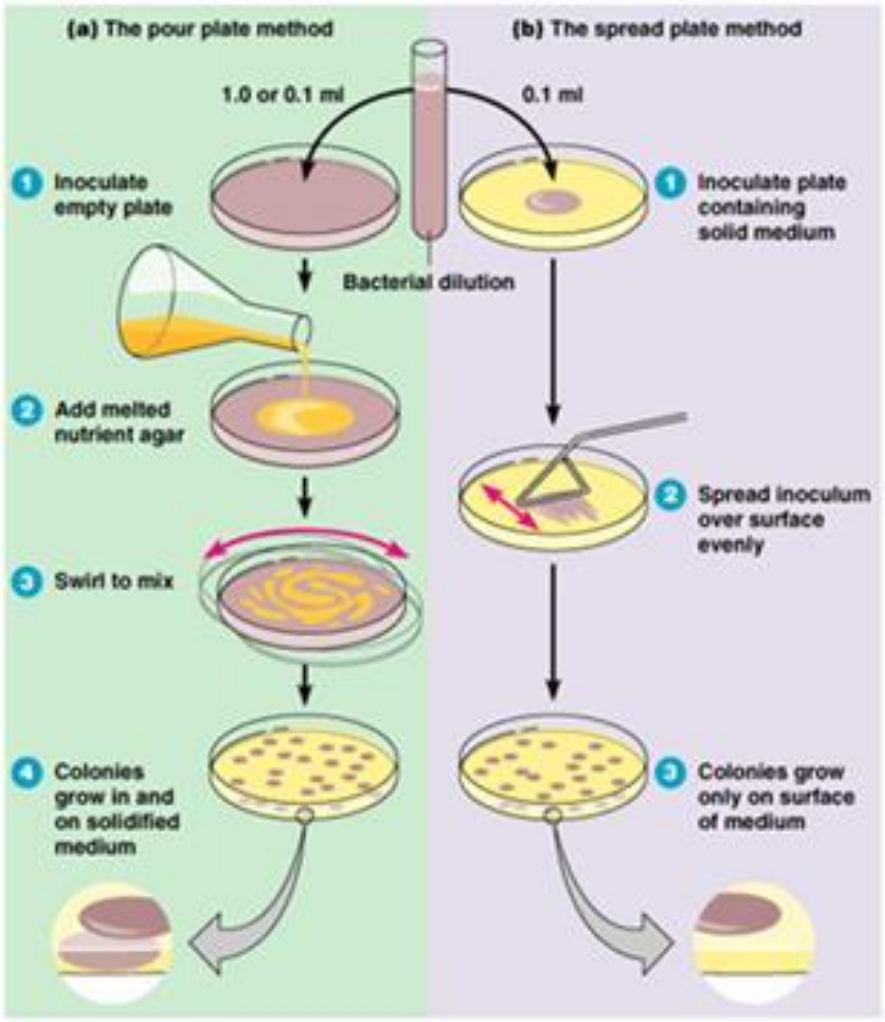


شکل ۲۰- کشت سطحی

۳-۷-۳ 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 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 کاملا 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.

شکل۲۱-کشت پورپلیت



شکل ۲۲- انواع روش های کشت در پلیت

۳-۷-۳-۱ کشت‌های دو لایه

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

۳-۸ رنگ آمیزی

۳-۸-۱ رنگ آمیزی گرم

- **تهیه گسترش روی لام:**

ابتدا از نمونه باکتری یک گسترش روی لام تهیه شود.

- **رنگ آمیزی با کریستال ویوله:**

در این مرحله مقداری از رنگ کریستال ویوله را با قطره چکان به روی سطح گسترش میکروبی

روی لام بریزید و به مدت زمان ۱ دقیقه، صبر کنید تا رنگ در دیواره سلولی میکروب‌ها نفوذ کند.

✓ **مرحله شستشو:**

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

✓ **مرحله اضافه کردن محلول ید:**

با چند قطره از محلول ید[۱] روی گسترش را پوشانیده و به مدت یک دقیقه صبر کنید.

✓ **مرحله شستشو:**

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

✓ **مرحله رنگ بری با استفاده از استن – الکل:**

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

✓ **رنگ آمیزی با محلول سافرانین:**

در این مرحله سطح لام را با محلول سافرانین را با رنگ ثانویه یعنی سافرانین، به مدت۱۰ ثانیه بپوشانید سپس رنگ اضافی را خالی کرده و با آب مقطر لام را شستشو دهید.

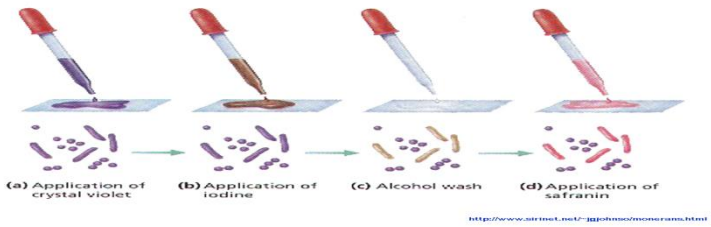
✓ **خشک کردن لام:**

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

✓ **مشاهده و تفسیر**

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

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



شکل۲۳ -مراحل روش رنگ آمیزی

۱ - Iodine

یادآوری نکات مهم:

- حرارت بیش از اندازه هنگام تثبیت گسترش باعث پاره شدن دیواره سلولی باکتری شده بنابراین باکتری گرم مثبت رنگ اولیه (کریستال ویوله) را هنگام رنگ بری از دست می دهد و رنگ ثانویه را جذب می نماید و در نتیجه باکتری گرم مثبت، بصورت گرم منفی دیده می شود.
- اگر گسترش ضخیم باشد هنگام مرحله بی رنگ شدن، ممکن است مانند یک گسترش معمولی رنگ نشود و این مسئله باعث خطا در تشخیص شما در گرم منفی یا مثبت بودن باکتری خواهد شد.
- غلظت درست و تازه بودن رنگ‌ها هم در رنگ آمیزی موثر است .
- رنگ بری بیش از حد ممکن است باعث پاره شدن جدار باکتری‌های گرم مثبت شده در نتیجه این باکتری‌ها رنگ کریستال ویوله خود را از دست داده و رنگ ثانویه را جذب می نماید و بصورت گرم منفی دیده می‌شود.
- دقت شود هنگام تهیه گسترش روی لام از محیط کشت، سن کشت باکتری باید ۲۴ ساعت یا کمتر باشد . بنابراین در محیط کشت‌هایی که از عمر آنها گذشته و کهنه شده-اند، در قابلیت نفوذ دیواره سلولی باکتری‌ها تغییراتی حاصل می شود که خاصیت گرم مثبت بودن را از دست می‌دهد.

۳-۸-۲ رنگ آمیزی شفر- بولتون

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

✓ **تهیه گسترش روی لام:**

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

✓ **رنگ آمیزی با مالاشیت گرین**

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

لام آغشته به رنگ را حرارت دهید تا رنگ بخار شود. این عمل را با وارونه کردن شعله گاز بر روی لاک و عبور شعله به تناوب از روی رنگ انجام دهید. وقتی که رنگ شروع به بخار شدن کرد

شعله را کنار ببرید همین کـه تبخیـر متوقـف شـد دو بـار کـار را تکـرار کنیـد و نگذاریـد رنـگ بجوشـد . مدت ۳ تا ۵ دقیقـه بـه ترتیـب ذکـر شـده عمـل کنیـد و اگـر مالاشـیت گـرین کـاملا از روی لام تبخیـر شـد دوبـاره مقـداری رنـگ بـه لام اضـافه کنیـد. بگذاریـد لام سـرد شـود تـا از شکسـتن آن جلـوگیری شود. بـه مـوازات سـرد شـدن لام بـه اضـافه کـردن رنـگ ادامـه دهیـد زیـرا رنـگ هنـوز در حـال تبخیـر است.

