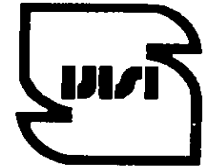




ریاست جمهوری  
سازمان ملی استاندارد ایران



جزوه دوره کارآموزی  
میکروبیولوژی انواع شکلات



شماره مدرک : ۶۲۲/۱۴/ج

تاریخ تصویب : ۱۳۹۷

شماره تجدید نظر:

تاریخ تجدید نظر:

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

## به نام خدا

### آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

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

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، 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)<sup>۱</sup>، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)<sup>۲</sup> و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)<sup>۳</sup> است و به عنوان تنها رابط<sup>۴</sup> کمیسیون کدکس غذایی (CAC)<sup>۵</sup> در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای 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) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization

2- International Electrotechnical Commission

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

4-Contact point

5- Codex Alimentarius Commission

## پیشگفتار

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

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

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

## محتوای دوره کارآموزی

عنوان دوره کارآموزی:  
میکروبیولوژی انواع شکلات

### گروه مخاطب:

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

### هدف از برگزاری دوره آموزشی:

هدف از برگزاری این دوره کارآموزی آشنایی با آزمون‌های میکروبیولوژی انواع شکلات بر اساس استاندارد ملی ایران ۲۳۹۵ می باشد و موارد زیر را در برمی‌گیرد:

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

### توانایی‌های آموزشی گیرندگان پس از طی دوره:

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

### پیش‌نیاز:

ندارد

## رئوس مطالب آموزشی:

منبع / استانداردها	اجراکننده		مدت آموزش (ساعت)		محتوای آموزشی	رئوس مطالب	ردیف
	کارآموز	مدرس	عملی	تئوری			
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹		*		۱	آشنایی با وسایل مورد نیاز آشنایی با اصول آزمایشگاهی آشنایی با قسمت های مختلف آزمایشگاه میکروبیولوژی	آشنایی با الزامات فنی آزمایشگاه میکروبیولوژی	۱
استانداردهای ملی ایران ۲۳۹۵ و ۹۸۹۹	*	*	۰/۵	۰/۵	روش تهیه محیط کشت مرتبط با شکلات 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 ۲۳۹۵		*		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 ۲۳۹۵		*		۱	آشنایی با باکتریهای احتمالی موجود در شکلات	آشنایی با شاخص های میکروبی و حدود مجاز آنها در شکلات	۵
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۲۳۹۵	*	*	۰/۵	۰/۵	تهیه سوسپانسیون اولیه و سایر رقت ها با استفاده از رقیق کننده مناسب	روش آماده سازی نمونه در آزمایشگاه	۶
جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۲۳۹۵	*	*	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 باکتری ها	۷
جزوه آموزشی و استانداردهای ملی ایران ۲۳۹۵		*		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 ۲۳۹۵	*	*	۱	۱	بررسی و نحوه شمارش و محاسبه کلنی‌ها پس از گرمخانه‌گذاری - تعیین وجود یا عدم وجود باکتری‌ها - انجام آزمون‌های بیوشیمیایی مناسب جهت تایید	تشخیص ، شمارش کلنی‌ها و آزمون تاییدی	۹
استانداردهای ملی ایران ۲۳۹۵		*	۱	۱	نحوه گزارش نتایج بررسی شده	ارائه گزارش آزمون	۱۰
مدت دوره: ۲ روز							

#### سایر استانداردها و منابع:

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

#### نحوه برگزاری آزمون:

عملی	تئوری
*	*

## جزوه کارآموزی میکروبیولوژی شکلات

تهیه کننده / تهیه کنندگان:

معصومه اطهری نیا

گروه پژوهشی / آزمایشگاه:

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

منابع و مآخذ:

- ۱- استاندارد ملی ایران ۲۳۹۵: میکروبیولوژی فرآورده‌های شیرینی و قنادی - ویژگی‌ها و روش‌های آزمون
- ۲- نجفی یاسوری. فاضل. میکروبیولوژی عمومی، دانشگاه گیلان
- ۳- جاوتز. میکروب شناسی پزشکی
- ۴- یگانه، مهرداد. استاندارد و استاندارد کردن، چاپ اول، موسسه دانش پارسیان، ۱۳۸۹

## فهرست

صفحه	عنوان
ب	آشنایی با پژوهشگاه استاندارد
ج	پیشگفتار
د	محتوای دوره کارآموزی
ز	جزوه کارآموزی میکروبیولوژی شکلات
ط	مقدمه
۱	۱ هدف
۱	۲ استانداردهای مورد استفاده
۲	۳ انواع شکلات
۲	۴ اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی
۱۸	۵ روش های آزمون میکروبیولوژی
۱۸	۶ آزمون های میکروبیولوژی
۱۹	۷ نمونه برداری
۱۹	۸ روش آزمون
۲۰	۹ روش کشت
۲۰	۱۰ آزمون شمارش کپک
۲۲	۱۱ آزمون شمارش مخمر
۲۳	۱۲ آزمون جستجوی اشريشياکلی
۲۵	۱۳ آزمون شمارش آنتروباکتریاسه
۲۷	۱۴ آزمون جستجوی سالمونلا
۳۳	۱۵ آزمون جستجوی استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت
۳۶	پیوست الف انواع استانداردها
۳۸	پیوست ب مفاهیم مورد استفاده در کنترل کیفیت
۳۹	پیوست پ اطلاعاتی
۴۳	پیوست ت نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون های انواع شکلات طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۹۵



## مقدمه:

شکلات (بصورت خام یا فرآوری شده) ماده غذایی است که از دانه درخت گرمسیری کاکائو به دست می‌آید. اولین استفاده ثبت شده از شکلات به سال ۱۱۰۰ قبل از میلاد باز می‌گردد. در ابتدا اقوامی مانند مایاها و آزتک‌ها از شکلات نوشیدنی می‌ساختند که به آن نامی به معنای "آب تلخ" داده بودند.

شکلات به خوراکی‌های مشتق از کاکائو گفته می‌شود. این ماده غذایی پر طرفدار و انرژی‌زا بطور معمول از ترکیب شیر، شکر، کره کاکائو و پودر کاکائو با نسبت‌های متفاوت تولید می‌شود. شکلات‌ها معمولاً با شیر ترکیب شده و وارد بازار می‌گردند. هر قدر درصد شکلات استفاده شده بیشتر باشد شکلات سیاه‌تر و تلخ‌تر می‌شود. شکلات‌ها از ۱۰٪ (شکلات سفید) تا ۹۹٪ (شکلات تلخ) درجه‌بندی می‌شوند. معمولاً اسانس نعنا، پرتقال، موز، توت فرنگی و... را برای طعم دادن به شکلات اضافه می‌کنند.

در شکلات‌های تخته‌ای از مغز میوه‌ها مثل، گردو، فندق، بادام زمینی و... استفاده می‌شود. گاهی عسل، کارامل، مربا یا کشمش هم در تهیه شکلات به کار می‌رود. شکلات یکی از معروف‌ترین اسنک‌ها در همه جای دنیاست.

یکی از افزودنی‌های نامطلوب که باعث کاهش قیمت شکلات می‌شود، موم پارافین است. شکلات‌های دارای این افزودنی در دمای بدن به سرعت ذوب نمی‌شوند و از این روش قابل شناسایی می‌باشند. نوع سیاه شکلات به دلیل وجود آنتی‌اکسیدان جلوی تولید رادیکال‌های آزاد را می‌گیرد و بنابراین مفیدتر می‌باشد. همچنین مصرف این ماده به راحتی از پوکی استخوان پیشگیری کرده و سرعت پیشرفت آن را کاهش می‌دهد.

## جزوه دوره کارآموزی میکروبیولوژی انواع شکلات

### ۱ هدف

هدف از تدوین این جزوه کارآموزی آشنایی با روش های میکروبیولوژی انواع شکلات بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۹۵ می باشد.

یادآوری ۱- توصیه می شود کارآموزان این دوره با الزامات آزمایشگاهی میکروبیولوژی و نیز استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۹۵ آشنایی داشته باشند.

