



ریاست جمهوری
سازمان ملی استاندارد ایران



جزوه دوره کارآموزی

میکروبیولوژی مربا، مارمالاد و ژله مربا



شماره مدرک : ۶۲۲/۲۶/ج

تاریخ تصویب : ۱۳۹۸

شماره تجدید نظر:

تاریخ تجدید نظر:

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

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

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

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

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

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

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

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 ۰۲۱-۸۸۸۷۹۴۶۹ تماس حاصل نموده و یا از طریق پست الکترونیکی isiri.amozesh.qc@gmail.com و آدرس تهران، ضلع جنوب غربی میدان ونک شماره ۲۵۹۲ صندوق پستی ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ اقدام فرمایید. از بذل عنایتی که می‌فرمایید سپاسگزاریم.

محتوای دوره کارآموزی

عنوان دوره کارآموزی:

میکروبیولوژی مربا، مارمالاد و ژله مربا

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 مربا، مارمالاد و ژله مربا بر اساس استانداردهای ملی ایران ۸۸۹۸ می باشد و موارد زیر را در بر می گیرد:

- ۱- آشنایی روش‌های بهینه و جدید آزمایشگاهی
- ۲- یکسان سازی رویه آزمایشگاه میکروبیولوژی مربا، مارمالاد و ژله مربا
- 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 مربا، مارمالاد و ژله مربا
- ۵- آشنایی با الزامات فنی آزمایشگاه میکروبیولوژی بر اساس استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹

توانایی های کارآموزان پس از طی دوره:

- روش تهیه و سترون‌سازی محیط کشت های 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:

منبع / استانداردها	اجراکننده		مدت آموزش (ساعت)		محتوای آموزشی	رئوس مطالب	ردیف
	کارآموز	مدرس	عملی	تئوری			
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹		*		۱	آشنایی با وسایل مورد نیاز آشنایی با اصول آزمایشگاهی آشنایی با قسمت های مختلف آزمایشگاه میکروبیولوژی	آشنایی با الزامات فنی آزمایشگاه میکروبیولوژی	۱
استانداردهای ملی ایران ۸۸۹۸ و ۹۸۹۹	*	*	۰/۵	۰/۵	روش تهیه محیط کشت مرتبط با مریا، مارمالاد و ژله مریا و اتوکلاو کردن محیطها	آشنایی با روش تهیه محیط کشت های مورد نیاز و روش سترون سازی	۲
استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹	*	*	۰/۵	۰/۵	روش آماده سازی و سترون سازی وسایل مورد نیاز	آماده سازی وسایل مورد نیاز و روش سترون سازی وسایل	۳
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۸۸۹۸		*		۰/۵	هدف و دامنه کاربرد، مواد و دستگاه های مورد نیاز جهت انجام آزمون	آشنایی با استاندارد روش آزمون	۴
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۸۸۹۸		*		۱	آشنایی با باکتریهای احتمالی موجود در مریا، مارمالاد و ژله مریا	آشنایی با شاخص های میکروبی و حدود مجاز آنها در مریا، مارمالاد و ژله مریا	۵
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۸۸۹۸	*	*	۰/۵	۰/۵	تهیه سوسپانسیون اولیه و سایر رقتها با استفاده از رقیق کننده مناسب	روش آماده سازی نمونه در آزمایشگاه	۶
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۸۸۹۸	*	*	۱	۱	استفاده از سوسپانسیون اولیه و یا رقت های مورد نیاز در پلیت، برای شمارش استفاده از سوسپانسیون اولیه و یا رقت های مورد نیاز در لوله های حاوی محیط کشت مناسب برای جستجو	روش شمارش و جستجوی باکتریها	۷
جزوه آموزشی و استانداردهای ملی ایران ۸۸۹۸		*		۰/۵	گرمخانه گذاری در دما و زمان مناسب بر حسب باکتری های مورد نظر	گرمخانه گذاری	۸

منبع / استانداردها	اجراکننده		مدت آموزش (ساعت)		محتوای آموزشی	رئوس مطالب	ردیف
	کارآموز	مدرس	عملی	تئوری			
جزوه آموزشی و استانداردهای ملی ایران ۸۸۹۸	*	*	۱	۱	بررسی و نحوه شمارش و محاسبه کلنی‌ها پس از گرمخانه‌گذاری -تعیین وجود یا عدم وجود باکتری‌ها	تشخیص و شمارش کلنی‌ها	۹
جزوه آموزشی و استانداردهای ملی ایران ۸۸۹۸		*	۱	۱	نحوه تفسیر، بررسی نتایج و گزارش‌دهی	تفسیر نتایج	۱۰
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 میکروبی شناسی

نحوه برگزاری آزمون:

تئوری	عملی
*	*

جزوه دوره کارآموزی میکروبیولوژی مربا، مارمالاد و ژله مربا

تهیه کننده:

ساره داورزنی

گروه پژوهشی:

گروه پژوهشی میکروبیولوژی- آزمایشگاه فرآورده های کنسرو شده
به سفارش دفتر آموزش و ترویج استاندارد

منابع و مآخذ:

- ۱- استاندارد ملی ایران ۸۸۹۸: مربا، مارمالاد و ژله مربا- ویژگی ها و روش های آزمون میکروبیولوژی
- ۲- استاندارد ملی ایران ۱۰۸۹۹-۲: 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 (aw) کمتر از ۰/۹۵
- ۳- استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹: میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - راهنمای الزامات کلی برای آزمون
- ۴- آزمایشگاه میکروبیولوژی عمومی- تالیف : مهرانوش تنگستانی
- ۵- یگانه، مهرداد. استاندارد و استاندارد کردن، چاپ اول، موسسه دانش پارسیان، ۱۳۸۹

