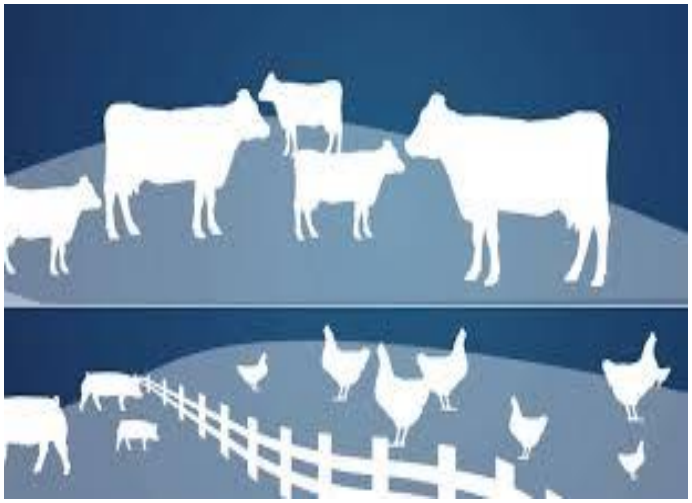
ریاست جمهوری
سازمان ملی استاندارد ایران

جزوه دوره کارآموزی

میکروبیولوژی خوراک دام، طیور و آبزیان



شماره مدرک : ۶۲۲/۳۸ج
تاریخ تصویب : ۱۳۹۸

تاریخ تجدید نظر: **شماره تجدید نظر:**

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

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

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

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سـازمان، صـاحب‌نظـران مراکـز و مؤسسـات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شـرایط تولیـدی، فناوری و تجاری اسـت کـه از مشـارکت آگاهانـه و منصـفانهٔ صـاحبان حـق و نفـع، شـامل تولیدکننـدگان، مصـرف‌کننـدگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتـی حاصـل مـی‌شـود. پـیش‌نـویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربـوط ارسـال مـی‌شـود و پـس از دریافـت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایـران چـاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضـوابط تعیـین شـده تهیـه مـی‌کننـد درکمیته ملی طرح، بررسی و درصـورت تصـویب، بـه عنـوان اسـتاندارد ملـی ایـران چـاپ و منتشـر مـی‌شـود. بـدین ترتیـب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتـهٔملی اسـتاندارد مربـوط 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 بین‌المللـی الکتروتکنیـک (IEC)[۲] و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی(OIML)[۳] است و به عنـوان تنهـا رابـط[۴] کمیسـیون کـدکس غـذایی(CAC)[۵] در کشـور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهایملی ایـران ضـمن تـوجه بـه شـرایط کلـی و نیازمنـدی‌هـای خـاص کشـور، از آخـرین 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 عمـومی، حصـول اطمینـان از کیفیـت محصـولات و ملاحظـات زیسـت‌محیطـی و اقتصـادی، اجـرای بعضـی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عـالی اسـتاندارد، اجبـاری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهـای بـین‌المللـی بـرای محصـولات کشـور، اجـرای اسـتاندارد کالاهـای صـادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسـات فعـال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست محیطی، آزمایشـگاه‌هـا و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اسـاس ضـوابط نظـام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکـرد آن‌هـا نظارت میکند. ترویج دستگاه بین المللی یکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجـام تحقیقـات کـاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

۱- International Organization for Standardization

۲- International Electrotechnical Commission

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

۴-Contact point

۵- Codex Alimentarius Commission

پیشگفتار

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

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

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

محتوای دوره کارآموزی

عنوان دوره کارآموزی:

میکروبیولوژی خوراک دام، طیور و آبزیان

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 خوراک دام، طیور و آبزیان بر اساس استانداردهای ۱۸۱۰-۲۹۴۶ می‌باشد و موارد زیر را در برمی‌گیرد:

۱-اطلاع رسانی روش‌های بهینه و جدید آزمایشگاهی

۲-یکسان سازی رویه آزمایشگاه میکروبیولوژی خوراک دام، طیور و آبزیان

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 خوراک دام، طیور و آبزیان

۵-آشنایی با الزامات فنی آزمایشگاه میکروبیولوژی بر اساس استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹

فهرست استانداردهای ضروری جهت دوره کارآموزی:

توانایی های آموزشی کارآموزان پس از طی دوره:

روش تهیه و سترون‌سازی محیط کشت‌های مورد نیاز

- روش آماده‌سازی و سترون‌سازی وسایل مورد نیاز

- -روش آلودگی‌زدایی مواد مصرفی و وسایل

- نحوه استفاده صحیح از تجهیزات مورد نیاز در آزمایشگاه

- روش بکارگیری از استانداردهای مرتبط

-روش اجرای آزمون طبق استاندارد

- شناسایی و تعیین هویت باکتری‌ها

-چگونگی گزارش نتیجه آزمون

پیش نیاز:

ندارد

رئوس مطالب آموزشی :

ردیف	رئوس مطالب	محتوای آموزشی	مدت آموزش (ساعت)		اجراکننده		منبع / استانداردها
			تئوری	عملی	مدرس	کارآموز	
۱	آشنایی با الزامات فنی آزمایشگاه میکروبیولوژی	آشنایی با وسایل مورد نیاز آشنایی با اصول آزمایشگاهی آشنایی با 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 خوراک دام 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 استانداردهای ملی ایران ۲۹۴۶-۱۸۱۰
۵	آشنایی با شاخص‌های میکروبی و حدود مجاز آنها در گوشت و فرآورده های آن	آشنایی با باکتریهای احتمالی موجود در خوراک دام	۱	*			جزوه آموزشی و استانداردهای ملی ایران ۲۹۴۶-۱۸۱۰
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 ۱-۸۹۲۳
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 استانداردهای ملی ایران ۲۹۴۶-۱۸۱۰

ردیف	رئوس مطالب	محتوای آموزشی	مدت آموزش (ساعت)		اجراکننده		منبع/ استانداردها
			تئوری	عملی	مدرس	کارآموز	
۸	گرمخانه‌گذاری	گرمخانه‌گذاری در دما و زمان مناسب بر حسب باکتری‌های مورد نظر	۰/۵		*		جزوه آموزشی و استانداردهای ملی ایران ۲۹۴۶-۱۸۱۰
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 استانداردهای ملی ایران ۲۹۴۶-۱۸۱۰
۱۰	ارائه گزارش آزمون	نحوه گزارش نتایج بررسی شده	۱	۱	*	*	جزوه آموزشی و استانداردهای ملی ایران ۲۹۴۶-۱۸۱۰
مدت دوره: دو روز							

سایر استانداردها و منابع:

نحوه برگزاری آزمون:

عملی	تئوری
*	*

جزوه دوره کارآموزی میکروبیولوژی خوراک دام، طیور و آبزیان

تهیه کننده :
رامتین احمدی

گروه پژوهشی/ آزمایشگاه:
میکروبیولوژی/ آزمایشگاه خوراک دام،طیور و آبزیان
به سفارش دفتر آموزش و ترویج استاندارد

منابع و مآخذ:

۱- یگانه، مهرداد. استاندارد و استاندارد کردن، چاپ اول، موسسه دانش پارسیان، ۱۳۸۹
۲- استاندارد ملی ایران ۱-۸۹۲۳ : میکروبیولوژِی مواد غذایی و خوراک دام -آماده سازی آزمایه- سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمونهای میکروبیولوژی- قسمت اول -مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری
۳- استاندارد ملی ایران ۳۲۰۷ : ویژگیهای بهداشتی و میکروبیولوژیکی مواد اولیه خوراک طیور و دان آماده
۴- استاندارد ملی ایران ۶۰۵ : خوراک طیور- ویژگیها و روشهای آزمون
۵- استاندارد ملی ایران ۲۵۹۵ : خوراک طیور -کنسانتره -ویژگیها
۶- استاندارد ملی ایران ۳۷۷۴: خوراک دام، طیور و آبزیان -کنسانتره خوراک دام- ویژگی‌ها
۷- استاندارد ملی ایران ۲۳۸۷ : خوراک طیور-مکمل های ویتامینی و معدنی-ویژگی‌ها
۸- استاندارد ملی ایران ۱۳۵۷۸ : خوراک دام - مکمل ویتامینی و معدنی – ویژگی‌ها- روش های آزمون
۹- استاندارد ملی ایران ۷۲۲ : پودر ماهی -ویژگی ها و روش های آزمون
۱۰- استاندارد ملی ایران ۶۸۴۹ : تفاله مرکبات مورد مصرف خوراک دام وطیور– ویژگی‌ها و روش های آزمون
۱۱- استاندارد ملی ایران ۲۹۴۶ : میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش جستجو و شمارش اشریشیاکلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی
۱۲- استاندارد ملی ایران ۱۸۱۰ : میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-روش جستجوی سالمونلا در مواد غذایی