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

### ۲ استانداردهای مورد استفاده

شماره استانداردها	عنوان استاندارد
۲۳۹۵	میکروبیولوژی فرآورده های شیرینی و قنادی-ویژگی ها و روش های آزمون
۹۸۹۹	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - راهنمای الزامات کلی برای آزمون
۸۹۲۳-۱	آماده سازی آزمایش-سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمونهای میکروبیولوژی-قسمت اول - مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری
۸۹۲۳-۴	آماده سازی آزمایش، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون میکروبیولوژی - قسمت چهارم : مقررات ویژه برای آماده سازی محصولاتی به غیر از شیر، گوشت، ماهی و فرآورده های آن
۲۴۶۱-۲	روش جامع برای جستجو، شناسایی و شمارش آنتروباکتریاسه- قسمت دوم روش شمارش کلنی
۲۹۴۶	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جستجو و شمارش اشیشیاکلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی
۱۰۸۹۹-۲	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 (aw) مساوی یا کمتر از ۰.۹۵/
۱۸۱۰	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -روش جامع برای جستجو و شناسایی گونه های سالمونلا
۶۸۰۶-۳	روش جامع برای شمارش استافیلوکوکوس های کواگولاز مثبت قسمت سوم : جستجو و شناسایی به روش محتمل ترین تعداد ( MPN ) برای تعداد کم میکروارگانیزم ها

### ۳ انواع شکلات

شکلات به خوراکی‌های مشتق از کاکائو گفته می‌شود. این ماده غذایی بطور معمول از ترکیب شیر، شکر، کره کاکائو و پودر کاکائو با نسبت‌های متفاوت تولید می‌شود. هر قدر درصد شکلات استفاده شده بیشتر باشد شکلات سیاه‌تر و تلخ‌تر می‌شود. شکلات‌ها از ۱۰٪ (شکلات سفید) تا ۹۹٪ (شکلات تلخ) درجه‌بندی می‌شوند



شکل ۲- شکلات تلخ



شکل ۱- شکلات سفید

### ۴ اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

در آزمایشگاه میکروبیولوژی رعایت اصول اولیه الزامی است. بخشی از این اصول و قواعد مربوط به ایمنی فرد آزمایش‌کننده بوده و برخی نیز به ایمنی محیط و تجهیزات آزمایشگاه مربوط می‌باشد.

#### ۴-۱ فضای آزمایشگاه

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

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

با توجه 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 (از سوسپانسیون اولیه) شامل گرمخانه گذاری میکروارگانیزمها ؛
- آزمون میکروارگانیزمها ی بیماریزای احتمالی ؛
- نگهداری سویه مرجع و سایر سویه ها ؛
- آماده سازی و سترون سازی محیط های کشت و وسایل ؛
- انبارش محیط های کشت و واکنشگرها ؛
- آزمون سترونی مواد غذایی ؛
- آلودگی زدایی ؛
- شستشو و تمیز کردن وسایل شیشه ای و سایر تجهیزات ؛
- انبارش مواد شیمیایی مخاطره آمیز، ترجیحاً نگهداری در کابینت ها، قفسه ها، اتاقها.

#### ۴-۱-۲ فضای عمومی

فضاهای جداگانه برای موارد زیر توصیه می شود:

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

#### ۴-۲ بهداشت کارکنان

به منظور پیشگیری از آلودگی نمونه ها، محیط های کشت و خطر عفونت کارکنان اقدامات بهداشتی زیر باید انجام شود:

- از لباس و کفش مخصوص در محیط آزمایشگاه استفاده کنید؛
  - ناخن ها را تمیز و ترجیحاً کوتاه نگه دارید ؛
  - هنگام کار در آزمایشگاه از صحبت کردن خودداری کنید ؛
  - از خوردن و آشامیدن در آزمایشگاه خودداری کنید ؛
  - کشیدن پی پت با دهان ممنوع می باشد.
- پیش از شروع کار و پس از انجام آزمون باید سطح میز با محلول ضد عفونی کننده مناسب ضد عفونی شود.

#### ۳-۴ تجهیزات

توصیه می‌شود مطابق با شرایط خوب آزمایشگاهی، کلیه وسایل و تجهیزات تمیز و در محل مناسب نگهداری شوند. پیش از استفاده بهتر است وسایل از نظر داشتن شرایط لازم برای کار تصدیق و در صورت لزوم در مدت استفاده، عملکرد آن پایش شود. از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۶۸ و همچنین وسایل زیر استفاده کنید:

جدول ۱- لیست تجهیزات مورد نیاز در آزمایشگاه میکروبیولوژی

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

## وسایل شیشه‌ای



شکل ۳ - وسایل شیشه‌ای

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

## فور یا آون



شکل ۴ - فور یا آون

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

## اتوکلاو



شکل ۵- اتوکلاو

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

## انکوباتور



شکل ۶- انکوباتور

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

### حمام مایع با دمای ثابت



شکل ۷- حمام مایع با دمای ثابت

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

- الف- گرمخانه‌گذاری محیط کشت تلقیح شده در یک دمای ثابت؛
- ب- نگهداری محیط کشت جامد سترون ذوب شده در طی آماده‌سازی محیط کشت؛
- پ- تعدیل دمای محیط کشت جامد ذوب شده سترون برای استفاده در روش‌های خاص؛
- ت - آماده‌سازی سوسپانسیون‌های اولیه یا محلول‌ها در یک دمای کنترل شده؛
- ث- فرآیند حرارتی سوسپانسیون‌های اولیه در یک دمای کنترل شده (مانند پاستوریزاسیون).

### شمارشگر کلنی



شکل ۸- شمارشگر کلنی



## میکروسکوپ



شکل ۹- میکروسکوپ نوری

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

## pH متر



شکل ۱۰- pH متر

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

## همگن‌کننده، خردکن و مخلوط‌کن



شکل ۱۱- همگن‌کننده، خردکن و مخلوط‌کن

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

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

## ترازو



شکل ۱۲- ترازو

وسيله‌ای برای توزین با دقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ 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.

#### ۴-۴ استریلیزاسیون

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

روش‌های رایج سترون کردن عبارتند از:

۱. روش حرارتی به وسیله دستگاه‌های مانند اتوکلاو و فور که در این روش از تاثیر گرما و فشار بخار آب برای کشتن میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود.
  ۲. روش شیمیایی به وسیله مواد ضد عفونی کننده مانند آب اکسیژنه و انجام واکنش‌های شیمیایی (مانند رادیکالهای آزاد) برای سترون کردن استفاده می‌شود.
  ۳. روش پرتو دهی به وسیله تابش پرتو گاما، پرتو ایکس و پرتو فرابنفش.
  ۴. روش فیلتراسیون برای مایعات استفاده شده و شامل عبور دادن مایع از فیلترهای مخصوص می‌باشد.
- در آزمایشگاه میکروبیولوژی برای استریلیزاسیون محیط‌های کشت و وسایل مورد نیاز روش حرارتی به دو صورت خشک (با استفاده از فور) و مرطوب (با استفاده از اتوکلاو) انجام می‌شود. برای تشخیص بین مواد سترون شده و سترون نشده می‌توان از نشانگرهای سترون‌سازی استفاده کرد.

#### ۴-۵ آب

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

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

#### ۴-۶ محیط کشت

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

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

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

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

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

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

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

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

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

محیط‌های کشت را از جنبه‌های مختلف تقسیم بندی می کنند:

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

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

محیط های کشت به سه صورت زیر می‌باشند :

محیط کشت مایع یا آبگوشتی (liquid or broth media)

محیط کشت جامد (solid media)

محیط کشت نیمه جامد (semi solid media)



شکل ۱۴- محیط کشت مایع



شکل ۱۳- محیط کشت نیمه جامد و جامد

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

- محیط کشت جامد: این محیط کشت دارای آگار می‌باشد (به نام آگار هم خوانده می‌شود) مانند نوترینت آگار و مولر همینتون آگار

دلیل بکارگیری محیط جامد، تشخیص باکتری‌ها به وسیله :

- تشکیل کلنی
  - تولید پیگمانت
  - خصوصیات خاص هر کلنی
  - تشخیص انواع باکتری‌ها که چند نوع باکتری در نمونه میکروبی وجود دارد.
  - موکوئیدی بودن باکتری
  - دیدن منطقه همولیز .
- محیط کشت نیمه جامد: مقدار آگار آن‌ها نسبت به محیط جامد کمتر است ( ۱ تا ۵٪ آگار دارند). این نوع محیط‌های کشت زمانی استفاده می‌شوند که لازم باشد حرکت باکتری‌ها را مشاهده کرد.
- ۲- تقسیم بندی بر اساس نوع کاربرد محیط کشت
- محیط‌های کشت باکتری را از نظر نوع مواد تشکیل دهنده و از نظر کاربرد به چهار دسته تقسیم می‌شوند:
- محیط کشت پایه (Basic Media) :
- این محیط کمترین مقدار مواد غذایی برای رشد باکتریها را دارد. مبنای تهیه انواع و اقسام محیط‌های کشت می‌باشد. اکثر انواع باکتری‌ها در آن رشد می‌کنند زیرا فاقد ماده ضد میکرب است. مانند محیط نوترینت آگار، نوترینت براث.
- محیط کشت غنی‌کننده (Enrichment Media) :
- محیط مقوی بوده که دارای مواد تغذیه‌ای زیادی نظیر ویتامین‌ها، لیپیدها، اسیدهای آمینه برای رشد باکتری است. بنابراین تعداد زیادی از باکتریها روی آن بخوبی رشد می‌کنند. مانند شکلات آگار، بلاد آگار
- محیط کشت افتراقی (Differential Media) :
- محیط کشت تشخیصی بوده که کلنی باکتریهای مختلف روی آن کاملا از همدیگر متمایز می‌گردد. مانند محیط E.M.B، 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 کلنی‌های سفید رنگ تشکیل می‌دهند. از محیط‌های افتراقی دیگر محیط TSI، سیمون سترات را می‌توان نام برد. این محیط‌ها برای رشد باکتریهای گرم منفی روده‌ای (انتروباکتریاسه) مناسب هستند. وجود املاح صفراوی در این محیط مانع از رشد باکتری‌های گرم مثبت در محیط می‌شوند.

