سیستم مدیریت ایزو

www.isomanagement.ir

تماس تلفنی جهت دریافت مشاوره:

۱. مشاور دفتر تهران (آقای محسن ممیز)

۰۹۱۲ ۹۶۳ ۹۳۳۶

۲. مشاور دفتر اصفهان (سرکار خانم لیلا ممیز)

۰۹۱۳ ۳۲۲ ۸۲۵۹

مجموعه **سیستم مدیریت ایزو** با هدف بهبود مستمرعملکرد خود و افزایش رضایت مشتریان سعی برآن داشته، کلیه استانداردهای ملی و بین المللی را در فضای مجازی نشر داده و اطلاع رسانی کند، که تمام مردم ایران از حقوق اولیه شهروندی خود آگاهی لازم را کسب نمایند و از طرف دیگر کلیه مراکز و کارخانه جات بتوانند به راحتی به استانداردهای مورد نیاز دسترسی داشته باشند.

این موسسه اعلام می دارد در کلیه گرایشهای سیستم های بین المللی ISO پیشگام بوده و کلیه مشاوره های ایزو به صورت رایگان و صدور گواهینامه ها تحت اعتبارات بین المللی سازمان جهانی IAF و تامین صلاحیت ایران می باشد.

هم اکنون سیستم خود را با معیارهای جهانی سازگارکنید...

ISO

9001
14001
18001

CE

GMP
GAP
22716

IMS
HSE-MS

22000
HACCP

45001

INSO
15496
1st Edition
2018
Modification of
BS EN 13783:
2002

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران

استاندارد ملی ایران
۱۵۴۹۶
چاپ اول
۱۳۹۷

مواد غذایی- آشکارسازی مواد غذایی پرتودهی شده با استفاده از روش فیلتر اپی‌فلورسنت مستقیم/ شمارش پلیت هوازی- روش غربال‌گری- روش آزمون

Foodstuffs– Detection of irradiated food using Direct Epifluorescent Filter Technique/Aerobic Plate Count (DEFT/APC) – Screening method– Test method

ICS:67.050

استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۵۴۹۶ (چاپ اول) : سال ۱۳۹۷

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. gov.ir

وبگاه: http://www.isiri.gov.ir

Iranian National Standardization Organization (INSO)

No. 2592 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. gov.ir

Website: http://www.isiri.gov.ir

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 به‌منظور 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 صدور گواهی 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

« مواد غذایی- آشکارسازی مواد غذایی پرتودهی شده با استفاده از روش فیلتر اپی‌فلورسنت مستقیم/ شمارش پلیت هوازی- روش غربال‌گری- روش آزمون»

رئیس:	**سمت و/یا محل اشتغال:**
سیحون، مرضیه (کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی)	سازمان انرژی اتمی ایران- پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای- پژوهشکده کاربرد پرتوها
دبیران:	
احمدی‌روشن، مرضیه (کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی)	سازمان انرژی اتمی ایران- پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای- پژوهشکده کاربرد پرتوها
برنجی اردستانی، سمیرا (دکتری تخصصی مهندسی علوم و صنایع غذایی)	سازمان انرژی اتمی ایران- پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای- پژوهشکده کاربرد پرتوها
اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
پزشک، لیلا (کارشناسی ارشد مدیریت تکنولوژی)	انجمن مواد جهش‌زای زیست محیطی ایران
جانعلی‌پور شهرانی، محمدرضا (کارشناسی ارشد فیزیک حالت جامد)	پژوهشکده سیستم‌های پیشرفته صنعتی
جمالی، سپیده السادات (کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی)	سازمان انرژی اتمی ایران- شرکت توسعه کاربرد پرتوها
حیدریه، مرضیه (دکتری دامپزشکی آبزیان)	سازمان انرژی اتمی ایران- پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای- پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای
رجایی، رسا (کارشناسی ارشد بیولوژی)	سازمان انرژی اتمی ایران- پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای- پژوهشکده کاربرد پرتوها
رحیمی‌فرد، ناهید (دکتری تخصصی میکروبیولوژی)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی- سازمان غذا و دارو- آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا و دارو
سرابی، مونا (کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)	سازمان انرژی اتمی ایران- شرکت توسعه کاربرد پرتوها
سمیع‌پور، فرهاد (کارشناسی ارشد مهندسی شیمی)	پژوهشکده سیستم‌های پیشرفته صنعتی

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	**سمت و/یا محل اشتغال:**
شاه‌حسینی، غلامرضا (دکتری تخصصی بهداشت و بیماری‌های آبزیان)	سازمان انرژی اتمی ایران- پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای- پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای
شیخ‌نصیری، سارا (کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)	سازمان انرژی اتمی ایران- شرکت توسعه کاربرد پرتوها
گلشن تفتی، ابوالفضل (دکتری مهندسی علوم و صنایع غذایی)	وزارت جهاد کشاورزی- مؤسسه تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی
ویراستار:	
حمزه لوئی، میترا (کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی- صنایع غذایی)	اداره کل استاندارد استان زنجان