۱۳- استاندارد ملی ایران ۳-۱۰۸۹۹: میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -روش جامع برای شمارش کپک ها و مخمرها-قسمت دوم-روش شمارش کلنی در فرآورده های با فعالیت آبی مساوی یا کمتر از ۰/۶۰
۱۴- استاندارد ملی ایران **۱-۶۸۰۶** : : میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-روش شناسایی و شمارش استافیلوکوک های کوآگولاز مثبت در مواد غذایی

۱۵. 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	۲۸
۵- میکروارگانیسم هایی که درخوراک دام، طیور و آبزیان بر طبق استاندارد ملی ایران جستجو و شناسایی می شوند	۲۸
۶- خصوصیات میکروارگانیسم ها:	۲۸
۷-روش‌های آزمون میکروبیولوژی درخوراک دام،طیور و آبزیان	۳۰
۸- اصطلاحات و تعاریف	۳۳
۹- محیط‌های کشت و رقیق‌کننده‌ها	۳۳
۱۰- روش اجرای آزمون	۳۸
۱۱- اصول آزمون	۴۱
۱۲- بیان نتایج	۴۹
پیوست الف- انواع استاندارد	۵۱
پیوست ب- مفاهیم مورد استفاده در کنترل کیفیت	۵۲
پیوست پ- اطلاعاتی	۵۳
پیوست ت- نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌های میکروبیولوژی خوراک دام،طیور و آبزیان	۵۷

مقدمه

کنترل کیفی خوراک دام وطیور جهت پیشگیری از بیماری‌ها

یکی از اصول مهم درجهت کنترل بیماری‌ها، بهداشت و کنترل آلودگی های خوراک انسان و دام می‌باشد. اقلام ورودی به مزارع پرورش دام وطیور می توانند به صورت مستقیم در حیوان ایجاد بیماری نمایند و یا باعث ایجاد زمینه مناسب برای بروز بیماری های دیگردر حیوان گردند. همچنین می‌تواند با ایجاد آلودگی در چرخه تولید غذای انسان باعث ایجاد بیماری در انسان گردند.

به طور خلاصه جهت تولید غذای سالم برای انسان باید عوامل بیماری زا از ابتدای چرخه تولید غذا یعنی از خوراک دام وطیور کنترل کرد.

کارخانه های خوراک دام از مقادیر زیادی از پروتئین های گیاهی و حیوانی استفاده می‌کنند. ترکیبات مواد غذایی بطور معمول با باکتری سالمونلا الوده است که اغلب این آلودگی در مواد تولید شده در ضایعات حیوانی مانند پودر گوشت و پودر ماهی مشاهده می گردد و با حذف منابع پروتئین حیوانی به نظر می‌رسد می‌توان آلودگی میکروبی جیره را کاهش داد. اما چندین مشکل با حذف این مواد به وجود می‌آید:

الف- حذف منابع پروتئینی حیوانی از غذای دام باعث افزایش قیمت تمام شده جیره می‌گردد.

ب- استفاده از ضایعات حیوانی باعث کاهش آلودگی محیط زیست می‌گردد.

ج- منابع گیاهی نیز حاوی آلودگی‌های باکتریایی هستند.

مطالعات نشان داده که آلودگی‌های باکتریایی ابتدا از غذا به گله مادر انتقال پیدا کرده و سپس از گله مادر از طریق تخم به جوجه ها انتقال می‌یابد.

آلودگی های قارچی

غلات کپک زده حاوی متابولیت‌های قارچی هستند که مایکوتوکسین نامیده می‌شوند. وجود مایکوتوکسین در جیره غذایی باعث بیماری و یا مرگ در حیوانات می‌گردد. این مواد شامل آفلاتوکسین، اکراتوکسین، زرالنون، فومونیزین است. هر کدام از این مایکوتوکسین‌ها توسط یک یا چند نوع قارچ تولید می‌گردد و رشد آنها بیشتر در شرایط گرم و مرطوب صورت می‌گیرد. مایکوتوکسین‌ها باعث خسارت زیادی به غلات می شوند.

علائم کلینیکی ناشی از سموم مایکوتوکسین‌ها شامل: کارکرد نادرست کبد، ناهنجاری های خونریزی، اسهال، استفراغ و در نهایت مرگ حیوان می‌باشد.

آلودگی در خط تولید

یکی از مشکلات اساسی کارخانجات تولید خوراک است. شستشوی نادرست سطوح آلوده، محیط مناسبی برای رشد باکتری‌ها فراهم می‌کند. با ادامه رشد باکتری‌ها روی تجهیزات و قطعات مختلف، آلودگی به محصول نیز انتقال یافته و مدت نگهداری محصول کاهش می‌یابد.

از مهم ترین راهکارهای کنترل آلودگی، کاهش میزان رطوبت و طراحی مناسب قطعات و تجهیزات دستگاه می‌باشد. اما غالبا به دلیل عدم کنترل رطوبت و پاکسازی نامناسب بخش‌های مختلف، شرایط برای رشد باکتری‌ها مهیا می‌گردد. بنابراین پاکسازی و ضدعفونی موثر خطوط تولید در کارخانه دو امر مهم و اساسی در تولید خوراک می‌باشد.

جزوه دوره کارآموزی میکروبیولوژی خوراک دام، طیور و ابزیان

۱ هدف

هدف از تدوین این جزوه آموزشی آشنایی با روش‌های آزمون میکروبیولوژی خوراک دام و طیور ، مطابق با استانداردهای ملی ایران می‌باشد.

یادآوری ۱- توصیه می شود کارآموزان این دوره با الزامات آزمایشگاه میکروبیولوژی و نیز استاندارد های ملی ایران به شماره های ۱/۸۹۲۳-۳۲۰۷-۶۰۵-۲۵۹۵-۳۷۷۴-۲۳۸۷-۱۳۵۷۸آشنایی داشته باشند.

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

۲ استانداردهای ملی ایران

استانداردهای ملی ایران در ارتباط با آزمون میکروبیولوژی خوراک دام،طیور و آبزیان ، به شرح زیر می‌باشند:

جدول ۱- لیست استانداردهای میکروبیولوژی خوراک دام و طیور

ردیف	عنوان استاندارد	شماره استاندارد
۱	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	۱-۸۹۲۳
۲	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش جستجو و شمارش اشریشیاکلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی	۲۹۴۶
۳	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-روش جستجوی سالمونلا در مواد غذایی	۱۸۱۰
۴	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -روش جامع برای شمارش کپک ها و مخمرها-قسمت سوم روش شمارش کلنی در فرآورده های با فعالیت آبی مساوی یا کمتر از ۰/۶۰	۳-۱۰۸۹۹
۵	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-روش شناسایی و شمارش استافیلوکوک های کوآگولاز مثبت در مواد غذایی	۱-۶۸۰۶
۶	ویژگیهای بهداشتی و میکروبیولوژیکی مواد اولیه خوراک طیور و دان آماده	۳۲۰۷
۷	خوراک طیور- ویژگیها و روشهای آزمون	۶۰۵
۸	خوراک طیور -کنسانتره –ویژگیها	۲۵۹۵
۹	خوراک دام، طیور و آبزیان -کنسانتره خوراک دام- ویژگیها	۳۷۷۴

ردیف	عنوان استاندارد	شماره استاندارد
۱۰	خوراک طیور-مکمل های ویتامینی و معدنی-ویژگیها	۲۳۸۷
۱۱	خوراک طیور-ذرت دامی -ویژگیها	۱۴۴۵
۱۲	خوراک دام - مکمل ویتامینی و معدنی - ویژگی ها- روش های آزمون	۱۳۵۷۸
۱۳	پودر ماهی -ویژگی ها و روش های آزمون	۷۲۲
۱۴	تفاله مرکبات مورد مصرف خوراک دام وطیور -ویژگی ها و روش های آزمون	۶۸۴۹

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

۳-۱-۲ فضای عمومی

فضاهای جداگانه برای موارد زیر توصیه می‌شود:

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

۳-۲ بهداشت کارکنان

به منظور پیشگیری از آلودگی نمونه‌ها، 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 و ترجیحاً 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 شیشه‌ای آزمایشگاهی
۲	اتوکلاو
۳	انکوباتور
۴	بن ماری
۵	ترازو
۶	شمارش گر کلنی
۷	فور
۸	همگن کننده، خردکن و مخلوط کن
۹	میکروسکوپ
۱۰	pH متر

وسایل شیشه‌ای

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

شکل۱ – وسایل شیشه‌ای

فور[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

۱ - Aven

پلاستیکی استفاده نشود. پیش از سترون‌سازی، همه وسایل فلزی و شیشه‌ای را تمیزکنید و در آون قرار دهید. پس ازسترون‌سازی، به منظور پیشگیری از شکستن وسایل شیشه‌ای بهتر است پیش از خارج کردن از آون، آن‌ها را خنک کنید.