- محیط کشت اختصاصی (Special Media):

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

- محیط کشت انتخابی (Selective Media):

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

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

مطابق دستورالعمل سازنده مقدار لازم از محیط کشت که بصورت پودری می‌باشد را برداشته و با مقدار توصیه شده آب مقطر در داخل ارلن مخلوط کنید سپس در صورت لزوم همراه با گرم کردن، سریعاً یکنواخت کنید. pH را با استفاده از pH متر اندازه‌گیری کنید و باید در صورت لزوم، قبل از سترون‌سازی تنظیم شود، به این ترتیب پس از سترون‌سازی و رسیدن دما به  $25^{\circ}\text{C}$ ، pH محیط کشت باید در محدوده مورد نظر  $\pm 0.2$  واحد pH باشد، مگر اینکه مقادیر دیگری توصیه شده باشد. تنظیم pH معمولاً با استفاده از محلول سدیم هیدروکسید با غلظت تقریبی  $40 \text{ g/l}$  ( $[\text{c}(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}]$ ) یا هیدروکلریک اسید رقیق شده با غلظت تقریبی  $36.5 \text{ g/l}$  ( $[\text{c}(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}]$ ) انجام می‌شود. اگر تنظیم pH پس از سترون‌سازی انجام شود، باید از محلول‌های سترون استفاده شود. جهت کسب اطلاعات بیشتر به استاندارد ملی ایران ۱۱۰۶۸ مراجعه کنید. محیط کشت را در ظروف مناسب توزیع کنید بطوری که مطمئن شوید فضای کافی مناسب برای جلوگیری از سر رفتن محیط در طی فرآیند سرد کردن بعد از عملیات حرارتی بوسیله اتوکلاو یا ذوب مجدد، یا از لبریز شدن بعد از اضافه کردن مکمل‌ها وجود دارد.

محیط‌های کشت تهیه شده را در روز آماده‌سازی سترون کنید.

سترون‌سازی محیط‌های کشت و معرف‌ها معمولاً با استفاده از حرارت مرطوب با استفاده از اتوکلاو یا فیلتراسیون انجام می‌شود.

بعضی از محیط‌های کشت به سترون‌سازی با اتوکلاو نیاز ندارند، ولی می‌توان آنها را با دمای جوش سترون نمود. برای مثال محیط‌های کشت آنتروباکتریاسه‌ها که دارای برلیانت گرین بوده و بخصوص به حرارت و نور حساس هستند و بهتر است به سرعت پس از جوشیدن سرد شده و در برابر نور شدید محافظت شوند. همچنین، بعضی

از معرف‌ها را نیز می‌توان بدون سترون‌سازی مورد استفاده قرار داد. در همه موارد طبق دستورالعمل‌های سازنده یا استانداردهای مناسب انجام دهید.

پس از سترون کردن، محیط‌ها را در شرایطی که از تغییر ترکیبات جلوگیری کند نگهداری کنید برای مثال از نور و خشک شدن محافظت کنید. اگر محیط کشت بلافاصله استفاده نشده یا شرایط دیگری در استاندارد خاصی مشخص نشده باشد، در یخچال در دمای  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  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  $47^{\circ}\text{C}$  تا  $50^{\circ}\text{C}$ ، خنک کنید.

#### - افزودن مکمل‌ها

مکمل‌هایی که حساس به حرارت هستند، باید بعد از اینکه دمای محیط به کمتر از  $50^{\circ}\text{C}$  رسید، به محیط کشت اضافه شوند. مکمل سترون شده باید قبل از افزودن به محیط آگاردار به دمای اتاق برسد. افزودن مکمل‌های مایع سرد ممکن است سبب بسته شدن آگار یا تشکیل پرک‌های شفاف شود و از توزیع مناسب جلوگیری کند. طبق دستورالعمل تولیدکننده عمل کنید. همه مکمل‌ها را در محیط کشت به آرامی و کامل مخلوط کرده و به سرعت در ظروف نهایی تقسیم کنید.

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

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

#### ۴-۷ روش‌های کشت در میکروبیولوژی

کشت در پلیت به سه روش زیر قابل انجام است .

۱- کشت خطی

۲- کشت سطحی

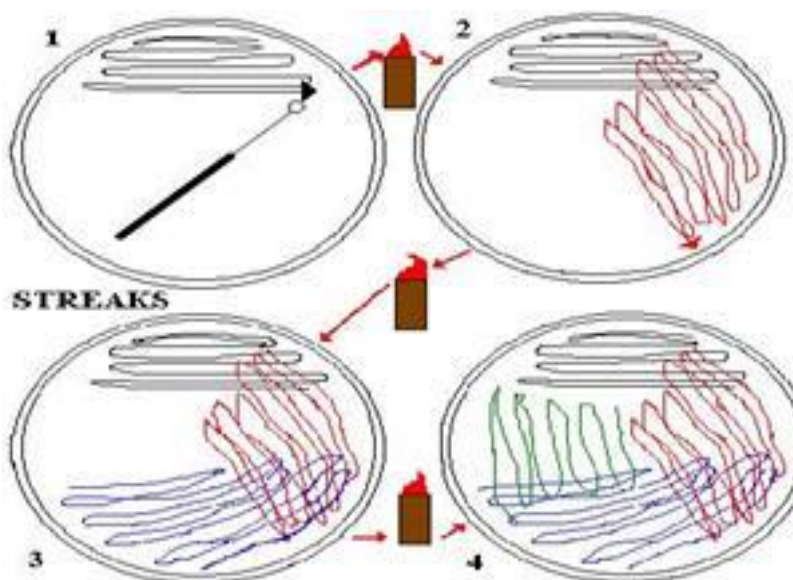
۳- کشت آمیخته یا پورپلیت



## - روش کشت خطی

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

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



شکل ۱۵- روش انجام کشت خطی

## - کشت سطحی

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

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

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

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



شکل ۱۶- روش انجام کشت سطحی

#### - کشت آمیخته یا پورپلیت

در این روش کشت هم نیاز به تهیه سوسپانسیون از باکتری می‌باشد. یعنی باید از باکتری مورد نظر در محیط مایع رقت معینی را تهیه نموده بعد به میزان ۱ ml از آنرا در کف پلیت استریل ریخته سپس از محیط کشت مورد نظر که قبلا سترون شده و حرارت آن به حدود  $45^{\circ}\text{C}$  رسیده به میزان ۱۸ ml تا ۲۰ ml به پلیت اضافه نمائید. سپس با حرکات دورانی بصورت عدد ۸ انگلیسی آنرا کاملا مخلوط کنید. اگر نیاز بود مجددا سطح محیط آمیخته با باکتری را با یک لایه نازکی از همان محیط کشت بپوشانید در این حالت به آن کشت دولایه هم گفته می‌شود.

## ۵ روش های آزمون میکروبیولوژی

روش های آزمون میکروبیولوژی شکلات بر اساس جدول زیر می باشد.

جدول ۲ - روش آزمون میکروبیولوژی انواع شکلات

ردیف	نوع میکروارگانیسمها	روش مرجع
۱	آنتروباکتریاسه	طبق استاندارد ملی ۲۴۶۱-۲
۲	اشریشیاکلی	طبق استاندارد ملی ۲۹۴۶
۳	سالمونلا	طبق استاندارد ملی ۱۸۱۰
۴	استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت	طبق استاندارد ملی ۶۸۰۶-۳
۵	کپک	طبق استاندارد ملی ۱۰۸۹۹-۲
۶	مخمر	طبق استاندارد ملی ۱۰۸۹۹-۲

## ۶ آزمون های میکروبیولوژی

۱-۶ محیط های کشت

۱-۱-۶ محیط های کشت مورد استفاده

جدول ۳ - محیط های کشت مورد استفاده

ردیف	نام فارسی	نام انگلیسی
۱	ویولت رد بایل گلوکز آگار	VRBG ( Violet red bile glucose agar )
۲	آبگوشت لوریل سولفات تریپتوز	LS ( Lauryl Sulfate tryptose broth
۳	آبگوشت اشریشیاکلی	EC ( E.C Broth )
۴	آب پپتونه بدون اندول	TW ( Peptone water indol free)
۵	دی کلران ۱۸٪ گلیسرول آگار	DG ( Dichloran 18% mass fraction glycerol agar 18
۶	آب پپتونه بافری	BPW ( Buffered Pepton Water)
۷	آبگوشت مولر کافمن تتراتیونات نئوبیوسین	MKTTn ( Muller – Kauffman tetrathionate/ novobiocine Broth)
۸	آبگوشت راپاپورت واسیلیادیس منیزیوم کلراید	RV( Rappaport-Vassiliadis Magnesium Chloride)
۹	گزیلوز لیزین دزوکسی کولات آگار	XLD ( Xylose Lysine Deoxycholate Agar)
۱۰	آگار سبز درخشان / قرمز فنل	BGA ( Phenol red / Brilliant green agar)
۱۱	آبگوشت اصلاح شده جیولیتی کانتونی	GC ( Modified Giolitti and Cantoni broth
۱۲	برد پارکر	BP ( Baird – Parker agar )

## ۶-۲ محلول های رقیق کننده

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

- محلول پپتون نمکی

- آب پپتونه بافری

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

## ۷ نمونه برداری

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

## ۸ روش آزمون

### ۸-۱ ماده سازی نمونه

قبل از همگن سازی نمونه ها، آنها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار دهید. جهت جلوگیری از آلودگی میکروبی نمونه ها با منابع خارجی، تمام مراحل آماده سازی و دست کاری نمونه ها باید رعایت شرایط آسپتیک و تجهیزات سترون و در کنار شعله انجام شود. پیش از انجام آزمون، سطح میزکار و همچنین دست ها باید با یک محلول گندزدای مناسب مانند الکل اتیلیک ۷۰ درجه گندزدایی شود. قسمت خارجی بسته و به خصوص قسمتی که باز می شود نیز باید با الکل ۷۰ درجه پاکیزه شود. هنگام آماده سازی نمونه ضمن ایجاد شرایط بهداشتی در محل انجام آزمون مقدار مناسبی از نمونه را خرد کرده و سپس ۱۰ گرم از آن را با ۹۰ میلی لیتر رقیق کننده مناسب رقیق نمائید.