فهرست

صفحه	عنوان
ب	آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران
ج	پیش‌گفتار
د	محتوای دوره کارآموزی
ط	مقدمه
۱	۱ هدف
۱	۲ استانداردهای ملی ایران
۱	۳ اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی
۱۸	۴ روش‌های آزمون میکروبیولوژی
۱۸	۵ محیط‌های کشت و محلول‌های رقیق‌کننده
۱۸	۶ آماده‌سازی نمونه
۱۹	۷ روش آزمون
۲۲	پیوست الف انواع استاندارد
۲۴	پیوست ب مفاهیم مورد استفاده در کنترل کیفیت
۲۵	پیوست پ اطلاعاتی
۲۹	پیوست ت نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌های انواع مربا، مارمالاد و ژله مربا طبق استاندارد ملی ایران شماره ۸۸۹۸

تهیه مربا و مارمالاد به عنوان نوعی روش نگهداری محصولات میوه مرسوم بوده است. یکی از اهداف تولید مربا، حرارت دادن به میوه ها برای افزایش طول عمر آن ها و ایجاد تنوع در گنجاندن یک غذای تازه در صبحانه می باشد. مربا فرآورده‌ای است که از میوه کامل سالم یا از قطعات میوه طی فرآیند پخت با افزودن مقداری آب و شکر به دست می‌آید. اساس تهیه مربا تشکیل ژل پکتین است. به هنگام رسیدن میوه تحت تاثیر آنزیم‌های پکتولیتیک و هیدرولیز عوامل مذکور، پکتین ایجاد می‌شود. پکتین در حضور مواد قندی و محیط اسیدی قادر است ژل تشکیل دهد. به این دلیل معمولاً میوه رسیده برای تهیه مربا مناسب است. اصولاً در فرایند تولید مربا تکه های میوه را داخل شهدی شیرین قرار می دهند و چنانچه طی فرایند تولید، میوه ها پخته شوند و با آب و شکر مخلوط شوند و به شکل خمیر درآیند مارمالاد گفته می شود. به عبارت ساده‌تر، مارمالاد به مربای خمیری یا ژله‌ای شکلی گفته می‌شود که به هیچ عنوان تکه‌های میوه در آن وجود ندارد (میوه ها بصورت رنده یا ریز شده هستند). اما اصل و اساس تولید مارمالاد هم میوه‌ها هستند.

جزوه دوره کارآموزی میکروبیولوژی مربا، مارمالاد و ژله مربا

۱ هدف

هدف از تدوین این جزوه کارآموزی آشنایی با روش های آزمون میکروبیولوژی مربا، مارمالاد و ژله مربا بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۸۸۹۸ می باشد.

یادآوری ۱- توصیه می شود کارآموزان این دوره با الزامات آزمایشگاهی میکروبیولوژی و نیز استانداردهای ملی ایران شماره ۸۶۶۳ و ۱۰۸۹۹ آشنایی داشته باشند.

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

۲ استانداردهای ملی ایران

استانداردهای ملی ایران در ارتباط با آزمون های میکروبیولوژی مربا، مارمالاد و ژله مربا به شرح ذیل می باشند:

جدول ۱- لیست استانداردهای میکروبیولوژی مربا، مارمالاد و ژله مربا

ردیف	عنوان استاندارد	شماره استاندارد
۱	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 (aw) بیشتر یا کمتر از ۰/۹۵	۱۰۸۹۹-۲
۲	مربا، مارمالاد و ژله مربا - ویژگی ها و روش های آزمون میکروبیولوژی	۸۸۹۸
۳	میکروبیولوژی مواد غذایی، خوراک دام و آب - آماده سازی، ساخت، ذخیره سازی و آزمون عملکرد محیط های کشت	۸۶۶۳

۳ اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

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

۳-۱ فضای آزمایشگاه

آزمایشگاه باید دارای سه محل جداگانه برای نمونه ها، 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 موادخام (مانند: فرآورده‌های پودری حاوی تعداد زیاد میکروارگانیسم‌ها)
- آزمون نمونه‌ها (ازسوسپانسیون اولیه) شامل گرمخانه‌گذاری میکروارگانیسم‌ها
- آزمون میکروارگانیسم‌های بیماریزای احتمالی
- نگهداری سوبیه مرجع و سایر سوبیه‌ها
- 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 موادشیمیایی مخاطره آمیز، ترجیحاً نگهداری در کابینت‌ها، قفسه‌ها، اتاق‌ها

۳-۱-۲ فضای عمومی

فضاهای جداگانه برای موارد زیر توصیه می‌شود:

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

۳-۲ بهداشت کارکنان

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

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

۳-۳ وسایل و تجهیزات

توصیه می شود مطابق با شرایط خوب آزمایشگاهی، کلیه وسایل و تجهیزات تمیز و در محل مناسب نگهداری شوند. پیش از استفاده بهتر است وسایل از نظر داشتن شرایط لازم برای کار تصدیق و در صورت لزوم در 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 در پیچ‌دار، انواع لوله آزمایش، پتری‌دیش و غیره می‌باشد.