شکل۲- فور یا آون

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. زمان لازم برای اتوکلاو کردن معمولا ۱۵ دقیقه می باشد.

شکل ۳- 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 ا ست. دستگاهی است که درجه حرارت مناسب رشد، تکثیر و تشکیل کلنی را فراهم می‌کند. در انواع

۱ - Incubator

انکوباتورهـــای آزمایشـــگاهی (معمـــولی، شـــیکردار، یخچالـــدار، CO_2دار) در آزمایشـــگاه‌هـــای میکـــرو بیولوژی و بیولوژی سلولی کاربرد اساسی دارد.

شکل ۴- انواع انکوباتور

میکروسکوپ [۱]

میکروســـکوپ یکـــی از وســـایل آزمایشـــگاهی اصـــلی در آزمایشـــگاه زیســـت شناســـی اســـت. از دو واژه یونانی میکرو بـه معنـی کوچـک و سـکوپ، بـه معنـی دیـدن، گرفتـه شـده اسـت. اصـول کلـی در تمـامی انواع میکروسکوپ ها بر اساس عبور نـور بـا طـول مـوج‌هـای متفـاوت از چنـدین عـــدسی محـدب مـی-باشد که هرچقدر طول موج نور به کـار رفتـه در میکروسـکوپ مزبـور کوتـاه‌تـر باشـد قـدرت تفکیـک و یـا جـــداکنندگی آن میکروســـکوپ بیشـــتر اســـت. انـــواع مختلفـــی از میکروســـکوپ هـــا شـــامل: اســـتریو میکروســـکوپ[۲]، میکروســـکوپ اینـــورت[۳]، میکروســـکوپ فلورســـنت[۴]، میکروســـکوپ دوچشمی[۵]می‌باشد.

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.

شکل۵- میکروسکوپ نوری

حمام مایع[1] (بن ماری[2]) 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 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 ۶- انواع حمام مایع با دمای ثابت

۱ - Water bath

۲ - Bain marie

شمارشگر کلنی

شکل ۷- شمارش گر

pH متر

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

شکل۸- pH متر

همگن کننده، خردکن و مخلوط کن

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

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

شکل ۹- 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 ۱۰- 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*[1] و ژئوباسیلوس *استئاروترموفیلوس*[2] 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.

۳-۵ آب

برای آماده‌سازی محیط‌های کشت، فقط از آب خالص[3] یعنی آب مقطر[4]، آب بدون املاح[5]، آب یون زدایی شده[6] 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 یون های 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 ۱۱- دستگاه دیونایزر

۱-Bacillus subtilis
۲-Bacillus. Stearothermophilus
۳-Purified water
۴- Distilled
۵ -Demineralized
۶- Deionized
۷- Reverse osmosis

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 تهیه مواد غذایی لازم جهت رشد باکتری ساخته شده‌اند. بعضی مواقع این محیطهای کشت عمومی را با اضافه کردن اجزای مغذی که موجب افزایش سریع رشد ارگانیسمهای سخت رشد می شوند، غنی می‌کنند. ماهیت این مواد مغذی چنان است که نمی توان آنها را همراه با محیط اصلی سترون کرد، بلکه باید بعد از اتوکلاو شدن محیط بطور سترون این مواد اضافه شوند. نمونه هایی از این مواد مغذی عبارتند از: شیر بی 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:

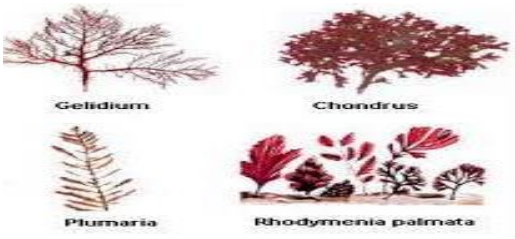
- ✓ تمام محیط کشتها باید واجد مواد غذایی ضروری برای رشد میکروبها باشند.
- ✓ pH محیط کشت باید در حد معین قبل از استفاده برای کشت تنظیم شود.
- ✓ ظروف مورد استفاده برای تهیه محیط کشتها باید کاملا تمیز و عاری از مواد خارجی باشند.
- ✓ آب مقطر مورد استفاده باید بطریقه صحیح تهیه شود.
- ✓ درجه حرارتی که برای 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 مواد شیمیایی موجود 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[۱] قرمز و (عمدتا از جنس *گراسیلاریا*[۲] و *جیلیدیوم*[۳]) استخراج می‌شود. آگار وپکتین یک پلیمر اسیدی است و از زیرواحدهای گالاکتوز به صورت دو نوع پلیمر آگارز[۴] و آگاروپکتین[۵] ساخته شده است. آگار برای میکروارگانیسم‌ها ارزش غذایی ندارد و هیچ میکروارگانیسمی نمی‌تواند آن را هضم کند. نقطه ذوب آن ۹۵ °C و با رسیدن دمای آن به حدود ۴۳ °C شبکه‌ای ایجاد می‌کند که سبب جامد شدن محیط می شود. محیط‌های جامد معمولاً دارای (۱۵- ۱۳) گرم بر لیتر آگار هستند.



شکل۱۲ –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

محیط‌های 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)

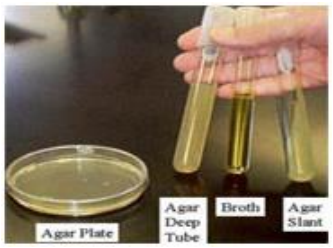
۱-Algae

۲-Gracilari

۳-*Gelidium*

۴-Agarose

۵-Agaropectin

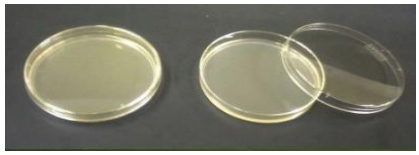


شکل ۱۳- انواع محیط کشت

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



شکل۱۴ -محیط کشت آگار دار

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

الف کشت‌های عمقی[۲]

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

۱-Solid media

۲- Stab Cultures

ب کشت در داخل محیط جامد[1]

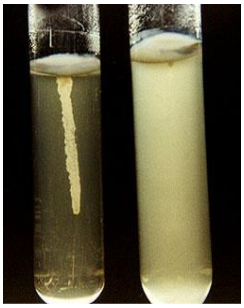
به لوله‌های آزمایش محتوی محیط کشت جامد پس از ذوب شدن که تا ۴۵ °C سرد شده است. باکتری مورد نظر را افزوده و لوله را بین دست‌ها تکان می‌دهند تا باکتری‌ها کاملاً با محیط کشت مخلوط شوند، سپس لوله آزمایش را به طور عمودی قرار می‌دهند تا محیط بسته شود.

پ کشت شیب دار[2]

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[3]**

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.



شکل۱۵ -محیط کشت نیمه جامد

- **محیط کشت مایع یا آبگوشتی [4]**

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.

۱- Shake Cultures

۲ -Slant media

۳ -Semi Solid media

۴ -Liquid or broth media

شکل۱۶ -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 سازی طولانی مدت به وجود آید محافظت کرده و پس از این مدت، به آنها قدرت بازیابی دهد.
مانند: "محیط کشت دورستاگ[۴]"، اسلوپ‌های : نوترینت آگار[۵]"

- **محیط کشت باز یابی** [۶]

---

۱ -Transport medium
۲ -Stuartor amiestransport medium
۳ -Preservation medium
۴ -Dorset agar
۵ -Nutrient medium
۶ -Resuscitation medium

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[۱]"

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[۲] و غنی کننده [۳]**

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[۴]**

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[۵]

- **محیط کشت غنی کننده غیر انتخابی (محیط کشت پایه)[۶]**

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[۷]**

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

- **محیط کشت جداکننده انتخابی [۸]**

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 ارگانیسم

۱-Buffered peptone water
۲ -Pre- enrichmen medium
۳ -Enrichmen medium
۴ -Reference medium
۵ -*Rappaport-Vassiliadis* (RV)
۶ -Basic Media
۷ -Selective isolation medium
۸ -Selective isolation medium

ها 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 محیط‌ها، XLD آگار ، محیط کشت فنیل اتیل الکل آگار است که از رشد باسیل‌های گرم منفی هوازی و بی‌هوازی اختیاری ممانعت بعمل آورده و به ارگانیسم‌های گرم مثبت اجازه رشد می‌دهد.