## ۹ روش کشت

### ۹-۱ کشت آمیخته (Pour plate)

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

### ۹-۲ گرمخانه‌گذاری و شمارش

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

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

که در آن

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

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

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

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

$d$ : ضریب رقت 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 ۹/۹ - ۱/۰ ضربدر توانی از ۱۰ گزارش نمایید.

### ۱۰ آزمون شمارش کپک

کپک‌ها را با ظاهری کرکدار و پنبه‌ای شکل که گاهی اوقات رنگی هستند همه می‌شناسند. معمولاً غذاهای کپک زده قابل خوردن نیستند. با اینکه کپک‌ها در فساد بسیاری از غذاها دخالت دارند بعضی از انواع آنها در ساخت یا ترکیب تعدادی از غذاها به عنوان مثال بعضی پنیرها مفید می‌باشد علاوه بر آن کپک‌ها می‌توانند موادی را که

در بعضی غذاها استفاده می‌گردند، تولید نمایند مانند آمیلاز که در تهیه نان و اسید سیتریک که در تهیه نوشابه‌های غیرالکلی بکاربرده می‌شوند. کپک‌ها می‌توانند باعث ایجاد اشکالاتی شوند :

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

#### ۱-۱۰ محیط کشت

محیط کشت مورد استفاده برای شمارش کپک دی کلران ۱۸٪ گلیسرول آگار DG18 و یا عصاره مخمر- دکستروز - کلرامفنیکل YGC می باشد.

**یادآوری:** با توجه به میزان فعالیت آبی فرآورده روش آزمون کپک و مخمر و همچنین محیط کشت مورد استفاده تغییر خواهد کرد. در صورتی که میزان فعالیت آبی فرآورده زیر ۶۵٪ باشد از محیط کشت YGC و روش کشت آمیخته استفاده خواهد شد. در صورتی که میزان فعالیت آبی فرآورده بیشتر از ۶۵٪ و کمتر از ۹۵٪ باشد از محیط کشت DG18 و روش کشت سطحی استفاده خواهد شد.

#### ۱-۲ روش آزمون با استفاده از محیط کشت DG18 و کشت سطحی

با استفاده از پپت سترون مقدار ۰/۱ میلی لیتر از آزمايه یا ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه را به یک پلیت دارای محیط کشت DG18 انتقال دهید. به کمک میله شیشه‌ای سترون مایعات تلقیحی را روی سطح محیط کشت پخش کنید تا همه مایعات به طور کامل جذب شوند. پلیت‌ها را در دمای °C ۲۵ به مدت پنج تا هفت روز گرمخانه گذاری کنید. پس از سپری شدن مدت زمان گرمخانه گذاری پلیت‌های دارای کمتر از ۱۵۰ کلنی، پروپاگول یا جوانه را انتخاب کرده و همه آنها را شمارش کنید.



شکل ۱۷- کلنی های کپک

### ۱۱ آزمون شمارش مخمر

مخمرها موجودات میکروسکوپی می باشند آنها را از باکتری های معمولی، بوسیله اندازه بزرگتر سلول، شکل و همچنین چگونگی تولیدمثل آنها که با ایجاد جوانه صورت می گیرد، می توان متمایز کرد. شکل مخمرها ممکن است کروی تا بیضی، استوانه‌ای و سه گوش باشند. مخمرها ممکن است در غذاها مفید یا مضر باشند. مخمرهای تخمیرکننده در ساخت مواد غذایی مانند نان، سرکه و بعضی پنیرها دخالت دارند. اینها در محیط‌های غیرهوازی قدرت تبدیل قند به  $CO_2$  و الکل اتیلیک را دارا می باشند. هنگامی که موجب فساد میوه‌ها، شربت‌ها، ملاس‌ها، عسل، ژله‌ها، گوشت و سایر مواد غذایی می گردند، نامطلوب هستند. اکثر کلنی‌های مخمرهای جوان مرطوب و در بعضی موارد لزج می باشند اما ممکن است آردی نیز به نظر برسند. آزمون مخمرها همانند کپک‌ها می باشد.



شکل ۱۸- کلنی های مخمر

## ۱۲ آزمون جستجوی اشریشیاکلی

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

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

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

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

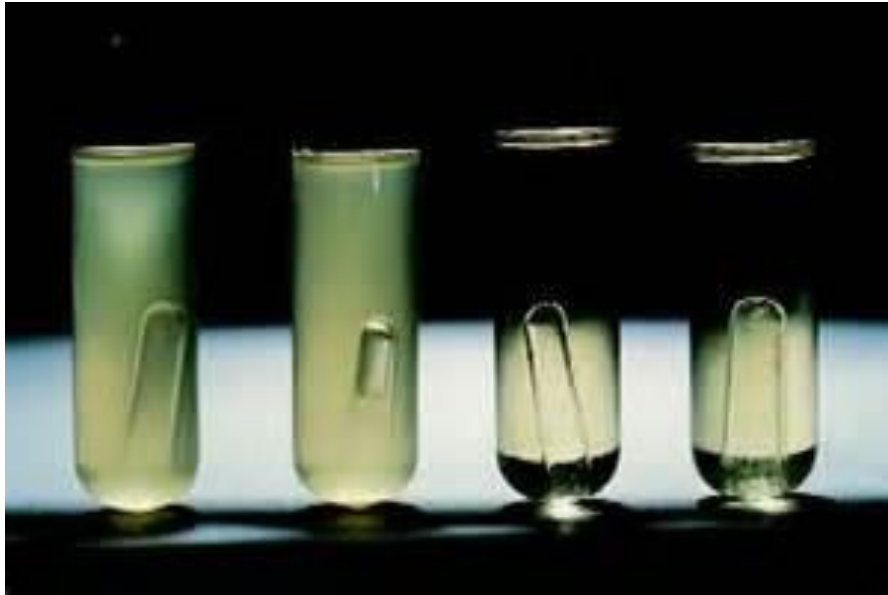
### ۱-۱۲ محیط کشت

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

### ۲-۱۲ روش جستجوی اشریشیاکلی

جستجوی اشریشیاکلی به معنی تعیین وجود یا عدم وجود این باکتری در مقدار مشخصی از فرآورده، می‌باشد. برای این منظور مقدار ۱۰ ml از سوسپانسیون اولیه تهیه شده را در ۱۰ ml از محیط کشت لوریل سولفات تریپتوز برات با غلظت مضاعف (LS<sup>+</sup>) دارای لوله درهام بوسیله یک پی پت سترون بریزید. لوله آزمایش تلقیح شده را در دمای ۳۷ °C به مدت زمان ۲h ± ۲۴h گرمخانه گذاری کنید. پس از سپری شدن مدت زمان گرمخانه گذاری لوله را از لحاظ تولید گاز یا کدورت بررسی کنید. در صورت وجود گاز آزمون تاییدی را جهت مشخص کردن باکتری اشریشیاکلی انجام دهید.