✓ **مرحله شستشو:**

رنگ اضافی روی لام را خـالی کـرده در حالیکـه لام را بـه صـورت مایـل نگهداشـته‌ایـد بـا اسـتفاده از آب مقطر به آرامی به مدت ۳۰ ثانیه سطح روی گسترش را شستشو دهید.

✓ **رنگ آمیزی با سافرانین:**

سطح گسترش میکروبی را با رنگ سافرانین به مدت زمان ۱ دقیقه بپوشانید.

✓ **مرحله شستشو:**

رنگ اضافی روی لام را خـالی کـرده. در حالیکـه مایـل نگهداشـته‌ایـد بـا اسـتفاده از آب مقطـر بـه آرامـی به مدت زمان ۳۰ ثانیه سطح روی گسترش را شستشو دهید.

✓ **مشاهده و تفسیر:**

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

چون هاگ پوشش مقاومی است کـه در برابـر نفـوذ رنـگ مقاومـت مـی کنـد بنـابر ایـن در رنـگ آمیـزی معمولی مـی تـوان اسـپورها را بـه صـورت ناحیـه رنـگ نشـده در داخـل سـلول رویشـی (بـاکتری مولـد) مشاهده نمود. اگر تعـداد اسـپورها موجـود کـم باشـد و یـا اگـر از داخـل بـاکتری مولـد خـارج شـده و در گستره به صـورت پراکنـده باشـند، اغلـب توسـط رنـگ آمیـزی سـاده و یـا گـرم قابـل مشـاهده نخواهنـد بود.

شکل۲۴ - اسپور

۴ نمونه برداری

نمونه‌هایی که به آزمایشگاه ارسال می شود، باید نماینده واقعی کل کالا بوده و در طی حمل، جابجائی و نگه داری آن صدمه ندیده و یا تغییرات فیزیکی و شیمیایی در آن ایجاد نشده باشد. همچنین، نمونه ها بایـد در شرایطی نگه داری شوند که امکان رشد میکروارگانیسم ها در آن وجود نداشته باشـد. بـرای کسـب آگـاهی های بیش‌تر از شرایط کلی نمونه برداری و نگه داری نمونه، به منظور انجام آزمون های میکروبیولـوژی، بـه

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

۵ روش های آزمون میکروبیولوژی سویا برگر

روش‌های میکروبیولوژی سویا برگر مطابق جدول زیر می باشد:

جدول۳-روش های آزمون میکروبیولوژی سویا برگر

ردیف	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	*شمارش کلی میکروارگانیسم ها*	طبق استاندارد ملی ۱-۵۲۷۲
۲	*اشرشیا کلی*	طبق استاندارد ملی ۱-۶۸۰۸
۳	*استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولازمثبت*	طبق استاندارد ملی ۱۱۹۴
۴	*سالمونلا*	طبق استاندارد ملی۱۸۱۰
۵	*کپک ومخمر*	طبق استاندارد ملی ۱- ۱۰۸۹۹

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

۶ میکروارگانیسم‌هایی که در سویا برگر برطبق استاندارد ملی ایران، جستجو و شناسایی می‌شوند:

- *سالمونلا*[1]
- *اشرشیا کلی*[2]
- *استافیلوکوکوس اورئوس*[3]
- *کپک و مخمر*[4]

خصوصیات میکروارگانیسم‌ها:

سالمونلا

نکات کلیدی:

✓ از پاتوژن‌های اصلی خانواده آنتروباکتریاسه

1-*Salmonella*
2- *E. coli*
3- *Staphylococcus aureus*
4- *Mold & Yeast*

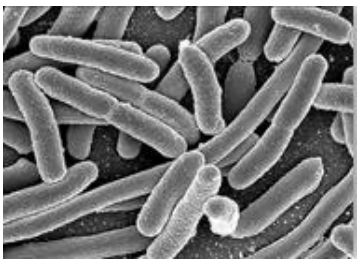
- ✓ باسیل گرم منفی
- ✓ تخمیر کننده قندهایی مثل گلوکز، مانیتول، آرابینوز
- ✓ عدم تخمیر لاکتوز، ساکارز (استثناهایی وجود دارد)
- ✓ هوازی و بی هوازی اختیاری، کاتالاز مثبت
- ✓ درجه حرارت مناسب برای رشد آنها ۳۷ درجه سلسیوس
- ✓ اکثر سروتیپ‌ها متحرک (به وسیله تاژک های اطرافی)
- ✓ اکسیداز منفی
- ✓ تولید H_2S درمحیط TSI
- ✓ لیزین دکربوکسیلاز مثبت
- ✓ تولید اوره آز منفی

شکل ۲۵- گونه ای از *سالمونلا*

اشرشیاکلی

نکات کلیدی:

- ✓ از پاتوژن های اصلی خانواده آنتروباکتریاسه
- ✓ دارای سویه‌هایی با توانایی بیماری‌زایی متفاوت
- ✓ با تخمیر لاکتوز ایجاد پرگنه‌های صورتی رنگ در محیط MAC
- ✓ متحرک (به وسیله تاژک‌های پیرامونی)
- ✓ فعالیت همولیتیک در برخی از سویه‌ها
- ✓ اندول مثبت
- ✓ لیزین دکربوکسیلاز مثبت
- ✓ تولید اوره آز منفی

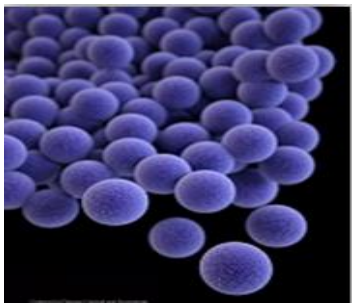


شکل ۲۶- *اشرشیاکلی*

استافیلوکوک اورئوس

نکات کلیدی:

- ✓ کوکسی های گرم مثبت به شکل خوشه های انگور
- ✓ بی هوازی اختیاری، غیر متحرک و کاتالاز مثبت
- ✓ ایجاد همولیز دوگانه
- ✓ اکسیداز منفی
- ✓ فاقد هاگ
- ✓ تولید کننده کوآگولاز که شاخص مهمی در بیماری‌زایی باکتری می باشد
- ✓ در محیط‌های غنی نشده نیز رشد می‌کند



شکل ۲۷- *استافیلوکوک اورئوس*

- ✓ ایجاد پرگنه‌های زرد طلایی با اندازه متوسط
- ✓ نسبتاً در محیط مقاوم‌اند

کپک

کپک‌ها، قارچ‌های رشته‌ای، هوازی، غیر فتوسنتتیک، چند سلولی، هتروتروف هستند. کپک‌ها تولید واحدهای میکروسکوپی بنام (Hypha (Tall می‌کنند که با تجمع آنها جرم رشته‌ای تشکیل می‌گردد که به آن میسیلیوم گفته می‌شود. معمولاً به صورت کلنی، پروپاگول[1] یا جوانه[2] صاف یا کرکدار، اغلب با ساختار اسپورزایی یا تولید مثل رنگی در سطح محیط‌های کشت قارچی رشد می‌کنند. بهترین رشد کپک‌ها در محیط اسیدی با غلظت بالای قند می‌باشد. کلنی‌های ایجاد شده توسط کپک‌ها به رنگ‌های مختلف سفید، آبی، سبز، خاکستری و بنفش می‌باشد. کلنی ممکن است بصورت برجسته یا فرورفته، چین دار یا مسطح، خامه‌ای با قوام بسیار محکم باشند، در پاره‌ای از موارد کلنی‌ها بصورت کرکی شکل یا پنبه‌ای شکل می باشند. کپک ها علاوه بر سطح در عمق محیط کشت نیز می‌توانند کلنی‌های گرد عدسی شکل ایجاد کنند. طبقه بندی کپکها بر اساس شکل ظاهری (مورفولوژی) و تشکیل یا عدم تشکیل اسپور جنسی استوار است.

