INSO
2326
4th .Revision
2016

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران
Iranian National Standards Organization

استاندارد ملی ایران
۲۳۲۶
تجدیدنظر چهارم
۱۳۹۵

میکروبیولوژی مواد غذایی کنسرو شده- سترونی تجاری- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون

Microbiology of Canned foods- Commercial sterility- Specifications and test methods

ICS:07.100.30;67.230

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران، ضلع جنوب غربی میدان ونک، خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق‌پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران- ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج ، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج - ایران

تلفن: ۸- ۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶)

رایانامه: standard@isiri.org.ir

وبگاه: http://www.isiri.org

Iranian National Standardization Organization (INSO)

No.1294 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@isiri.org.ir

Website: http://www.isiri.org

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

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

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

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند درکمیته ملی طرح، بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ 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)[1]، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین 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 استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه 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

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

« میکروبیولوژی مواد غذایی کنسرو شده- سترونی تجاری- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون »

(تجدید نظر چهارم)

رئیس:	**سمت و/یا نمایندگی**
رحیمی‌فرد، ناهید (دکترای تخصصی میکروبیولوژی)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی – سازمان غذا و دارو، مرکز آزمایشگاه های مرجع کنترل غذا و دارو
دبیر:	
اطهری‌نیا، معصومه (کارشناسی ارشد زیست‌شناسی)	پژوهشگاه استاندارد- پژوهشکده غذایی و کشاورزی- گروه پژوهشی میکروبیولوژی
اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفباء)	
ابراهیمی امام، غلامحسن (کارشناس صنایع غذایی)	کارشناس استاندارد
اکبری سلطانی، شهرو (کارشناس میکروبیولوژی)	اداره کل اجرای استاندارد
اوصیاء، نوشین (کارشناس صنایع غذایی)	سندیکای کمپوت و کنسرو
بلقدر، مهتاب (کارشناس صنایع غذایی)	شرکت کامبیز- انجمن مدیریت کیفیت ایران
بیگلری، راضیه (کارشناس میکروبیولوژی)	شرکت صنایع غذایی سحر همدان

کمیسیون فنی تدوین استاندارد (ادامه)

اعضاء:	**سمت و/یا نمایندگی**
جنتی، روشنک (کارشناس صنایع غذایی)	صنایع غذایی بهروز
جنانی، علیرضا (دکترا میکروبیولوژی)	انیستیتو پاستور ایران
دوچشمه، مهدی (کارشناس ارشد مهندسی محیط زیست)	پژوهشگاه استاندارد- پژوهشکده غذایی و کشاورزی- گروه پژوهشی میکروبیولوژی
داورزنی، ساره (کارشناس ارشد میکروبیولوژی مواد غذایی)	پژوهشگاه استاندارد- پژوهشکده غذایی و کشاورزی- گروه پژوهشی میکروبیولوژی
رشیدی، افشین (کارشناس ارشد صنایع غذایی)	شرکت بی همتا صنعت جاودانه
رمضانعلی، محمد تقی (کارشناس مدیریت)	اداره کل اجرای استاندارد
زیاری، مانا (کارشناس ارشد صنایع غذایی)	شرکت شیلتون
شرفی، نورا (دکترای میکروبیولوژی)	اداره کل استاندارد استان تهران
شفیعی، مهناز (کارشناس صنایع غذایی)	شرکت صنایع غذایی سحر همدان
صمیعی، بیتا (کارشناس ارشد بیوشیمی)	اداره کل استاندارد استان تهران
قربانی، پدرام (دکترا میکروبیولوژی)	دانشگاه تهران

کمیسیون فنی تدوین استاندارد (ادامه)

اعضاء:	**سمت و/یا نمایندگی**
کاظمی، مریم (کارشناس ارشد صنایع غذایی)	شرکت بی همتا صنعت جاودانه
کوهی کمالی دهکردی، پالیز (کارشناس ارشد میکروبیولوژی)	انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور
کهن نیا، ناصر (کارشناس ارشد میکروبیولوژی)	گروه تولیدی مهرام
محمدی، فرشاد (کارشناس ارشد میکروبیولوژی)	شرکت کدبانو (دلپذیر)
مختاری، فهیمدخت (کارشناس ارشد ایمونولوژی)	پژوهشگاه استاندارد- پژوهشکده غذایی و کشاورزی- گروه پژوهشی یکروبیولوژی
مهرپور، رامش (کارشناس، صنایع)	پژوهشگاه استاندارد- پژوهشکده غذایی و کشاورزی- گروه پژوهشی میکروبیولوژی
مهیمنی، بنفشه (کارشناس ارشد صنایع غذایی)	صنایع غذایی بهروز
موحد، فاطمه (کارشناس میکروبیولوژی)	شرکت کشت و صنعت ماریان
میرطاهری، مهسا (کارشناس ارشد صنایع غذایی)	شرکت کدبانو (دلپذیر)

فهرست **صفحه**

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ج
کمیسیون فنی تدوین استاندارد د
پیش گفتار ح

۱ هدف و دامنه کاربرد ۱
۲ مراجع الزامی ۱
۳ اصطلاحات و تعاریف ۱
۴ ویژگی ظاهری ۳
۵ ویژگی میکروبیولوژی ۳
۶ نمونه برداری ۴
۷ اصول آزمون ۴
۸ محیط های کشت و رقیق کننده ۴
۹ وسایل ۱۳
۱۰ روش اجرای آزمون ۱۳
۱۱ بیان و تفسیر نتایج ۱۹
۱۲ گزارش آزمون ۱۹
پیوست الف (اطلاعاتی)– فساد کنسروها ۲۰
پیوست ب (اطلاعاتی) - شمایی از دربازکن قوطی ۲۱
پیوست پ (اطلاعاتی) – کتابنامه ۲۲

پیش گفتار

استاندارد « میکروبیولوژی مواد غذایی کنسرو شده- سترونی تجاری – ویژگی‌ها و روش‌های آزمون» که نخستین‌بار در سال ۱۳۶۰ تدوین و منتشر شد، بر اساس پیشنهادهای دریافتی و بررسی و تأیید کمیسیون-های مربوط برای چهارمین بار مورد تجدیدنظر قرار گرفت و در چهارصد و سی و یکمین اجلاسیه کمیتهٔ ملی استاندارد بیولوژی و میکروبیولوژی مورخ ۱۳۹۵/۲/۱۴ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران بر اساس استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوهٔ نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت لزوم تجدیدنظر خواهند شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

این استاندارد جایگزین استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۳۲۶ : سال ۱۳۸۸ می‌شود.

منبع و مآخذی که برای تهیه و تدوین این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

COMPENDIUM OF METHODS FOR THE MICROBIOLOGIAL EXAMINATION OF FOOD, 4th ed., 2010, PP.577-582, (APHA).

میکروبیولوژی مواد غذایی کنسرو شده- سترونی تجاری – ویژگی‌ها و روش‌های آزمون

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد تعیین ویژگی‌ها و روش‌های آزمون میکروبیولوژی مواد غذایی کنسرو شده[1] می‌باشد.

این استاندارد برای مواد غذایی کنسرو شده‌ای که فرآیند حرارتی در مورد آنها اعمال شده و سترون تجاری هستند، کاربرد دارد.

