

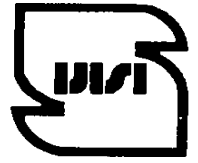


جمهوری اسلامی ایران

Islamic Republic of Iran

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

Institute of Standards and Industrial Research of Iran



استاندارد ملی ایران

۲۶۳۰

تجدیدنظر اول

**ISIRI**

**2630**

**1st.Revsn**

**میکروبیولوژی مواد غذایی –**

**باکتری های بی هوازی اسپوردار گرما دوست –**

**روش شناسایی**

**Food microbiology –**

**Thermophilic anaerobic spore formers –**

**Detection method**

## « بسمه تعالی »

### آشنایی با مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب قانون، تنها مرجع رسمی کشور است که عهده دار وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) میباشد.

تدوین استاندارد در رشته های مختلف توسط کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه، صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط با موضوع صورت میگیرد. سعی بر این است که استانداردهای ملی، در جهت مطلوبیت ها و مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فنی و فن آوری حاصل از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع شامل: تولیدکنندگان، مصرف کنندگان، بازرگانان، مراکز علمی و تخصصی و نهادها و سازمانهای دولتی باشد. پیش نویس استانداردهای ملی جهت نظرخواهی برای مراجع ذینفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال میشود و پس از دریافت نظرات و پیشنهادات در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که توسط مؤسسات و سازمانهای علاقمند و ذیصلاح و با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می شود نیز پس از طرح و بررسی در کمیته ملی مربوط و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی چاپ و منتشر می گردد. بدین ترتیب استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مفاد مندرج در استاندارد ملی شماره ((۵)) تدوین و در کمیته ملی مربوط که توسط مؤسسه تشکیل میگردد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد میباشد که در تدوین استانداردهای ملی ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندیهای خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین المللی استفاده می نماید.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون به منظور حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردها را با تصویب شورای عالی استاندارد اجباری نماید. مؤسسه می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه بندی آنرا اجباری نماید.

همچنین بمنظور اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمانها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و گواهی کنندگان سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست محیطی، آزمایشگاهها و کالیبره کنندگان وسایل سنجش، مؤسسه استاندارد اینگونه سازمانها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران مورد ارزیابی قرار داده و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آنها اعطا نموده و بر عملکرد آنها نظارت می نماید. ترویج سیستم بین المللی یکاها، کالیبراسیون وسایل سنجش تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی از دیگر وظایف این مؤسسه می باشد.

نشانی مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران : کرج - شهر صنعتی، صندوق پستی ۱۶۳-۳۱۵۸۵

دفتر مرکزی : تهران - ضلع جنوبی میدان ونک - صندوق پستی : ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵

تلفن مؤسسه در کرج: ۰۲۶۱-۲۸۰۶۰۳۱-۸



تلفن مؤسسه در تهران: ۰۲۱-۸۸۷۹۴۶۱-۵

دورنگار: کرج ۰۲۶۱-۲۸۰۸۱۱۴ - تهران ۰۲۱-۸۸۸۷۰۸۰-۸۸۸۷۱۰۳

بخش فروش - تلفن: ۰۲۶۱-۲۸۰۷۰۴۵ - دورنگار: ۰۲۶۱-۲۸۰۷۰۴۵

پیام نگار: [Standard @ isiri.or.ir](mailto:Standard@isiri.or.ir)

بهاء ۱۲۵۰ ریال

-  **Headquarters:** Institute Of Standards And Industrial Research Of Iran  
**P.O.Box :** 31585-163 Karaj – IRAN
-  **Tel (Karaj):** 0098 (261) 2806031-8
-  **Fax (Karaj):** 0098 (261) 2808114
- Central Office:** Southern corner of Vanak square, Tehran  
**P.O.Box :** 14155-6139 Tehran-IRAN
-  **Tel (Tehran):** 0098 21 8879461-5
-  **Fax (Tehran):** 0098 21 8887080, 8887103
-  **Email:** [Standard @ isiri.or.ir](mailto:Standard@isiri.or.ir)
-  **Price:** 1250 RLS