مخمرها

مخمرها یکی از گروه‌های قارچ‌های فاقد رشته و تک سلولی می‌باشند و بوسیله جوانه زدن تکثیر پیدا می‌کنند. این میکروارگانیسم‌های هوازی مزوفیل در دمای ۲۵ °C، در سطح محیط کشت قارچی کلنی های گرد مات یا درخشان، معمولاً دارای پیرامون منظم و با تحدب کم یا زیاد ایجاد می‌کنند. کلنی‌های مخمرها خامه‌ای و یا بلغمی با قوام بسیار نرم است. بیشتر گونه‌های آن تخمیرکننده و غیر بیماری زا هستند، برخی نیز عامل فساد مواد غذایی هستند.

۷اصطلاحات و تعاریف

در این جزوه آموزشی و استانداردهای ملی مربوط به آن، اصطلاحات و تعاریف زیر به کار می رود:

۶-۱ سوسپانسیون اولیه (اولین رقت اعشاری)

به سوسپانسیونی گفته می‌شود که پس از توزین حجم معینی از فراورده مورد آزمون و مخلوط کردن با ۹ برابر حجم آن از یک رقیق کننده بدست می‌آید.

۷- ۲ رقت اعشاری بعدی

به سوسپانسیونی گفته می‌شود که پس از مخلوط کردن حجم معینی از سوسپانسیون اولیه با ۹ برابر حجم رقیق کننده بدست می‌آید، با تکرار این عمل رقت‌های اعشاری بعدی بدست می‌آید.

۱- Propagule به اجتماع قابل مشاهده و متمرکز توده میکروبی ناشی از یک ذره زنده رشد یافته در سطح یا داخل محیط کشت مغذی گفته می‌شود.

2- Germ

۸ اصول آزمون:

الف- شمارش

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

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

ب- روش جستجو (روش کیفی)

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

- **اساس روش جستجو**

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

- مرحله اول: نمونه‌ها معمولاً در یک محیط آبگوشت غنی‌کننده منتقل می‌شوند. به این ترتیب، تعداد میکروارگانیسم‌ها بدون خطر ممانعت از رشد و تکثیر بوسیله‌ی ترکیبات انتخابی موجود در محیط کشت انتخابی/ افتراقی افزایش می یابد.

- مرحله دوم: برای جداسازی روی محیط کشت جامد انتخابی/ افتراقی کشت داده می شود. از کلنی‌های به دست آمده روی سطح محیط کشت جامد برای انجام آزمون‌های تاییدی مناسب برای شناسایی استفاده می‌شوند.

۹ محیط‌های کشت و رقیق‌کننده‌ها

دستورالعمل‌های کلی برای تهیه محلول‌های رقیق‌کننده و محیط‌های کشت در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۹۲۳-۴، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون میکروبیولوژی- قسمت چهارم: مقررات ویژه برای آماده سازی محصولاتی به غیر از شیر، گوشت، ماهی و فرآورده های آن تعیین شده است.

جدول۴ - لیست محیط‌های کشت

ردیف	محیط های کشت
۱	Buffered peptone water (BWP)
۲	Rappaport-Vassiliadis Salmonella Enrichment Broth (RVS)
۳	Muller kauffmann tetrathionate novobiocin broth| (MKTT n broth)
۴	Xylose lysine desoxycholate agar (XLD)
۵	Brilliant green lactose bile agar(BGA)
۶	Nutrient agar (NA)
۷	Triple sugar/iron agar (TSI)
۸	Urea agar
۹	Lysine decarboxylase broth
۱۰	Lauryl Sulphate Broth (LS)
۱۱	EC Broth (EC)
۱۲	Tryptone water broth (TW)
۱۳	Giolitti and cantoni broth (GC)
۱۴	Bird park (BP)
۱۵	Brain- heart infusion broth
۱۶	Dichloran-rose Bengal chloramphenicol agar (DRBC)
۱۷	Plate Count Agar (PCA)

جدول۵ - لیست رقیق کننده و معرف‌ها

ردیف	رقیق کننده و معرف‌ها
۱	Ringer
۲	Kovac's reagent
۳	Rabbit plasma
۴	potassium tellurite
۵	Iodine solution
۶	Urea
۷	egg yolk emulsion
۸	Urea

۱۰ روش اجرای آزمون

۱۰-۱ آماده سازی آزمایه

۱۰-۲ پورپلیت

۱۰-۲-۱ آماده سازی سوسپانسیون اولیه

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

برای آماده سازی این فرآورده‌ها مراحل زیر را انجام دهید.

- محتویات بطری در بسته را به وسیله تکان دادن و وارونه کردن آن به طور کامل مخلوط کنید.
- مقدار نمونه لازم را به ظرف آزمایشگاهی سترون منتقل کنید.
- با استفاده استوانه مدرج سترون مقدار ml (۱±۹۰) رقیق کننده را در ارلن ۲۵۰ml سترون منتقل کنید و در ارلن را ببندید.
- با استفاده پی‌پت مقدار (۱۰±۰/۱ml) نمونه را با دقت ۰/۰۵ ml بردارید.
- آزمونه را به ارلن حاوی رقیق‌کننده مناسب[1] با دمای ۴۵°C اضافه کنید.
- برای یکنواخت نمودن آزمونه، ارلن را به آرامی بچرخانید، سپس آن را ۱۰ بار با حرکت دست به شعاع ۳۰۰ میلی متر به مدت زمان حدود هفت ثانیه بچرخانید.
- رقت بدست آمده 10^{-1} می‌باشد.

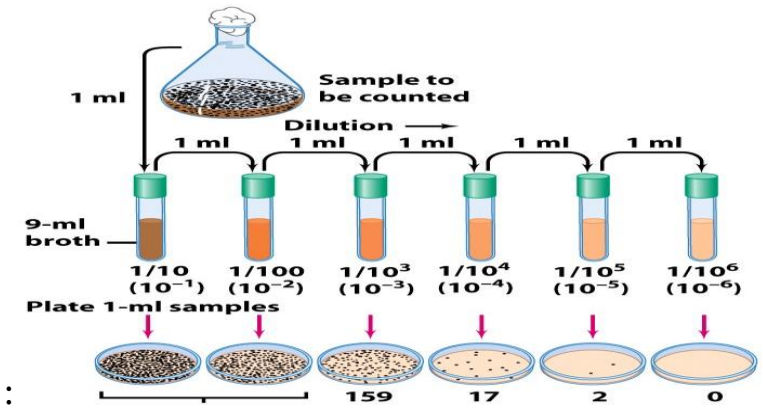
---

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

۱۰-۲-۲ رقت اعشاری متوالی

برای تهیه رقت‌های اعشاری بعدی، ۱ml از سوسپانسیون اولیه را، با استفاده از پی‌پت سترون به ۹ml محلول رقیق کننده سترون که دمای مناسبی دارند، منتقل کنید. لوله‌های حاوی رقت تهیه شده را با استفاده از یک همزن مکانیکی به مدت (۵ الی۳) ثانیه مخلوط کنید.

رقت بدست آمده$^{-۲}$۱۰ می‌باشد. در صورت لزوم، به همین ترتیب و رقت‌های بعدی ($^{-۳}$۱۰ ،$^{-۴}$۱۰) را تهیه کنید تا حدی که برای شمارش میکروارگانیسم‌ها مناسب باشند. مراقب باشید، پی‌پت را بیش از۱cm داخل سوسپانسیون اولیه فرو نکنید همچنین برای دقت مناسب از تماس پی پت حاوی سوسپانسیون اولیه با محلول رقیق کنندهٔ سترون جلوگیری کنید. هنگام آماده سازی رقیق کننده سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری بعدی، زمان بین پایان آماده سازی تا لحظه تماس ماده تلقیحی با محیط کشت یا آبگوشت غنی کننده نباید بیش از ۴۵ دقیقه باشد.



:

شکل۲۸ -سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها

- **کشت میکروبی**

تلقیح را تا حد امکان به سرعت شروع کنید.