۲ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد ملی به آنها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد ملی ایران محسوب می شود. درصورتی که به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه ها و تجدید نظرهای بعدی آن مورد نظر این استاندارد ملی نیست. در مورد مدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آنها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدید نظر و اصلاحیه های بعدی آنها مورد نظر است.

استفاده از مراجع زیر برای این استاندارد الزامی است:

۲-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۸۶۶۳، میکروبیولوژی مواد غذایی ،خوراک دام و آب -آماده سازی، ساخت، ذخیره سازی و آزمون عملکرد محیط های کشت

۲-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- الزامات کلی و راهنما برای آزمون‌های میکروبیولوژی

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات وتعاریف زیر به کار می‌رود:

1 -Canned food

۱-۳

مواد غذایی کنسرو شده

موادغذایی که با استفاده از فرآیند حرارتی مناسب به صورت تجاری سترون شده و در ظروف غیرقابل نفوذ، بسته‌بندی، نگهداری و حمل می‌شوند. این فرآورده‌ها فاقد نگهدارنده[1] بوده و در شرایط عادی (بدون کاهش دما ویا سرد کردن فرآورده) قابل نگهداری می‌باشند.

۲-۳

سترون تجاری

روشی که در آن مواد غذایی با کاربرد حرارت در ظروف نفوذناپذیر بسته‌بندی شده و فرآورده عاری از میکروارگانیسم‌های قادر به رشد، عامل فساد ویا بیماری‌زا در شرایط عادی نگهداری (بدون کاهش دما ویا سرد کردن فرآورده) باشد.

۳-۳

ظروف نفوذناپذیر

ظروفی که از نفوذ هوا، میکروارگانیسم‌ها و رطوبت جلوگیری کند و مانع فساد ماده غذایی پس از دربندی آن شود. این ظروف مانند قوطی‌های فلزی، شیشه‌ای، ظروف آلومینیومی لمینیت شده با پلی‌پروپیلین و ظروف قابل انعطاف مانند بسته‌های چند لایه مقوایی با لایه آلومینیوم جهت مواد خوراکی می‌باشد.

۴-۳

مواد غذایی کنسرو شده کم اسید

مواد غذایی کنسرو شده‌ای که دارای pH بیشتر از ۴٫۶ (۴٫۶ ≤ pH) است.

۵-۳

مواد غذایی کنسرو شده اسیدی یا اسیدی شده[2]

مواد غذایی کنسرو شده‌ای که به طور طبیعی دارای pH برابر ۴٫۶ و یا کمتر هستند (۴٫۶ ≥ pH) ، یا در pH برابر ۴٫۶ یا کمتر اسیدی شده‌اند (۴٫۶ ≥ pH).

۶-۳

باکتری‌های مزوفیل

باکتری‌هایی هستند که دمای بهینه برای رشد آنها ۳۰°C تا ۳۵°C است.

1 - Preservative
2 - Acidified

۷-۳

باکتری‌های ترموفیل

باکتری‌هایی هستند که دمای بهینه برای رشد آنها $55^{\circ}C$ است.

۸-۳

باکتری‌های بی هوازی

باکتری‌هایی هستند که در شرایط فقدان اکسیژن گازی یا محلول، رشد و تکثیر می‌کنند.

۴ ویژگی ظاهری

ویژگی ظاهری نمونه را هنگام دریافت و بعد از گرمخانه‌گذاری بررسی و ثبت کنید. درصورتی که نمونه دارای نشتی ویا بادکردگی سخت (طبق پیوست اطلاعاتی الف) هنگام دریافت و بعد از گرمخانه‌گذاری باشد، از انجام آزمون خودداری نموده و نمونه به دلیل نبودن سترون تجاری و عدم انطباق با این استاندارد مردود اعلام می‌شود.

یادآوری: برای کسب اطلاعات بیشتر در مورد ردیابی علل فساد از استانداردهای ملی ایران به شماره‌های ۳۱۸۸ و ۳۱۳۹ استفاده نمایید (پیوست اطلاعاتی پ).

۵ ویژگی‌های میکروبیولوژی

۵-۱ ویژگی‌های میکروبیولوژی مواد غذایی کنسرو شده کم اسید

ویژگی‌های میکروبیولوژی مواد غذایی کنسرو شده کم اسید باید با جدول شماره ۱ مطابقت داشته باشد.

جدول ۱- ویژگی‌های میکروبیولوژی مواد غذایی کنسرو شده کم اسید

ویژگی	حد قابل قبول (g/ ml)	روش آزمون
باکتری‌های مزوفیل	منفی	طبق بند ۱۰-۵-۲
باکتری‌های مزوفیل بی‌هوازی	منفی	طبق بند ۱۰-۵-۳
باکتری‌های ترموفیل	منفی	طبق بند ۱۰-۵-۴
باکتری‌های ترموفیل بی‌هوازی	منفی	طبق بند ۱۰-۵-۵

۵-۲ ویژگی‌های میکروبیولوژی فرآورده‌های اسیدی

ویژگی‌های میکروبیولوژی مواد غذایی کنسرو شده اسیدی ویا اسیدی شده باید با جدول شماره ۲ مطابقت داشته باشد.

جدول ۲- ویژگی‌های میکروبیولوژی مواد غذایی کنسرو شده اسیدی ویا اسیدی شده

ویژگی	حد قابل قبول (g/ ml)	روش آزمون
باکتری‌های مقاوم به اسید مزوفیل	منفی	طبق بند ۱۰-۶-۲
باکتری‌های مقاوم به اسید ترموفیل	منفی	طبق بند ۱۰-۶-۳
کپک و مخمر	منفی	طبق بند ۱۰-۶-۴

۶ نمونه برداری

نمونه‌هایی که به آزمایشگاه تحویل داده می‌شود باید نماینده واقعی کل نمونه بوده و در طی حمل، جابه‌جایی و نگهداری صدمه ندیده و تغییری درآن ایجاد نشده باشد. نمونه های جمع‌آوری شده باید در صورت امکان در همان روز نمونه برداری، مورد آزمون قرار گیرند. برای کسب آگاهی بیشتر از الزامات و شرایط کلی نمونه برداری و نگهداری نمونه به استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ مراجعه کنید.

۷ اصول آزمون

هنگام دریافت نمونه وضعیت ظاهری نمونه (طبق بند ۴) بررسی و در صورت داشتن شرایط، نمونه پذیرش می‌شود. به منظور فراهم کردن شرایط مناسب برای رشد میکروارگانیسم‌های احتمالی موجود درمواد غذایی کنسرو شده، نمونه‌ها (طبق بند۱۰-۱) گرمخانه‌گذاری شده، پس از پایان مدت گرمخانه‌گذاری، وضعیت ظاهری ظروف و محتویات نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده (طبق بند۱۰-۲) بررسی و پس از گندزدایی ظروف (طبق بند ۱۰-۳) درِ آن‌ها باز (طبق بند ۱۰-۴) و کشت‌های میکروبی (طبق بندهای ۱۰-۵ و ۱۰-۶) انجام می شود.

۸ محیط‌های کشت و رقیق‌کننده

۸-۱ کلیات

ترکیبات مورد استفاده در آزمون باید دارای کیفیت آزمایشگاهی بوده و برای اهداف میکروبیولوژی مناسب باشند. چنانچه محیط‌های کشت به صورت آماده در بازار در دسترس باشند، آنها را مطابق با دستورالعمل سازنده تهیه کنید. برای کنترل عملکرد و تضمین کیفیت محیط‌های کشت به استاندارد ملی ایران ۸۶۶۳ مراجعه کنید.