فهرست مندرجات

عنوان **صفحه**

پیش‌گفتار ح
مقدمه ط
۱ هدف و دامنه کاربرد ۱
۲ مراجع الزامی ۱
۳ اصول کلی ۲
۴ واکنشگرها ۲
۴-۱ کلیات ۲
۴-۲ رقیق‌کنندهٔ پپتون نمکی ۳
۴-۳ بافر با pH برابر با ۳٫۰ ۳
۴-۴ محلول آکریدین اورنج ۵
۴-۵ ۲-پروپانول ۶
۴-۶ تریتون® X-100، محلول پاک‌کنندهٔ ۱٪ ۶
۴-۷ محیط کشت تریپتون- عصاره مخمر-گلوکز-آگار ۷
۵ وسایل ۷
۶ تکنیک نمونه‌برداری ۱۰
۷ روش انجام آزمون ۱۰
۷-۱ پیش تیمار ۱۰
۷-۲ فیلتراسیون غشایی برای آماده‌سازی لام DEFT ۱۱
۷-۳ رنگ‌آمیزی و شستشوی فیلتر غشایی DEFT ۱۱
۷-۴ جاگذاری لام DEFT ۱۱
۷-۵ روش کشت آمیخته برای تعیین میکروارگانیسم‌های هوازی زنده (APC) ۱۲
۷-۶ شمارش ۱۲
۸ ارزیابی ۱۴
۸-۱ محاسبه DEFT ۱۴
۸-۲ محاسبه APC ۱۴
۸-۳ محاسبه APC/DEFT ۱۵
۹ محدودیت‌ها ۱۵
۱۰ صحه‌گذاری ۱۵
۱۱ گزارش آزمون ۱۵

عنوان **صفحه**

پیوست الف	(الزامی) صحه‌گذاری	۱۷
پیوست ب	(آگاهی‌دهنده) نمودار گردش کار انجام آزمون	۱۸
پیوست پ	(آگاهی‌دهنده) مثال عملی برای محاسبه فاکتور میکروسکوپ	۱۹
پیوست ت	(الزامی) تغییرات اعمال شده در این استاندارد ملی در مقایسه با استاندارد منبع	۲۰
کتاب‌نامه		۲۱

پیش‌گفتار

استاندارد «مواد غذایی- آشکارسازی مواد غذایی پرتودهی شده با استفاده از روش فیلتر اپی‌فلورسنت مستقیم/ شمارش پلیت هوازی- روش غربال‌گری- روش آزمون» که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط تهیه و تدوین شده است، در یک‌هزار و ششصد و چهل و ششمین اجلاسیه کمیتهٔ ملی استاندارد خوراک و فرآورده‌های کشاورزی مورخ ۱۳۹۷/۰۴/۲۰ 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، به‌عنوان 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 زمینهٔ 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 کمیسیون‌های مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

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

BS EN 13783: 2002, Foodstuffs– Detection of irradiated food using Direct Epifluorescent Filter Technique/Aerobic Plate Count (DEFT/APC) – Screening method

.

مقدمه

پرتودهی مواد غذایی برای فرآوری محصولات غذایی با استفاده از پرتوهای یون‌ساز و به‌منظور کنترل عوامل بیماری‌زای قابل انتقال از طریق مواد غذایی، کاهش بار میکروبی و آسیب حشرات، جلوگیری از جوانه‌زنی محصولات ریشه‌ای و افزایش ماندگاری محصولات با قابلیت فساد بالا انجام می‌شود.

این استاندارد حاوی اطلاعاتی برای آشکارسازی مواد غذایی پرتودهی‌شده است. علاوه بر این استاندارد، استانداردهای EN 1784، EN 1785، EN 1786، EN 1787، EN 1788، EN 13751 و EN 13784 نیز برای آشکارسازی مواد غذایی پرتودهی شده، تدوین شده است که هریک از این استانداردها برای گروه خاصی از مواد غذایی یا همه گروه‌های مواد غذایی کاربرد دارد. روش ارائه شده در این استاندارد، برای گروه‌های مواد غذایی «گیاهان با مصارف خاص»[1] و ادویه‌ها به‌طور موفقیت‌آمیزی آزمایش و صحه‌گذاری شده است (به پیوست **الف** مراجعه شود). همچنین این استاندارد روی انواع دیگری از مواد غذایی مانند گوشت، شیر، غذاهای دریایی و ماکیان، مورد آزمایش قرار گرفته است. (به منابع [۴]، [۶]، [۷]، [۸] و [۱۰] کتاب‌نامه مراجعه شود).

1 -Herbs

منظور از گیاهان با مصارف خاص شامل گیاهان ادویه‌ای، دارویی و معطر می‌باشد.

مواد غذایی- آشکارسازی مواد غذایی پرتودهی شده با استفاده از روش فیلتر اپی‌فلورسنت مستقیم/ شمارش پلیت هوازی- روش غربال‌گری- روش آزمون

هشدار ۱- استفاده از این استاندارد ممکن است مستلزم کارکردن با مواد، عملیات و تجهیزات خطرناک باشد. در این استاندارد تمام موارد ایمنی مرتبط با استفاده از آن‌ها درج نشده است. در صورت مواجهه با چنین مواردی، مسئولیت برقراری شرایط بهداشت و ایمنی مناسب و اجرای آن و همچنین در نظر گرفتن محدودیت‌های قانونی و مقررات بهداشتی، برعهده کاربر این استاندارد است.

هشدار ۲- کاربران این استاندارد، باید با فعالیت‌های معمول آزمایشگاهی آشنایی داشته باشند و کاملاً ضروری است که آزمون‌های صورت گرفته بر طبق این استاندارد، به‌وسیله کارکنان صلاحیت‌دار انجام پذیرد.

۱ هدف و دامنهٔ کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روش غربال‌گری میکروبیولوژیکی برای آشکارسازی تیمار پرتودهی گیاهان با مصارف خاص و ادویه‌ها با استفاده از روش ترکیبی فیلتر اپی‌فلوئورسنت مستقیم (DEFT)[1] و شمارش پلیت هوازی (APC)[2] است. روش DEFT/APC فقط برای پرتو به‌کار نمی‌رود، بنابراین، توصیه می‌شود که نتایج مثبت با استفاده از روش استانداردسازی شده‌ای (به‌عنوان مثال استانداردهای EN 1788 و EN 13751)، تأیید شود، تا به صراحت تیمار پرتودهی مواد غذایی مشکوک اثبات شود.