- **گرمخانه گذاری**

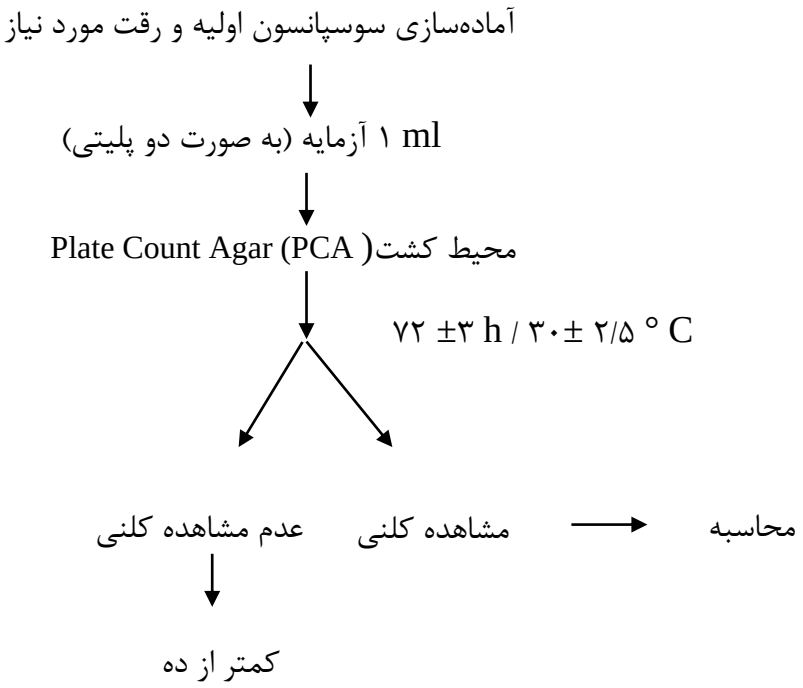
۱۰-۳ شمارش کلی میکروارگانیسم های هوازی

استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۵۲۷۲ میکروبیولوژی زنجیره غذایی- روش جامع برای شمارش میکروارگانیسم‌ها-قسمت ۱- شمارش کلنی در ۳۰درجه سانتی گراد با استفاده از روش کشت آمیخته

شمارش میکرو ارگانیسم‌های‌هوازی مزوفیل متداولترین روش جهت نشان دادن کیفیت میکروبی محصول است و مبنای قضاوت بهداشتی یک محصول تولید شده می‌باشد ولی ارزش تشخیصی آن محدود است. این

روش در تعیین شرایط بهداشتی و کنترل تولید، شرایط حمل و نقل و نگهداری محصول، تعیین میزان آلودگی ماده اولیه یا تشخیص احتمالی آلودگی در ضمن تولید حائز اهمیت است. باکتری‌هایی هستند که در شرایط هوازی رشد می‌کنند.

- **روش انجام آزمون**



۱۰- ۴ آزمون *جستجوی سالمونلا*

استاندارد ملی ایران شماره۱۸۱۰- میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -روش جامع برای جستجو و شناسایی گونه‌های سالمونلا

سالمونلاها باسیل‌های گرم منفی بدون اسپور، هوازی و بی هوازی اختیاری، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی هستند. اکثر سالمونلاها در روی آگار مغذی بعد از ۲۴ ساعت پرگنه هایی به قطر ۳-۲ میلی متر و به رنگ سفید، خاکستری، مرطوب،کروی، مسطح، برجسته و صاف ایجاد می‌کنند. *سالمونلاها* از نظر بیوشیمیایی خواص عمومی خانواده *آنترو باکتریاسه* را دارا هستند. PH پائین تر از ۴ باعث از بین رفتن میکروارگانیسم می‌شود. از نظر آنتی ژنی دارای سه نوع آنتی ژن است:

۱- آنتی ژن O (سوماتیک) مربوط به پیکره
۲- آنتی ژن H مربوط به فلاژل یا تاژک
۳- آنتی ژن Vi مربوط به کپسول باکتری است.

ایـــن بـــاکتری اندوتوکســـین[1] ترشـــح کـــرده و دارای لیپـــو پـــروتئین ســـاکارید [2] و لیپیـــد A مـــی‌باشـــد. سندرم‌های بالینی عفونت‌های سالمونلایی به چهار صورت بروز می‌کند:
گاسترو انتریت (اسهال واستفراغ)، سپسمی سمی (آلودگی در خون)، تب تیفوئید (حصبه با تب روده‌ای) و حاملان بدون علامت (حامل مزمن)

محیط کشت‌های مورد نیاز

محیط کشت مورد استفاده برای جستجوی سالمونلا، محیط کشت آب پپتونه بافری BPW برای پیش غنـی سازی، آبگوشت مولر کافمن تتراتیونات نئوبیوسین MKTTn و آبگوشـت راپـاپورت و اسـیلیادیس منیزیـوم کلراید RV برای غنی سازی و گزیلوز لیزین دزوکسی کولات آگار XLD و آگار سبز درخشـان / قرمـز فنـل BGA برای تایید نهایی می‌باشد.
سـالمونلا ممکـن اسـت بـه تعـداد کـم و اغلـب همـراه بـا تعـداد قابـل ملاحظـه‌ای از سـایر میکروارگانیســم‌هــای خــانواده آنتــرو باکتریاســه یــا خــانواده‌هــای دیگــر، موجــود باشــد، لــذا انجــام مرحلــه پــیش غنــی ســازی بــرای جســتجوی *سـالمونلا*هــای آســیب دیــده و تعــداد کــم ضروری است.

روش آزمون

- تهیه سوسپانسیون اولیه (محیط کشت BPW)
- کشت در محیط غنی کننده انتخابی (RVS broth و MKTT n broth)
- کشت در محیط جامد انتخابی (BGA و XLD)

شکل ۲۹- محیط کشت BPW

شکل ۳۰- محیط کشت RVS broth

شکل ۳۱- محیط کشت MKTT n broth

۱- سمی که بواسطه تخریب دیواره سلولی باکتری گرم منفی ایجاد می‌شود.

2-Lipopolysaccharides (LPS)

۲۵ گرم نمونه + ۲۲۵ میلی لیتر محیط پیش غنی کننده غیر انتخابی (BPW)

↓ ۲۴ h / ۳۷ ° C

۱ ml سوسپانسیون اولیه + ۱۰ ml محیط MKTT n broth

۰/۱ ml سوسپانسیون اولیه + ۱۰ ml محیط RVS broth

↓ ۲۴ ±۳ h / ۳۷ ° C

↓ ۲۴ ±۳ h / ۴۱/۵ ° C

↓ ۲۴ h / ۳۷ ° C

کشت خطی روی دو محیط جامد انتخابی

↓

محیط جامـد انتخابـی از پیش ریخته XLD

↓

یکی از محیط‌های پیش ریخته انتخابیBGA / BSA /SSA

(انتخاب به عهده آزمایشگاه است)

↓ ۲۴ h / ۳۷ ° C

در صورت عدم مشاهده کلنی، گرمخانه گذاری را ۴۰ الی ۴۸ ساعت دیگر ادامه دهید

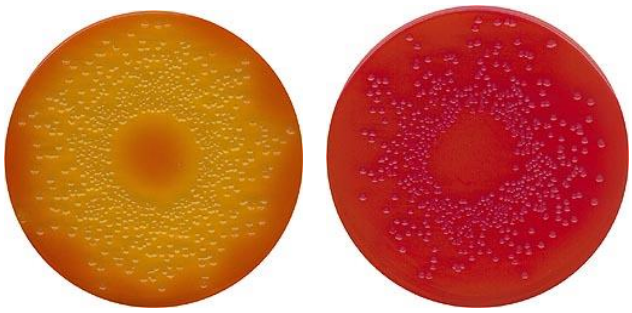
در صورت وجود سالمونلا پرگنه‌های صورتی بر روی محیط کشت BGA و پرگنه‌های سیاه بر روی محیط کشت XLD ایجاد می‌شود

↓

انجام تست های تاییدی

↓

تست سرولوژیکی و بیوشیمیایی



شکل۳۲- محیط کشت BGA

شکل ۳۳- محیط کشت XLD

ظاهر کلنی ها در محیط BGA:

صورتی که توسط هاله ای قرمز رنگ احاطه شده (باکتری‌های لاکتوز و ساکارز منفی مثل سالمونلا

یادآوری ۳ -زرد- سبزکه توسط هاله ای سبز-زرد احاطه شده (باکتری‌های لاکتوز یا ساکارز مثبت مثل پروتئوس، سیتروباکتر، کلبسیلا)

ظاهر کلنی ها در محیط XLD:

کلنی همرنگ محیط، شفاف گاهی با مرکز سیاه (سالمونلا)

یادآوری ۴ -زرد، توسط هاله‌های زرد احاطه شده، شفاف با مرکز سیاه (پروتئوس)

- **کشت در محیط آگار مغذی**

جهت انجام آزمون‌های تاییدی بیوشیمیایی و سرولوژیکی از کلنی‌های مشکوک به سالمونلا، حداقل ۵ کلنی را از محیط‌های انتخابی BGA و XLD انتخاب کرده و بر روی محیط آگار مغذی کشت داده شود.