۸-۲ آب

آب مورد مصرف باید درجه خلوص آزمایشگاهی داشته و برای کشت میکروبیولوژی مناسب باشد. بدین منظور باید از آب مقطر تازه و یا دیونیزه و یا آب الترافیلتراسیون و یا آب مقطر تهیه شده بوسیله اسمز

معکوس[1] (RO) استفاده نمود. آب مورد مصرف باید عاری از سموم و مهارکننده رشد باکتریایی باشد. برای تهیه محیط‌های کشت از آب مقطر یا آب خالص طبق استاندارد ملی ایران شماره ۸۶۶۳ استفاده کنید.

۸-۳ دکستروز تریپتون براث (DTB)[2]

مواد تشکیل دهنده	مقدار
پپتون از کازئین	۱۰/۰g
D (+) گلوکز	۵/۰ g
بروموکروزول ارغوانی	۰/۰۴ g
آب	۱۰۰۰ ml

روش تهیه:

مواد بالا را در آب حل کنید و در صورت لزوم آن را حرارت دهید. محیط را در لوله‌های درپیچ‌دار به حجم‌های ۱۰ ml تقسیم کنید. سپس آن را دراتوکلاو ۱۲۱˚C ± ۳˚C به مدت ۱۵ min سترون کنید. pH محیط کشت را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی برابر ۰/۲ ± ۶/۸ در دمای ۲۵˚C باشد.

۸-۴ لیور براث (LB)[3]

مواد تشکیل دهنده	مقدار
جگر تازه گوسفند	۵۰۰/۰g
تریپتون	۱۰/۰ g
نشاسته محلول	۱ ml
دی‌پتاسیم فسفات	۱/۰ g
آب	به حجم ۱۰۰۰ ml برسانید

روش تهیه :

ابتدا چربی جگر تازه گوسفند را گرفته و آن را خرد کنید و سپس آن را با ۱ l آب مخلوط کنید و به مدت ۱h به آرامی حرارت دهید. سپس از صافی رد کرده، حجم شیرابه حاصل را مجدداً به ۱ l برسانید و تکه‌های جگر خورد شده جداشده از این شیرابه را خشک کنید. به شیرابه حاصل دی‌پتاسیم فسفات، تریپتون و نشاسته محلول را اضافه کرده و مجدداً آن را صاف کنید. سپس شیرابه را در حجم‌های ۱۵ml در لوله‌های آزمایش در پیچ‌دار تقسیم کرده و به هریک از این لوله‌ها تقریباً به نسبت مساوی از تکه‌های جگر خرد شده بالا را که خشک گردیده، اضافه کنید. سپس این لوله‌ها را در اتوکلاو ۱۲۱˚C ± ۳˚C به مدت ۱۵ min

1-Reverse osmosis
2 -Dextrose tryptone broth
3 -Liver Broth

سترون کنید. pH محیط کشت را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی برابر ۰٫۲± ۶٫۸ در دمای ۲۵°C باشد. محیط کشت آماده شده سترون را می‌توانید حداکثر تا چهار هفته در دمای۲°C± ۴°C نگهداری کنید. چنانچه محیط بلافاصله پس از آماده سازی مصرف نمی‌شود، آن را پیش از استفاده به مدت ۲۰ min در حمام ۱۰۰°C قرار دهید تا هوای آن کاملاً خارج شود.

۸-۵ پپتون یست اکستراکت بروموکروزول پرپل براث (PE2) [1]

مواد تشکیل دهنده	مقدار
پپتون هضم شده بافت حیوانی	۲۰٫۰ g
عصاره مخمر	۳٫۰ g
بروموکروزول ارغوانی (محلول الکلی ۲٪)	۲ ml
نخود	۸ تا ۱۰ عدد برای هرلوله
آب	۱۰۰۰ml

روش تهیه:

مواد بالا (به جز نخود) را در آب حل کنید و در صورت نیاز از حرارت ملایم استفاده کنید. سپس محیط را در حجم‌های ۱۹ ml درلوله‌های درپیچ‌دار که دارای ۸ تا ۱۰ عدد نخود هستند، تقسیم کنید. اجازه دهید تا محیط کشت به مدت ۱ h دراین حالت باقی مانده تا نخودها آب را به خود جذب کنند. سپس محیط کشت را در دمای ۳°C ± ۱۲۱°C به مدت ۱۵ min سترون کنید. محیط کشت آماده شده سترون را می‌توانید حداکثر تا چهار هفته در دمای ۲°C± ۴°C نگهداری کنید. چنانچه محیط کشت بلافاصله پس از آماده‌سازی مصرف نمی‌شود، آن را پیش از استفاده به مدت ۲۰min در حمام آب ۱۰۰°C قراردهید تا هوای آن کاملاً خارج شود.

برای تهیه محلول بروموکروزول دو درصد، مقدار 2g بروموکروزول ارغوانی را به ۱۰ml الکل اتیلیک خالص اضافه کرده و سپس آن را با آب به حجم ۱۰۰ml برسانید.

۸-۶ محیط کشت کوکد میت [2]

مواد تشکیل دهنده	مقدار
قلب یا جگرگاو	۴۵۰٫۰ g
پروتئوز پپتون یا پپتون	۲۰٫۰ g
گلوکز	۲٫۰ g
کلرید سدیم	۵٫۰ g
سود ۰٫۵ نرمال	۴۵۰ ml

1 - Peptone yeast extract bromocresol purple broth
2 - Cooked meat

آب	۱۰۰۰ ml

روش تهیه:

قلب یا جگر گاو را چرخ کرده و پس از اضافه کردن محلول سود، آن را به مدت ۲۰ min بجوشانید. محلول را به هم بزنید و پس از گذراندن آن از چند لایه تنزیب و خارج کردن آب اضافی، آن را روی کاغذ صافی گسترده تا آب آن تبخیر و کاملاً خشک شود. سدیم کلراید، گلوکز و پپتون را در ۱L آب حل کنید. سپس تعداد کافی لوله‌های درپیچ‌دار را انتخاب و به هریک از آنها ۱g تا ۱٫۵ g از قلب یا جگر خشک شده و ۱۰ ml از محلول سدیم کلراید، گلوکز و پپتون تهیه شده اضافه کنید. سپس به مدت ۱۵ min در اتوکلاو با دمای ۱۲۱°C ± ۳°C به مدت ۱۵ min سترون کنید. pH نهایی محیط کشت پس از سترون سازی باید برابر ۷٫۲ ± ۰٫۲ در دمای ۲۵°C باشد.

۸-۷ اورنج سرم آگار (OSA) [1]

مواد تشکیل دهنده	مقدار
پپتون از کازئین	۱۰٫۰g
عصاره مخمر	۳٫۰ g
گلوکز D(+)	۴٫۰ g
دی پتاسیم هیدروژن فسفات	۳٫۰ g
عصاره پرتقال	۵٫۰ g
آگار	۱۷٫۰ g
آب	۱۰۰۰ ml

روش تهیه:

مواد بالا را در آب حل کنید و در صورت لزوم حرارت دهید. پس از تقسیم محیط کشت در حجم‌های مورد نیاز، آن را در اتوکلاو با دمای ۱۱۵°C به مدت ۱۵ min سترون کنید. pH محیط کشت را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس ازسترون سازی برابر ۵٫۵ ± ۰٫۲ در ۲۵°C باشد.