یادآوری- این استاندارد در آزمون‌های بین‌آزمایشگاهی، با گیاهان با مصارف خاص و ادویه‌ها به‌طور موفقیت‌آمیزی آزمایش شده است (به منابع [۱] تا [۵] کتاب‌نامه مراجعه شود).

۲ مراجع الزامی

در مراجع زیر ضوابطی وجود دارد که در متن این استاندارد به‌صورت الزامی به آن‌ها ارجاع داده شده است. بدین‌ترتیب، آن ضوابط جزئی از این استاندارد محسوب می‌شوند.

درصورتی‌که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام‌آور نیست. در مورد مراجعی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی برای این استاندارد الزام‌آور است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

2-1 ISO 4833-1, Microbiology – General guidance for the enumeration of microorganisms– Colony count technique at 30 °C

1- Direct Epifluorescent Filter Technique
2- Aerobic Plate Count

یادآوری- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵۲۷۲-۱: سال ۱۳۹۳، میکروبیولوژی زنجیره غذایی -روش جامع برای شمارش میکروارگانیسم‌ها - قسمت ۱- شمارش کلنی در ۳۰ °C با استفاده از روش کشت آمیخته، با استفاده از استاندارد ISO 4833-1: 2013 تدوین شده است.

2-2 ISO 7218, Microbiology of food and animal feeding stuffs– General rules for microbiological examinations.

یادآوری- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹: سال ۱۳۹۴، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - الزامات کلی و راهنما برای آزمون‌های میکروبیولوژی، با استفاده از استاندارد ISO 7218: 2007+ AMD 1:2013 تدوین شده است.

۳ اصول کلی

این روش غربال‌گری، بر اساس مقایسه APC با شمارش به‌دست آمده با استفاده از روش DEFT است. APC، تعداد میکروارگانیسم‌های زنده را در نمونه پس از پرتودهی احتمالی و DEFT، شمارش کل میکروارگانیسم‌ها، شامل سلول‌های غیرزنده موجود را در نمونه، نشان می‌دهند. به‌طور کلی، تفاوت بین تعداد DEFT و APC در ادویه‌های تیمار شده در دُزهای ۵ KGy تا ۱۰ KGy، در حدود یا بیشتر از ۳ واحد لگاریتمی تا ۴ واحد لگاریتمی است. همچنین تفاوت‌های مشابهی بین شمارش‌های DEFT و APC می‌تواند ناشی از سایر روش‌های تیماردهی مواد غذاییِ کُشنده میکروارگانیسم‌ها، مانند گرما باشد، بنابراین، نتایج مثبت باید تأیید شود.

به‌منظور تغلیظ میکروارگانیسم‌ها روی فیلتر، حجم مشخصی از نمونه از طریق فیلتر غشایی در فشار کم، پالایش می‌شود. میکروارگانیسم‌های رنگ‌شده با «فلوروکروم» و آکریدین اورنج (AO)[1]، زیر تابش نور آبی در طول موج‌های ۴۵۰ nm تا ۴۹۰ nm، منجر به نور فلورسانس نارنجی و نارنجی- زرد می‌شود. این میکروارگانیسم‌ها با استفاده از میکروسکوپ اپی‌فلورسانس، برای به‌دست آوردن تعداد DEFT، شمارش می‌شوند. با این وجود، میکروارگانیسم‌هایی که پیش از پرتودهی زنده نبودند، فلورسانس سبز نشان داده و شمارش نمی‌شوند. به‌صورت هم زمان، APC از بخش دوم همان نمونه آزمون تعیین می‌شود (به منابع [۶] تا [۱۰] کتاب‌نامه مراجعه شود).

۴ واکنشگرها

۴-۱ کلیات

در طی آنالیز، فقط از واکنشگرهای آزمایشگاهی با درجه تجزیه‌ای شناخته شده، استفاده کنید. کلیه واکنشگرهای مورد استفاده در تعیین DEFT و APC، باید با فیلترهایی با اندازه منافذ ۰٫۲ µm یا به‌وسیله اتوکلاو، سترون شوند.

1- Acridine Orange

۴-۲ رقیق‌کننده پپتون نمکی[1]

۴-۲-۱ ترکیب

جدول ۱- ترکیب اجزای تشکیل دهنده رقیق کننده پیتون نمکی

ماده	مقدار
سدیم کلرید	۸٫۵ g
پپتون	۱٫۰ g
آب مقطر یا آب یون‌زدایی‌شده	۱۰۰۰ ml

۴-۲-۲ آماده‌سازی

اجزای ترکیب را در آب حل کنید (به جدول ۱ مراجعه شود). در صورت نیاز، pH را تنظیم کنید، تا پس از سترون‌سازی، pH نهایی محلول در دمای ۲۰ °C تا ۲۵ °C، برابر با (۷٫۲±۰٫۲) باشد. محلول را در اتوکلاو، در دمای °C (۱±۱۲۱) به‌مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید (به زیربند ۵-۱۳ مراجعه کنید). محلول رقیق‌کننده را می‌توان درون بطری شیشه‌ای، در دمای ۴ °C تا ۶ °C، حداکثر تا دو هفته نگهداری کرد.