انتخـــاب کلنـــی از هرپلیت و کشت در محیط مغذی
Nutrient agar

↓ ۲۴ h / ۳۷ ° C

آزمون‌های تاییدی

آزمون‌های تاییدی

- کشت در محیط TSI آگار
- کشت در محیط اوره آگار

- L– لیزین – دکربوکسیلاز
- شناسایی بتا – گالاکتوزیداز
- وژس پروسکوئر
- واکنش اندل

روش آزمون

- **واکنش در محیط سه قندی آهن دار**

تلقیح باکتری در محیط (TSI) به صورت تلقیح نیزه‌ای (Stab inoculate) در عمق و کشت خطی در سطح شیبدار (گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت زمان ۱۸ساعت)

واکنش مثبت:

عمق :

زرد {گلوکز مثبت}

قرمز {گلوکز منفی}

سیاه {سولفید هیدرژن مثبت (H_2S)}

حباب یا ترک {تولید گاز از گلوکز}

سطح شیبدار:

شکل ۳۴- واکنش در محیط TSI

زرد {لاکتوز یا ساکارز مثبت (استفاده از لاکتوز یا ساکارز)}

قرمز یا بدون تغییر {لاکتوز و ساکارز منفی (عدم استفاده از لاکتوز یا ساکارز)}

جدول ۶- واکنش‌ها در محیط سه قندی آهن دار **به وسیله اعضای مهم خانواده آنتروباکتریاسه**

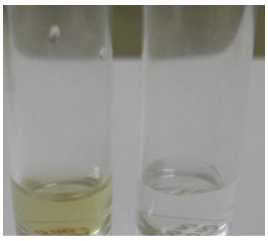
تغییرات pH			
گونه	سطح	عمق	تولید H_2S
سروتیپ های *سالمونلا*	قرمز	زرد	+
پروتئوس میرابیلیس	قرمز	زرد	+
پروتئوس ولگاریس	زرد	زرد	+
اشریشیا کلی	زرد	زرد	-
یرسینیا آنترکولیتیکا	زرد	زرد	-
یرسینیا سودوتوبرکلوزیس و پستیس	قرمز	زرد	-
آنتروباکتر آئروژنز	زرد	زرد	-
کلبسیلا پنومونیه	زرد	زرد	-

واکنش بتا- گالاکتوزیداز[1] (ONPG):

تلقیح یک حلقه کامل در لوله حاوی ۰/۲ میلی لیتر محلول سرم فیزیولوژی و یک قطره تولوئن و گرمخانه گذاری در دمای ۳۷°c، سپس افزودن ۰/۲۵ میلی لیتر معرف شناسایی بتا – گالاکتوزیداز وگرمخانه گذاری در دمای ۳۷°c به مدت زمان ۲۴ ساعت

واکنش مثبت: {مشاهده رنگ زرد بعد از ۲۰ دقیقه}

بیشتر سالمونلاها از نظر این واکنش منفی هستند.



شکل۳۵- واکنش بتا- گالاکتوزیداز

واکنش وژس پرسکوئر[2]:

یک حلقه کامل از کلنی مشکوک را در به لوله حاوی ۳ میلی لیتر محلول **vp**، تلقیح کرده و در دمای ۳۷°cبه مدت زمان ۲۴ساعت گرمخانه گذاری کنید، سپس دو قطره محلول کراتین و سه قطره محلول اتانوئیک ۱- نفتول و دو قطره محلول پتاسیم هیدروکسید را بیافزایید.

واکنش مثبت: {مشاهده رنگ صورتی روشن بعد از ۱۵ دقیقه}

بیشتر سالمونلاها از نظر این واکنش منفی هستند.

1-β-galactosidase
2-Voges-Proskauer (VP)

واکنش اندول[1]:

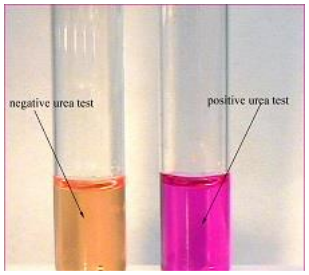
یک حلقه کامل از کلنی مشکوک تلقیح در لوله حاوی ۵ میلی لیتر محلول تریپتون – تریپتوفان تلقیح کرده و در دمای ۳۷°cبه مدت زمان ۲۴ساعت گرمخانه گذاری کنید، سپس یک میلی لیتر از معرف کواکس به آن بیافزایید

واکنش مثبت، {مشاهده حلقه قرمز رنگ آلبالویی}

بیشتر سالمونلاها از نظر این واکنش منفی هستند.

- **آزمایش‌های بیوشیمیایی تکمیلی**

آزمایش لیزین دکربوکسیلاز و تولید اوره آز برای تمایز گونه‌های پروتئوس و سالمونلا که در محیط TSI واکنش‌های مشابه‌ای را ایجاد می‌کنند به کار می‌رود. سالمونلا لیزین دکربوکسیلاز مثبت و اوره آز منفی است در حالی که پروتئوس لیزین دکربوکسیلاز منفی و اوره آز مثبت می‌باشد.



شکل ۳۶- محیط اوره

شکل ۳۷- محیط لیزین دکربوکسیلاز

جدول۷- واکنش‌های بیوشیمیایی *سالمونلا*

TSI			H2S	Citrate	LAI	Eundol	Urea	MIO (Motility, Ornithine)	VP	ONPG
S	L	G	+	P	P	N	N	P	N	N
-	–	+								

1-Eundol

آزمون‌های تاییدی سرولوژیکی و سروتایپی با استفاده از آنتی ژن‌های O و Vi و H

روش آزمون:

تشخیص وجود آنتی ژن‌های O، VI، H سالمونلا با مشاهده آگلو تیناسیون بر روی لام هنگامی که از کلنی‌های خالص و آنتی سرم های مناسب استفاده شود. این آزمون پس از حذف سویه های خود آگلوتینه شونده صورت می‌گیرد. در واکنش آگلوتینه شدن آنتی ژنها (میکروارگانیسم‌ها) و بعضی از کلاس‌های آنتی بادی ایجاد شده علیه آنها به هم می‌چسبند. به این آنتی بادی‌ها «آگلوتینین» و به این خاصیت «آگلوتیناسیون» گفته می‌شود.

آنتی سرم‌ها

چندین نوع آنتی سرم (شامل آنی_بادی برای یک یا چند آنتی ژن O[1])، که هنگام آزمون مثبت، انعقاد ایجاد می‌کنند و به صورت تجارتی در دسترس می‌باشد برای مثال: آنتی سرم حاوی یک یا چند تپ از گروه "O" (آنتی سرم یک ظرفیتی یا چند ظرفیتی O) هم چنین آنتی سرم Vi و آنتی سرم شامل آنتی بادی برای یک یا چند ین فاکتورH [2]، (آنتی سرم یک ظرفیتی یا چند ظرفیتیH)

حذف سویه های خود آگلوتینه شونده:

یک قطره از محلول سرم فیزیولوژی بر روی لام تمیز قرار دهید و کلنی مورد آزمون را در این قطره حل کنید تا سوسپانسیون یکنواخت شود.