## پیشگفتار

استاندارد " میکروبیولوژی مواد غذایی - باکتری های بی هوازی اسپوردار گرمادوست - روش شناسایی " که نخستین بار در سال ۱۳۶۹ تهیه گردید ، براساس پیشنهادهای رسیده و بررسی و تایید کمیسیون فنی مربوطه برای اولین بار مورد تجدید نظر قرار گرفت و در یکصدوپنجمین جلسه کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی و بیولوژی. مورخ ۱۳۸۵/۱۲/۱۳.. مورد تصویب قرار گرفته است ، اینک به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت های ملی و جهانی در زمینه صنایع ، علوم و خدمات ، استاندارد های ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هرگونه پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استاندارد ها ارائه شود ، در هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوطه مورد توجه قرار خواهد گرفت.

بنابراین برای مراجعه به استانداردهای ملی ایران باید همواره از آخرین تجدید نظر آنها استفاده نمود. در تهیه و تدوین این استاندارد سعی شده است که ضمن توجه به شرایط موجود و نیازهای جامعه ، در حد امکان بین این استاندارد و استانداردهای ملی کشورهای صنعتی و پیشرفته هماهنگی ایجاد شود. منابع و ماخذی که برای تهیه این استاندارد به کار رفته به شرح زیر است:

۱- استاندارد ملی ایران ۲۶۳۰ : سال ۱۳۶۹ " روش جستجو و شناسایی اسپور باکتریهای گرمادوست "

۲- استاندارد ملی ایران ۶۵۹۸ : سال ۱۳۸۲ میکروبیولوژی مواد غذایی - واژه نامه .

3-Carl, Vanderzant & Don F. splittstoesser : Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3<sup>rd</sup> ed ,Am. Pub. Health Association 1992.

باکتری های بی هوازی اسپوردار گرمادوست غیر مولد سولفید هیدروژن در خانواده ی باسیلاسه و جنس کلسترییدیوم طبقه بندی می شوند. یکی از مهمترین گونه های این گروه کلسترییدیوم ترموساکارولیتیکوم<sup>۱</sup> است. این ارگانسیم ها بی هوازی اجباری و به طور قوی ساکارولیتیک می باشند و اسید و گاز فراوان از گلوکز، لاکتوز، ساکارز، سالیسین و نشاسته ایجاد می کنند و قادر به هیدرولیز پروتئین نیستند و از نیترات ها، نیتريت تولید نمی کنند. سلول های رویشی این باکتری ها به صورت میله ای گرم مثبت، استوانه ای بلند مستقیم یا کمی خمیده و با قابلیت ضعیف رنگ پذیری هستند و دارای اسپورهای انتهایی و متورم می باشند. سم و عفونت ایجاد نمی کنند بنابراین این ارگانسیم ها از نظر فساد دارای اهمیت هستند و از نظر بهداشت عمومی مشکل ساز نیستند.

اسپور این ارگانسیم ها دارای مقاومت حرارتی قابل توجه است به طوری که ارزش  $D^2$  آن ها در  $121 \pm 3$  درجه سلسیوس به مدت ۳ تا ۴ دقیقه یا بیشتر و ارزش  $Z^3$  (شیب منحنی زمان مرگ حرارتی) آن ها حدود ۶ تا ۷ درجه سلسیوس است و در محدوده حرارتی ۱۰۵ تا ۱۱۳ درجه سلسیوس مقاوم هستند. این باکتری هامی توانند عامل فساد کنسروهای کم اسید یا اسیدی باشند. باکتری های بی هوازی اسپور دار گرمادوست به ندرت در غذاهای فرایند شده در دمای بالاتر از  $121 \pm 3$  درجه سلسیوس یافت می شوند. فقط در شرایطی که محصول نهایی به طور نادرست سرد شود یا به مدت زیاد در دمای بالا نگهداری گردد، می توان احتمال حضور آن ها را داد.