یادآوری: با توجه به حساس بودن محیط کشت OSA از حرارت دادن محیط کشت، بیش از حد تعیین شده برای آن خودداری کنید.

1 -Orange serum agar

۸-۸ اورنج سرم براث (OSB) [1]

مواد تشکیل دهنده	مقدار
کازئین هیدرولیز شده آنزیمی [2]	۱۰/۰ g
دکستروز	۴/۰ g
عصاره پرتقال (به دست آمده از ۲۰۰ ml)	۹/۰ g
عصاره مخمر	۳/۰ g
دی پتاسیم فسفات	۹/۰ g
آب	۱۰۰۰ ml

روش تهیه:

مواد بالا را در آب حل کنید و در صورت لزوم حرارت دهید. پس از تقسیم محیط کشت در حجم‌های مورد نیاز، آن را در اتوکلاو با دمای ۱۱۵°C به مدت ۱۵ min سترون کنید. pH محیط کشت را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس ازسترون سازی برابر ۵/۵ ±۰/۲ در ۲۵°C باشد.

یادآوری: با توجه به حساس بودن محیط کشت OSB از حرارت دادن محیط کشت، بیش از حد تعیین شده برای آن خودداری کنید.

۸-۹ ترمواسیدورانس آگار (TAA) [3]

مواد تشکیل دهنده	مقدار
پروتئوز پپتون	۵/۰ g
عصاره مخمر	۵/۰ g
گلوکز D(+)	۵/۰ g
دی‌پتاسیم فسفات	۴/۰ g
منگنز سولفات	۰/۲ g
آگار	۲۰/۰ g
آب	۱۰۰۰ ml

1 -Orange serum broth
2 -Casein enzymic hydrolysate
3 -Thermoacidurans agar

روش تهیه:

مواد بالا را درآب حل کنید و در صورت لزوم آن را حرارت دهید. پس از تقسیم محیط کشت در حجم‌های مورد نیاز، آن را در اتوکلاو با دمای $۱۲۱^{\circ}C \pm ۳^{\circ}C$ به مدت ۱۵ min سترون کنید. pH محیط کشت را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی برابر ۰/۲ ± ۵ در $۲۵^{\circ}C$ باشد.

۸-۱۰ پوتیتو دکستروز آگار اسیدی شده (PDA) [1]

مواد تشکیل دهنده	مقدار
عصاره سیب زمینی (به دست آمده از ۲۰۰ g)	۴/۰ g
گلوکز D(+)	۲۰/۰ g
آگار	۱۵/۰ g
محلول اسید تارتاریک ٪ ۱۰	۱۴ ml
آب	۱۰۰۰ ml

روش تهیه :

مواد بالا به جز اسید تارتاریک را در آب حل کنید و درصورت لزوم حرارت دهید. پس از تقسیم محیط کشت در حجم‌های مورد نیاز آن را دراتوکلاو با دمای $۱۲۱^{\circ}C \pm ۳^{\circ}C$ به مدت ۱۵ min سترون کنید. pH محیط کشت را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی برابر ۰/۲ ± ۵/۶ باشد. قبل از استفاده، برای اسیدی شدن محیط کشت تهیه شده (pH =۳/۵) به ازای هر یک لیتر از این محیط کشت ۱۴ ml اسید تارتاریک ٪ ۱۰ اضافه کنید.

۸-۱۱ سابورود دکستروز کلرامفنیکل آگار (SDA) [2]

مواد تشکیل دهنده	مقدار
گلوکز D(+)	۴۰/۰ g
پپتون	۱۰/۰ g
آگار	۱۵/۰ g
آب	۱۰۰۰ ml

روش تهیه:

مواد بالا را در آب حل کنید و درصورت لزوم حرارت دهید. پس از تقسیم محیط کشت در حجم‌های مورد نیاز آن را دراتوکلاو با دمای $۱۲۱^{\circ}C \pm ۳^{\circ}C$ به مدت ۱۵ min سترون کنید. pH محیط کشت را به گونه‌ای

1 -Potato dextrose agar
2 -Sabouraud dextrose agar

تنظیم کنید که پس از سترون سازی برابر ۵/۶ ±۰/۲ باشد. قبل از استفاده، به ازای هر ml ۱۰۰ محیط کشت ml ۱ از محلول کلرامفنیکل ٪ ۱ به آن اضافه کنید.

۸-۱۲ ایبیست اکستراکت دکستروز کلرامفنیکل آگار (YGC)[1]

۸-۱۲-۱ محیط پایه

مواد تشکیل دهنده	مقدار
عصاره مخمر	۵/۰ g
دکستروز	۲۰/۰ g
آگار	۱۵/۰ g
آب	۱۰۰۰ ml

روش تهیه:

مواد بالا را در آب حل کنید و درصورت لزوم حرارت دهید. در صورت نیاز، pH محیط کشت را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون کردن برابر ۶/۶ در دمای ۲۵°C باشد. محیط کشت را در مقادیر ۱۰۰ ml تقسیم نموده و توسط اتوکلاو در دمای ۱۲۱°C ± ۳°C به مدت زمان ۱۵ min سترون کنید.

۸-۱۲-۲ محلول کلرامفنیکل

مواد تشکیل دهنده	مقدار
کلرامفنیکل	۰/۱ g
آب مقطر	۱۰۰۰ ml

روش تهیه:

کلرامفنیکل را درآب حل کرده و آن را با استفاده از صافی غشایی با اندازه روزنه ۰/۲۲ µm سترون کنید. محلول باید بلافاصله پیش از استفاده و به صورت تازه تهیه شود.

۸-۱۲-۳ محیط کامل

در هنگام آزمایش ml ۱۰ از محلول بالا را به ml ۱۰۰ از محیط کشت پایه بند ۸-۱۲-۱ که دمای آن حدود ۴۵°C است اضافه کنید.

۸-۱۳ محلول رقیق کننده رینگر ۱/۴

مواد تشکیل دهنده	مقدار
کلرور سدیم	۲/۲۵ g

1 -Yeast extract dextrose chloromphenicool

کلرور پتاسیم	۰/۱۰۵ g
کلرور کلسیم بدون آب	۰/۰۶ g
کربنات سدیم هیدروژن	۰/۰۵ g
آب	۱۰۰۰ ml

روش تهیه:
مواد بالا را در آب حل کنید. pH را به گونه ای تنظیم کنید که بعد از سترون کردن ۰/۲ ± ۶/۹ در ۲۵°C باشد.

۸-۱۴ اسید براث (AB) [1]

مواد تشکیل دهنده	مقدار
پلی پپتون	۵/۰ g
عصاره مخمر	۵/۰ g
دکستروز	۵/۰ g
مونوپتاسیم فسفات	۵/۰ g
آب	۱۰۰۰ ml

روش تهیه:
مواد بالا را در آب حل کنید و درصورت لزوم حرارت دهید. پس از تقسیم محیط کشت در ظروف مناسب، آن را در اتوکلاو با دمای ۳°C ± ۱۲۱°C به مدت زمان ۱۵ min سترون کنید. pH را به گونه‌ای تنظیم کنید که بعد از سترون کردن ۰/۲ ± ۵/۰ در ۲۵°C باشد.