شکل ۱- وسایل شیشه‌ای

فور یا آون

آون اتاقتکی است که قابلیت تثبیت دمای 160°C تا 180°C را برای از بین بردن میکروارگانیسیمها به وسیله حرارت خشک دارد. آون فقط برای سترون سازی تجهیزات مقاوم به حرارت خشک مانند وسایل فلزی و شیشه‌ای استفاده می شود. از آون برای سترون سازی وسایل لاستیکی و پلاستیکی استفاده نشود. پیش از سترون سازی، همه وسایل فلزی و شیشه‌ای را تمیز کنید و در آون قرار دهید. روند سترون سازی باید برای حداقل ۱h در دمای $170^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ یا ترکیب معادلی از دما/ زمان ادامه یابد. پس از سترون سازی، به منظور پیشگیری از شکستن وسایل شیشه‌ای بهتر است پیش از خارج کردن از آون، آن‌ها را خنک کنید.



شکل ۲ - فور یا آون

اتوکلاو

این دستگاه قادر است بخار آب اشباع شده را با حرارت 121°C ایجاد نماید که این درجه حرارت در شرایط بخار ایجاد شده می تواند موجب تخریب ساختمان میکروبها و هاگ آنها شده و تقریباً باعث نابودی تمام میکروارگانیسیمهای شناخته شده شود.



شکل ۳ - اتوکلاو

انکوباتور

انکوباتور شامل اتاقک عایق بندی شده است که برای کشت و رشد دادن نمونه های زنده مانند سلول ها یا میکروب ها به کار می رود. این دستگاه دارای قابلیت نگهداری دمایی ثابت و توزیعی یکنواخت دما با حداکثر خطای مجاز در مقدار نوسانات دمایی تعیین شده در روش های آزمون است. که درجه حرارت مناسب رشد، تکثیر و تشکیل کلنی را فراهم می کند و در انواع انکوباتورهای آزمایشگاهی (معمولی، شیکردار، یخچال دار، CO₂ دار) در آزمایشگاه های میکرو بیولوژی و بیولوژی سلولی کاربرد اساسی دارد.



شکل ۴- انکوباتور

میکروسکوپ

از دو واژه یونانی میکرو به معنی کوچک و سکوپ، به معنی دیدن، گرفته شده است. اصول کلی در تمامی انواع میکروسکوپ ها بر اساس عبور نور با طول موج های متفاوت از چندین عدسی محدب می باشد که هرچقدر طول موج نور به کار رفته در میکروسکوپ مزبور کوتاه تر باشد قدرت تفکیک و یا جداکنندگی آن میکروسکوپ بیشتر است. انواع مختلفی از میکروسکوپ ها 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 تست های سرولوژیک، آگلوتیناسیون، بیوشیمی، تست های دارویی و انجام مراحل انکوباسیون صنعتی، به منظور تثبیت دمای مشخص استفاده این دستگاه دارای یک مخزن آب می باشد که ممکن است بر روی مخزن فوق درپوشی تعبیه شده باشد. معمولاً در پوش ها زاویه دار و حدود ۳۰ درجه بوده (برای اینکه بخارات به داخل لوله هایی که در دستگاه قرار می گیرد 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 می شود.

کاربرد اصلی این دستگاه در آزمایشگاه میکروبیولوژی به شرح زیر است:

الف- گرمخانه گذاری 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 روش های خاص؛

ت- آماده سازی سوسپانسیون های اولیه یا محلول ها در یک دمای کنترل شده؛

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

ت- به منظور گرم کردن معرف ها و ذوب کردن نمونه ها نیز استفاده می شود.



شکل ۵- حمام مایع با دمای ثابت

شمارشگر کلنی

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



شکل ۶- شمارشگر

pH متر

pH متر برای اندازه‌گیری اختلاف پتانسیل در یک دمای معین بین الکتروده‌سنجش و الکتروده مرجع یا قرار دادن هر دو الکتروده داخل فرآورده به کار می‌رود. قابلیت اندازه‌گیری باید با دقت ۰/۰۵ واحد pH باشد.



شکل ۷- pH متر

همگن کننده، خردکن و مخلوط کن

این تجهیزات برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه از فرآورده های مورد آزمون استفاده می شود. وسایلی که ممکن است به کار رود عبارت است از:

- مخلوط کن ضربه ای (استومکر) با کیسه های سترون و در صورت امکان مجهز به وسیله ی تنظیم کننده ی سرعت و زمان
- مخلوط کن چرخشی
- مخلوط کن ارتعاشی
- سایر سیستم های مخلوط کردن با کارایی مشابه



شکل ۸- همگن کننده، خردکن و مخلوط کن

ترازو

وسيله ای برای توزین با دقت های ۰/۱ و ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ در آزمایشگاه می باشد. 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 سترون سازی 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... می باشد.

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 می شود.

(ب) روش شیمیایی: به وسیله مواد ضد عفونی کننده مانند آب اکسیژنه و انجام واکنشهای شیمیایی (مانند رادیکالهای آزاد) برای سترون کردن استفاده می شود.

(پ) روش پرتو دهی: 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 می باشد. 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 می شود. برای تشخیص بین مواد سترون شده و سترون نشده می توان از نشانگرهای سترون سازی استفاده کرد.