عـــــــدم مشاهـــده باکتـــری به صورت توده‌های کم و بیش مجزا غیر خود آگلوتینه شونده

↓

آزمون تاییدی سرولوژیکی

مشاهده باکتری به صورت توده‌های کم و بیش مجزا آگلوتینه شونده

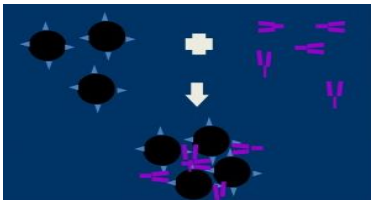
↓

نشان دهنده سویه خود آگلوتینه شونده است و نباید در ادامه آزمون مورد استفاده قرار گیرد. شناسایی آنتی ژن مقدور نیست

در صورت عـــدم مشاهـــده باکتـــری به صورت توده‌های کم و بیش مجزا غیر خود آگلوتینه شونده آزمون تاییدی سرولوژیکی ردیابی و شناسایی انجام می‌گیرد.

1 -Mono Valnt or Polyvalent Anti –O- Sera
2-Mono Valnt or Polyvalent Anti –H- Sera

شکل۳۸ -واکنش منفی واکنش مثبت



شکل ۳۹ - کمپلکس آنتی ژن- آنتی بادی

ادامه آزمون تاییدی سرو لوژیکی

سویه غیـــر خود آگلوتینـــه شونـــده

آزمـــون آنتـــی ژن O

تهیه سوسپانسیون کلنی خالص با یک قطره آنتی سرم**O**

واکنش سرولوژیکی: مثبت

تفسیر: آگلوتینه شدن

استفاده از آنتی سرم‌هـــای یک ظرفیتی و چند ظرفیتی یکی پس از دیگری

آزمـــون آنتـــی ژن VI

تهیه سوسپانسیون کلنی خالص با یک قطره آنتی سرم VI

واکـــنش ســـرولوژیکی: مثبـــت

تفسیر: آگلوتینه شدن

آزمـــون آنتـــی ژن H

کشت از کلنی خالص غیر خود آگلوتینه شونده در لوله محتوی نوترینت آگار نیمه جامد و گرمخانه گذاری در دمای ۳۷^{o}C به مدت زمان ۲۴ ساعت

تهیه سوسپانسیون از کلنی های لوله نوترینت آگار نیمه جامد با یک قطره آنتی آنتی ژن H

واکنش ســـــرولوژیکی: مثبت

تفسیر: آگلوتینه شدن

تفسیـــــر واکنش‌هـــای بیـــــو شیمیـــایـــــی

واکنش‌های **مشخص** کلنـــی خود آگلوتینـــه

واکنش **نا مشخص** کلنـــی خود آگلوتینـــه

بـــــــی **خیـــــــــر** **خیـــــــــر**

واکنش سرولوژیکی: همه واکنش منفی
تفسیر: سویه‌ها مشکوک به سالمونلا

واکنش سرولوژیکی: آنتی ژنهای (O, vi, H) مثبت

واکنش سرولوژیکی: آزمون نشده
تفسیر: سویه‌ها مشکوک به سالمونلا است

واکنش سرولوژیکی: آنتی ژن‌های (O , vi, H) مثبت
تفسیر: سویه سالمونلا است

واکنش سرولوژیکی: همه واکنـش‌ها منفـی
تفسیر: سویه‌ها سالمونلا نیست

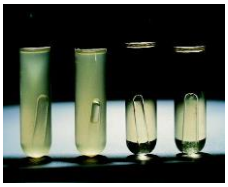
تایید نهایی:
ارسال به آزمایشگاه مرجع

۱۰-۵ جستجوی *اشریشیا کلی*

استاندارد ملی ایران شماره۲۹۴۶_ میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش جستجو و شمارش اشریشیاکلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی

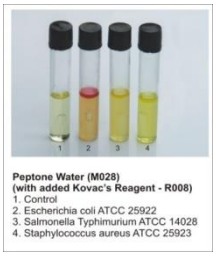
روش آزمون

- آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه
- تلقیح به محیط غنی کننده انتخابی Lauryl sulfate broth
- در صورت مشاهده گاز یا کدورت تلقیح به محیط انتخابی EC از محیط LS
- در صورت مشاهده گاز یا کدورت تلقیح به محیط TW از محیط EC
- انجام تست اندول با استفاده از معرف کواکس (افزودن معرف کواکس به محیط TW)



شکل ۴۰- محیط LS

شکل ۴۱- محیط EC



شکل ۴۲- محیط TW

آماده سازی سوسپانسیون اولیه

↓

۱۰میلی لیتر نمونه + ۹۰ ml محیط کشت سوسپانسیون

↓

۱۰ میلی لیتراز سوسپانسیون اولیه تهیه شده + ۱۰میلی لیتر محیط LS (مضاعف)

↓ ۲۴تا۴۸ h / ۳۷ ° C

درصورت مشاهده گاز در لوله، تلقیح به محیط EC

↓ ۲۴تا۴۸ h / ۴۴ ° C

درصورت مشاهده گاز در لوله، تلقیح به محیط TW

↓ ۲۴تا۴۸ h / ۴۴ ° C

مثبت ← تشکیل حلقه قرمز یا ارغوانی ← افزودن ۰/۵ ml معرف کواکس

۱۰-۶ شمارش استافیلوکوک‌های کوآگولاز مثبت

استاندارد ملی ایران شماره۳-۶۸۰۶- میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-روش جامع برای شمارش استافیلوکوکوس های کواگولاز مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و سایر گونه ها) قسمت سوم-جستجو، شناسایی و شمارش به شیوه محتمل ترین تعداد (MPN) برای تعداد کم میکروارگانیسم

روش انجام آزمون(جستجو)

تهیه آزمونه، سوسپانسیون اولیه و رقت ها

۱ ml از فراورده مایع به

۱۰ml آبگوشت غنی کننده (**GC**)
با غلظت معمـــولـــی

۱۰ ml از سوسپانسیون اولیه به

۱۰ml آبگوشت غنی کننده (**GC**)
با غلظت مضـــاعف

۲۴تا ۴۸ h / ۳۷ ° C
بی هوازی

کشت سطحی در پلیت‌های از پیش ریخته
Baird-Parker agar (BP)

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

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

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

یادآوری- در هر دو حالت بصورت دو تایی آزمون شود.

یادآوری- برای پخش کردن روی محیط کشت، می توان از یک پخش کننده برای پلیتهای تلقیح شده با رقت‌های متوالی استفاده نمود، به شرطی که پخش کردن از رقت‌های بالاتر شروع شود.

آزمون‌ها به صورت (به صورت دو پلیتی) انجام می‌گیرد.

گرمخـــــــانه گـــــــــذاری پـلیت ها
۳۷ ° C / ۲۴± ۲ h

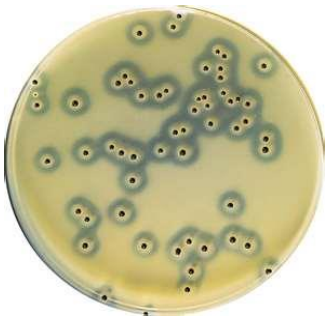
در صورت لزوم گرمخانه گذاری را تا (۲ ±۲۴) دیگر در دمای ۳۷ ° C ادامه دهید.

خصوصیات کلنی *استافیلو کوکوس اورئوس* کواگولاز مثبت

کلنی های سیاه یا خاکستری براق، محدب احاطه شده با هاله شفاف

- **آزمون تاییدی**

در صورت مشاهده کلنی مشخص به صورت سیاه یا خاکستری براق و محدب با قطر ۱تا ۱/۵ میلی متر بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری و قطر ۱/۵ تا ۲/۵ میلی متر پس از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری با هاله شفاف که ممکن است بصورت جزیی تیره شده باشد آزمون تاییدی (کوآگولاز) انجام شود.