۸-۱۵ محیط کشت تریپتیک سوی آگار[2] (TSA)

مواد تشکیل دهنده	مقدار
هضم شده پانکراتیک کازئین	۱۵/۰ g
هضم شده پاپائیک سویا[3]	۵/۰ g
کلرید سدیم	۵/۰ g
آگار	۱۵/۰ g
آب	۱۰۰۰ ml

1 - Acid Broth
2 - Tribtic soya agar
3 - Papaic digest of soybean meal

روش تهیه:

مواد بالا را در آب حل کنید و درصورت لزوم حرارت دهید. پس از تقسیم محیط کشت در ظروف مناسب، آن را در اتوکلاو با دمای $121^{\circ}C \pm 3^{\circ}C$ به مدت زمان 15 min سترون کنید. pH را به گونه‌ای تنظیم کنید که بعد از سترون کردن برابر ۰٫۲ ± ۷٫۳ در دمای آزمایشگاه باشد.

۸-۱۶ محیط کشت پلیت کانت آگار [1] (PCA)

مواد تشکیل دهنده	مقدار
هضم شده آنزیمی کازئین	۵٫۰ g
عصاره مخمر	۲٫۵ g
گلوکز بدون آب	۱٫۰ g
آگار	۹٫۰ g تا ۱۸٫۰ g
آب	۱۰۰۰ ml

روش تهیه:

مواد بالا را در آب حل کنید و درصورت لزوم حرارت دهید. آن را در اتوکلاو با دمای $121^{\circ}C \pm 3^{\circ}C$ به مدت زمان 15 min سترون کنید. در صورت لزوم، pH را طوری تنظیم کنید که پس از سترون سازی برابر ۰٫۲ ± ۷ در ۲۵ °C باشد.

۸-۱۷ محلول‌های مورد نیاز

۸-۱۷-۱ الکل اتیلیک ٪۷۰

این محلول برای سترون سازی سطوح کار مورد استفاده قرار می گیرد. برای تهیه می توان از هر الکلی با هر درجه خلوصی استفاده کرد. به این منظور ۷۰ml از الکل با آب مقطر (تا درجه پایه اولیه الکل) به حجم ۱۰۰ ml رسانده می‌شود.

۸-۱۷-۲ محلول پرکلرین ppm ۱۰۰

این محلول برای سترون سازی ظروف مواد غذایی کنسرو شده مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۸-۱۸ محلول های رنگ آمیزی

برای رنگ‌آمیزی میکروارگانیسم‌های احتمالی باید از رنگ‌آمیزی ساده استفاده شود. به این منظور از رنگ کریستال ویوله (محلول٪ ۰٫۵ تا ٪ ۱) استفاده می شود.

1 -Plate count agar

۹ وسایل

تمام وسایل و قسمت‌هایی از وسایل که بطور مستقیم با نمونه یا محیط کشت در تماس است باید سترون شده باشد. از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی طبق استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ و همچنین وسایل زیر استفاده کنید:

۹-۱ دربازکن قوطی، دربازکن مخصوصی است که برای بازکردن ظروف فلزی و شیشه‌ای طراحی شده است، این دربازکن به لایه‌های ظروف هیچگونه آسیبی وارد نمی‌کند. همچنین می‌توانید ازسایر دربازکن‌های فلزی با قابلیت استریل شدن نیز استفاده نماید (طبق پیوست اطلاعاتی ب).

۹-۲ اتوکلا، با قابلیت تنظیم در دمای $121^{\circ}C \pm 3^{\circ}C$ و $115^{\circ}C$ برای سترون‌سازی با حرارت مرطوب

۹-۳ فور یا آون، با قابلیت تنظیم در دمای $170^{\circ}C$ تا $180^{\circ}C$ برای سترون‌سازی با حرارت خشک

۹-۴ گرمخانه، با قابلیت تنظیم در دماهای $30^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ و $35^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ و $55^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ و $25^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$

۹-۵ حمام آب، قابل تنظیم دردماهای $45^{\circ}C$ ، $80^{\circ}C$ و $100^{\circ}C$

۹-۶ pH متر، با دقت $0/1 \pm$ واحد pH در دمای $25^{\circ}C$

۹-۷ لوله کشت درپیچ دار، در اندازه $150\ mm \times 20\ mm$

۹-۸ پلیت، به قطر $90\ mm$ تا $100\ mm$

۹-۹ اسپاچول یا قاشقک، از جنس فولاد زنگ نزن

۹-۱۰ مخلوط‌کن، مخلوط‌کن ضربه‌ای مانند استومکر یا چرخشی مانند بلندر

۹-۱۱ جار بی‌هوازی به همراه ملزومات ایجاد شرایط بی هوازی

یادآوری: برای ایجاد شرایط بی هوازی می توان از کیت یا دستگاه ایجاد شرایط بی هوازی استفاده کرد.

۱۰ روش اجرای آزمون

آزمون سترونی تجاری مواد غذایی کنسرو شده بهتر است در زیر هود لامینار انجام گیرد. آزمایه‌ها را می‌توان در اتاقی که ازهرگونه منابع آلودگی و گرد و غبار محافظت شده و سطوح کاری آن، قبل از انجام آزمون، با

استفاده ازالکل اتیلیک ٪۷۰ (طبق بند ۸-۱۷-۱) یا ضدعفونی کننده مناسب دیگر گندزدایی شده باشد، نیز آزمون نمود.

۱۰-۱ گرمخانه‌گذاری

۱۰-۱-۱ پاک کردن و شستشوی سطوح خارجی

پس از برداشتن برچسب ظروف کنسرو (درصورت وجود)، آنها را با الکل ٪۷۰ یا یک ضدعفونی کننده مناسب دیگر تمیز کنید و اجازه دهید باقی مانده ماده پاک کننده از سطح ظرف در دمای محیط خشک شود.

۱۰-۱-۲ شناسه‌گذاری

هریک از ظروف نمونه را با استفاده از قلم نوک الماس ویا وسیله مناسب دیگر، به گونه‌ای شناسه‌گذاری کنید که درهنگام گرمخانه‌گذاری و آزمون، شناسه آن از بین نرود. در شناسه‌گذاری تاریخ شروع گرمخانه‌گذاری نیز باید قید شود.

۱۰-۱-۳ تعداد نمونه و مدت گرمخانه‌گذاری

۳ نمونه را در دمای$30^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ و یا $35^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ به مدت ۱۰ تا ۱۴روز و ۳ نمونه را در دمای $55^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ را به مدت ۵ تا ۷ روز گرمخانه‌گذاری کنید.

یادآوری: درمواردی که به دلایلی تعداد نمونه ارسالی به آزمایشگاه کمتر از ۳ باشد، آزمون روی همان تعداد انجام می‌شود. در این صورت باید تعداد نمونه مورد آزمون در گزارش آزمون قید شود.

۱۰-۲ بررسی وضعیت ظاهری ظروف

پس از پایان دوره گرمخانه‌گذاری و رسیدن دمای نمونه‌ها به دمای محیط، وضع ظاهری کلیه نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده را از نظر وجود نشتی و یا بادکردگی بررسی و مشخص و طبق بند ۴ عمل نمایید.