۳-۵ آب

برای آماده سازی 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 یون های فلزات می باشد. آب خالص باید در ظرفی 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 می شود 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 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 میکروبهها 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 محیطهای کشت که در پلیت مصرف می شوند، محیطهای کشت عمومی هستند که اساساً برای تهیه مواد غذایی لازم جهت رشد باکتری ساخته شده اند. بعضی مواقع این محیطهای کشت عمومی را با اضافه کردن اجزای مغذی که موجب افزایش سریع رشد ارگانیسیمهای سخت رشد می شوند، غنی می کنند. 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. نمونه هایی از این مواد مغذی عبارتند از: شیر بدون چربی، خون گوسفند، زرده تخم مرغ.

۳-۶-۱ محیطهای متداول در کشت میکروبی

برای مطالعه میکروارگانیسیمها باید بطریقی آنها را بر روی محیطهای کشت مناسب از نظر شرایط فیزیکی و شیمیایی کشت داد. مطالعه زیاد درباره ی میکروارگانیسیمها 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 میکروارگانیسیم 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 میکروبهها باشند.
- pH محیط کشت باید در حد معین قبل از استفاده برای کشت تنظیم شود.
- ظروف مورد استفاده برای تهیه محیط کشتها باید کاملاً 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 می شوند.

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 ارگانسیم‌های آزمون باشند. برای بهبود تکثیرپذیری توصیه می‌شود که مواد بدون آب قابل دسترس تجارتي 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- انواع تقسیم بندی محیط‌های کشت

محیط‌های کشت را از جنبه‌های مختلف تقسیم بندی می‌کنند:

۱) تقسیم بندی بر اساس میزان آگار

آگار یک نوع آلف دریایی می‌باشد که بر خلاف ژلاتین می‌تواند حرارت 37°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 95°C و نقطه انجماد آن حدود 43°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.
- موکونیدی 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 می‌کنند، 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 بر روی 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 صفاوی 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 الصافی 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 25°C ، pH محیط کشت باید در محدوده مورد نظر ± 0.2 واحد pH باشد، مگر اینکه مقادیر دیگری توصیه شده باشد. تنظیم pH معمولاً با استفاده از محلول سدیم هیدروکسید با غلظت تقریبی 40 g/l ($\text{C}(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$) یا هیدروکلریک اسید رقیق شده با غلظت تقریبی $36/5 \text{ g/l}$ ($\text{C}(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$) انجام می‌شود. اگر تنظیم pH پس از سترون‌سازی انجام شود، باید از محلول‌های سترون استفاده شود. جهت کسب اطلاعات بیشتر به استاندارد ملی ایران ۱۱۰۶۸ مراجعه کنید.

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

محیط‌های کشت تهیه شده را در روز آماده‌سازی سترون کنید. سترون‌سازی محیط‌های کشت و معرف‌ها معمولاً با استفاده از حرارت مرطوب با استفاده از اتوکلاو یا فیلتراسیون انجام می‌شود. بعضی از محیط‌های کشت به سترون‌سازی با اتوکلاو نیاز ندارند، ولی می‌توان آنها را با دمای جوش سترون نمود. برای مثال محیط‌های کشت آن‌تروباکتریاسه‌ها که 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 $3 \pm 5^{\circ}\text{C}$ نگهداری کنید.

اگر محیط‌های کشت در یخچال نگهداری شود معمولاً توصیه می‌شود مدت زمان نگهداری برای پلیت‌ها از دو تا چهار هفته و برای بطری‌های بسته شده و لوله‌ها سه تا شش ماه بیشتر نشود.

برای ذوب مجدد، محیط‌های کشت را به وسیله قرار دادن آن در حمام آب جوش و یا هر فرایند دیگری که همان نتیجه را دهد، ذوب کنید (مانند قرار دادن در بخار اتوکلاو). محیط کشت ذوب شده، در حمام آب گرم با دمای تنظیم شده به دمای 47°C تا 50°C خنک کنید.

۳-۶-۳ افزودن مکمل‌ها

مکمل‌هایی که حساس به حرارت هستند، باید بعد از اینکه دمای محیط به کمتر از 50°C رسید، به محیط اضافه شوند. مکمل سترون شده باید قبل از افزودن به محیط آگاردار 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.

۳-۶-۴ 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 ۹۰، معمولاً 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 40°C است، محیط کشت بیشتری ممکن است در پتری دیش‌ها ریخته شود. پلیت‌ها را به صورت در بسته روی یک سطح افقی و خنک قرار دهید تا

آگار سرد شده و ببندد. پلیتهای آگاردار آماده شده تجارتي بهتر است طبق دستورالعمل توليدکننده نگهداری و استفاده شود.

۳-۷ روشهای کشت در میکروبیولوژی

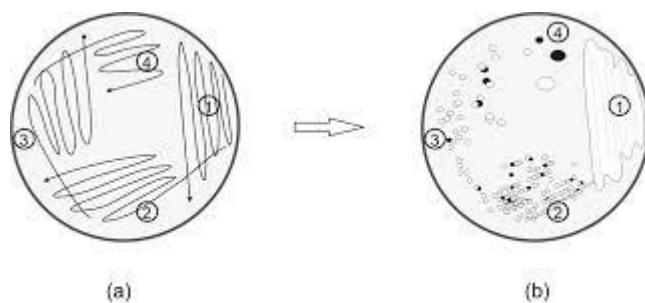
کشت در پلیت به سه روش قابل انجام است.