---

1-*Clostridium thermosacharolyticum*

2-D value

3-Z value

دمای مطلوب رشد این ارگانیسم ها بین ۵۵ تا ۶۰ درجه سلسیوس است و به ندرت در دمای پایین تر از ۳۲ درجه سلسیوس رشد می کنند. در صورتی که اسپورها قبلا در دمای بالاتر جوانه زده باشند می توانند در مدت ۱۴ روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس موجب فساد ماده غذایی گردند. رشد مطلوب آن ها در pH ۲ تا ۶/۲ است ولی به آسانی در فرآورده های با pH ۴/۷ یا بیشتر نیز رشد می کنند. این باکتری عامل فساد فرآورده های گوجه فرنگی با pH بین ۴/۱ تا ۴/۵ می باشند.

# کمیسیون استاندارد " میکروبیولوژی مواد غذایی - باکتری های بی هوازی اسپوردار گرمادوست - روش شناسایی " ( تجدیدنظر)

## رئیس

عبدی عالی ، احیاء

(دکترای تخصصی باکتریولوژی)

## نمایندگی

دانشگاه الزهراء

## اعضاء

امینیان ، حمید رضا

( دکترای دامپزشکی )

سازمان حمایت از مصرف کنندگان و تولیدکنندگان

اوصیاء ، نوشین

(لیسانس صنایع غذایی)

شرکت صنایع غذایی بهروز نیک

پیری آذر هریس ، رسول

(لیسانس میکروبیولوژی)

شرکت صنایع غذایی بهروز نیک

خضری پور، معصومه

(لیسانس تغذیه )

وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی -

آزمایشگاههای کنترل غذا و دارو

زند و کیلی ، فاطمه

(فوق لیسانس علوم بهداشتی در تغذیه)

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

رحیمی فرد، ناهید

(دکترای تخصصی میکروب شناسی)

وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی -

آزمایشگاه کنترل غذا و دارو

سلطانی، زهرا

(لیسانس تغذیه )

شرکت سهامی گوشتیران

شریعتی، منیژه

(لیسانس علوم تغذیه)

دفتر امور تدوین استاندارد

عبیری ، زهرا

(فوق لیسانس علوم بهداشتی در تغذیه)

اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان تهران

کوهی کمالی ، پالیز  
(فوق لیسانس میکروبیولوژی)

انستیتو تغذیه و تحقیقات صنایع غذایی کشور

## دبیران

پوراعتدال ، زهره  
( فوق لیسانس علوم بهداشتی در تغذیه )

اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان تهران

صمیعی ، بیتا  
( لیسانس میکروبیولوژی )

اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان تهران



## فهرست مندرجات

## صفحه

الف	پیشگفتار
ب	مقدمه
۱	هدف و دامنه کاربرد
۱	مراجع الزامی
۲	اصطلاحات و تعاریف
۲	اساس روش
۳	نمونه برداری
۴	مواد لازم
۶	وسایل لازم
۷	روش اجرای آزمون
۹	بیان نتایج

# میکروبیولوژی مواد غذایی – باکتریهای بی هوازی اسپوردار گرمادوست –

## روش شناسایی

### ۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد تعیین روش جستجو و شناسایی باکتری های بی هوازی اسپوردار گرمادوست است. این روش برای انواع مواد غذایی کاربرد دارد.

### ۲ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیرحالی مقرراتی است که در متن این استاندارد به آنها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد محسوب می شود. در مورد مراجع دارای تاریخ چاپ و/ یا تجدید نظر، اصلاحیه ها و تجدیدنظرهای بعدی این مدارک مورد نظر نیست. معهذاً بهتر است کاربران ذینفع این استاندارد امکان کاربرد آخرین اصلاحیه ها و تجدیدنظرها مدارک الزامی زیر را مورد بررسی قرار دهند. در مورد مراجع بدون تاریخ چاپ و/ یا تجدید نظر آخرین چاپ و/ یا تجدید نظر آن مدارک الزامی ارجاع داده شده مورد نظر است. استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

۱-۲ استاندارد ملی ایران ۲۷۴۷: سال ۱۳۸۱ "میکروبیولوژی - آیین کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی".