- **محیط کشت جداکننده غیر انتخابی [۱]**

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

- **محیط کشت انتخابی کروموژنیک [۲]/ فلوروژنیک [۳]**

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

- **محیط کشت افتراقی[۴]**

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

- **محیط کشت شناسایی [۵]**

محیط کشت با قدرت تشخیصی بالا که نیاز به استفاده از محیط کشت‌های تاییدی ندارد. مانند "بایل اسکولین آزاید[۶] "

---

۱ -Selective isolation medium

۲ -Chromogenic

۳ -Fluorogenic

۴ -Media Differential

۵ -Identification medum

۶ - Bile Esculin Azide Agar (Enterococcus Selective Agar)

- **محیط کشت شمارش** [۱]

محیط کشت انتخابی/غیر انتخابی که بیشتر برای شمارش میکروارگانیسم‌ها بکار می‌رود. برد پارکر[۲]"ایبست اکسترکت آگار [۳]"

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

- **محیط کشت تاییدی** [۴]

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 [۵]"

- **محیط کشت دارای ترکیبات خنثی کننده** [۶]

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[۷]"که یک محیط بازیابی، جداکننده ، افتراقی برای رد یابی همولیز بکار می‌رود .

- **محیط کشت مرجع**

محیط کشت غیر انتخابی مانند:"تریپتون سوی آگار[۸]"که برای ارزیابی مقایسه‌ای کنترل عملکرد محیط 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.

---

۱ -Enumeration medium

۲ -Baird-Parker Agar

۳ -Yeast Extract Agar

۴ -Confirmation medium

۵ -Kligler_Iron_Agar_(KIA)

۶ -Medium containing nutralisers

۷ -Blood agar

۸-Tryptic Soy Agar(TSA)

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(۱ 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

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

---

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.

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 $۵۰^{o}C$ 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 $۴۰^{o}C$ 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.

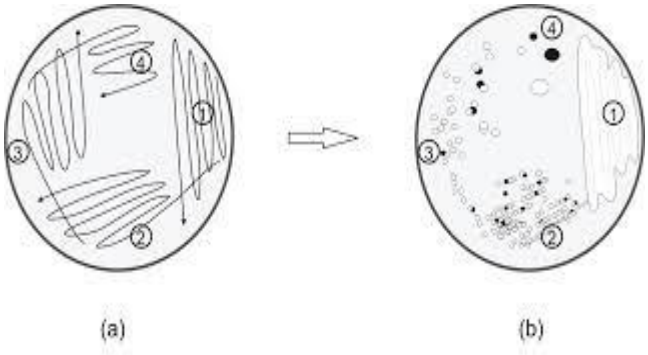
۳- ۷روش های کشت در میکروبیولوژی

کشت در پلیت به سه روش قابل انجام است.

- ✓ کشت خطی[1]
- ✓ کشت سطحی[2]
- ✓ کشت آمیخته یا پور پلیت[3]

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 می‌باشد و در نتیجه در مناطق دیگر هم به ترتیب از تعداد باکتریها کاسته می‌شود تا جائیکه در منطقه چهارم شما می‌توانید کلنی‌های تکی داشته باشید که کلنی خالص نامیده می‌شود. در مورد محیطهای کشت باکتریایی که بصورت مایع می‌باشند برای انجام کشت خطی روی محیط پیش ریخته فقط یکبار حلقه کشت را داخل محیط محتوی باکتری کرده و یک حلقه کشت از آن بردارید سپس آنرا روی محیط پیش ریخته قرار داده و بصورت خطوط موازی آنرا در چند جهت بکشید و یا مراحل فوق را روی آن انجام دهید.



شکل ۱۷- کشت خطی

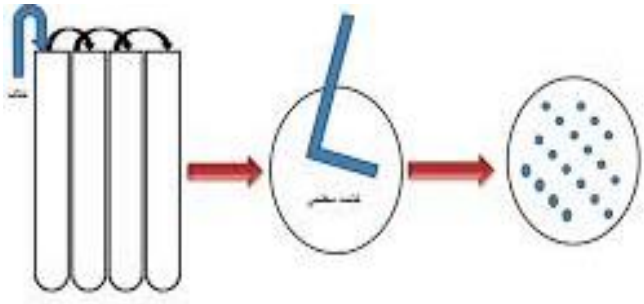
۱ -Streak plate
۲ -Surface plating technique
۳ -Pour plating technique

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.

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 ºC (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 ۱۸- کشت سطحی

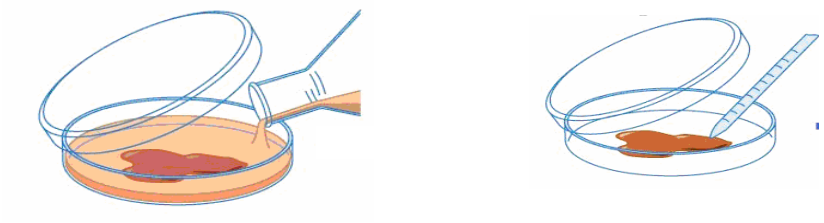
۱ -Heat-sensitive organisms

۲ -Psychrotrophic

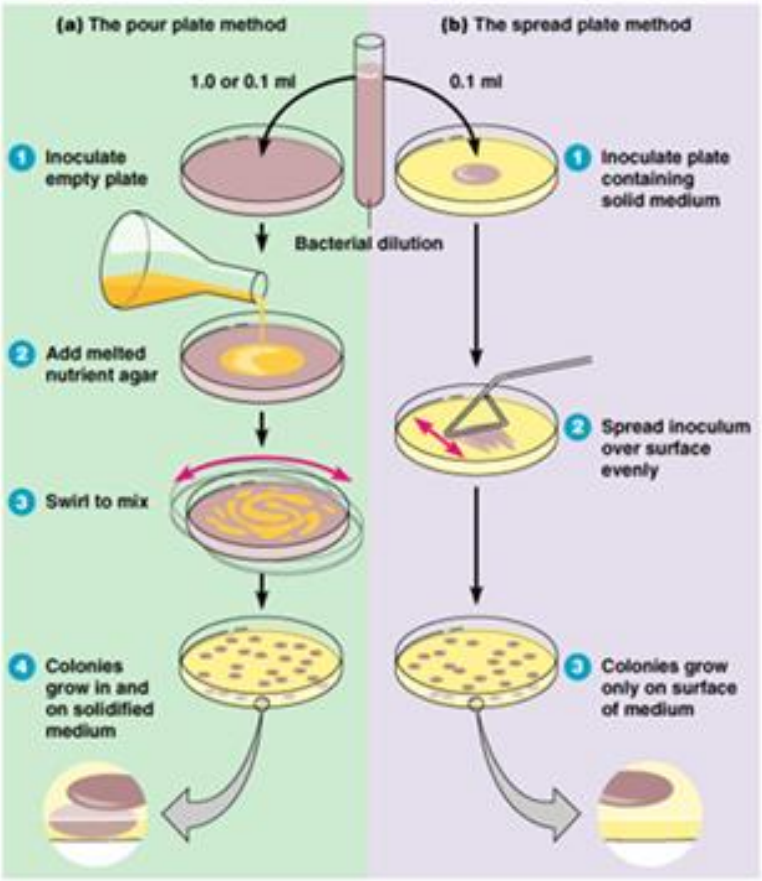
۳ -*Pseudomonas spp.*

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.



شکل۱۹ -کشت پورپلیت



شکل ۲۰- 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 مجدداً 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 زمان۱ 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.

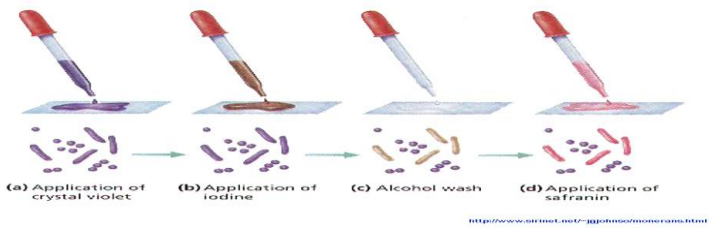
✓ **خشک کردن لام:**

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.



شکل۲۱ -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 شده‌اند، 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 که تبخیر متوقف شد دو بار کار را تکرار کنید و نگذارید رنگ بجوشد . مدت

۳ تا ۵ دقیقه به ترتیب ذکر شده عمل کنید و اگر مالاشیت گرین کاملا از روی لام تبخیر شد دوباره مقداری رنگ به لام اضافه کنید. بگذارید لام سرد شود تا از شکستن آن جلوگیری شود. به موازات سرد شدن لام به اضافه کردن رنگ ادامه دهید زیرا رنگ هنوز در حال تبخیر است.