۴-۳ بافر با pH برابر با ۳٫۰

۴-۳-۱ محلول سیتریک اسید

غلظت ماده $c(C_6H_8O_7 \cdot H_2O)$= ۰٫۱ mol /l

۴-۳-۱-۱ ترکیب

جدول ۲- ترکیب اجزای تشکیل دهنده محلول سیتریک اسید

ماده	مقدار
سیتریک اسید تک‌آبه	۲۱ g
آب مقطر یا آب یون‌زدایی شده	۱۰۰۰ ml

۴-۳-۱-۲ آماده‌سازی

سیتریک اسید تک‌آبه را در آب حل کنید (به جدول ۲ مراجعه کنید). محلول را می‌توان درون بطری شیشه‌ای، در دمای ۴ °C تا ۶ °C، حداکثر تا سه ماه نگهداری کرد.

1- Peptone saline diluent

۴-۳-۲ محلول سدیم هیدروکسید

غلظت c(NaOH)= ۰/۱ mol /l

۴-۳-۲-۱ ترکیب

جدول ۳- ترکیب اجزای تشکیل دهنده محلول سدیم هیدروکسید

ماده	مقدار
سدیم هیدروکسید یا محلول سدیم هیدروکسید ۱ mol/l	۴/۰ g ۱۰۰ ml
آب مقطر یا آب یون‌زدایی شده	۹۰۰ ml

۴-۳-۲-۲ آماده‌سازی

سدیم هیدروکسید را در آب حل کنید و یا محلول سدیم هیدروکسید را در آب رقیق کنید (به جدول ۳ مراجعه کنید). این محلول را می‌توان درون بطری شیشه‌ای، در دمای ۴ °C تا ۶ °C، حداکثر تا سه ماه نگهداری کرد.

۴-۳-۳ بافر کامل با pH برابر با ۳/۰

۴-۳-۳-۱ ترکیب

جدول ۴- ترکیب اجزای تشکیل دهنده محلول بافر کامل

ماده	مقدار
محلول سیتریک اسید[a]	۱۰۰ ml
محلول سدیم هیدروکسید[b]	۵۴ ml
[a] به زیربند ۴-۳-۱ مراجعه کنید. [b] به زیربند ۴-۳-۲ مراجعه کنید.	

۴-۳-۳-۲ آماده‌سازی

محلول سیتریک اسید و محلول سدیم هیدروکسید را مخلوط کنید (به جدول ۴ مراجعه کنید). با محلول سیتریک اسید یا محلول سدیم هیدروکسید، pH را روی (۳/۰±۰/۲) تنظیم کنید. قبل از استفاده، بافر را از طریق فیلترهای غشایی با اندازه منافذ ۰/۲ µm (به زیربند ۵-۳ مراجعه کنید)، سترون کنید. این محلول را می‌توان درون بطری شیشه‌ای، در دمای ۴ °C تا ۶ °C، حداکثر تا سه هفته نگهداری کرد.

۴-۴ محلول آکریدین اورنج

۴-۴-۱ محلول بافر با pH برابر با ۶٫۶

۴-۴-۱-۱ ترکیب

جدول ۵- ترکیب اجزای تشکیل دهنده محلول بافر

ماده	مقدار
محلول سیتریک اسید[a]	۳۵٫۵ ml
محلول سدیم هیدروکسید[b]	۱۰۰ ml
[a] به زیربند ۴-۳-۱ مراجعه کنید. [b] به زیربند ۴-۳-۲ مراجعه کنید.	

۴-۴-۱-۲ آماده‌سازی

محلول سیتریک اسید و سدیم هیدروکسید را مخلوط کنید (به جدول ۵ مراجعه کنید). با محلول سیتریک اسید یا محلول سدیم هیدروکسید، pH را روی (۶٫۶±۰٫۲) تنظیم کنید. پیش از استفاده، بافر از طریق فیلترهای غشایی با اندازه منافذ ۰٫۲ µm (به زیربند ۵-۳ مراجعه کنید)، سترون کنید. این محلول را می‌توان درون بطری شیشه‌ای، در دمای ۴ °C تا ۶ °C، حداکثر تا سه هفته نگهداری کرد.

۴-۴-۲ محلول آکریدین اورنج کامل

۴-۴-۲-۱ ترکیب

جدول ۶- ترکیب اجزای تشکیل دهنده محلول آکریدین اورنج کامل

ماده	مقدار
آکریدین اورنج	۰٫۰۲۵ g
بافر با pH برابر با ۶٫۶[a]	۱۰۰ ml
[a] به زیربند ۴-۴-۱ مراجعه کنید.	

۴-۴-۲-۲ آماده‌سازی

آکریدین اورنج، را در محلول بافر حل (به زیربند ۴-۴-۱ مراجعه کنید) کرده و محلول آکریدین اورنج را پیش از استفاده، از طریق فیلترهای غشایی با اندازه منافذ ۰٫۲ µm (به زیربند ۵-۳ مراجعه کنید)، سترون کنید. این محلول را می‌توان درون بطری شیشه‌ای، در دمای ۴ °C تا ۶ °C، حداکثر تا یک هفته نگهداری کرد.

یادآوری ۱- محلول تغلیظ شده آکریدین اورنج، از محصولات تجاری موجود در بازاراست. این اطلاعات برای راحتی کاربران این استاندارد و بنا بر دلایل ایمنی ارائه شده است و به منزله تأییدیه این محصول نیست. می‌توان محصولات معادل مورد استفاده قرار گیرد، به‌شرطی که ملاحظات ایمنی رعایت و استفاده از آن محصول منجر به نتایج مشابهی شود.

یادآوری ۲- از آن‌جایی‌که آکریدین اورنج، به‌عنوان یک ماده جهش‌زا، شناخته شده است، هنگام توزین واکنشگر رنگی، باید از دستکش یک‌بار مصرف و ماسک صورت استفاده شود.