۲-۲ استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵: سال ۱۳۸۱ "میکروبیولوژی - آیین کاربرد روش های عمومی در آزمایشگاه میکروبیولوژی".

### ۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات و/ یا واژه ها با تعاریف زیر به کار می رود:

### ۳-۱ باکتری های بی هوازی اسپوردار گرمادوست

باکتری های اسپوردار که درجه حرارت مناسب رشدشان ۵۵ تا ۶۰ درجه سلسیوس و برای تعدادی ۷۵ تا ۹۰ درجه سلسیوس است و حداقل دمای رشد آن ها ۳۵ درجه سلسیوس می باشد.

### ۳-۲ اسپور(ها)

برخی از باکتری های گرم مثبت به ویژه از خانواده باسیلاسه، تحت شرایط نامساعد محیطی به شکل خفته باکتری به نام هاگ تبدیل می شوند که نسبت به شرایط فیزیکی محدود شده مانند کمبود مواد مغذی، حرارت و پرتو دهی بسیار مقاوم هستند. هاگ ها مجدداً پس از قرار گرفتن در شرایط محیطی مساعد رویش می یابند.

### ۳-۳ بهر

مقداری از فراورده که در یک زمان معین و با یک کد شناسایی مشخص تولید می شود.

### ۴ اساس روش

روش جستجو و شناسایی براساس تلقیح مقدار معینی از مواد غذایی در محیط کشت اختصاصی و گرمخانه گذاری در زمان و دمای مناسب می باشد.

### ۵ نمونه برداری

#### ۱-۵ مواد اولیه

از مواد اولیه خشک به صورت سترون از محموله ها یا بهرهای حاوی ۵۰ ظرف (بسته) یا کمتر از ۵ کیسه یا بشکه مختلف که به صورت مواد اولیه خشک هستند، به میزان ۲۰۰ گرم نمونه برداری کنید. در بهرهای حاوی ۵۰ تا ۱۰۰ تایی (ظرف یا بسته) از ۱۰ درصد بهر نمونه برداری کنید و از محموله های بیش از ۱۰۰ تایی ظرف یا بسته) معادل جذر اندازه بهر، نمونه برداری می شود. از شکر مایع در مراحل انتقال یا عملیات پرکردن در تصفیه خانه میزان ۵ نمونه ۲۰۰ گرمی از هر تانک نمونه بردارید. نمونه ها باید در ظرف در بسته و سترون قرارداد شوند. در صورت وجود تغییرات قابل ملاحظه در تجزیه و تحلیل اولیه بهر، تعداد نمونه ها باید افزایش یابند.

#### ۲-۵ تجهیزات

باکتری های بی هوازی اسپوردار گرمادوست در تجهیزات رشد نمی کنند مگر اینکه دمای بالا در یک محیط نسبتاً بی هوازی حاوی مواد مغذی فراهم باشد. از مواد غذایی تجمع یافته در چنین مکان هایی با استفاده از قاشق سترون یا وسیله مشابه دیگر نمونه برداری کنید و آن را در ظرف سترون در بسته قرار دهید و بلافاصله آزمایش را (طبق بند ۸) انجام دهید. آزمون مواد غذایی قبل و بعد از تماس با تجهیزات مورد استفاده در فرایند به تعیین میزان آلودگی تجهیزات کمک می کند.

## ۳-۵ فراورده در طی فرایند

برای پایش دوره ای سیستم ، نمونه ۲۰۰ گرمی از فراورده در طی فرایند تهیه کنید. زمان نمونه برداری را به گونه ای تنظیم کنید که شروع تولید بهر جدید با پایان بهر قبلی منطبق باشد در این صورت لازم است نمونه را گرمخانه گذاری کنید. سپس نمونه ها را به آرامی تا رسیدن به دمای اتاق سرد کنید و به سرعت آزمایش را (طبق بند ۸) انجام دهید. یخچال گذاری سفارش نمی شود.