۱۰-۳ گندزدایی ظروف

پس از بررسی وضع ظاهری نمونه‌ها و قبل از انجام آزمون، کلیه نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده را بر روی سطوح کاری به گونه‌ای قرار دهید که انتهای شناسه‌گذاری نشده آنها رو به طرف بالا باشد. سپس انتها و لبه‌های مجاور را با محلول پرکلرین ۱۰۰ppm (طبق بند ۸-۱۷-۲) یا محلول گندزدای مناسب دیگری که روی باکتری‌ها و قارچ‌ها موثر باشد، به مدت ۱۰min گندزدایی کنید. به این صورت که محلول گندزدا را روی در ظروف (انتهای شناسه‌گذاری نشده) بریزید. پس از گرفتن رطوبت اضافی این ظروف با استفاده از دستمال سترون خشک، ظروف را در دمای محیط خشک کنید. برای اطمینان از خشک شدن کامل ظروف، انتهای گندزدایی شده را از قسمت آبی شعله عبور دهید.

یادآوری۱: الکل٪۷۰ تنها بر باکتری‌های موثر می‌باشد.
یادآوری۲: در مورد ظروف دارای بادکردگی، برای تبخیر پرکلرین از شعله استفاده نکنید.
یادآوری۳: پس از گندزدایی ظروف، درصورت نیاز به جابجایی آنها، از وسایل سترون مانند دستکش، انبرک و یا سایر وسایل مناسب استفاده کنید.

۱۰-۴ بازکردن ظروف

پس از باز کردن در کلیه ظروف گرمخانه‌گذاری شده، محتویات هریک از آنها را از نظر وجود کف درسطح، بوی غیرطبیعی و قوام، با نمونه قبل از گرمخانه‌گذاری مقایسه و ثبت کنید.

۱۰-۴-۱ ظروف فلزی

پس از گندزدایی ظروف، درست پیش از باز کردن در آن، محتویات ظرف را کاملاً مخلوط کنید. این عمل را با چرخاندن کامل ظرف به مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه انجام دهید. ظرف را روی سطح میز طوری قرار دهید که انتهای شناسه‌گذاری نشده آن به طرف بالا قرارگیرد. سپس با استفاده از دربازکن سترون و با رعایت شرایط اسپتیک در ظرف را به گونه‌ای باز کنید که نمونه برداری از محتویات آن به راحتی امکان پذیر باشد. برای بازکردن در ظروف آسان بازشو از سمت دیگر ظرف (غیراز سمت آسان بازشو) استفاده کنید.

یادآوردی: در مواردی که سترون کردن دربازکن امکان پذیر نیست، دربازکن را در الکل اتیلیک ٪۷۰ غوطه‌ور و با عبور از قسمت آبی شعله گندزدایی کنید.

۱۰-۴-۲ ظروف شیشه‌ای

پس از گندزدایی ظروف، درست پیش از بازکردن در آن با چرخاندن کامل ظرف (مانند ظروف فلزی) محتویات آن را کاملاً مخلوط کنید. سپس با استفاده از دربازکن سترون ویا گندزدائی شده و یا با روش مناسب دیگر با رعایت شرایط اسپتیک در ظرف را بازکنید.

۱۰-۴-۳ ظروف قابل انعطاف

پس از گندزدایی ظروف، درست پیش ازباز کردن درآن، با تکان دادن ظرف، محتویات آن را کاملاً مخلوط کنید. چنانچه فرآورده داخل ظرف قابل جابه جا شدن باشد، آن را با فشار از یک سمت ظرف دور کنید و با استفاده از قیچی سترون آن را برش دهید. سپس بدون تماس دست با انتهای بریده شده، آن را باز کنید.

۱۰-۴-۴ ظروف فلزی و شیشه‌ای دارای بادکردگی

ظروف دارای بادکردگی (غیر از بادکردگی نوع سخت) را پیش از باز کردن، در یخچال قراردهید تا سرد شود. پس از گندزدایی ظرف و مخلوط کردن محتویات آن، با استفاده از دربازکن سترون و یا گندزدایی شده و با رعایت شرایط اسپتیک، در ظرف را به گونه‌ای باز کنید که نمونه برداری از محتویات آن به راحتی امکان پذیر باشد. هنگام بازکردن در ظروف بادکرده، برای جلوگیری از ریزش محتویات آن‌ها به بیرون و آلودگی

محیط اطراف، قیف شیشه‌ای سترون را به صورت واژگون روی در ظرف قراردهید. سپس با استفاده از وسیله نوک تیز سترون و با ضربه از قسمت سوراخ قیف، در ظرف را سوراخ کرده، اجازه دهید تا گاز درون ظرف خارج شود و سپس با رعایت شرایط آسپتیک در ظرف را باز کنید.

۱۰-۴-۵ ظروف قابل انعطاف بادکرده

برای بازکردن در ظروف قابل انعطاف بادکرده (غیر از بادکردگی نوع سخت) ، ابتدا آن‌ها را در کیسه پلاستیکی سترون قرار داده و انتهای باز کیسه را در اطراف قیچی سترون محکم نگهدارید. سپس با استفاده از قیچی ظرف را برش دهید.

۱۰- ۵ آزمون مواد غذایی کنسرو شده کم اسید

۱۰-۵-۱ آماده سازی آزمونه

محتویات هر ۳ ظرف آزمایه و یا بخشی ازآن (مقدار برداشتی به حجم نمونه اولیه بستگی دارد) را پس از بازکردن در آن، در یک ظرف سترون با یکدیگر کاملاً مخلوط کنید و یا هر یک از ظرف‌های آزمایه را به صورت جداگانه آزمون نمایید.

در صورتی که قسمت عمده آزمایه به صورت فاز مایع می‌باشد (مانند کنسرو لوبیا چیتی) برای برداشت آزمونه از فاز مایع آن استفاده کنید. درصورتی که قسمت عمده آزمایه به صورت جامد باشد (مانند کنسرو ماهی تن، کنسرو انواع خورش) برای تهیه آزمونه، محتویات آزمایه را با استفاده از مخلوط کن (طبق بند ۹-۱۰) کاملاً مخلوط کنید.

۱۰-۵-۲ جستجوی باکتری‌های مزوفیل

۲g یا ۲ml از هر آزمایه مخلوط شده (طبق بند ۱۰-۵-۱) را به ۲ لوله، (هر لوله ۱g یا ۱ml)، دارای محیط کشت DTB (طبق بند ۸-۳) بیفزایید. پس از مخلوط کردن محیط کشت و نمونه، لوله‌ها را در شرایط هوازی و در دمای ۳۰˚C ±۱˚C و یا ۳۵˚C ±۱˚C به مدت ۳ تا ۵ روز گرمخانه‌گذاری کنید. پس از پایان گرمخانه‌گذاری لوله‌ها را از نظر کدورت و یا تغییر رنگ بررسی کنید. در صورت وجود کدورت و یا تغییر رنگ با استفاده از لوپ سترون از هر لوله مشکوک بر روی محیط کشت TSA (طبق بند ۸-۱۵) یا PCA (طبق بند ۸-۱۶) کشت خطی دهید و در دمای ۳۰˚C ±۱˚C و یا ۳۵˚C ±۱˚C به مدت ۲۴h تا ۴۸h گرمخانه‌گذاری نمایید. پس از سپری شدن مدت زمان گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها را از نظر رشد کلنی بررسی کنید.