شکل ۴۳- محیط BP

آزمون کوآگولاز

انتقال کلنی به محیط *Brain- heart infusion broth*

↓ ۴تا ۶h / ۳۷ ° C

انتقال ۰/۱ ml از سوسپانسیون فوق به لوله استریل ۷۵×۱۰ میلی متر+ ۰/۳ ml پلاسمای خرگوش

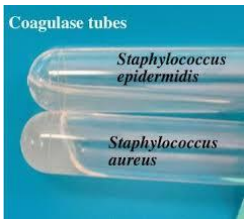
↓ ۴ تا ۶ h / ۳۷ ° C

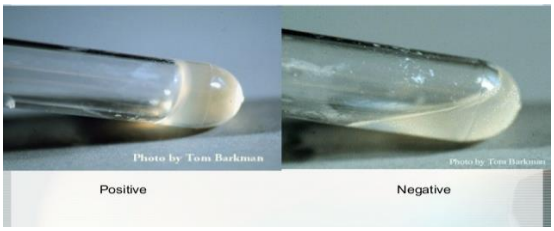
بررسی تشکیل لخته

اگر نتیجه منفی بود تا مدت زمان ۱۸ تا ۲۴ ساعت نگهداری شود

↓

تشکیل لخته و انعقاد پلاسما ← کواگولاز : مثبت





شکل ۴۴- آزمون کواگولاز

شمارش *استافیلوکوک*های کوآگولاز مثبت

روش انجام آزمون شمارش

↓

تهیه آزمونه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها

↓

پیش غنی ساز غیر انتخابی

۱۰ میلی لیتر آزمونه (فراورده های مایع)/۱۰ میلی لیتر سوسپانسیون اولیه

↓ ↓ ↓

به ۳ لوله
GC broth
با غلظت دو برابر

به ۳ لوله
GC broth
با غلظت معمولی

به ۳ لوله
GC broth
با غلظت معمولی

↓

گرمخـــــانه گـــــــذاری در شرایط بـــی هـــوازی
۳۷ ° C/۲۴± ۲ h

آزمون‌ها به صورت (به صورت دو پلیتی) انجام می‌گیرد.

کشت سطحی در محیط انتخابی بردپارکر آگار

↓

گرمخانه گذاری پلیت‌ها
۳۷ ° C / ۲۴± ۲h

خصوصیات کلنی *استافیلو کوکوس اورئوس* کواگولاز مثبت در محیط انتخابی بردپارکر آگار:
کلنی‌های سیاه یا خاکستری براق، محدب احاطه شده با هاله شفاف

آزمون تاییدی

↓

آزمون کواگولاز

تفسیر نتایج :
با توجه به معیار تشخیص نتایج مثبت، تعداد نتایج مثبت به دست آمده از لوله‌ها را شمارش و ثبت کنید.

تعیین مقادیر MPN:
مقادیر MPN/*استافیلو کوکوس ارئوس*، مطابق بند ۱۱-۵-۶ و بند ۱۱-۵-۷ استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -الزامات کلی و راهنما برای آزمون‌های میکروبیولوژی تعیین می‌شود.

۹-۵ شمارش کپک‌ها ومخمرها

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

روش آزمون

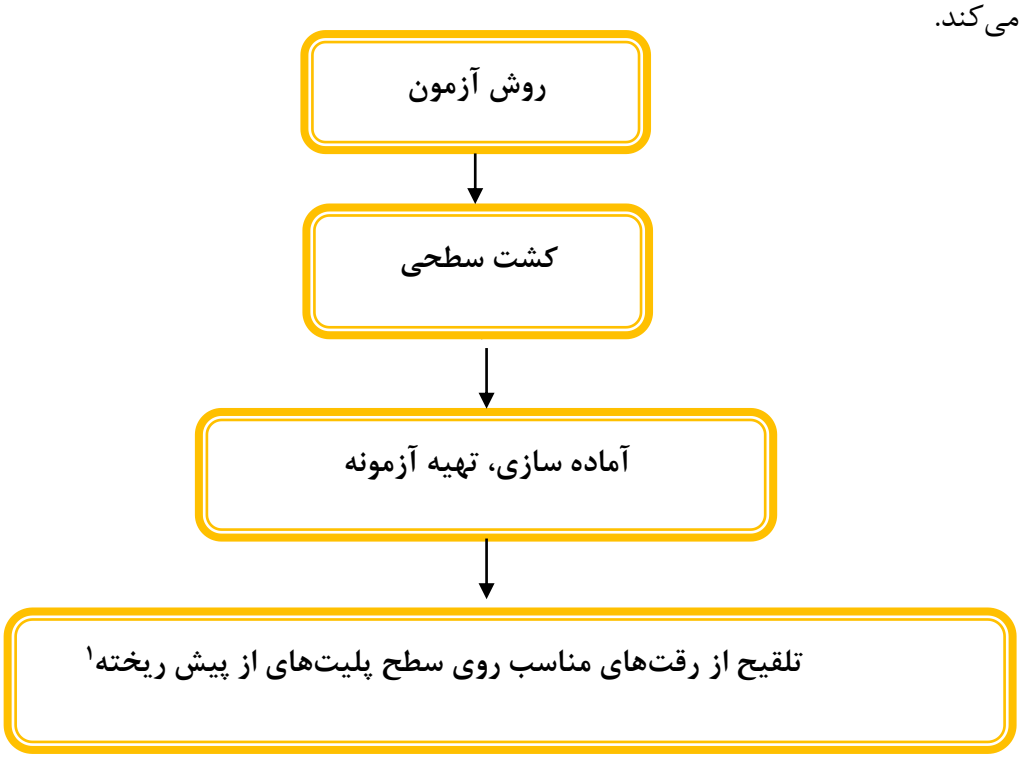
- آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه
- تلقیح و گرمخانه گذاری

برای سهولت در شمارش تعداد کم کپک و مخمر، می‌توان مقدار ۰/۳۳ میلی لیتر از رقت اولیه را به سه پلیت مجزا و یا مقدار ۰/۱ میلی لیتر از رقت های دیگر را به سطح محیط انتقال داد.

آزمونه را به کمک پخش کننده سترون روی سطح محیط کشت Dichloran-rose Bengal chloramphenicol agar (DRBC) پخش کنید تا به طور کامل جذب شود. به مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه پلیت ها را قرارداده تا مایع کشت داده شده جذب محیط کشت شود.

پس از مدت زمان مذکور پلیت‌ها را به صورت وارونه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت زمان پنج روز گرمخانه گذاری کنید.

از روش کشت آمیخته نیز می‌توان استفاده کرد، اما در این حالت باید حتماً همخوانی نتایج در مقایسه با روش سطحی مورد اعتبار سنجی قرار بگیرد، همچنین در این روش تمایز بین کپک‌ها و مخمرها به سختی امکان پذیر است. روش سطحی به دلیل برقراری حداکثر تماس سلول با اکسیژن هوا نتایج دقیق تری را ارائه می‌کند.



- اسپورهای کپک‌ها به راحتی در هوا پخش می‌شوند لذا، پلیت‌ها را با احتیاط جابجا کنید تا از پیدایش کلنی های اقماری جلو گیری شود در غیر این صورت شمارش، غیر واقعی و بالا خواهد بود.

- کلنی‌های مخمرها و کلنی‌ها یا پروپاگول‌های کپک‌ها را در صورت نیاز، جدا گانه شمارش کنید.