۳

## ۴-۵ فراورده نهایی

نمونه انتخابی از محصول نهایی بایستی معرف شرایط کل تولید در یک دوره باشند . نیاز به نمونه برداری با توجه به یافته هایی مثل نتایج ثبت شده قبلی محصول در رابطه با فسادباکتری های گرمادوست واسترس های دمایی که محصول در طی حمل ونگهداری تحت تاثیر آن قرارداشته است مشخص می شود.تعداد نمونه بایستی یک هزارم حجم کل تولید باشد . اگر سرد کردن پس از فرایند تا دمای ۴۳ در جه سلسیوس بلافاصله امکان پذیر نباشد ، جستجوی باکتری های گرمادوست باقی مانده بسیار با اهمیت خواهد بود . سپس آزمون فراورده نهایی را ( طبق بند ۸ ) انجام دهید .

## ۶ مواد لازم

### ۶-۱ ممیط کشت PE-2

### ۶-۱-۱ مواد تشکیل دهنده

<u>مقدار</u>	<u>نام مواد</u>
۲۰ گرم	پپتون <sup>۱</sup>
۳ گرم	عصاره مخمر <sup>۲</sup>
۲ میلی لیتر	بروموکروزول ارغوانی <sup>۳</sup>
	(محللول الکلی دودرصد)
۸-۱۰ عدد برای هر لوله	نخود دولپه <sup>۴</sup> بدون آفت کش
۱۰۰۰ میلی لیتر	آب مقطر

1-Pepton

2-Yeast Extract

3-Bromochrosol Purple

4-Cinser arientoum L.

## ۶-۱-۲ طرز تهیه

مواد فوق را در آب مقطر حل کنید در صورت نیاز از حرارت ملایم استفاده کنید. سپس آن را در حجم های ۱۹ میلی لیتری در لوله های کشت در پیچ دار که حاوی ۸ تا ۱۰ عدد نخوددولپه هستند توزیع کنید. اجازه دهید تا محیط کشت به مدت یک ساعت در این حالت باقی مانده تا آب را به خود جذب کند. سپس محیط را در اتوکلاو با دمای  $121 \pm 3$  درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه سترون کنید.

برای تهیه محلول دو درصد بروموکرزول ارغوانی دو گرم پودر بروموکرزول را به ده میلی لیتر الکل اتیلیک اضافه کنید و سپس آن را با آب مقطر به حجم ۱۰۰ برسانید.

**یادآوری ۱-** اگر محیط تازه آماده استفاده نشود، لوله های سترون باید در معرض جریان بخار به مدت ۲۰ دقیقه قرار گیرند تا اکسیژن خارج شود و قبل از استفاده تا دمای ۵۵ درجه سلسیوس سرد شوند و پس از تلقیح سطح لوله ها با ۳ میلی لیتر آگار سترون ۲ درصد یا وازپار پوشانده شود. لازم است قبل از گرمخانه گذاری در دمای ۵۵ درجه سلسیوس موجود احتمالی، از سرپوش منفذ دار<sup>۱</sup> برای خروج گاز استفاده شود.

**یادآوری ۲-** بخار دهی تکراری لوله های استفاده نشده اثر بخشی آن را به عنوان سوپسترا برای باکتری های بی هوازی اسپور دار گرما دوست کاهش نمی دهد. غذاهای کنسروی فاسد مشکوک به رشد باکتری های گرما دوست نباید یخچال گذاری شوند. زیرا سلول های رویشی این باکتری ها معمولا در دمای یخچال از بین می روند و اسپور ها معمولا در غذاهای کنسروی ایجاد نمی شوند.

## ۲-۶ وازپار

### ۱-۲-۶ مواد تشکیل دهنده

<u>مقدار</u>	<u>نام مواد</u>
۵۰ گرم	وازلین
۵۰ گرم	پارافین با نقطه ذوب ۵۸ درجه سلسیوس

### ۲-۲-۶ طرز تهیه

مواد فوق را پس از مخلوط کردن در اتوکلاو با دمای  $3 \pm 121$  درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید.