شکل ۱۹- تشکیل گاز و وجود کدورت در لوله های LS

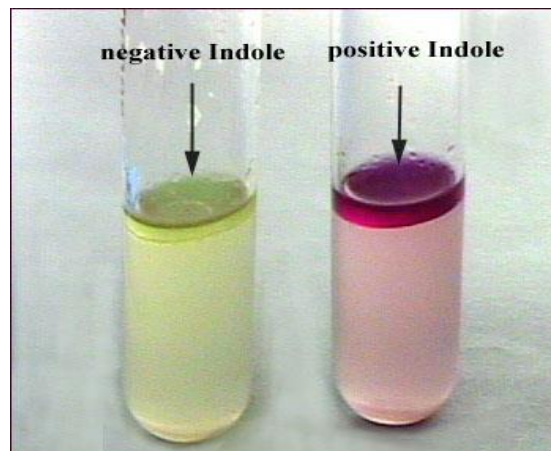
۳-۱۲ آزمون تاییدی

۱-۳-۱۲ محیط کشت

جهت آزمون تائیدی اشريشياکلی از محیط کشت های آبگوشت اشريشياکلی (EC Broth) و آب پپتونه (Peptone water) استفاده می شود،

۴-۱۲ روش آزمون تائیدی اشريشياکلی

از لوله مشکوک به اشريشياکلی یک الی دو قطره به داخل محیط های مذکور ریخته و به مدت ۲۴ h تا ۴۸ h در دمای ۴۴ °C گرمخانه گذاری کنید. وجود گاز در محیط EC و تشکیل حلقه ارغوانی در محیط کشت TW هر دو با هم نشانه وجود باکتری اشريشياکلی در ماده غذایی می باشد. لازم به ذکر است که جهت تشکیل حلقه ارغوانی از یک الی دو قطره معرف کوآکس استفاده می شود.



شکل ۲۰- تشکیل حلقه اندول در محیط کشت TW

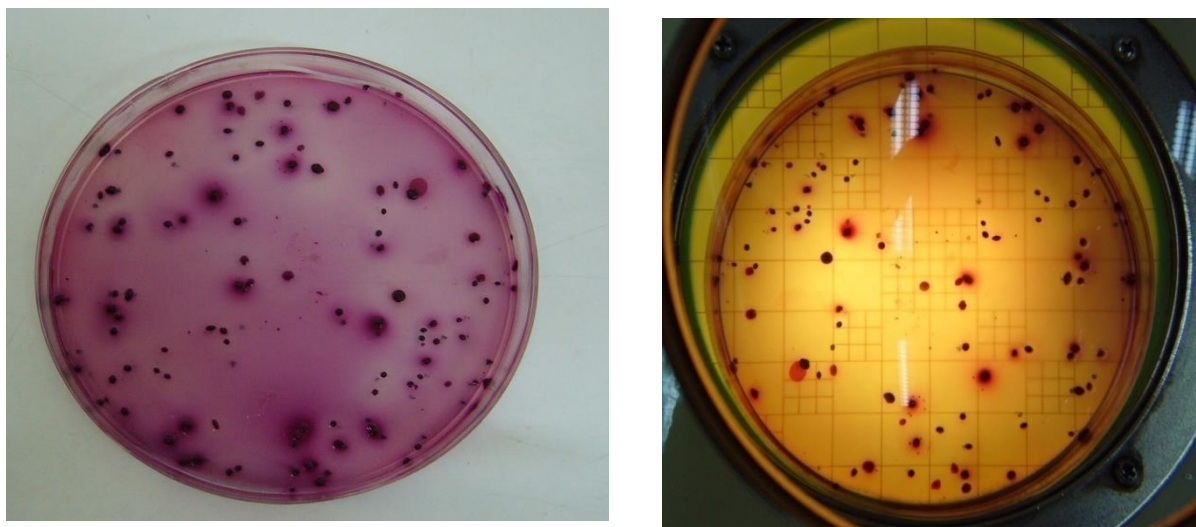
### ۱۳ آزمون شمارش آنتروباکتریاسه

آنتروباکتریاسه یک گروه ناهمگن از باسیل‌های گرم منفی روده ای هستند که زیستگاه طبیعی آنها روده انسان و حیوانات می‌باشد. در این خانواده جنس‌های متعددی وجود دارد که از بین آنها جنس‌های اش‌ریشیا، کلبسیلا، آنتروباکتر، یرسینیا، سالمونلا و شیگلاها بیماریزا هستند. بعضی از ارگانسیم‌های روده ای ( از قبیل اش‌ریشیاکلی ( بخشی از فلور طبیعی هستند که گاهی به طور تصادفی موجب ابتلاء به بیماری می‌شوند اما سالمونلا و شیگلا همواره به عنوان عامل بیماری‌زا شناخته می‌شوند. برخی از آنها ساپروفیت‌های آزاد خاک و آب بوده و عده ای نیز در گیاهان ایجاد بیماری می‌کنند.

این باسیل‌ها گلوکز و سایر کربوهیدرات‌ها را در حرارت ۳۵ درجه سلسیوس در مدت ۴۸ ساعت تخمیر و تولید گاز می‌نمایند. به صورت هوازی و یا بی‌هوازی اختیاری، گرم منفی و بدون اسپور، اکسیداز منفی هستند و گلوکز را تخمیر کرده ولی همواره از تخمیر، گاز تولید نمی‌کنند. کپسول در عده‌ای از آنها ( در کلبسیلا و گاهی برخی سویه‌های آنتروباکتریاسه و اش‌ریشیا ) وجود دارد. اکثر این باکتری‌ها متحرک بوده و دارای تازوهای پیرامونی می‌باشند ولی شیگلا، کلبسیلا و یرسینیا نامتحرک هستند.

محیط اختصاصی جامد برای شمارش آنتروباکتریاسه شامل Violet red bile agar (VRBA) می‌باشد. بدلیل وجود قند سوکروز در فرآورده‌های قنادی در صورت استفاده از محیط‌های ذکر شده، آن دسته از باکتریهای خانواده آنتروباکتریاسه که قادر به تخمیر لاکتوز نبوده و می‌توانند سوکروز را تخمیر نمایند مانند بیشتر پرتئوس‌ها با استفاده از قند موجود در این فرآورده‌ها واکنشی مشابه کلیفرم‌ها دارند، با افزودن گلوکز به محیط‌های مذکور کلیه پرگنه‌های قرمز رنگ یا صورتی را شمارش و به عنوان آنتروباکتریاسه گزارش نمایید. برای این منظور به محیط VRBA مقدار ۱۰ گرم گلوکز به ازاء هر لیتر اضافه می‌شود ( در صورتی که محیط دارای گلوکز لازم باشد، نیازی به این کار نیست ). محیط کشت آماده شده باید فقط یکبار برای ذوب شدن حرارت داده شود.

به علت متحرک بودن باسیل‌های آنتروباکتریاسه از دولایه محیط کشت استفاده می‌گردد بدین صورت که پس از ریختن محیط کشت به داخل پلیت و بستن لایه اول، لایه دوم به آن اضافه می‌شود. پس از بستن لایه دوم پلیت‌ها به صورت وارونه به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری می‌شود. پس از سپری شدن مدت زمان مورد نظر تمامی کلنی‌های صورتی رنگ دوکی شکل شمارش می‌شوند.



شکل ۲۱- کلنی های آنتروباکتریاسه

#### ۱۴ آزمون جستجوی سالمونلا

سالمونلا بیماریزای مهم انسانی بوده که در روده انسان و تعدادی از حیوانات ساکن می‌شود. سالمونلا باسیل گرم منفی و از نظر شکلی شبیه سایر باسیل‌های روده‌ای است و براحتی با رنگ‌های عادی رنگ گرفته و در زیر میکروسکوپ آرایش خاصی نشان نمی‌دهند. کپسول غیرقابل تشخیص بدون هاگ بوده و معمولاً گلوکز را تخمیر و تولید گاز می‌نمایند. در غذاهایی که اسیدی نباشند در حرارت ۳۷ درجه سلسیوس بخوبی رشد و تکثیر می‌نمایند ولی در یخچال رشد آنها متوقف می‌شود. همچنین پاستوریزاسیون باعث از بین رفتن این باکتری می‌شود.

همه سالمونلاها انگل اجباری بوده و در عده‌ای از میزبانهای حیوانی از جمله انسان یافت می‌شوند، برخی از این باکتریها به انسان محدود گشته نظیر سالمونلا تیفی که در انسان بیماری ایجاد کرده یا انسان ناقل آنها می‌باشد. عفونتهای سالمونلایی در انسان تقریباً همیشه با وارد شدن میکروب به همراه مواد غذایی آلوده، شیر و آب از راه دهان ایجاد می‌شود. دو نوع سالمونلوز وجود دارد: ۱- گاستروانتریت حاد که به استفراغ و اسهال مشخص می‌گردد. ۲- تب تیفوئید که آنرا تب روده نیز می‌نامند. وجود سالمونلا حتی به تعداد زیاد در مواد غذایی از نظر ظاهری مانند بو، رنگ و حتی مزه تغییری نمی‌دهد. این میکروارگانیسم پس از یک دوره کمون ۱۲-۲۴ ساعته علائم خود را آشکار می‌سازد.

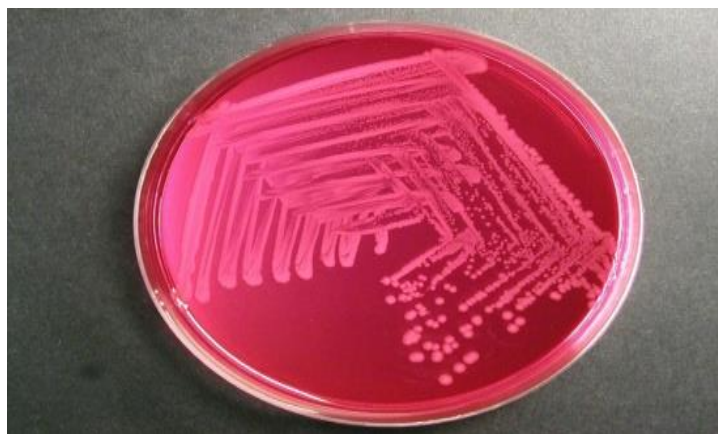
#### ۱-۱۴ محیط کشت

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 واسیلیادیس منیزیوم کلراید

R.V برای غنی سازی و گزیزلوز لیزین دزوکسی کولات آگار XLD و آگار سبز درخشان / قرمز فنل BGA برای تایید نهایی می باشد.