- کشت خطی
- کشت سطحی
- کشت آمیخته یا پورپلیت

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 می کشید. در کشتهای خطی برای بدست آوردن کلنیهای تک می توانید 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 می دهید و در منطقه سوم و چهارم هم به همین صورت عمل می کنید. خصوصیت این روش این است که وقتی خطوط موازی را روی سطح محیط می کشید به ترتیب از تراکم باکتریها کاسته می شود و به انتهای خط که می رسید تراکم باکتری کمتر است و در منطقه دیگر وقتی از انتهای خط منطقه قبلی استفاده می کنید 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 می شود تا جائیکه در منطقه چهارم شما می توانید کلنیهای تکی داشته باشید که کلنی خالص نامیده می شود.

در مورد محیطهای کشت باکتریایی که بصورت مایع می باشند 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.



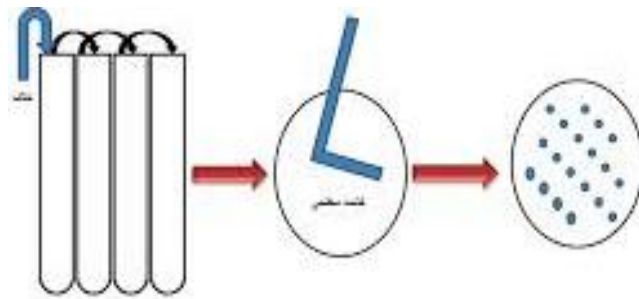
شکل ۱۲- کشت خطی

۳-۷-۲ روش 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 می‌توانید 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 قبلاً 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 میکروارگانیسم‌های موجود در آزمایش (N) بر حسب میانگین تعداد شمارش شده از دو رقت متوالی را محاسبه کنید:

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

که در آن

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

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

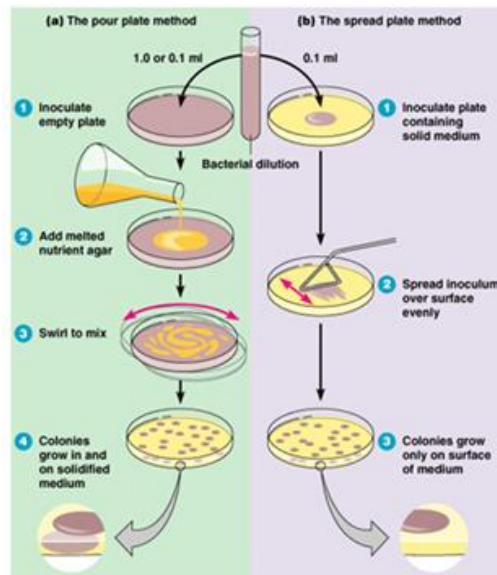
n_1 : تعداد ظروف پتری شمارش شده در اولین رقت مورد نظر (یعنی رقتی که حاوی غلظت بیشتر نمونه باشد)

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

d : ضریب رقت بر حسب اولین رقت مورد نظر

عدد بدست آمده را تا دو رقم معنی‌دار گرد کنید و سپس تعداد میکروارگانیسم‌ها در گرم را به صورت عددی

بین $10^0 - 10^9$ ضربدر توانی از 10 گزارش نمائید.



شکل ۱۴- انواع روش‌های کشت در پلیت

۴ روش های آزمون میکروبیولوژی

روش های آزمون میکروبیولوژی مربا، مارمالاد و ژله مربا بر اساس جدول زیر می باشد:

جدول ۳- روش های آزمون میکروبیولوژی مربا، مارمالاد و ژله مربا

روش مرجع	نوع میکروارگانیسم
طبق استاندارد ملی ۸۸۹۸	شمارش باکتری های مقاوم به اسید
طبق استاندارد ملی ۸۸۹۸	شمارش باکتری های اسید لاکتیک
طبق استاندارد ملی ۱۰۸۹۹-۲	شمارش کپک
طبق استاندارد ملی ۱۰۸۹۹-۲	شمارش مخمر

۵ محیط های کشت و محلول های رقیق کننده

دستورالعمل های کلی برای تهیه محلول های رقیق کننده و محیط های کشت در استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ تعیین شده است. محیط های کشت و محلول های رقیق کننده مورد نیاز برای انجام آزمون های میکروبیولوژی مربا، مارمالاد و ژله مربا در جدول زیر آورده شده است:

جدول ۴- محیط های کشت و محلول های رقیق کننده

ردیف	مواد
۱	آب پپتونه
۲	اورنج سرم آگار OSA
۳	MRS آگار
۴	دی کلران ۱۸٪ گلیسرول آگار DG18

۶ آماده سازی نمونه

انتها و لبه های مجاور نمونه ها را با الکل اتیلیک ۷۰ درصد گندزدایی کنید سپس محتویات ظرف را کاملا مخلوط نمایید و با استفاده از در بازکن سترون با رعایت شرایط آسپتیک در ظرف را باز کنید. حجم معین از آزمایش را با ۹ برابر حجم یا وزن آن از محلول رقیق کننده مخلوط کنید تا سوسپانسیون اولیه به دست آید.

۷ روش های آزمون

۱-۷ نمونه برداری

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

۲-۷ کپک و مخمر

با استفاده از پیپت سترون مقدار یک دهم میلی لیتر از آزمایش را به پلیت حاوی محیط کشت DG18 انتقال دهید و با پیپت های سترون دیگر به همین ترتیب از رقت های 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. پلیت ها را به صورت هوازی با درپوش بالا و ایستاده در گرمخانه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ تا ۷ روز گرمخانه گذاری کنید. پلیت های کمتر از ۱۵۰ کلنی را برای شمارش انتخاب کنید و کلنی های مخمر و کپک را جداگانه شمارش کنید.