✓ **مرحله شستشو:**

رنگ اضافی روی لام را خالی کرده در حالیکه لام را به صورت مایل نگهداشته‌اید با استفاده 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.

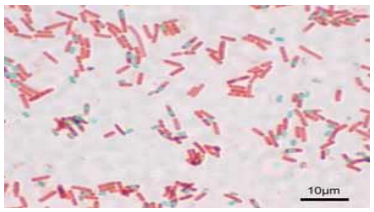
✓ **مرحله شستشو:**

رنگ اضافی روی لام را خالی کرده. در حالیکه مایل نگهداشته‌اید با استفاده از آب مقطر به آرامی به مدت زمان ۳۰ ثانیه سطح روی گسترش را شستشو دهید.

✓ **مشاهده و تفسیر:**

در مشاهده میکروسکوپی لام رنگ آمیزی شده، اسپورها گرد بیضی به رنگ سبز مشاهده می‌شوند. و سلول‌های رویشی، قرمز دیده می‌شوند.

چون هاگ پوشش مقاومی است که در برابر نفوذ رنگ مقاومت می کند بنابر این در رنگ آمیزی معمولی می توان اسپورها را به صورت ناحیه رنگ نشده در داخل سلول رویشی (باکتری مولد) مشاهده نمود. اگر تعداد اسپورها موجود کم باشد و یا اگر از داخل باکتری مولد خارج شده و در گستره به صورت پراکنده باشند، اغلب توسط رنگ آمیزی ساده و یا گرم قابل مشاهده نخواهند بود.



شکل۲۲ – 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 باید در

شرایطی نگه داری شوند که امکان رشد میکروارگانیسم ها در آن وجود نداشته باشد. نمونه برداری باید مطابق استاندارد ملی شماره ۶۹۰ : "گوشت و فرآورده های آن – نمونه برداری" باشد.

۵ میکروارگانیسم‌هایی که در خوراک دام، طیور و آبزیان برطبق استاندارد ملی ایران، جستجو وشناسایی می‌شوند:

- *سالمونلا*
- *اشریشیا کلی*
- *استافیلوکوکوس کواگولاز مثبت*
- *کپک و مخمر*

۶ خصوصیات میکروارگانیسم‌ها:

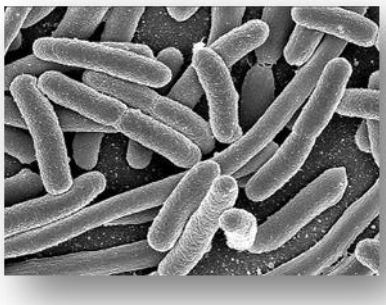
سالمونلا

شکل ۲۳- گونه‌ای از *salmonella*

نکات کلیدی:

- ✓ از پاتوژن های اصلی خانواده آنتروباکتریاسه
- ✓ 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 سروتیپ ها متحرک(به وسیله تاژک های اطرافی)
- ✓ اکسیداز منفی
- ✓ تولید H_2S درمحیط TSI
- ✓ لیزین دکربوکسیلاز مثبت
- ✓ تولید اوره آز منفی

اشریشیا کلی



شکل ۲۴- *E. coli*

نکات کلیدی:

- ✓ از پاتوژن های اصلی خانواده آنتروباکتریاسه
- ✓ دارای سویه هایی با توانایی بیماری زایی متفاوت
- ✓ با تخمیر لاکتوز ایجاد پرگنه‌های صورتی رنگ در محیطMac
- ✓ متحرک(به وسیله تاژک های اطرافی)

- ✓ فعالیت همولیتیک در برخی از سویه‌ها
- ✓ اندول مثبت
- ✓ لیزین دکربوکسیلاز مثبت
- ✓ تولید اوره آز منفی

استافیلوکوکوس اورئوس

نکات کلیدی:

- ✓ کوکسی‌های گرم مثبت به شکل خوشه‌های انگور
- ✓ بی هوازی اختیاری، غیر متحرک و کاتالاز مثبت
- ✓ ایجاد همولیز دوگانه
- ✓ اکسیداز منفی
- ✓ فاقد هاگ
- ✓ تولید کننده کوآگولازکه شاخص مهمی در بیماری‌زایی باکتری می‌باشد
- ✓ در محیط‌های غنی نشده نیز رشد می‌کند
- ✓ ایجاد پرگنه‌های زرد طلایی با اندازه متوسط
- ✓ نسبتا در محیط مقاوم‌اند

شکل ۲۵-*استافیلوکوکوس*

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. معمولا به صورت کلنی، پروپاگول یا جوانه صاف یا کرکدار، اغلب با ساختاراسپورزایی 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 برنگ‌های مختلف سفید، آبی، سبز، خاکستری، و بنفش می باشد 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 می‌باشند 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 می-کنند این میکروارگانیسم‌های هوازی مزوفیل در دمای ^{o}C ۲۵، در سطح محیط کشت قارچی کلنی‌های گرد

مات یا درخشان، معمولا دارای پیرامون منظم وبا 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 غذائی هستند.

۷ روش های آزمون میکروبیولوژی خوراک دام و طیور

روش‌های میکروبیولوژی خوراک دام و طیور در جداول زیر آورده شده است:

جدول۳-روش های آزمون میکروبیولوژی مواد اولیه تهیه خوراک طیور (با منشاء پروتئین حیوانی)

	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	*سالمونلا*	طبق استاندارد ملی ۱۸۱۰
۲	*اشریشیا کلی*	طبق استاندارد ملی ۲۹۴۶
۳	مخمر	طبق استاندارد ملی ۳-۱۰۸۹۹

نمونه هایی از مواد اولیه تهیه خوراک طیور(با منشاء پروتئین حیوانی)

پودر ماهی

پودر گوشت

پودر کشک

پودر خون

پودر پرهیدرولیز شده

جدول۴-روش‌های آزمون میکروبیولوژی مواد اولیه تهیه خوراک طیور (با منشاء پروتئین گیاهی، غلات و حبوبات)

	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	*سالمونلا*	طبق استاندارد ملی ۱۸۱۰
۲	*اشریشیا کلی*	طبق استاندارد ملی ۲۹۴۶
۳	مخمر	طبق استاندارد ملی ۳-۱۰۸۹۹

نمونه‌هایی از مواد اولیه تهیه خوراک طیور با منشاء پروتئین گیاهی

کنجاله سویا
کنجاله تخم پنبه
کنجاله آفتاب گردان
کنجاله بادام کنجد
کنجاله بادام زمینی
کنجاله بذر کتان
گلوتن

نمونه‌هایی از مواد اولیه تهیه خوراک طیور با منشاء غلات و حبوبات

گندم ذرت خوشه‌ای
سبوس برنج
ارزن
ذرت
جو
سبوس گندم

جدول۵-روش‌های آزمون میکروبیولوژی دان طیور

	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	*سالمونلا*	طبق استاندارد ملی ۱۸۱۰
۲	*اشریشیا کلی*	طبق استاندارد ملی ۲۹۴۶
۳	مخمر	طبق استاندارد ملی ۳-۱۰۸۹۹

جدول۶-روش‌های آزمون میکروبیولوژی کنسانتره طیور

	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	*سالمونلا*	طبق استاندارد ملی ۱۸۱۰
۲	*اشریشیا کلی*	طبق استاندارد ملی ۲۹۴۶
۳	مخمر	طبق استاندارد ملی ۳-۱۰۸۹۹

جدول۷-روش‌های آزمون میکروبیولوژی مکمل های ویتامین و معدنی در خوراک طیور

	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	*سالمونلا*	طبق استاندارد ملی ۱۸۱۰
۲	*اشریشیا کلی*	طبق استاندارد ملی ۲۹۴۶
۳	مخمر	طبق استاندارد ملی ۳-۱۰۸۹۹
۴	*استافیلوکوک اورئوس*	طبق استاندارد ملی ۱-۶۸۰۶

جدول۸-روش‌های آزمون میکروبیولوژی کنسانتره دام

	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	*سالمونلا*	طبق استاندارد ملی ۱۸۱۰
۲	*اشریشیا کلی*	طبق استاندارد ملی ۲۹۴۶
۳	مخمر	طبق استاندارد ملی ۳-۱۰۸۹۹

جدول۹-روش‌های آزمون میکروبیولوژی مکمل‌های ویتامین و معدنی در خوراک دام

	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	*سالمونلا*	طبق استاندارد ملی ۱۸۱۰
۲	*اشریشیا کلی*	طبق استاندارد ملی ۲۹۴۶
۳	مخمر	طبق استاندارد ملی ۳-۱۰۸۹۹

جدول۱۰-روش‌های آزمون میکروبیولوژی پودر ماهی

	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	*سالمونلا*	طبق استاندارد ملی ۱۸۱۰
۲	*اشریشیا کلی*	طبق استاندارد ملی ۲۹۴۶
۳	مخمر	طبق استاندارد ملی ۳-۱۰۸۹۹

جدول۱۱-روش‌های آزمون میکروبیولوژی تفاله مرکبات

	میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	*سالمونلا*	طبق استاندارد ملی ۱۸۱۰
۲	*اشریشیا کلی*	طبق استاندارد ملی ۲۹۴۶
۳	*کپک ومخمر*	طبق استاندارد ملی ۳-۱۰۸۹۹

۷ اصطلاحات و تعاریف:

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

۸-۱ محیط کشت سوسپانسیون

محیطی است که به منظور جداسازی میکروارگانیسم‌ها از یک فراورده مورد آزمون و انتقال آنها به یک فاز مایع، بدون امکان تکثیر یا بازدارندگی در طی زمان تماس، طراحی شده است.