۴-۵ ۲-پروپانول

۴-۶ تریتون X-100®[1]، محلول پاک‌کننده ٪۱

یادآوری- تریتون X-100، از محصولات تجاری موجود در بازاراست. این اطلاعات برای راحتی کاربران این استاندارد ارائه شده است و به منزله تأییدیه این محصول نیست.

۴-۶-۱ ترکیب

جدول ۷- ترکیب اجزای تشکیل دهنده محلول پاک کننده ٪۱

ماده	مقدار
تریتون X-100،	۱۰ ml
آب مقطر یا یون‌زدایی شده	۱۰۰۰ ml

۴-۶-۲ آماده‌سازی

تریتون X-100، را با آب‌گرم (۸۰ °C) مخلوط کنید (به جدول ۷ مراجعه کنید). محلول، را به‌وسیله فیلتر غشایی با اندازه منافذ ۰٫۲ µm (به زیربند ۵-۳ مراجعه کنید)، سترون کنید. این محلول را می‌توان درون بطری شیشه‌ای، در دمای ۴ °C تا ۶ °C، حداکثر تا سه هفته نگهداری کرد.

1 - Triton® X-100

۴-۷ محیط کشت تریپتون– عصاره مخمر– گلوکز– آگار[1]

۴-۷-۱ ترکیب

جدول ۸- ترکیب اجزای تشکیل دهنده محلول کشت تریپتون– عصاره مخمر– گلوکز– آگار

ماده	مقدار
تریپتون	۵/۰ g
عصاره مخمر	۲/۵ g
دکستروز (گلوکز)	۱/۰ g
آگار (طبق قدرت ژل آگار)	۱۲ g تا ۱۸ g
آب مقطر یا یون‌زدایی شده	۱۰۰۰ ml

۴-۷-۲ آماده‌سازی

اجزای سازنده یا محیط کشت کامل بدون آب، را در آب حل کرده (به جدول ۷ مراجعه کنید) و تا زمان به جوش آمدن، حرارت دهید. در صورت نیاز، pH را تنظیم کنید، تا پس از سترون‌سازی pH نهایی برابر با (۷/۲±۰/۲) در دمای °C ۲۰ تا °C ۲۵ باشد. محلول را در اتوکلاو (به زیربند ۵-۱۳ مراجعه کنید)، در دمای °C (۱±۱۲۱) به‌مدت ۱۵دقیقه سترون کنید.

۵ وسایل[2]

وسایل آزمایشگاهی معمول مطابق با استاندارد ISO 7218 و به‌ویژه وسایل زیر مورد نیاز است:

۵-۱ وسایل برای فیلتراسیون غشایی سوسپانسیون‌های نمونه

از تجهیزات فیلتراسیون، از جنس فولاد زنگ‌نزن یا شیشه باید استفاده شود. فیلتر پایینی باید از «شیشه پخته‌شده»[3] یا فولاد زنگ‌نزن تعیین شده برای فیلترهای با قطر mm ۲۵ باشد (به زیربند ۵-۵ مراجعه کنید). کمینه حجم «ستون فیلتر»[4] باید ml ۱۰ باشد. تجهیزات فیلتراسیون را به‌صورت عمودی روی یک فلاسک مکش یا یک لوله چند شاخه‌ای[5] متصل به یک پمپ آب یا پمپ خلأ با تنظیم‌کننده فشار قرار دهید. خلأ در طی فیلتراسیون به‌طور معمول باید حدود kPa ۷۰ باشد.

یادآوری- اگر نمی‌توان فشار آب را تنظیم کرد، استفاده از پمپ آب چندان مناسب نیست.

1- Plate count agar
2- Apparatus
3- Sintered glass
4- Filter tower
5- Manifold

۵-۲ قیف فیلتر

فلاسک‌های مکش مناسب که از جنس شیشه هستند، برای فیلتراسیون تحت شرایط سترون واکنشگرها و رقیق‌کننده استفاده می‌شوند.

۵-۳ فیلترهای غشایی

از جنس استر سلولز یا مشابه آن است که اندازه منافذ ۰٫۲ µm، برای مثال با قطر ۳۰ mm و/یا ۴۷ mm بوده و برای فیلتراسیون تحت شرایط سترون واکنشگرها استفاده می‌شود.

۵-۴ فیلترهای غشایی

از جنس پلی‌پروپیلن بوده که، قُطر و اندازه منافذ به‌ترتیب ۲۵ mm و ۱۰ µm، برای پیش‌فیلتراسیون[1] نمونه‌ها استفاده می‌شوند.

۵-۵ فیلترهای غشایی

از جنس پلی‌کربنات سفید بوده که، قُطر و اندازه منافذ به‌ترتیب ۲۵ mm و ۰٫۶ µm، برای فیلتراسیون غشایی محلول نمونه آزمون استفاده می‌شوند.

۵-۶ کاغذ فیلتر سریع سترون[2]

این کاغذ برای فیلتراسیون نمونه‌های ادویه استفاده می‌شود.

۵-۷ میکروسکوپ اپی‌فلورسنت

با ترکیب مناسب نور (در گسترهٔ طول موج‌های ۴۵۰ nm تا ۴۹۰ nm) و فیلتر استفاده می‌شوند.

۵-۸ تجهیزات اُپتیکی

عدسی شیئی غوطه‌وری[3] ۱۰۰ برابر، بزرگ‌نمایی چشمی ۱۰ برابر (با استفاده از مجرای بزرگ‌نمایی ۱٫۲۵، بزرگ‌نمایی کل ۱۲۵۰ برابر به‌دست می‌آید)، به‌کار می‌رود.

۵-۹ لام[4] میکروسکوپ

برای مثال در ابعاد ۷۶ mm × ۲۶ mm به‌کار می‌رود.