شکل ۴۵-محیط DRBC

- **خصوصیات کلنی مخمر**
- گرد

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

۱۱بیان نتایج

۱۱-۱ شمارش

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

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

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

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

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

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

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

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

که در این فرمول‌ها،

m میانگین حسابی به دست آمده از دو پلیت،

V حجم ماده تلقیحی به هر پلیت، به میلی لیتر،

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

c تعداد کلنی‌های شمارش شده روی یک پلیت،

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

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

که در آن :

$\sum c$ مجموع کلنی‌های شمارش شده از تمام پلیت های حاصل از دو رقت متوالی می باشد،

n_1 تعداد پلیت‌های شمارش شده برای سوسپانسیون اولیه (یا اولین رقت شمارش شده) می باشد،

n_2 تعداد پلیت‌های شمارش شده برای رقت ۱ به ۱۰ از سوسپانسیون اولیه (یا دومین رقت شمارش شده) می‌باشد.

نتیجه را تا دو رقم معنی‌دار گرد کنید.

۲-۱۱ جستجو

اگر در شناسایی کلنی‌ها، وجود باکتری‌ها تایید شد، نتیجه را به صورت زیر بیان کنید:

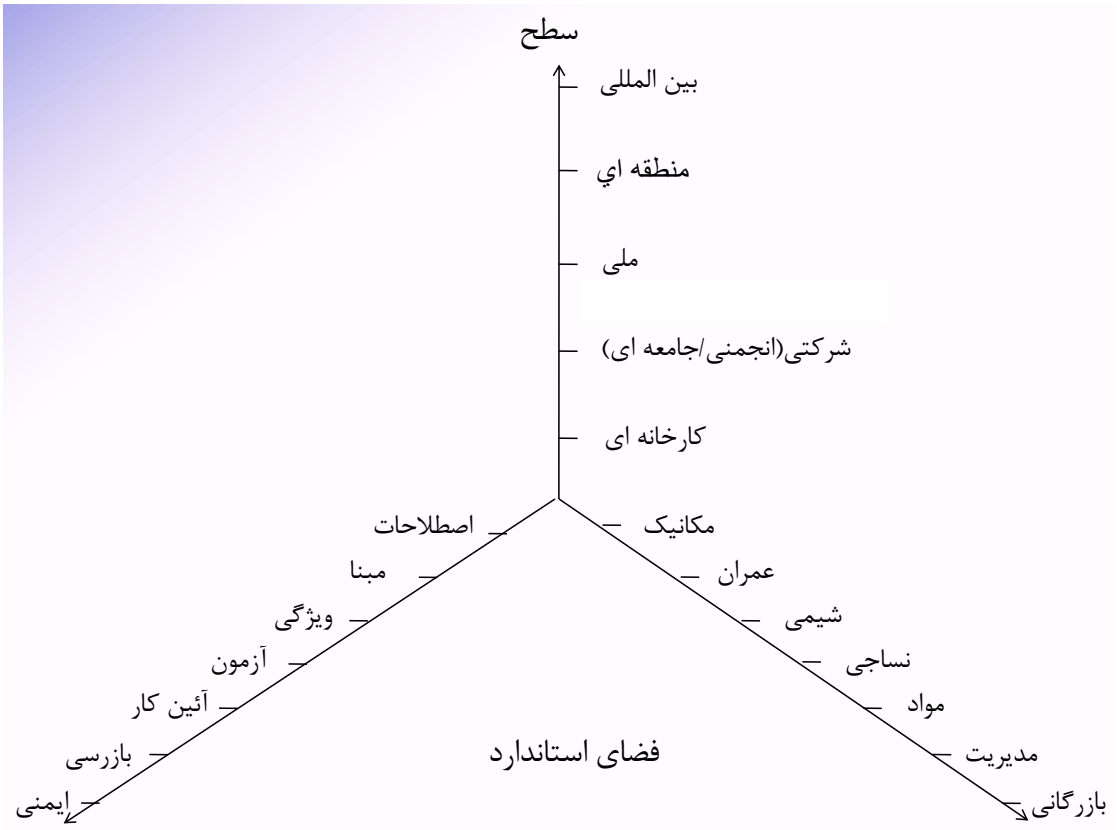
وجود باکتری (مثبت) در نمونه S .

چنانچه پس از غنی‌سازی رشدی مشاهده نشد و یا چنانچه شناسایی کلنی‌ها وجود این گونه را تایید نکند، نتیجه را به صورت زیر بیان کنید:

عدم وجود باکتری (منفی) در نمونه S.

پیوست الف
انواع استاندارد

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



الف-۲- سطح استاندارد

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

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

ب- استانداردهای ملی (مانند ISIRI, BS, BIS ASTM و ...)، این گونه استانداردها به وسیله سازمان استاندارد در یک کشور که به عنوان مقام ذی صلاحی برای این کار شناخته شده است، تهیه می‌شود. در تدوین این استانداردها تمامی افراد ذی نفع از قبیل تولید کنندگان، مصرف کنندگان، اعضای مراکز علمی و

فنی، مراکز تجاری کارشناسان مرتبط از سازمان‌ها یا مراکز دولتی و امثال آن شرکت دارند.
پ- استانداردهای منطقه‌ای (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 می‌باشد.

الف-۳- جنبه استاندارد

در راستای رشد و تکامل دانش بشری جنبه‌های مختلف استاندارد نیز گسترش یافته و می‌تواند موضوعات مختلفی را شامل شود.
الف- استانداردهای ویژگی
ب- استانداردهای روش آزمون
پ- استانداردهای آیین کار
ت- استانداردهای ایمنی
ث- واژه نامه
ت- سایر استانداردها (شامل 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 می‌شوند:
الف- استانداردهای اجباری، شامل استانداردهایی می‌باشد 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 می‌شوند.
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.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 آن‌ها بتوان در مورد کل جامعه یا محموله قضاوت کرد.

ب-۴- بازرسی (Inspection)

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

ب-۵-درستی (Accuracy)

نزدیکی نتیجه 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)

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

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

مدیرکنترل کیفیت واحد تولیدی طبق آیین نامه مذکور، علاوه بر انجام وظایف خود از جمله حضور تمام وقت در یک نوبت کاری و بازرسی، کنترل و نظارت کامل بر مواد اولیه، شرایط فرآورده حین ساخت، محصول نهایی و شرایط نگهداری درکلیه مراحل تولید و یا خدمت و سایر وظایف و موارد ذکر شده، موظف است نتایج آزمون نمونه های تولید شده در کارخانه را روزانه ثبت نموده و 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 می‌تواند 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 می‌گردد 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.

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

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

بر اساس دستورالعمل نحوه تذکر، اخطار، تعلیق و ابطال پروانه کاربرد علامت استاندارد ایران 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 می‌گردند:

ت-۲-۱-۱ نقص بحرانی:

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

ت-۲-۱-۲ نقص عمده:

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

ت-۲-۱-۳ نقص جزئی:

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

نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون ها به پیوست می‌باشد.

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

در صورتیکه 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 می‌نمایند.

جدول ۱- امتیازات منفی نواقص موجود در فرآورده

نوع نقص	امتیاز منفی
بحرانی	۳۰
عمده	۱۵
جزئی	۵

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

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

ت-۳-۱ در صورتیکه جمع امتیاز منفی یک گزارش نتیجه آزمون یا جمع امتیازات منفی نتایج چند آزمون به ۶۰ رسید، اداره کل استاندارد استان مربوط 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.

ت-۳-۲ در صورتیکه جمع امتیاز منفی گزارش نتیجه یک آزمون یا جمع امتیازات منفی نتایج چند آزمون به ۹۰ رسید، اداره کل استاندارد استان مربوط، علاوه بر اخطار کتبی، در مورد واحدهای مشمول استاندارد اجباری برای جمع آوری کالای مغایر با استاندارد ملی با شماره سری ساخت مربوط موضوع را 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.

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

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

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 میکروبیولوژی سویا برگر- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون طبق استاندارد ملی ایران شماره ۹۷۱۵

جدول ۱- نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌های میکروبیولوژی سویا برگر

ردیف	شرح آزمون	درجه اهمیت
۱	شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	عمده
۲	اشریشیا کلی	بحرانی
۳	استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولازمثبت	بحرانی
۴	سالمونلا	بحرانی
۵	کپک و مخمر	عمده