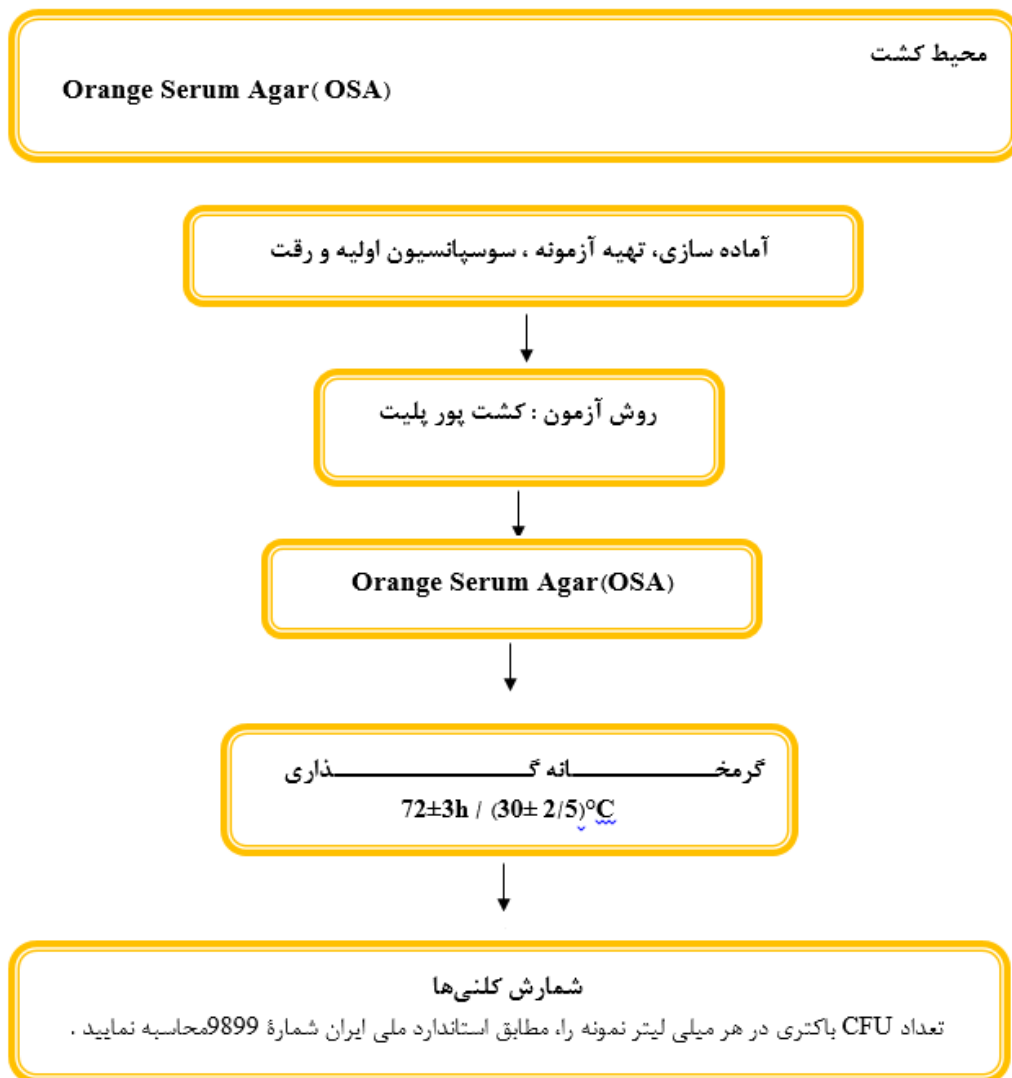
شکل ۱۵- کلنی های کپک



شکل ۱۶- کلنی های مخمر

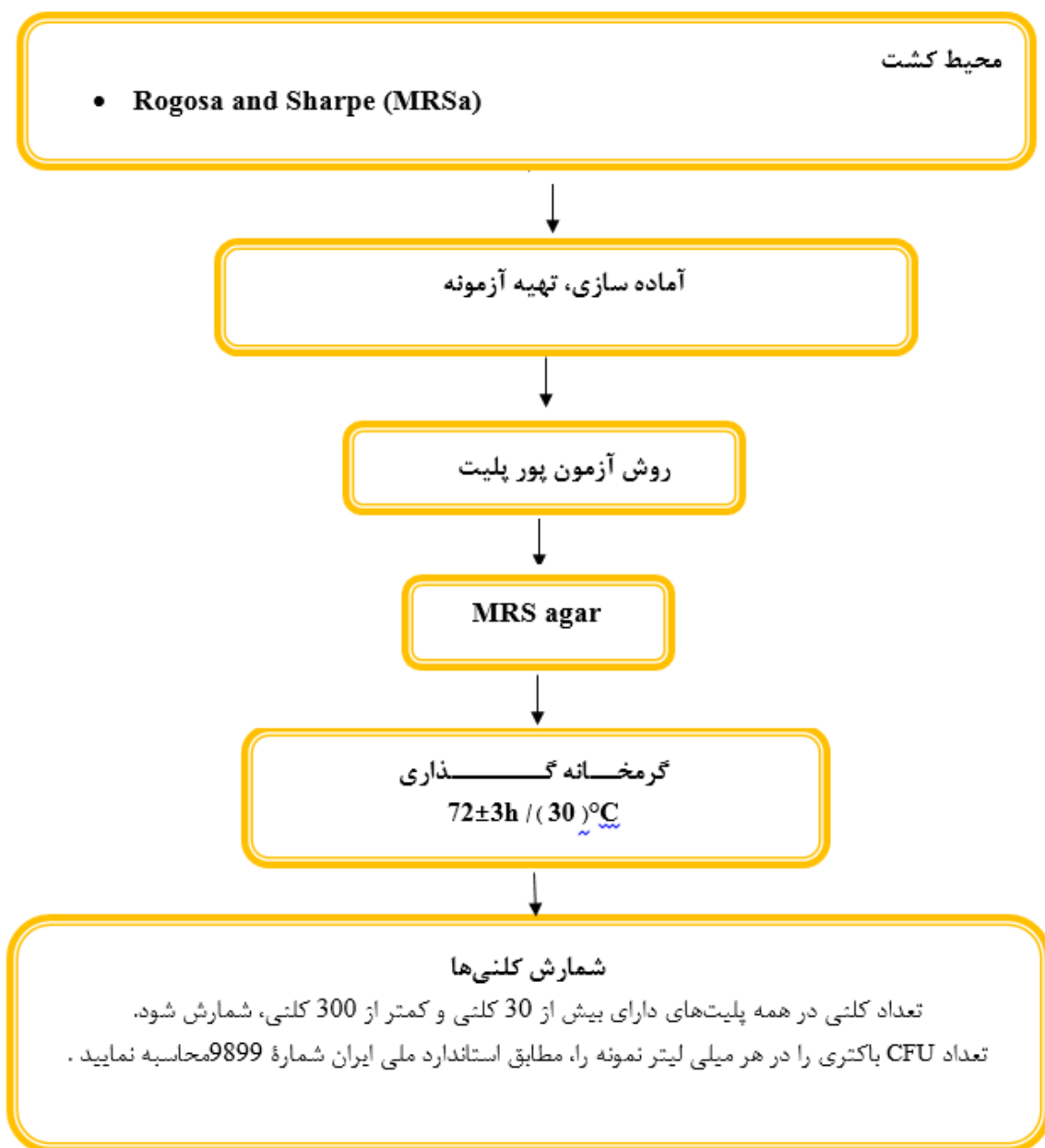
۳-۷ باکتری های مقاوم به اسید

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 سترون (به هر پتری دیش یک میلی لیتر) اضافه کنید و برای سایر رقت های اعشاری با استفاده از پیپت سترون دیگر به همین ترتیب عمل نمایید. سپس به مقدار مناسب از محیط کشت اورنج سرم آگار OSA را پس از رسیدن به دمای ۴۵ درجه سلسیوس به پلیت های 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 ۵ روز گرمخانه گذاری کنید. سپس همه کلنی های رشد یافته در پلیت را شمارش کنید. (تهیه رقت مطابق استاندارد ۸۹۲۳-۱ انجام شود).