1- Prefilltration

2- Sterile fast filter paper

۳- در میکروسکوپ نوری، غوطه‌وری عدسی شیئی، طراحی مخصوص آن است که برای افزایش وضوح میکروسکوپ مورد استفاده قرار می‌گیرد. این امر توسط غوطه‌ور کردن، عدسی و نمونه در مایعی دارای شاخص انکساری بالاتر از هوا به‌دست می‌آید، که در نتیجه، دیافراگم عددی عدسی شیئی را افزایش می‌دهد.

4- Slide

۵-۱۰ لامل

برای مثال در ابعاد ۲۵ mm × ۵۰ mm، با ضخامتی متناسب با الزامات عدسی شیئی به‌کار می‌رود.

۵-۱۱ روغن ایمرسیون[1] (غوطه‌وری)

غیرفلورسانس بوده و با ضریب شکست ۱٫۵۱۵ تا ۱٫۵۱۸ به‌کار می‌رود.

۵-۱۲ میکرومتر صفحه[2]

برای اندازه‌گیری قُطر میدان دید میکروسکوپ، با درجه‌بندی ۰٫۰۱ mm، به‌کار می‌رود.

۵-۱۳ اتوکلاو

برای سترون کردن رقیق‌کننده و محیط‌های کشت، به‌کار می‌رود.

۵-۱۴ آون

برای سترون کردن ظروف شیشه‌ای با حرارت خشک، به‌کار می‌رود.

۵-۱۵ همزن (ورتکس)

برای هم زدن سوسپانسیون نمونه و رقیق‌کننده به‌کار می‌رود.

یادآوری- همزن ویرل میکسر[3]، از محصولات تجاری موجود در بازار است که می‌توان از آن استفاده کرد. این اطلاعات برای راحتی کاربران این استاندارد ارائه شده است و به‌منزله تأییدیه این محصول نیست.

۵-۱۶ حمام آب

برای نگهداری محیط‌های کشت در دمای مناسب استفاده می‌شود.

۵-۱۷ گرم‌خانه (انکوباتور)

با توانایی حفظ دمای °C (۱±۳۰) استفاده می‌شود.

۵-۱۸ بطری‌های شیشه‌ای

با درپوش‌های پیچی، برای نگهداری واکنشگرها (DEFT) استفاده می‌شود.

۵-۱۹ لوله‌های آزمایش

برای رقت‌سازی محلول نمونه آزمون (APC) استفاده می‌شود.

1- Immersion
2- Stage micrometer
3- Whirlmixer™

۵-۲۰ پیپت

با حجم ۱ ml، ۲ ml، ۵ ml و ۲۰ ml استفاده می‌شود.

۵-۲۱ پلیت

با قُطر ۹۰ mm (APC) استفاده می‌شود.

۵-۲۲ شمارشگر پَرگنه[1] (APC)

۵-۲۳ پنس (انبر)

۵-۲۴ وسایل اختیاری/تجهیزات برای شمارش نیمه خودکار یا خودکار DEFT

این وسایل شامل پردازنده تصویر، دوربین ویدیویی برای میکروسکوپ، نمایشگر تلویزیون، صفحه کلید و چاپگر، «متمرکز کننده خودکار»[2] میکروسکوپ، صفحه گرداننده (خودکار) و لام میکروسکوپ[3] است.

۶ تکنیک نمونه‌برداری

۲۰۰g از نمونه را که نشان‌دهنده محصول مورد مطالعه است، در شرایط اسپتیک بردارید.

۷ روش انجام آزمون

۷-۱ پیش‌تیمار

نمونه آزمون را به وزن ۵ g در اِرلن حاوی ۴۵ ml رقیق‌کننده پپتون نمکی (به زیربند ۴-۲ مراجعه کنید)، سوسپانسیون کرده و با چرخاندن شدید اِرلن‌ها تقریباً به‌مدت ۳۰ ثانیه، هم بزنید. هر نمونه سوسپانسیون را از طریق کاغذ فیلتر سریع سترون (به زیربند ۵-۶ مراجعه شود)، صاف کنید. محلول فیلتر شده[4] (خارج‌شده از کاغذ فیلتر)، محلول نمونه آزمون است که بعداً مورد آزمایش قرار می‌گیرد (رقت این محلول فیلتر شده تقریباً $۱۰^{-۱}$ است).

پس از فیلتراسیون، شمارش‌های DEFT و APC تعیین می‌شوند. لام‌های DEFT را از رقت‌های $۱۰^{-۱}$ و/یا $۱۰^{-۲}$ محلول نمونه آزمون، با استفاده از محلول رقیق‌کننده پپتون نمکی با توجه به‌مقدار تخمینی میکروارگانیسم‌ها در ادویه‌ها آماده‌سازی کنید. سری رقت‌های محلول آزمون فیلتر شده ادویه را با استفاده از محلول رقیق‌کننده پپتون نمکی برای تعیین APC آماده‌سازی کنید (به زیربند ۷-۵ مراجعه کنید).

1- Colony
2- Autofocus (automatic)
3- Microscope stepping stage (automatic)
4- Filtrate

۷-۲ فیلتراسیون غشایی برای آماده‌سازی لام DEFT

تجهیزات فیلتراسیون غشایی (به زیربند ۵-۱ مراجعه کنید) را پیش از استفاده، با سه بار عبور دادن تریتون X-100 ٪۱، (به زیربند ۴-۶ مراجعه کنید) گرم شده (°C ۸۰)، فیلتر و سترون‌شده، تمیز کنید. ستون فیلتراسیون را قبل از استفاده از فیلتر پلی‌کربنات درون ستون، سه بار با آب جوش، شستشو دهید. فیلتر پلی‌کربنات µm ۰٫۶ (به زیربند ۵-۵ مراجعه کنید) را از سمت براق و صیقلی آن (به زیربند ۵-۱ مراجعه کنید) و پیش‌فیلتر با اندازه منافذ µm ۱۰ را روی فیلتر پلی‌کربنات در دستگاه فیلتراسیون غشایی، (به زیربند ۵-۴ مراجعه شود)، قرار دهید.