۱۰-۵-۳ جستجوی باکتری‌های مزوفیل بی‌هوازی

۲g یا ۲ml از هر آزمایه مخلوط شده (طبق بند ۱۰-۵-۱) را به ۲ لوله، (هر لوله ۱gیا ۱ml)، دارای محیط کشت LB (طبق بند ۸-۴) یا محیط کشت PE2 (طبق بند ۸-۵) یا کوکد میت (طبق بند ۸-۶) بیفزایید. پس از مخلوط کردن محیط کشت و نمونه، لوله‌ها را در شرایط بی‌هوازی و در دمای

$30^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ و یا $35^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ به مدت ۳ تا ۵ روز گرمخانه‌گذاری کنید. پس از پایان گرمخانه‌گذاری لوله را از نظر کدورت و تغییر رنگ بررسی کنید. در صورت وجود کدورت و یا تغییر رنگ با استفاده از لوپ سترون از هر لوله مشکوک بر روی محیط کشت TSA (طبق بند ۸-۱۵) یا PCA (طبق بند ۸-۱۶) کشت خطی دهید و در دمای $30^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ و یا $35^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ به مدت ۴۸ h تا ۲۴ h درشرایط بی‌هوازی گرمخانه گذاری نمایید. پس از سپری شدن مدت زمان گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها را از نظر رشد کلنی بررسی کنید. برای ایجاد شرایط بی‌هوازی می‌توان از هر یک از روش‌ها مطابق بند ۸-۶ استفاده نمود.

یادآوری۱: برای بی‌هوازی کردن لوله‌ها می‌توانید از وازپار استفاده کنید. برای تهیه، مقدار مساوی از وازلین و پارافین را مخلوط و در اتوکلاو در دمای ۳۰C ± ۱۲۱°C به مدت زمان ۱۵ min سترون کنید. همچنین می‌توانید از آگار یا روغن معدنی(پارافین مایع) ویا جار بی‌هوازی نیز برای بی‌هوازی کردن استفاده کنید.

یادآوری۲: درصورت استفاده از جار بی‌هوازی باید دقت شود در لوله‌ها محکم بسته نشود.

۱۰-۵-۴ جستجوی باکتری‌های ترموفیل

۲g یا ۲ml از هر آزمایه مخلوط شده (طبق بند ۱۰-۵-۱) را به ۲ لوله، (هر لوله ۱g یا ۱ml)، دارای محیط کشت DTB (طبق بند ۸-۳) بیفزایید. پس از مخلوط کردن محیط کشت و نمونه، لوله‌ها را در شرایط هوازی و در دمای $55^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ به مدت ۳ تا ۵ روز گرمخانه گذاری کنید. پس از پایان گرمخانه‌گذاری لوله را از نظر کدورت و یا تغییر رنگ بررسی کنید. در صورت وجود کدورت و یا تغییر رنگ با استفاده از لوپ سترون از هر لوله مشکوک بر روی محیط کشت TSA (طبق بند ۸-۱۵) یا PCA (طبق بند ۸-۱۶) کشت خطی دهید و در دمای $55^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ به مدت ۴۸ h تا ۲۴ h گرمخانه‌گذاری نمایید. پس از سپری شدن مدت زمان گرمخانه گذاری پلیت‌ها را از نظر رشد کلنی بررسی کنید.

۱۰-۵-۵ جستجوی باکتری‌های ترموفیل بی‌هوازی

۲g یا ۲ml از هر آزمایه مخلوط شده (طبق بند ۱۰-۵-۱) را به ۲ لوله، (هر لوله ۱g یا ۱ml)، دارای محیط کشت LB (طبق بند ۸-۳-۲) یا محیط کشت PE2 (طبق بند ۸-۵) یا محیط کشت کوکد میت (طبق بند ۸-۶) اضافه کنید. پس از مخلوط کردن محیط کشت و نمونه، لوله‌ها را در شرایط بی‌هوازی و در دمای $55^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ به مدت ۳ تا ۵ روز گرمخانه گذاری کنید. پس از پایان گرمخانه گذاری لوله را از نظر کدورت و تغییر رنگ بررسی کنید. در صورت وجود کدورت و یا تغییر رنگ با استفاده از لوپ سترون از هر لوله مشکوک بر روی محیط کشت TSA (طبق بند ۸-۱۵) یا PCA (طبق بند ۸-۱۶) کشت خطی دهید و در دمای $55^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ به مدت ۴۸ h تا ۲۴ h درشرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری نمایید. پس از سپری شدن مدت زمان گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها را از نظر رشد کلنی بررسی کنید.

یادآوری۱: برای بی‌هوازی کردن لوله‌ها می‌توانید از وازپار استفاده کنید. برای تهیه، مقدار مساوی از وازلین و پارافین را مخلوط و در اتوکلاو در دمای ۳°C ± ۱۲۱°C به مدت زمان ۱۵ min سترون کنید. همچنین می‌توانید از آگار یا روغن معدنی (پارافین مایع) و یا جار بی‌هوازی نیز برای بی‌هوازی کردن استفاده کنید.

یادآوری۲: درصورت استفاده از جار بی‌هوازی باید دقت شود در لوله‌ها محکم بسته نشود.

۱۰-۶ آزمون مواد غذایی کنسرو شده اسیدی و یا اسیدی شده

۱۰-۶-۱ آماده‌سازی آزمونه

محتویات هر ۳ ظرف آزمایه ویا بخشی ازآن (مقدار برداشتی به حجم نمونه اولیه بستگی دارد) را پس از بازکردن در آن، قبل از کشت، در یک ظرف استریل با یکدیگر کاملاً مخلوط کنید و یا هر یک از ظرف‌های آزمایه را به صورت جداگانه آزمون نمایید.

درصورتی که قسمت عمده آزمایه به صورت فاز مایع می‌باشد (مانند انواع کمپوت) برای برداشت آزمونه از فاز مایع آن استفاده کنید. درصورتی که قسمت عمده آزمایه به صورت نیمه جامد باشد (مانند انواع رب گوجه‌فرنگی) برای تهیه آزمونه محتویات آزمایه مخلوط شده را به نسبت مساوی با محلول رقیق کننده (طبق بند ۸-۱۳) رقیق نمایید و حجمی معادل عکس نسبت رقیق شده که دارای ۱ g از نمونه می‌باشد را برای آزمون بردارید.

۱۰-۶-۲ جستجوی باکتری‌های مقاوم به اسید مزوفیل

۲g یا ۲ml از هر آزمایه مخلوط شده (یا آزمونه رقیق شده طبق بند ۱۰-۶-۱) را به دو لوله، (هرلوله ۱g یا ۱ ml) دارای محیط کشت OSB (طبق بند ۸-۸) یا AB (طبق بند ۸-۱۴) بیفزایید. پس از مخلوط کردن محیط کشت و نمونه، لوله‌ها را در دمای ۱°C ± ۳۰°C و یا ۱°C ± ۳۵°C به مدت ۳ تا ۵ روز گرمخانه‌گذاری کنید. پس از پایان دوره گرمخانه‌گذاری لوله‌ها را از نظر کدورت و یا تغییر رنگ بررسی کنید. در صورت وجود کدورت و یا تغییر رنگ با استفاده از لوپ سترون از لوله مشکوک بر روی محیط کشت OSA (طبق بند ۸-۷) کشت خطی دهید. سپس پلیت‌ها را در دمای ۱°C ± ۳۰°C و یا ۱°C ± ۳۵°C به مدت ۴۸ h تا ۲۴ h گرمخانه‌گذاری نمایید. پس از سپری شدن مدت زمان گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها را از نظر رشد کلنی بررسی کنید.