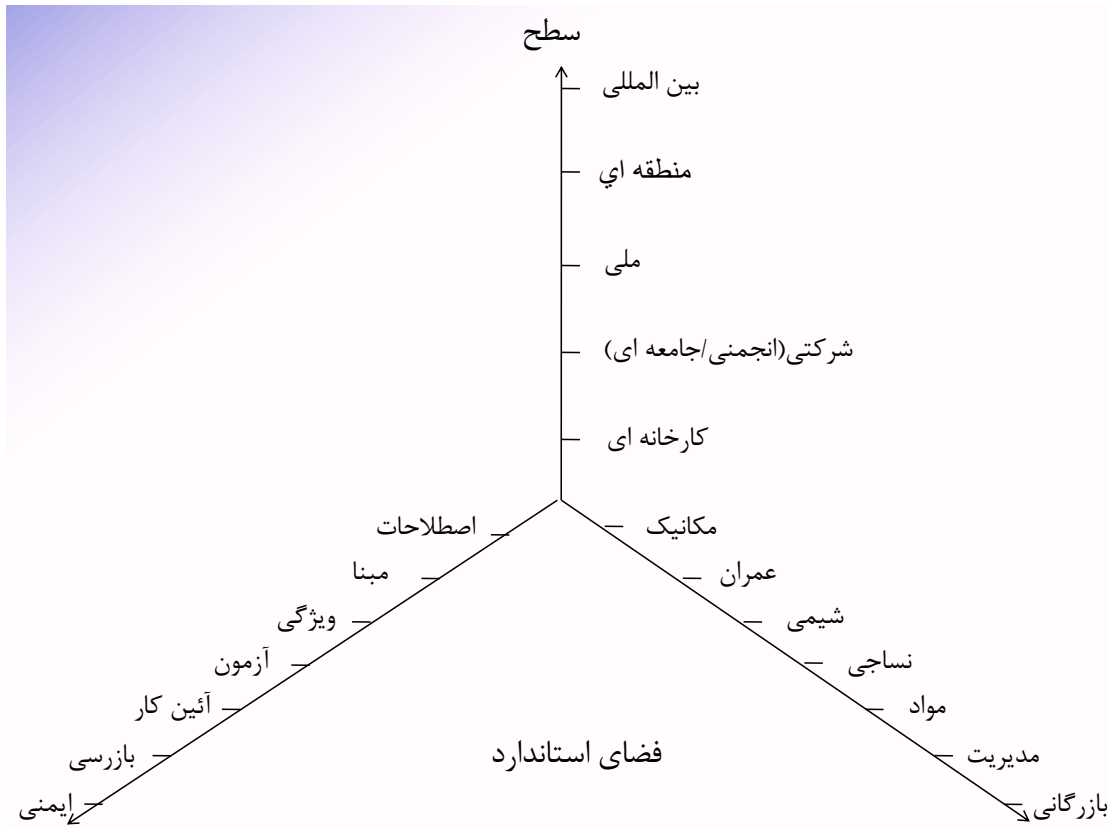
۴-۷ باکتری های اسید لاکتیک

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 سترون (به هر پتری دیش یک میلی لیتر) اضافه کنید و برای سایر رقت‌های اعشاری با استفاده از پیپت سترون دیگر به همین ترتیب عمل نمایید. سپس به مقدار مناسب از محیط کشت MRS آکار 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 ۵ روز گرمخانه گذاری کنید. سپس همه کلنی های رشد یافته در پلیت را شمارش کنید.



پیوست الف انواع استاندارد

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



الف-۲ سطح استاندارد

استانداردها دارای سه سطح کلی می باشند که می توان آن ها را به صورت زیر تقسیم بندی کرد:
الف- استانداردهای کارخانه ای، این گونه استانداردها توسط کارخانجات و به منظور استفاده در همان واحد تدوین می شود. در تدوین استاندارد کارخانه ای ضمن بررسی شرایط داخلی کارخانه باید شرایط و عوامل خارجی از قبیل مواد اولیه و منابع تهیه آن، چگونگی تهیه تجهیزات، بازاریابی و رقابت، نیاز مشتری و امثال آن باید مورد توجه قرار گیرد.

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

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

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

الف-۳- جنبه استاندارد

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

الف- استاندارد های ویژگی

ب- استاندارد های روش آزمون

پ- استانداردهای آیین کار

ت- استانداردهای ایمنی

ث- واژه نامه

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

الف-۴- اجرای استاندارد

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

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

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

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

www.isiri.gov.ir

پیوست ب

مفاهیم مورد استفاده در کنترل کیفیت

- ب-۱- نمونه (**Sample**)
یک یا چندین قلم، قطعه یا واحد که از یک جامعه یا مجموعه یا محموله انتخاب می شوند را نمونه گویند.
- ب-۲- حجم نمونه (**Sample Size**)
مقدار مواد یا تعداد اقلام یا واحدهای تشکیل دهنده یک نمونه را، حجم نمونه گویند.
- ب-۳- نمونه برداری (**Sampling**)
رویه ای است که بر طبق آن از جامعه یا محموله مورد بررسی بخش یا بخش های کوچکی انتخاب می شود تا بر اساس نتایج حاصل از بازرسی آن ها بتوان در مورد کل جامعه یا محموله قضاوت کرد.
- ب-۴- بازرسی (**Inspection**)
مجموع بررسی ها، اندازه گیری و آزمون هایی است که جهت مقایسه مشخصات مواد محصولات نیمه ساخته و محصولات تمام شده با مشخصات فنی یا استانداردها انجام می گیرد.
- ب-۵- درستی (**Accuracy**)
نزدیکی نتیجه اندازه گیری یک کمیت با مقدار واقعی آن کمیت است.
- ب-۶- دقت (**Precision**)
نزدیکی بین جواب های تکراری حاصل از چند آزمایش بر روی یک نمونه است.
- ب-۷- تجدید پذیری (**Reproducibility**)
نزدیکی میزان مقادیر بدست آمده از آزمون ها بر روی یک نمونه است در شرایطی که روش، آزمایش کننده، تجهیزات، محل و شرایط و زمان متفاوت باشد.
- ب-۸- تکرار پذیری (**Repeatability**)
نزدیکی مقدار نتایج اصل از یک آزمایش در شرایطی است که شرایط اندازه گیری، تجهیزات، آزمایش کننده و محل همگی یکسان باشد.
- ب-۹- رواداری (**Tolerance**)
حداکثر میزان انحراف قابل قبول برای یک کالا از اندازه خود (حداکثر خطای قابل قبول در یک اندازه گیری)

پیوست پ (اطلاعاتی)

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

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

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

عدم انجام هر یک از وظایف مدیر کنترل کیفیت و تخطی شغلی و قانونی او طبق آیین نامه ذکر شده می تواند منجر به اعمال تنبیهاتی به ترتیب شامل: تذکر شفاهی به عنوان کمترین و **ابطال 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

جدول ۱- امتیازات منفی نواقص موجود در فرآورده

نوع نقص	امتیاز منفی
بحرانی	۳۰
عمده	۱۵
جزئی	۵

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

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

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

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

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

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

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

منبع: دستورالعمل نحوه تذکر، اخطار، تعلیق و ابطال پروانه کاربرد علامت استاندارد ایران به علت عدم تداوم انطباق فرآورده با استاندارد مربوطه (مدرک شماره ۵/۱۱۹/۵۰)

پیوست ت

نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌های انواع مربا، مارمالاد و ژله مربا طبق استاندارد ملی ایران شماره ۸۸۹۸

ردیف	شرح آزمون	درجه اهمیت
۱	شمارش باکتری های مقاوم به اسید	عمده
۲	شمارش باکتری های اسید لاکتیک	عمده
۳	کپک	عمده
۴	مخمر	عمده