از طریق فیلترها در ستون، ml ۲ از محلول نمونه آزمون را فیلتر کنید. پیش‌فیلتر با اندازه منافذ µm ۱۰ (به زیربند ۵-۴ مراجعه کنید)، به‌کاررفته روی فیلتر پلی‌کربنات (به زیربند ۵-۵ مراجعه کنید) را، با خلأ که هنوز روشن است، برداشته و دور بریزید. در این مراحل فیلتراسیون، خلأ، فقط پس از اضافه شدن مایع، برقرار شود.

علاوه بر این (به‌عنوان نمونه شاهد)، ۲ml محلول رقیق‌کننده پپتون نمکی (به زیربند ۴-۲ مراجعه کنید) را به‌جای نمونه با استفاده از ستون فیلتر دیگر، آزمون کنید. این محلول به‌عنوان نمونه شاهد استفاده می‌شود.

ستون فیلتراسیون بین نمونه‌ها را سه بار با عبور دادن آب جوش، همان‌طور که در بالا تشریح شده، شستشو دهید.

۷-۳ رنگ‌آمیزی و شستشوی فیلتر غشایی DEFT

ml ۲٫۵ از محلول آکریدین اورنج (به زیربند ۴-۴ مراجعه شود) را به ستون فیلتراسیون انتقال داده و اجازه دهید تا روی فیلتر غشایی واکنش نشان دهد. پس از ۲ دقیقه، خلأ دوباره وصل شده و محلول رنگ با مکش تحت خلأ خارج شود. خلأ را متصل نگه داشته و بلافاصله فیلتر غشایی را با ml ۲٫۵ بافر با pH برابر ۳٫۰ (به زیربند ۴-۳ مراجعه کنید) آبکشی کنید. در نهایت فیلتر غشایی را با روش تصفیه سریع ml ۲٫۵، ۲-پروپانول (به زیربند ۴-۵ مراجعه شود) آبکشی کنید.

یادآوری- بسیار مهم است که به‌منظور جلوگیری از رنگ‌زدایی ناخواسته میکروارگانیسم‌ها، آبکشی ایزوپروپانول، تا حد ممکن با سرعت بالا انجام شود.

۷-۴ جاگذاری لام DEFT

خلأ را قطع کنید و با استفاده از یک جفت انبرک، فیلتر پلی‌کربنات را، به‌منظور خشک شدن در هوا، به‌دقت خارج کنید. قطره‌ای روغن ایمرسیون (به زیربند ۵-۱۱ مراجعه شود) را در وسط لام میکروسکوپ (به زیربند ۵-۹ مراجعه شود) قرار داده و فیلتر – قسمت براق و صیقلی به‌طرف بالا – را در مرکز قطره روغن قرار دهید. قطره دیگری از روغن ایمرسیون وسط فیلتر قرار دهید. لامل را روی فیلتر قرار داده (به زیربند ۵-۱۰ مراجعه شود) و ضخامت لایه‌های روغن را با فشار دادن با دقت لامل روی لام کاهش دهید.

اکنون لام DEFT برای بررسی با میکروسکوپ فلورسنت آماده است.

یادآوری- هنگامی‌که لام‌ها در تاریکی در دمای حدود ۵ °C نگهداری می‌شوند، برای مدت بیش از دو ماه قابل خواندن نیستند.

۷-۵ روش کشت آمیخته برای تعیین میکروارگانیسم‌های هوازی زنده (APC)

APC با استفاده از روش کشت آمیخته بر اساس استاندارد ISO 4833، پس از فیلتراسیون و رقت‌سازی (به زیربند ۷-۱ مراجعه شود) تا ۱۵ دقیقه تعیین شود. از رقت‌های مناسب محلول‌های نمونه آزمون، ۱ ml به پلیت‌های خالی اضافه کنید و تقریباً با ۱۵ ml محیط کشت آگار (پیش‌سرد شده تا دمای °C (۲±۴۷))، مخلوط کنید (به زیربند ۴-۷ مراجعه کنید). اجازه دهید، آگار جامد شده و سپس پلیت‌ها را به‌صورت وارونه در دمای °C (۱±۳۰) به‌مدت ۷۲ ساعت در گرم‌خانه قرار دهید.

۷-۶ شمارش

لام‌های DEFT را با میکروسکوپ اپی‌فلورسانس (به زیربند ۵-۷ مراجعه شود) بررسی‌کرده و واحدهای DEFT را به‌صورت چشمی یا در صورت امکان، با استفاده از پردازنده تصویر نیمه‌خودکار یا تمام- خودکار شمارش کنید (به زیربند ۵-۲۴ مراجعه شود).