۱۰-۶-۳ جستجوی باکتری‌های مقاوم به اسید ترموفیل

۲g یا ۲ml از هر آزمایه مخلوط شده (یا آزمونه رقیق شده طبق بند ۱۰-۶-۱) را به دو لوله، (هرلوله ۱g یا ۱ ml)، دارای محیط کشت OSB (طبق بند ۸-۸) یا AB (طبق بند ۸-۱۴) بیفزایید. پس از مخلوط کردن محیط کشت و نمونه، لوله‌ها را در شرایط هوازی و در دمای ۱°C ± ۵۵°C به مدت ۳ تا ۵ روز گرمخانه‌گذاری کنید. پس از پایان گرمخانه‌گذاری لوله‌ها را از نظر کدورت و یا تغییر رنگ بررسی کنید. در صورت وجود کدورت و یا تغییر رنگ با استفاده از لوپ سترون از لوله مشکوک بر روی محیط کشت TAA

(طبق بند ۸-۹) کشت خطی دهید. سپس پلیت‌ها را در دمای ۵۵°C ± ۱°C به مدت ۴۸ h تا ۲۴ h گرمخانه‌گذاری نمایید. پس از سپری شدن مدت زمان گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها را از نظر رشد کلنی بررسی کنید.

۱۰-۶-۴ جستجوی کپک و مخمر

۲g یا ۲ml از هر آزمایه مخلوط شده (یا آزمونه رقیق شده طبق بند ۱۰-۶-۱) را به دولوله، (هرلوله ۱g یا ml ۱)، دارای محیط کشت OSB (طبق بند ۸-۸) یا AB (طبق بند ۸-۱۴) بیفزایید. پس از مخلوط کردن محیط کشت و نمونه، لوله‌ها را در دمای ۲۵°C ± ۱°C به مدت ۳ تا ۵ روز گرمخانه گذاری کنید. پس از پایان دوره گرمخانه‌گذاری لوله‌ها را از نظر کدورت و تغییر رنگ بررسی کنید. در صورت وجود کدورت و یا تغییر رنگ با استفاده از لوپ سترون ازلوله مشکوک بر روی محیط کشت PDA (طبق بند ۸-۱۰) یا SDA (طبق بند ۸-۱۱) یا YGC (طبق بند ۸-۱۲) کشت خطی دهید. سپس پلیت‌ها را در دمای ۲۵°C ± ۱°C به مدت ۵ روز گرمخانه گذاری کنید. پس از پایان زمان گرمخانه گذاری، پلیت‌ها را از نظر رشد کلنی بررسی کنید.

۱۱ بیان و تفسیر نتایج

پس از انجام آزمون، نتایج را برای هر گروه از میکروارگانیسم‌ها به صورت مثبت یا منفی درگرم یا میلی‌لیتر بیان کنید. در صورتی که ۳ آزمایه جداگانه مورد آزمون قرار گرفته باشد، مثبت بودن هر یک از آنها به تنهایی، نشانگر غیر قابل قبول بودن نمونه می باشد.

۱۲ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی‌های زیر باشد:

۱۲-۱ مشخصات کامل نمونه

۱۲-۲ تاریخ نمونه بردای

۱۲-۳ تاریخ انجام آزمون

۱۲-۴ تاریخ گزارش آزمون

۱۲-۵ روش آزمون طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۲۶

۱۲-۶ نتایج آزمون طبق بند ...

۱۲-۷ نام، نام خانوادگی و امضای آزمایش کننده

پیوست (الف)
اطلاعاتی
فساد کنسرو

الف ۱ – فساد مواد غذایی

حالتی است که در آن ماده غذایی به دلیل فعالیت میکروبی یا شیمیایی به صورت غیرقابل مصرف در می‌آید. فساد ممکن است پیش یا پس از بسته‌بندی در ماده غذایی رخ دهد.

الف ۲ – فساد صاف[1]

نوعی فساد در انواع کنسروها است که بوسیله باکتری‌های گرماپای و یا گرمادوست اسپوردار مانند *باسیلوس استئاروترموفیلوس*[2] و یا باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری ایجاد می‌شود. این باکتری‌ها با مصرف کربوهیدرات‌ها تولید اسید کرده اما گاز تولید نمی‌کنند و در نتیجه درکنسرو هیچگونه بادکردگی مشاهده نمی‌شود.

الف ۳ – بادکردگی فلیپر[3]

قوطی‌هایی که دو انتهای آنها مسطح است ولی برای قرار گرفتن در یک سطح صاف خلاء کافی ندارند. بنابراین وارد کردن ضربه به یک انتهای قوطی سبب محدب شدن انتهای دیگر قوطی می‌شود که با فشار به آن دوباره به حالت عادی بر می‌گردد.

الف ۴ – بادکردگی اسپرینگر[4]

قوطی‌هایی که یک انتهای آن باد کرده است و با وارد کردن فشار به انتهای بادکرده، انتهای دیگر قوطی برجسته می‌شود.

الف ۵ – بادکردگی نرم[5]

قوطی‌هایی که هر دو انتهای آن به حدی برجسته است که به آسانی با فشار انگشت به سمت داخل فرورفتگی پیدا می‌کند.

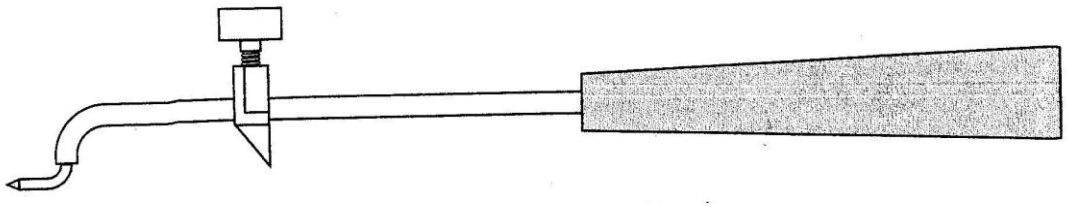
الف ۶ – بادکردگی سخت [6]

قوطی‌هایی که هر دو انتهای آن به حدی برجسته است که با فشار انگشت فرو رفتگی پیدا نمی‌کند.

---

1 -Flat sour
2 -*Bacillus stearothermophillus*
3 -Flipper
4 -Springer
5 -Soft well
6 -Hard well

پیوست (ب)
اطلاعاتی
شمایی از در بازکن قوطی



شکل ۱: در باز کن قوطی

پیوست (پ)
اطلاعاتی
کتابنامه

[۱] استاندارد ملی ایران شماره ۳۱۳۹، مواد غذایی کم اسید بسته‌بندی شده در ظروف نفوذناپذیر- ردیابی علل فساد

[۲] استاندارد ملی ایران شماره ۳۱۸۸، میکروبیولوژی مواد غذایی – ردیابی علل فساد در مواد غذایی اسیدی بسته‌بندی شده در ظروف نفوذ ناپذیر