این محیط ها، *رقیق کننده* نیز نامیده می‌شوند.

۸-۲ سوسپانسیون اولیه (اولین رقت اعشاری)

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

۸-۳رقت 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 رقت های اعشاری بعدی بدست می‌آید.

۸-۴ بهر

مقدار معینی از کالا می‌باشد که تحت شرایط فرضی ثابت و یکنواخت تولید می‌شود.

۸-۵ نمونه

عبارت است از یک یا چند قلم (واحد نمونه) که به گونه ای از یک بهر انتخاب می شود تا نماینده واقعی آن باشد.

۸-۶ واحد نمونه

عبارت است ازیک اندازه طبیعی تا قراردادی یا مقداری معلوم از موادکه قابل رویت است وبا معیارهای کمی وکیفی مشخص می‌گردد و از اجتماع آن ها نمونه شکل می‌گیرد.

۸- ۷رویه نمونه برداری

براساس برقراری و تعیین حدود پذیرش در یک بهر است وبرطبق آن تعداد معینی واحد نمونه به وسیله روش های مقررمورد آزمایش قرار می گیرد.رویه نمونه برداری ممکن است دورده ای یا سه رده ای باشد و در آن از شاخص‌های M,m,c,n استفاده می‌شود.

شاخص n

آن تعداد واحد نمونه از یک بهر است که بایستی مورد آزمایش قرار بگیرد.

شاخص c

حداکثرتعداد قبول واحد نمونه است که نتایج حاصل از آزمایش آنها می‌تواند از حد مجاز یا معیار کیفی m بیشتر یا مغایر باشد.

شاخص m

حداکثرتعداد یا حد مجازهر میکروارگانیسم در گرم یا سانتی متر مربع یا یک معیار کیفی در واحد نمونه است که فقط آن تعداد از واحدهای نمونه که توسط معیارc تعیین شده اند می‌توانند نتایج بالاتر یا متفاوت

با آن را داشته باشند. در آزمون شناسایی میکروارگانیسم‌هایی مانند سالمونلا معمولا m برابر صفرتعیین می شود.

شاخص M

کمیتی است که برای جداسازی واحد نمونه با کیفیت قابل قبول مشروط، از کیفیت غیر قابل قبول به کار می‌رود. این معیار فقط در رویه نمونه برداری سه رده ای کاربرد دارد. نتایج آزمایش برابر یا بالاتراز معیار M در هرواحد نمونه، غیر قابل قبول است و سبب مردود شدن بهر می‌گردد.

۹ محیط‌های کشت و رقیق‌کننده‌ها

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

جدول ۱۲- لیست محیط های 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	Baird parker (BP)
۱۵	Brain- heart infusion broth
۱۶	Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (YGC)

جدول۱۳ - لیست رقیق کننده و معرف ها

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

۱۰-۱آزمون *جستجوی سالمونلا*

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

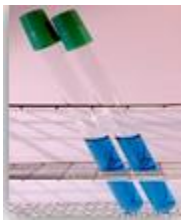
محیط کشت‌های مورد نیاز

محیط کشت مورد استفاده برای جستجوی سالمونلا، محیط کشت آب پپتونه بافری BPW برای پیش غنی سازی، آبگوشت مولر کافمن تتراتیونات نئوبیوسین MKTTn و آبگوشت راپاپورت و اسیلیادیس منیزیوم کلراید RV برای غنی سازی و گزیلوز لیزین دزوکسی کولات آگار XLD و آگار سبز درخشان / قرمز فنل BGA برای تایید نهایی می‌باشد.

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 ۲۶- محیط کشت BPW



شکل ۲۷- محیط کشت RVS broth

شکل ۲۸- محیط کشت MKTT n broth

۲۵ گرم نمونه + ۲۲۵ میلی لیتر محیط پیش غنی‌کننده غیر انتخابی (Buffered peptone water)

↓ ۲۴ h / ۳۷ ° C

۱ ml سوسپانسیون اولیه + ۱۰ ml محیط MKTT n broth

↓ ۲۴ ±۳ h / ۳۷ ° C

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

↓ ۲۴ ±۳ h / ۴۱/۵ ° C

↓ ۲۴ h / ۳۷ ° C

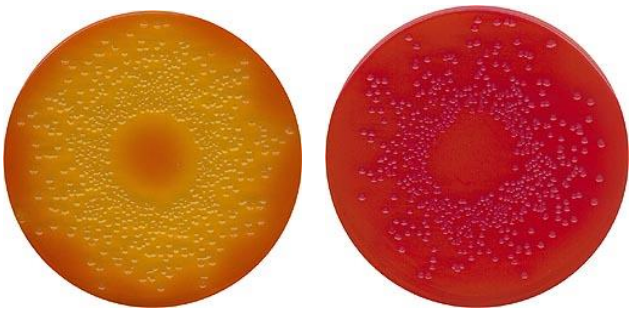
کشت خطی از محیط‌های MKTT n broth و RVS broth بر روی محیط‌های انتخابی BGA و XLD

↓

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

↓

انجام تست‌های تاییدی ← تست سرولوژیکی و بیو شیمیایی



شکل۲۹- محیط کشت BGA

شکل ۳۰- محیط کشت XLD

ظاهر کلنی‌ها در محیط BGA: صورتی که توسط هاله‌ای قرمز رنگ احاطه شده (باکتری های لاکتوز و ساکارز منفی مثل سالمونلا

یادآوری ۳ -زرد- سبزکه توسط هاله‌ای سبز-زرد احاطه شده (باکتری های لاکتوز یا ساکارز مثبت مثل پروتئوس، سیتروباکتر، کلبسیلا)

ظاهر کلنی‌ها در محیط XLD: کلنی همرنگ محیط، شفاف گاهی با مرکز سیاه (سالمونلا)

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

کشت‌های تائیدی

کلنی‌های مشکوک به سالمونلا را تجدید کشت کرده و پس از کشت مجدد با آزمون‌های سرولوژیکی و بیوشیمیایی مناسب آزمون تاییدی انجام دهید.

آزمون‌های تاییدی

- کشت در محیط TSI آگار
- کشت در محیط اوره آگار
- L– لیزین – دکربوکسیلاز
- شناسایی بتا – گالاکتوزیداز
- وژس پروسکوئر
- واکنش اندل

روش آزمون

- **کشت در محیط آگار مغذی**

جهت انجام آزمون‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی، از کلنی‌های مشکوک به سالمونلا، حداقل ۵ کلنی را از محیط های انتخابی BGA و XLD انتخاب کرده و بر روی محیط آگار مغذی کشت داده شود (به مدت ۲۴

ساعت گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری)

- **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:

شکل ۳۱- واکنش در محیط TSI

عمق :

زرد {گلوکز مثبت}

قرمز {گلوکز منفی}

سیاه {سولفید هیدرژن مثبت (H_2S)}

حباب یا ترک {تولید گاز از گلوکز}

سطح شیبدار:

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 ۱۴- 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.

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 هیدرو کسید را بیافزایید.

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

بیشتر سالمونلاها از نظر این واکنش منفی هستند.

واکنش اندول[3]:

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.