#### ۲-۱۴ روش آزمون

۲۵ گرم نمونه یکنواخت شده مورد آزمایش را در ۲۲۵ ml محیط کشت آب پیتونه بافری (BPW) ریخته به مدت ۲۴ h در دمای ۳۷ °C گرمخانه گذاری می کنیم. سپس به محیط کشت مولرکافمن تتراتیونات نئوبیوسین (MKTTn)، ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه، به مدت ۲۴ h در دمای ۳۷ °C و به محیط کشت RV، ml ۰/۱ از سوسپانسیون اولیه اضافه کنید سپس به مدت ۲۴ h در دمای ۴۱ °C گرمخانه گذاری کرده بعد از آن از هر یک، روی محیط های کشت BGA، XLD، کشت خطی می دهیم. به مدت ۲۴ h در دمای ۳۷ °C گرمخانه گذاری کرده در صورت وجود سالمونلا پرگنه های صورتی بر روی محیط کشت BGA و پرگنه های سیاه بر روی محیط کشت XLD مشاهده خواهد شد. در صورت مشاهده چنین کلنی هایی تست های تأییدی و بدنبال آن تست سرولوژیکی انجام می گیرد.



شکل ۲۲- کلنی های سالمونلا در محیط XLD و BGA

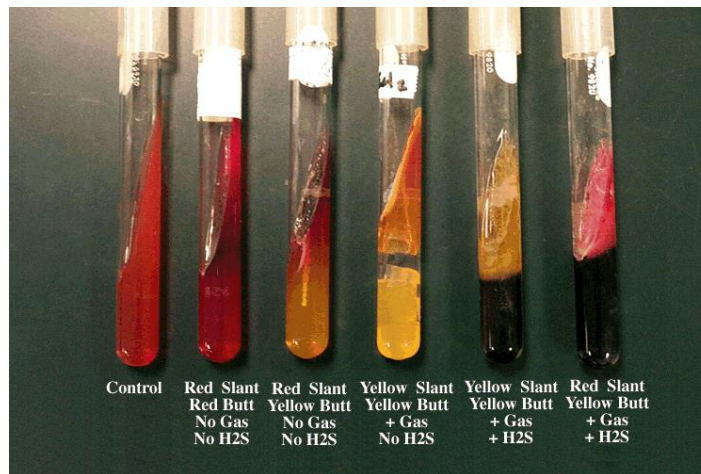
#### ۳-۱۴ کشت های تأییدی

کلنی های مشکوک به سالمونلا را تجدید کشت کرده و پس از کشت مجدد با آزمون های سرولوژیکی بیوشیمیایی مناسب آزمون تاییدی انجام می شود.

#### ۱-۳-۱۴ تایید بیوشیمیایی

#### ۱-۱-۳-۱۴ محیط کشت TSI آگار

با استفاده از سوزن کشت آغشته به کلنی‌ها، ابتدا سطح شیب دار محیط کشت را به صورت خطی کشت دهید، سپس سوزن را به عمق محیط کشت فرو ببرید. محیط کشت را در دمای  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  به مدت زمان  $24 \pm 3 \text{ h}$  ساعت گرمخانه‌گذاری کنید. در صورتی که کشت، از کلنی مشخص سالمونلا انجام گرفته باشد، سطح شیب‌دار محیط کشت، قلیایی (قرمز رنگ) همراه با تشکیل گاز و عمق محیط کشت اسیدی (زرد رنگ) همراه با تشکیل ۹۰٪ گاز و هیدروژن سولفید سیاه رنگ می‌باشد. باید توجه کرد که تایید وجود سالمونلا نباید تنها براساس نتایج آزمون کشت TSI انجام گیرد.



شکل ۲۳- آزمون محیط کشت TSI

#### ۱۴-۳-۱-۲ محیط کشت اوره آگار

با استفاده از سوزن کشت آغشته به کلنی‌ها، سطح شیب دار محیط کشت را به صورت خطی کشت دهید. محیط کشت را در دمای  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  به مدت زمان  $24 \pm 3 \text{ h}$  ساعت گرمخانه‌گذاری کنید. چنانچه واکنش مثبت باشد، از تجزیه اوره، آمونیاک به دست می‌آید، که رنگ قرمز فدل را به صورتی قرمز تغییر می‌دهد. اکثر سالمونلاها از نظر این واکنش منفی هستند.

## Urea Agar

Indicator: Phenol red.

Component : Urea

If the bacterium Produces urease:

Urea is hydrolyzed to  $\text{NH}_3$  and  $\text{CO}_2$  ---> light orange changes to reddish purple (in *Proteus* and *K pneumoniae*)



FIGURE 9-11 Urease test. Left, Positive result; right, negative result.

شکل ۲۴- آزمون محیط کشت اوره آگار

### ۳-۱-۳-۱۴ -L لیزین - دکربوکسیلاز

با استفاده از سوزن کشت آغشته به کلنی ها، داخل محیط کشت مایع را کشت دهید. محیط کشت را در دمای  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  به مدت زمان  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$  گرمخانه گذاری کنید. واکنش مثبت با ایجاد کدورت و رنگ ارغوانی مشاهده می شود. رنگ زرد نشان دهنده واکنش منفی است. اکثر سالمونلاها از نظر این واکنش مثبت هستند.

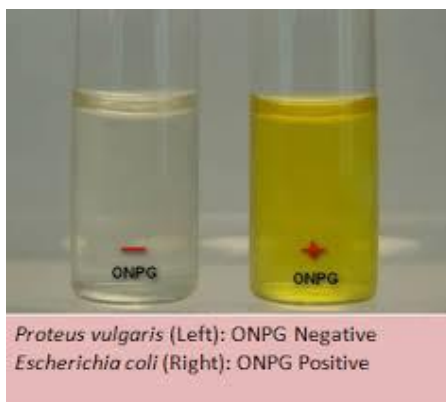


شکل ۲۵- آزمون L لیزین - دکربوکسیلاز

### ۴-۱-۳-۱۴ شناسایی بتا - گالاکتوزیداز

با استفاده از لوپ، یک حلقه کامل از کلنی مشکوک را به یک لوله آزمایش دارای  $0.25 \text{ ml}$  سرم فیزیولوژی اضافه کنید. سپس یک قطره تولوئن به آن افزوده و لوله را تکان دهید. لوله را به مدت ۵ دقیقه در حمام آب با دمای  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  قرار دهید، سپس  $0.25 \text{ ml}$  از معرف بتا-گالاکتوزیداز افزوده و مخلوط کنید. لوله را به مدت

زمان  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$  در حمام آب با دمای  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  قرار دهید. رنگ زرد نشان‌دهنده واکنش مثبت است که اغلب پس از مدت زمان ۲۰ دقیقه ظاهر می‌شود، اغلب سالمونلاها از نظر این واکنش منفی هستند.



شکل ۲۶ - شناسایی بتا-گالاکتوزیداز

#### ۵-۱-۳-۱۴ وژس پروسکوئر

با استفاده از لوپ، یک حلقه کامل از کلنی مشکوک را به یک لوله آزمایش دارای ۳ ml محیط کشت VP حل کنید، آن را در دمای  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  به مدت زمان  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$  گرمخانه‌گذاری کنید. پس از گرمخانه‌گذاری دو قطره محلول کراتین و سه قطره محلول اتانویک ۱- نفتول و دو قطره محلول هیدروکسید پتاسیم به آن بیفزایید. با مشاهده رنگ صورتی تا قرمز روشن در طی ۱۵ دقیقه واکنش مثبت است. سالمونلاها از نظر این واکنش منفی هستند.



شکل ۲۷ - آزمون وژس پروسکوئر

#### ۱۴-۳-۱-۶ واکنش اندل

یک کلنی مشکوک را به لوله دارای ۵ ml محلول تریپتون- تریپتوفان تلقیح کنید و در دمای  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  به مدت زمان  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$  گرمخانه گذاری کنید. پس از گرمخانه گذاری یک میلی لیتر معرف کوآکس به آن بیفزایید. تشکیل حلقه قرمز رنگ نشاندهنده واکنش مثبت است و تشکیل حلقه زرد-قهوه ای واکنش منفی را نشان می دهد. اکثر سالمونلاها از نظر این واکنش منفی هستند.



شکل ۲۸- آزمون اندول

#### ۱۴-۳-۱-۷ تفسیر آزمون های بیوشیمیایی

مشخصات سالمونلاها از نظر واکنش های بیوشیمیایی در جدول ۴ شرح داده شده است.