## ۳-۶ آگار ۲ درصد

## ۷ وسایل لازم

یادآوری-از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروب شناسی طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۷۴۷: سال ۱۳۸۱ و همچنین وسایل زیر استفاده کنید.

### ۱-۷ مخلوط کن<sup>۱</sup>

۲-۷ گرمخانه قابل تنظیم در دمای  $1 \pm 55$  درجه سلسیوس.

۳-۷ میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر با عدسی شی روغنی.

۴-۷ پی پت مخصوص میکروبیولوژی با ظرفیت های اسمی یک دهم، یک و ده میلی لیتر.

۵-۷ لوله های آزمایش با ابعاد ۱۸×۱۵۰ میلی متر با درپوش منفذ دار برای تخلیه گاز.

۶-۷ قاشقک از جنس فولاد زنگ نزن.

## ۸ روش اجرای آزمون

آماده سازی و تلقیح نمونه ها در محیط کشت باید با توجه به ماهیت هر فرآورده به شرح زیر انجام شود:

### ۱-۸ شکر و پودر شیر خشک

۲۰ گرم نمونه را در یک ارلن سترون قرار دهید و با آب مقطر سترون حجم آن را به ۱۰۰ میلی لیتر برسانید. برای حل شدن نمونه آن را به هم بزنید و محتوی ارلن را سریع بجوشانید. جوشاندن را به مدت ۵ دقیقه ادامه دهید. با وارد کردن ارلن در آب سرد آن را سرد کنید و با آب مقطر حجم را دوباره به ۱۰۰ میلی لیتر برسانید. ۲۰ میلی لیتر از محلول جوشیده را در حجم های مساوی در ۶ لوله حاوی محیط PE-2 بدون اکسیژن تقسیم کنید. سطح هر لوله را با سه میلی لیتر آگار دو درصد یا وازپارپوشانید و اجازه دهید آگار بسته شود ابتدا لوله ها را تا دمای  $55 \pm 1$  درجه سلسیوس گرم کنید و سپس به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری کنید.

### ۲-۸ قند مایع

نمونه معادل ۲۰ گرم شکر خشک را که بر اساس میزان بریکس معین می گردد (۲۹/۴۱۱ گرم قند مایع با بریکس ۶۸ درجه) را در ارلن سترون قرار دهید و مانند شکر خشک (طبق بند ۸-۱) آزمون را ادامه دهید. یادآوری- در صورتی که بریکس قند مایع از ۶۸ درجه کمتر یا بیشتر باشد باید میزان قند مایع مورد آزمون به گونه ای برداشته شود که معادل ۲۰ گرم شکر خشک باشد.

### ۳-۸ قارچ فوراکی تازه

۲۰۰ گرم قارچ را در ظرف سترون مخلوط کن قرار دهید و با چاقوی سترون آن را خرد کنید. تا خرد شدن کامل نمونه آن را مخلوط کنید. برای اطمینان از مخلوط شدن درست، لازم است ظرف مخلوط کن مرتب تکان داده شود. ۲۰ گرم نمونه مخلوط شده را در یک ارلن سترون قرار دهید و همانند شکر خشک (طبق بند ۸-۱) عمل کنید.

## ۸-۴ نشاسته و آرد

۲۰ گرم نمونه را در ارلن سترون حاوی تعدادی گلوله شیشه ای<sup>۱</sup> قرار دهید و با آب مقطر حجم نهایی را به ۱۰۰ میلی لیتر برسانید و تا دست یابی به سوسپانسیون یکنواخت آن را به خوبی تکان دهید. به طور مساوی ۲۰ میلی لیتر از سوسپانسیون را در ۶ لوله حاوی محیط pE-2 بدون اکسیژن تقسیم کنید. پس از اضافه کردن نمونه همزمان سه لوله را در دست به طور چرخشی تکان دهید. لوله ها را در حمام آب جوش قرار دهید و حرکت چرخشی لوله ها را در ۵ دقیقه اول حرارت دهی ادامه دهید. حرارت دهی را به مدت ۱۰ دقیقه دیگر ادامه دهید سپس لوله ها را خارج کنید و در آب سرد قرار دهید. سطح لوله ها را با سه میلی لیتر آگار دو درصد سترون یا وازیپار بپوشانید و بگذارید آگار بسته شود، ابتدا لوله ها را تا دمای ۵۵ درجه ی سلسیوس گرم کنید و سپس در همان دما به مدت ۷۲ ساعت گرم خانه گذاری کنید.