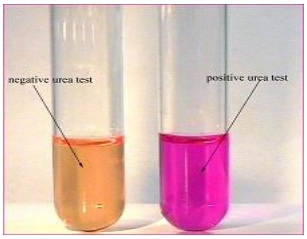
- **آزمایش‌های بیوشیمیایی تکمیلی**

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

۱-β-galactosidase

۲-Voges-Proskauer (VP)

۳-Eundol



شکل ۳۲- محیط اوره

شکل ۳۳- محیط لیزین دکربوکسیلاز

جدول۱۵- واکنش‌های بیوشیمیـــایی *سالمونـــلا*

TSI			H_2S	Citrate	LAI	Eundol	Urea	MIO (Motility,Ornithine)	VP	ONPG
S	L	G	+	P	P	N	N	P	N	N
-	–	+								

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

تشخیص وجود آنتی ژن های **O ، VI، H** *سالمونلا*، با مشاهده آگلوتیناسیون بر روی لام هنگامی که از کلنی‌های خالص و آنتی سرم‌های 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 آنی‌بادی برای یک یا چند آنتی ژن O)، که هنگام آزمون مثبت، انعقاد ایجاد می‌کنند و به صورت تجارتی در دسترس می باشد 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)، (آنتی سرم یک ظرفیتی یا چند ظرفیتیH)

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

↓

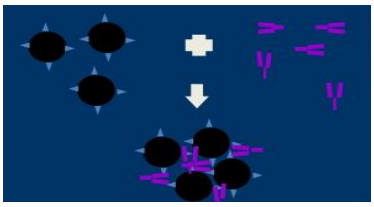
در صورت عـــدم مشاهـــده باکتـــری به صورت توده‌های کم و بیش مجزا غیر خود آگلوتینه شونده آزمون تاییدی سرو لوژیکی ردیابی و شناسایی انجام می‌گیرد.

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

شکل۳۴ -واکنش منفی **واکنش مثبت**



شکل ۳۵- کمپلکس آنتی ژن- آنتی بادی

آزمون تاییدی سرو لوژیکی

آزمون تاییدی سرو لوژیکی

سویه غیـــــر خود آگلوتینـــــه شونـــــده

آزمـــون آنتـــی ژن O
تهیه سوسپانسیون کلنی خالص با یک قطره آنتی سرم**O**
واکنش سرولوژیکی: مثبت
تفسیر: آگلوتینه شدن

آزمـــون آنتـــی ژن VI
تهیه سوسپانسیون کلنی خالص با یک قطره آنتی سرم VI
واکـــنش ســـــرولوژیکی: مثبـــت
تفسیر: آگلوتینه شدن

آزمـــــون آنتـــی ژن H
کشت از کلنی خالص غیر خود آگلوتینه شونده در لوله محتوی نوترینت آگار نیمه جامد و گرمخانه گذاری در دمای**C^{o}**۳۷ 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

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

تفسیـــــــر واکنش هـــای بیـــــو شیمیـــایـــــــی

واکنش های **مشخص** کلنـــی خود آگلوتینـــه

خیـــــــــــــر

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

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

تایید نهایی:
ارسال به ازمایشگاه مرجع

بلـــــــــــی

واکنش سرولوژیکی: آزمون نشده
تفسیر: سویه ها مشکوک به سالمونلا است

واکنش **نا مشخص** کلنـــی خود آگلوتینـــه

خیـــــــــــــر

واکنش سرولوژیکی: همه واکنـش ها منفـی
تفسیر: سویه‌ها سالمونلا نیست

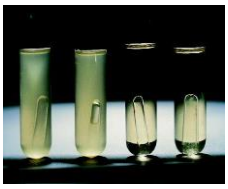
واکنش سرولوژیکی: آنتی ژنهای (O, vi, H) مثبت
تفسیر: سویه مشکوک به سالمونلا است

۲-۱۰ 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

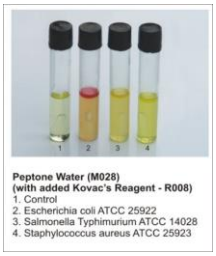
روش آزمون

- آماده سازی 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)



شکل۳۶- محیط LS

شکل ۳۷- محیط EC



شکل ۳۸- 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 ⟶

۳-۱۰ شمارش استافیلوکوک‌های کوآگولاز مثبت

استاندارد ملی ایران شماره ۳-۶۸۰۶- میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-روش جامع برای شمارش استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و سایر گونه‌ها) قسمت سوم-جستجو، شناسایی و شمارش به شیوه محتمل ترین تعداد (MPN) برای تعداد کم میکروارگانیسم

روش آزمون

- آماده سازی سوسپانسیون اولیه
- تلقیح به محیط GC مضاعف
- کشت سطحی در محیط انتخابی
- آزمون تاییدی

آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه

↓

انتقال ۱۰ml به محیط GC مضاعف

| ۲۴تا ۴۸ h / ۳۷ ° C

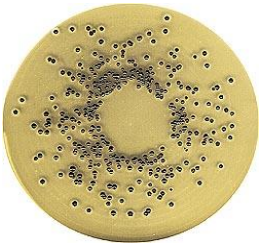
کشت بر روی سطح محیط برد پارکر آگار (به صورت دو پلیتی)