جدول ۴- تفسیر آزمون های بیوشیمیایی (مشخصات سالمونلاها از نظر واکنش های بیوشیمیایی)

سویه های سالمونلا										آزمون از بند (۹-۵-۳-۲ تا بند ۹-۵-۳-۷)
سایر سویه های سالمونلا		سالمونلا پاراتیفی C		سالمونلا پاراتیفی B		سالمونلا پاراتیفی A		سالمونلا تیفی		
درصد <sup>۱</sup>	واکنش	درصد <sup>۱</sup>	واکنش	درصد <sup>۱</sup>	واکنش	درصد <sup>۱</sup>	واکنش	درصد <sup>۱</sup>	واکنش	
۱۰۰	+		+		+	۱۰۰	+	۱۰۰	+	تشکیل اسید از تخمیر گلوکز در محیط کشت سه قندی TSI
۹۲	+		+		+	۱۰۰	+	۰	+	تشکیل گاز از تخمیر گلوکز در محیط کشت سه قندی TSI
۱	-		-		-	۱۰۰	-	۲	-	تشکیل اسید از تخمیر لاکتوز در محیط کشت سه قندی TSI
۱	-		-		-	۰	-	۰	-	تشکیل اسید از تخمیر ساکاروز در محیط کشت سه قندی TSI
۹۲	+		+		+	۱۰	-	۹۷	+	تولید هیدروژن سولفید (H <sub>2</sub> S) در محیط کشت سه قندی TSI
۱	-		-		-	۰	-	۰	-	تجزیه اوره
۹۵	+		+		+	۰	-	۹۸	+	لیزین دکربوکسیلاسیون
۳ <sup>۲</sup>	-		-		-	۰	-	۰	-	واکنش بتا-گالاکتوزیداز
۰	-		-		-	۰	-	۰	-	واکنش وژس پروسکوئر
۱	-		-		-	۰	-	۰	-	واکنش اندل

<sup>۱</sup> این درصدها نشان دهنده کلیه سویه های سالمونلا های جدا شده در واکنش های مثبت یا منفی نمی باشند این درصد ها ممکن است بین و درون سروتیپ های عامل مسمومیت غذایی در منابع غذایی مختلف، متفاوت باشند.

<sup>۲</sup> این درصد در منابع شناخته شده نیست.

<sup>۳</sup> سالمونلا تیفی یک آن آرتروزنیک است.

<sup>۴</sup> سالمونلا اتتریکا گونه آریزونا واکنش لاکتوز مثبت یا منفی می دهد ولیکن همیشه بتا- گالاکتوزیداز مثبت است برای مطالعه گونه های آن، آزمون های تکمیلی نیاز است.

#### ۱۴-۳-۲ تایید سرولوژیکی و سروتایپی

تشخیص وجود آنتی ژن های O و Vi و H سالمونلا، با مشاهده آگلوتیناسیون بر روی لام، هنگامی که از کلنی های خالص و آنتی سرم مناسب استفاده شود، صورت می گیرد.

## ۱۴-۳-۳ تایید در آزمایشگاه مرجع

سویه هایی که به عنوان سالمونلا در نظر گرفته می شوند و یا مشکوک به سالمونلا می باشند، باید برای تایید گونه به آزمایشگاه مرجع سالمونلا ارسال شوند.

## ۱۵ آزمون جستجوی استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت

استافیلوکوک ها سلولهای کروی گرم مثبت هستند که معمولاً در شکل دستجات نامنظمی شبیه به خوشه های انگور، آرایش می یابند. آنها به سهولت در بسیاری از محیط های کشت رشد می کنند. بعضی از آنها فلور طبیعی پوست و غشاهای مخاطی انسان بوده و بقیه آنها عامل بروز عفونت های چرکی، تشکیل آبسه هستند. شایعترین نوع مسمومیت غذایی مربوط به آنروتوکسین مقاوم- در برابر حرارت استافیلوکوکی است. رشد استافیلوکوکوس اورئوس در مواد غذایی موجب به مخاطره افتادن بهداشت عمومی می گردد زیرا بسیاری از سویه های این میکروارگانیسم سم آنروتوکسین ترشح می کنند که در صورت بلع موجب مسمومیت غذایی می شود. مواد غذایی که بعد از فرآیند بوسیله سویه های استافیلوکوک مولود آنروتوکسین آلوده می شوند بسیار خطرناک می باشند. زیرا میکروارگانیسم های رقیب که رشد استافیلوکوک ها را محدود می سازند موجود نیستند. در مواد غذایی فرآیند شده وجود استافیلوکوکوس اورئوس در غذا معمولاً مبین آلودگی به وسیله پوست، دهان یا بینی افرادی است که با غذا سروکار دارند که ممکن است مستقیماً در خط تولید به وسیله کارگرانی که دارای زخم های استافیلوکوکی در روی دست و بازوها هستند و یا در نتیجه سرفه و عطسه که معمولاً در عفونت های دستگاه تنفسی ایجاد می گردد، وارد غذا شود. باقیمانده مواد غذایی آلوده که در سطح یا مجاورت سطوح تولید قرار می گیرند نیز باعث آلودگی ماده غذایی فرآیند شده می شوند. وجود مقادیر زیاد استافیلوکوکوس اورئوس در ماده غذایی فرآیند شده دلیل بر عدم رعایت بهداشت و یا عدم کفایت کنترل درجه حرارت یا هر دو آنها می باشد.

در مواد غذایی خام مخصوصاً فرآورده های غذایی دامی، وجود استافیلوکوکوس اورئوس متداول بوده و ارتباطی با آلودگی آنها توسط انسان ندارد.

استافیلوکوکوس های کواگولاز مثبت در بیشتر موارد استافیلوکوکوس اورئوس می باشند اما استافیلوکوکوس اینترمدیوس و بعضی از سویه های استافیلوکوکوس هاییکوس نیز کواگولاز تولید می کنند.

## ۱۵-۱ محیط کشت

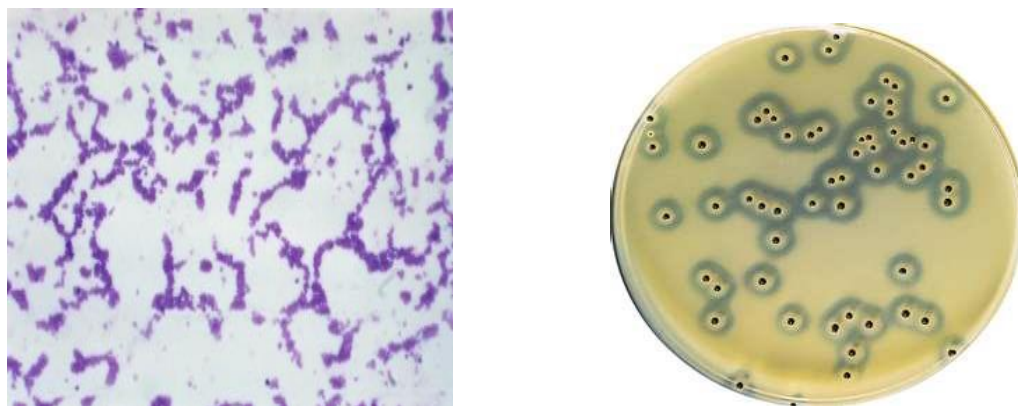
محیط کشت مورد استفاده برای جستجوی استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت آبگوشت اصلاح شده جیولیتی کانتونی GC و برای کشت تایید محیط کشت برد پارکر BP می باشد.

## ۱۵-۲ روش آزمون

یک میلی لیتر از فرآورده های مایع یا یک گرم از سایر فرآورده ها را به ۱۰ ml محیط کشت آبگوشت اصلاح شده جیولیتی و کانتونی با غلظت معمولی (GC) و یا با توجه به ماهیت نمونه، ۱۰ml از سوسپانسیون اولیه

(معادل ۱ گرم نمونه) را به ۱۰ ml از محیط کشت آبگوشت اصلاح شده جیولیتی و کانتونی با غلظت دو برابر (GC<sup>+</sup>) اضافه کنید. به دقت محلول آگار یا پارافین را که به دمای ۴۴ °C تا ۴۷ °C رسیده است به گونه‌ای به محیط کشت اضافه کنید تا سطح محیط کشت تلقیح شده کاملاً پوشانده شود. برای بی‌هوازی کردن به عنوان روش جایگزین می‌توان از جار یا گرمخانه بی‌هوازی نیز استفاده شود.

لوله‌ها به مدت ۲h ± ۲۴ h در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری کنید. اگر محیط کشت تلقیح شده، سیاه‌رنگ شد یا رسوب سیاه در آن ایجاد شد کشت سطحی در محیط انتخابی را انجام دهید. برای این کار، در شرایط آسپتیک، آگار یا پارافین روی لوله‌ها را با استفاده از اسپاچول سترون به صورت دو خط عمود بر هم ببرید و در صورت لزوم اطراف آگار یا پارافین را از پیرامون لوله جدا کنید. از محیط کشت درون لوله با استفاده از حلقه کشت سترون بر سطح پلیت دارای محیط کشت برد - پارکر آگار یا پلیت دارای محیط کشت پلاسمای خرگوش فیبرینوژن کشت خطی دهید تا کلنی‌های مجزا بدست آید. پلیت‌ها را وارونه کنید و در دمای ۳۷ °C برای مدت زمان ۲h ± ۲۴h گرمخانه‌گذاری کنید. کلنی‌های مشخص به صورت کلنی‌های سیاه خاکستری براق و محدب با هاله شفاف که ممکن است به صورت جزئی کدر شده باشند، دیده می‌شوند.