## ۸-۵ غلات و فمیرهای فوراکی<sup>۱</sup>

۵۰ گرم از نمونه را که به خوبی مخلوط شده در ظرف مخلوط کن سترون قرار دهید و به آن ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر سترون اضافه کنید. به مدت سه دقیقه تا به دست آوردن سوسپانسیون یکنواخت آن را به هم بزنید. آزمون را بر (طبق بند ۸-۱) ادامه دهید.

## ۸-۶ فراورده در طی فرایند

۱۰۰ گرم فراورده را در ظرف مخلوط کن سترون قرار دهید و به مدت سه دقیقه آن را به هم بزنید از نمونه مخلوط به میزان ۲۰ میلی لیتر یا گرم در ۶ لوله حاوی محیط pE-2 بدون اکسیژن توزیع کنید و مانند (طبق بند ۸-۱) آزمون را ادامه دهید.

## ۸-۷ فراورده نهایی

نمونه های انتخابی فراورده نهایی بایستی به مدت ۵ تا ۷ روز در  $55 \pm 1$  درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شوند و روزانه از نظر کاهش میزان خلایا تخریب ظرف مورد بررسی قرار گیرند. نمونه هایی که نشانه هایی از فساد مانند تشکیل گاز دارند، باید از گرمخانه خارج و در شرایط سترون باز شوند.

حدود سه گرم یا سه میلی لیتر از محتوی آن ها را در دو لوله حاوی محیط pE-2 بدون اکسیژن قرار دهید و در دمای  $55 \pm 1$  درجه سلسیوس به مدت ۵ روز گرم خانه گذاری کنید. تایید ریخت شناسی<sup>۱</sup> باید بر اساس بند ۹-۲ این استاندارد انجام شود.



**یادآوری -** در هنگام تهیه کشت از فراورده نهایی، باید شرایط لازم برای جلوگیری از آلودگی آزمایشگاهی طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۷۴۷ : ۱۳۸۱ رعایت شود.

## ۸ بیان نتایج

### ۱-۹ مستجو

لوله های محیط کشت PE-2 که از نظر رشد باکتری های بی هوازی اسپوردار گرمادوست غیر مولد سولفید هیدروژن مثبت اند با ایجاد گاز سبب بالا رفتن نخودهای خشک به سطح محیط مایع می گردند . باکتری های گرمادوست ایجاد کننده فساد صاف بدون ایجاد گاز رنگ بنفش را به زرد تغییر دهند .

### ۲-۹ بررسی و تایید ریخت شناسی

برای تایید ریخت شناسی بایستی گستره میکروسکوپی از فراورده ( طبق استاندارد ۲۳۲۵:۱۳۸۱ ) تهیه شود. مشاهده باسیل های اسپوردار گرم مثبت در گستره تائید کننده وجود باکتری های اسپوردار گرما دوست در نمونه مورد آزمون است.

## ۱۰- گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی های زیر باشد.

۱-۱۰ مشخصات کامل نمونه مانند نوع و نام نمونه، تاریخ و محل نمونه برداری .

۲-۱۰ تاریخ انجام آزمون.

۳-۱۰ روش نمونه برداری مورد استفاده در صورت مشخص بودن .

۴-۱۰ روش آزمون طبق استاندارد ملی ایران ۲۶۳۰ سال : ۱۳۸۶

۵-۱۰ بیان نتایج آزمون بر اساس استاندارد ملی ایران ۲۶۳۰ سال : ۱۳۸۶

۶-۱۰ نام و نام خانوادگی و امضاء آزمایش کننده.

1- Morphological

---

---

---

**ICS: 07.100.30**

**صفحة: ١٠**

---

---