↓ ۲۴تا ۴۸ h / ۳۷ ° C

در صورت نیاز انجام آزمون تاییدی

- **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 ۳۹- محیط BP

آزمون کوآگولاز

انتقال کلنی به محیط *Brain- heart infusion broth*

↓ ۴تا ۶h / ۳۷ ° C

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

↓ ۴ تا ۶ h / ۳۷ ° C

بررسی تشکیل لخته

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

↓

آزمایش کوآگولاز در صورتی مثبت است که لخته تشکیل شود

شکل ۴۰- آزمون کواگولاز

۱۰-۴ *شمارش کپک‌ها ومخمرها*

تهیه سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری

۱۰ گرم نمونه + ۹۰ ml محیط کشت سوسپانسیون

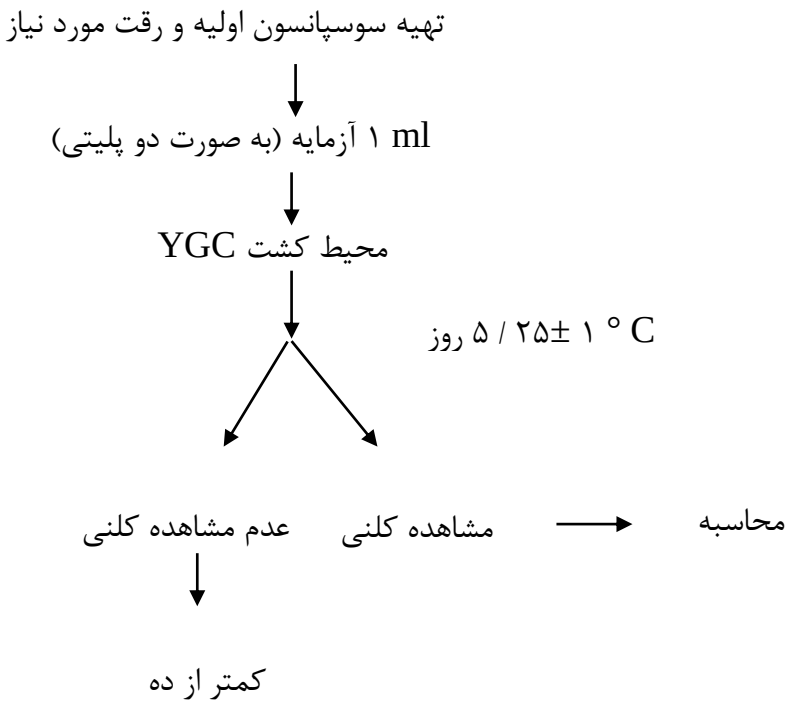
تلقیح به محیط YGC

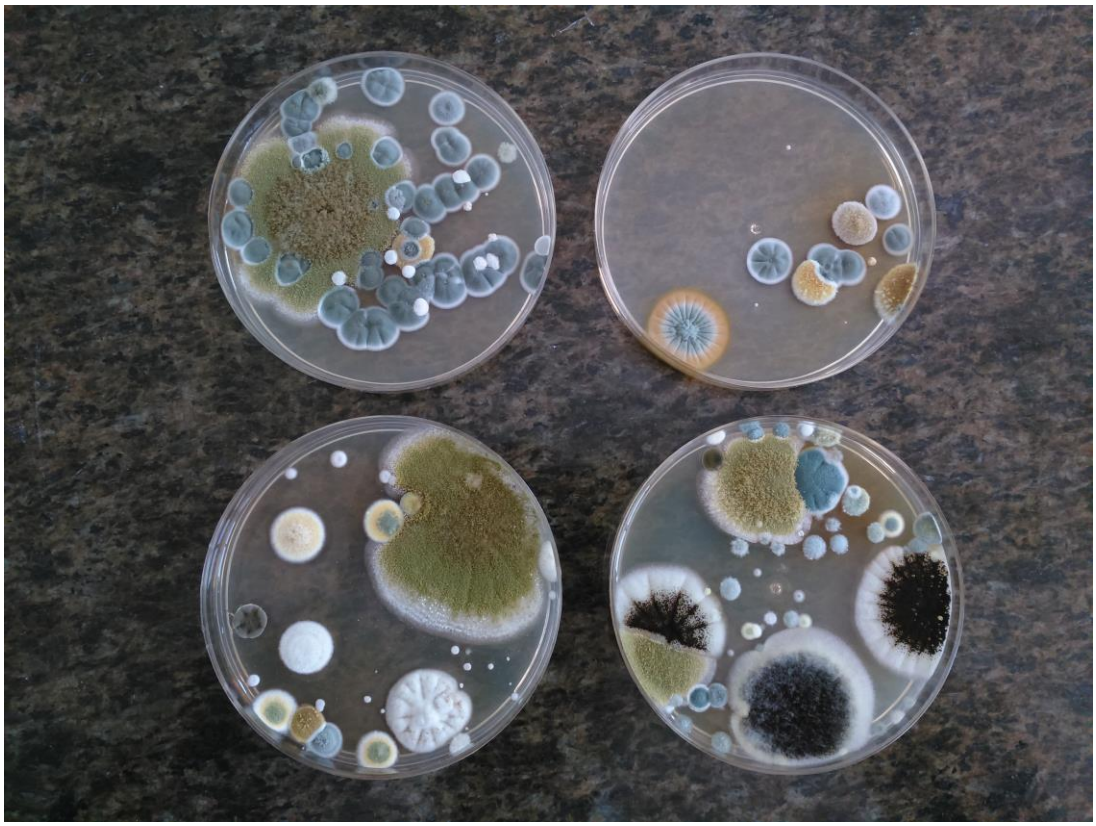
اگر احتمال وجود کپک و مخمر در نمونه کم باشد با استفاده از پیپت سترون یک ml از سوسپانسیون اولیه را برروی سه پلیت (۹۰ میلی متری) حاوی محیط انتقال داده(رقت $۱۰^{-۱}$)

در صورت نیاز، رقت $۱۰^{-۲}$و رقت های بعدی تکرار می‌شود.

نمونه ها به کمک میله شیشه ای در سطح محیط کشت پخش می‌شوند سپس به مدت ۱۵ دقیقه دردمای آزمایشگاه قرار می‌گیرند تا مایع کشت داده شده جذب محیط کشت شود.

از روش کشت آمیخته نیز می‌توان استفاده کرد اما در این حالت باید حتما 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 می کند (گرمخانه گذاری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت زمان ۵ روز)





شکل ۴۱- محیط کشت YGC

۱۱ بیان نتایج

۱۱-۱ جستجوی سالمونلا

نتایج آزمون بر اساس وجود یا عدم وجود سالمونلا در مقدار مشخصی آزمونه بر حسب X گرم یا X میلی لیتر فرآورده گزارش می‌شود.

۱۱-۲ جستجوی و شمارش اشریشیا کلی

نتایج آزمون بر اساس وجود یا عدم وجود احتمالی اشریشیاکلی در مقدار مشخصی آزمونه بر حسب X گرم یا X میلی لیتر فرآورده گزارش می‌شود.

۱۱-۳ شمارش کپک و مخمر

برای بیان نتایج به استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ مراجعه شود.

۱۱-۴ جستجوی و شمارش استافیلوکوک کواگولاز مثبت

برای بیان نتایج به استاندارد ملی ایران شماره ۶۸۰۶ قسمت های اول تا سوم مراجعه شود.

۱۲ گزارش آزمون

باید دارای آگاهی‌های زیر باشد:

۱۲-۱ مشخصات کامل نمونه مانند نوع ومقدار نمونه

۱۲-۲ تاریخ و محل نمونه برداری

۱۲-۳ تاریخ ارسال نمونه به آزمایشگاه

۱۲- ۴ تاریخ انجام آزمون

۱۲-۵ روش آزمایش مطابق با استانداردهای ملی ایران

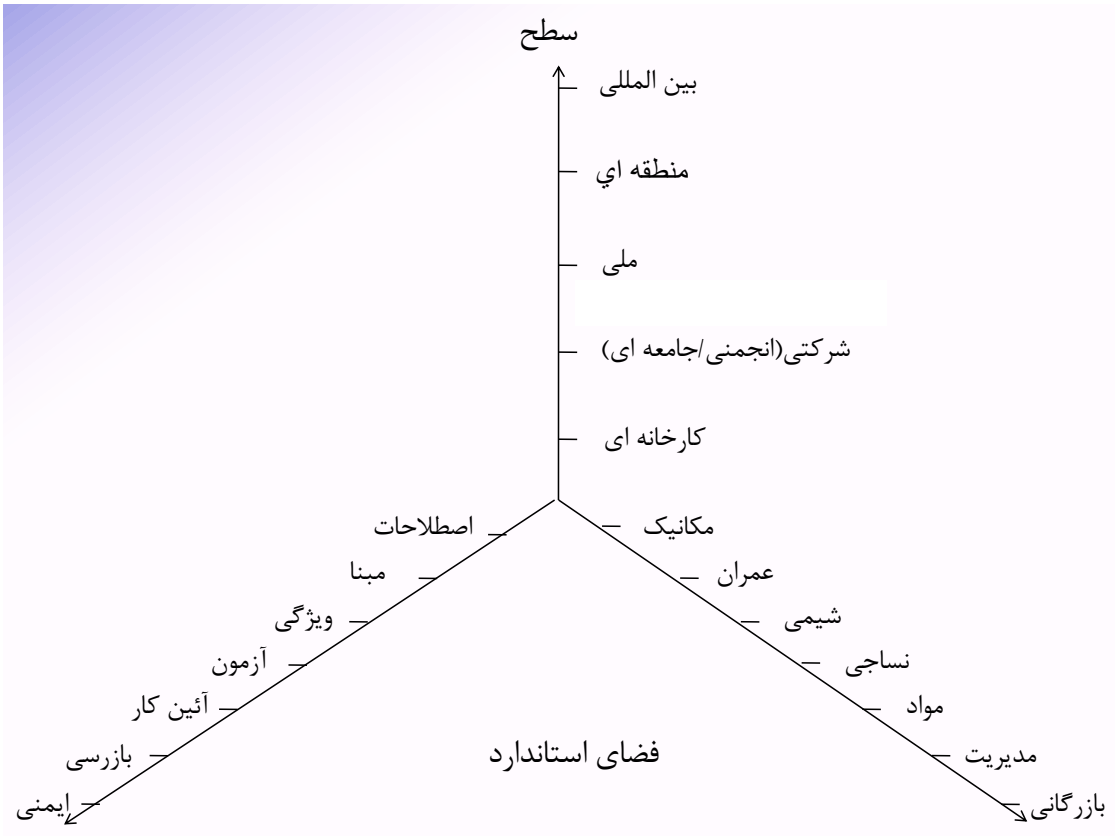
۱۲-۶ بیان نتایج آزمون

۱۲- ۷سایر اطلاعات مربوط به روش آزمون

۱۲-۸ نام، نام خانوادگی و امضای آزمایش کننده

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 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 منطقه‌ای 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 می‌باشد.

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- استاندارد های 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 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 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 می‌شود 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 می‌گیرد.

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

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 می تواند منجر به اعمال تنبیهاتی به ترتیب شامل: تذکر شفاهی به عنوان کمترین و **ابطال دایم پروانه** به عنوان بیشترین، برای مدیر کنترل کیفی اجرا شود.

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

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

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

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

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

پ -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.

پ -۲-۱-۲ نقص عمده:

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

پ -۲-۱-۳ نقص جزئی:

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

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

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

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

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 می دهد.

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

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

برداری مختلف بوده و حداقل ۳۰ امتیاز از جمع امتیازات منفی گزارش نتیجه آزمون آخر به واسطه نقایص عمده و بحرانی باشد، نسبت به تشکیل کمیته علایم برای ابطال پروانه کاربرد علامت استاندارد اجباری اقدام نموده و در صورت ابطال پروانه، موضوع را از طریق روابط عمومی به اطلاع عموم می رساند.

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

یادآوری ۲- انجام هریک از اقدامات ذکر شده در جدول ۲ ، نافی و مانع یکدیگر نمی باشد و تنها ملاک هر یک از اقدامات رسیدن 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 خوراک دام، طیور و آبزیان

طبق استاندارد ملی ایران ۱۸۱۰-۲۹۴۶-۶۸۰۶ قسمت اول-۱۰۸۹۹ قسمت سوم

ردیف	شرح آزمون	درجه اهمیت
۱	*اشرشیا کلی*	بحرانی
۲	*استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت*	بحرانی
۳	*سالمونلا*	بحرانی
۴	*کپک ومخمر*	بحرانی