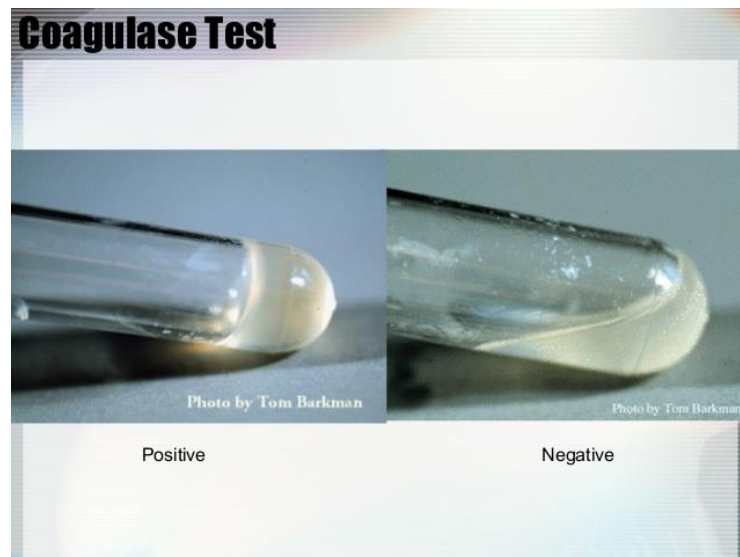


شکل ۲۹- کلنی‌های استافیلوکوکوس اورئوس

### ۱۵-۳ آزمون تاییدی

### ۱۵-۳-۱ آزمون کواگولاز

با استفاده از حلقه کشت، هر کلنی انتخاب شده را بردارید و به لوله های آزمایش دارای محیط کشت آبگوشت مغز و قلب منتقل کنید. سپس لوله ها را در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  برای مدت زمان  $24\text{h} \pm 2\text{h}$  ساعت گرمخانه گذاری کنید. پس از پایان زمان گرمخانه گذاری،  $0.1\text{ ml}$  از سوسپانسیون را در لوله آزمایش سترون ریخته و به آن  $0.3\text{ ml}$  پلاسمای خرگوش اضافه کنید. سپس لوله ها را در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  برای مدت زمان  $4\text{h}$  تا  $6\text{h}$  در دمای اتاق نگهداری کنید. در صورت مثبت بودن آزمون لخته در پلاسمای مشاهده می شود. آزمایش در صورتی معتبر است که نشانه ای از لخته در پلاسمای شاهد دیده نشود.

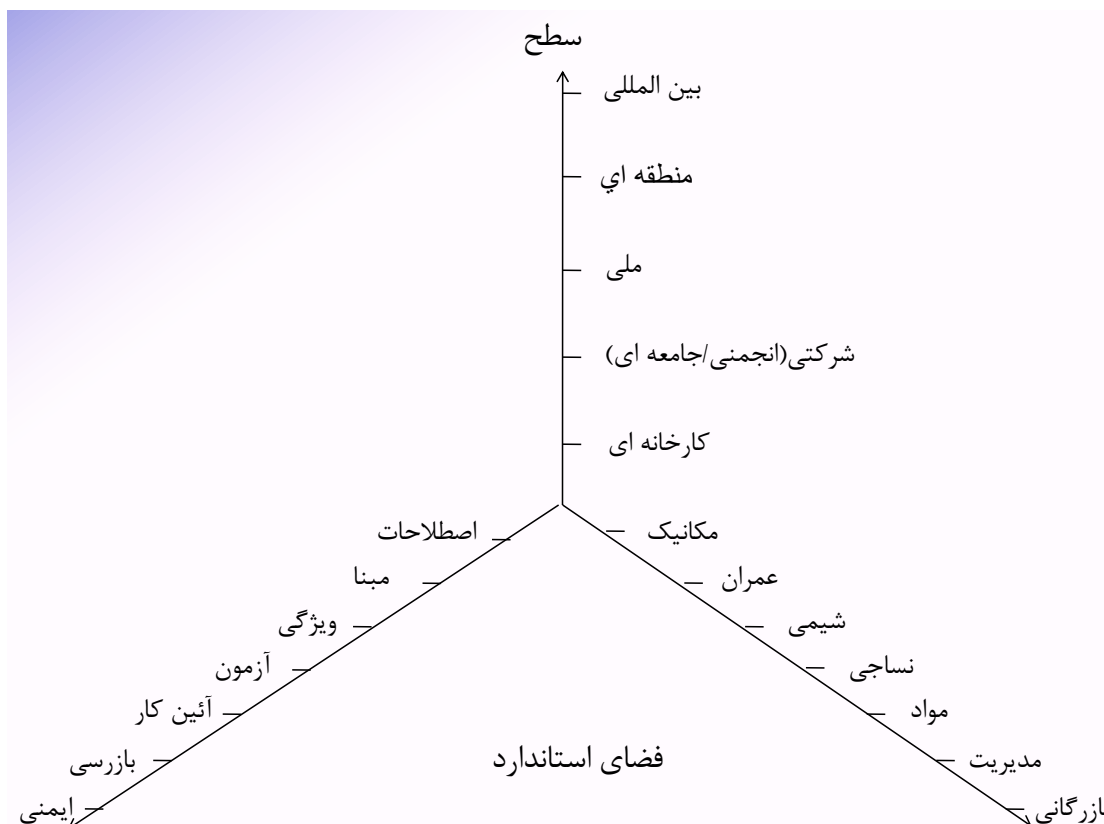


شکل ۳۰ - آزمون کواگولاز

## پیوست الف

### انواع استاندارد

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



### الف-۲ سطح استاندارد

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

الف- استانداردهای کارخانه ای، این گونه استانداردها توسط کارخانجات و به منظور استفاده در همان واحد تدوین می شود. در تدوین استاندارد کارخانه ای ضمن بررسی شرایط داخلی کارخانه باید شرایط و عوامل خارجی از قبیل مواد اولیه و منابع تهیه آن، چگونگی تهیه تجهیزات، بازاریابی و رقابت، نیاز مشتری و امثال آن باید مورد توجه قرار گیرد. در برخی مواقع کارخانجات، شرکتها یا تشکیلاتی که در یک زمینه خاص فعالیت می کنند از طریق یک جامعه یا انجمن استانداردهای موسوم به استانداردهای شرکتی یا جامعه ای را تدوین می کنند تا در امور مربوط مورد استفاده قرار گیرد.

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

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

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

### الف-۳- جنبه استاندارد

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

الف- استاندارد های ویژگی

ب- استاندارد های روش آزمون

پ- استانداردهای آیین کار

ت- استانداردهای ایمنی

ث- واژه نامه

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

### الف-۴- اجرای استاندارد

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

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

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

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

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

## پیوست ب

### مفاهیم مورد استفاده در کنترل کیفیت

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

## پیوست پ اطلاعاتی

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

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

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

عدم انجام هر یک از وظایف مدیر کنترل کیفیت و تخطی شغلی و قانونی او طبق آیین نامه ذکر شده می تواند منجر به اعمال تنبیهاتی به ترتیب شامل: تذکر شفاهی به عنوان کمترین و ابطال 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](http://WWW.ISIRI.GOV.IR) مراجعه شود.

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

علت عدم تداوم انطباق فرآورده با استاندارد مربوطه

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





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

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

پ-۳-۱ در صورتیکه جمع امتیاز منفی یک گزارش نتیجه آزمون یا جمع امتیازات منفی نتایج چند آزمون به ۶۰ رسید، اداره کل استاندارد استان مربوط به واحد بصورت کتبی اخطار داده و در مورد واحدهای مشمول استاندارد اجباری برای جمع آوری کالای مغایر با استاندارد ملی با شماره سری ساخت مربوط موضوع را به کمیسیون ماده ۱۹ ضوابط اجرایی استانداردهای اجباری و تشویقی و طرز به کار بستن 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 می‌نماید. همچنین در صورتیکه امتیاز منفی مذکور ناشی از حداقل نتایج آزمون سه نمونه برداری مختلف بوده و حداقل ۳۰ امتیاز از جمع امتیازات منفی گزارش نتیجه آزمون آخر به واسطه نقایص عمده و بحرانی باشد،

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

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

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

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

### پیوست ت

نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌های انواع شکلات طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۹۵

ردیف	شرح آزمون	درجه اهمیت
۱	آنتروباکتریاسه	عمده
۲	اشریشیاکلی	بحرانی
۳	استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت	بحرانی
۴	سالمونلا	بحرانی
۵	کپک	عمده
۶	مخمر	عمده