درصورت استفاده از شمارنده خودکار، باید برنامه‌ریزی کنید تا سلول‌ها و توده‌های فلورسنت نارنجی و نارنجی-زرد را شمارش کند. سپس همان‌طور که در بند ۸ توضیح داده شده، نتایج را به میکروب‌ها در هر گرم نمونه ادویه اولیه، تبدیل کنید. قطره‌ای از روغن ایمرسیون را روی لامل گذاشته و (به زیربند ۵-۱۱ مراجعه کنید). لام DEFT را در میکروسکوپ فلورسنت قرار دهید. آماده‌سازی را با استفاده از عدسی شیئی روغنی (به زیربند ۵-۸ مراجعه کنید) با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر بررسی کنید. تعداد واحدهای DEFT میکروارگانیسم‌های فلورسنت نارنجی و نارنجی-زرد را در میدان‌های دید تصادفی انتخاب شده میکروسکوپ مطابق با جدول ۹ شمارش کنید:

جدول ۹- تعداد واحدهای DEFT میکروارگانیسم‌های فلورسنت نارنجی و نارنجی-زرد در میدان‌های دید تصادفی

تعداد واحدهای DEFT هر میدان	تعداد میدان‌های دید (n)
۱ تا ۲۰ >	۲۰
۲۱ تا ۱۰۰	۱۰
۱۰۰ <	[a]_
[a]: سوسپانسیون نمونه پیش فیلتر شده را رقیق‌تر کرده و روش اجرایی را تکرار کنید.	

هر میکروارگانیسمی که به‌صورت جدا یا گروهی (توده‌ها و زنجیره‌ها)[1] با فواصلی کوتاه‌تر یا مساوی با دو برابر کوچک‌ترین قطر میکروارگانیسم‌ها ظاهرشده، به‌عنوان یک واحد DEFT شمارش کنید. توده‌ها و زنجیره‌ها و میکروارگانیسم‌های جداگانه که ریخت‌شناسی[2] متفاوت نشان داده و کمتر از دو قطر از یکدیگر جدا ظاهر می‌شوند، به‌عنوان دو واحد DEFT بشمارید.

معیارهای زیر را برای شمارش اعمال کنید:

- در طی شمارش چشمی، بهتر است از عدسی چشمی مدرج یا عدسی چشمی شطرنجی، استفاده کنید.

- ذرات فلورسانس نارنجی و نارنجی-زرد که به‌صورت چشمی به‌عنوان میکروارگانیسم شناخته نمی‌شوند، را نباید شمارش کنید (مثبت کاذب).

- اگر میدان دیدی با واحدهای DEFT سبز در یک لام دیده شود و در میدان دیگری واحدهای DEFT نارنجی و نارنجی- زرد غالب باشند، واحدهای DEFT فلورسنت سبز را نباید شمارش کنید (اما به‌عنوان میکروارگانیسم‌های غیرزنده، پیش از پرتودهی در نظر بگیرید).

- عدسی را بیش از حد نزدیک به لبه خارجی لام، قرار ندهید، زیرا شمارش فقط باید در داخل سطح صاف‌شده غشایی انجام شود.

- میدان‌های دید میکروسکوپی را به‌طور تصادفی انتخاب کنید، اما دقت کنید که این میدان‌ها در سرتاسر فیلتر، کامل توزیع شود.

- میکروارگانیسم‌ها/ واحدهای DEFT ظاهرشده در پیرامون محدوده میدان دید میکروسکوپ، فقط درصورتی شمارش می‌شوند که میکروارگانیسم کامل منفرد قابل رؤیت باشد، یا حداقل میکروارگانیسمی به‌عنوان بخشی از یک توده یا زنجیره دیده شود.

- برای جلوگیری از کم‌رنگ شدن لام‌ها، دقت کنید که آن‌ها فقط برای مدت زمان لازم جهت شمارش، در معرض نور قرار گیرند.

یادآوری- شمارش را می‌توان به‌صورت نیمه‌خودکار با استفاده از دوربین فیلم‌برداری، مانیتور تلویزیون و پردازنده تصویر یا به‌طور خودکار با استفاده از سیستم تمرکز خودکار و سیستم میکروسکوپ خودکار با صفحه گرداننده خودکار انجام داد.

آماده‌سازی DEFT باید بدون مزاحمت و نوفه[3] قابل توجهی باشد (واحدهای مثبت کاذب شامل ذرات نمونه و غیره می‌شود).

1- Clumps and chains
2- Morphology
3- Noise

۸ ارزیابی

۸-۱ محاسبهDEFT

با استفاده از فرمول‌های (۱) و (۲)، تعدادDEFT ، x، در هر گرم ادویه را محاسبه کنید:

$$x = \frac{N}{n} \cdot M \cdot D \qquad (۱)$$

با

$$M = \frac{F}{A \cdot V} \qquad (۲)$$

که در آن:

N مجموع واحدهای DEFT شمارش شده در n میدان دید میکروسکوپ؛

n تعداد میدان‌های دید شمارش‌شده میکروسکوپ؛

M فاکتور سنجیده میکروسکوپ (به پیوست **پ** مراجعه شود)؛

D فاکتور رقت نمونه، به‌طور مثال ۵ g نمونه + ۴۵ ml رقیق‌کننده پپتون نمکی= ۱۰ ml/g؛

F سطح فیلتر غشایی برحسب mm^2 (πr^2)، که با اندازه‌گیری قطر (r_1 = شعاع) بخش انتهایی ستون فیلتر محاسبه می‌شود.

A میدان دید میکروسکوپ برحسب mm^2 (πr^2)، که با اندازه‌گیری قطر (r_2 = شعاع) میدان دید میکروسکوپ با استفاده از جابه‌جا کننده میکرومتر صفحه میکروسکوپ، ۰٫۰۱ mm محاسبه می‌شود (به زیربند ۵-۱۲ مراجعه شود). قطر میدان دید میکروسکوپ همچنین به‌صورت نسبت بین تعداد میدان عدسی چشمی و بزرگ‌نمایی عدسی شیئی × بزرگ‌نمایی «لوله میکروسکوپ»[1] قابل محاسبه است.

V حجم نمونه برحسب میلی‌لیتر.

تعداد DEFT هر گرم ادویه با دو رقم معنی‌دار، داده شده است. سپس تعداد DEFT به مقیاس لگاریتمی با دو رقم معنی‌دار تبدیل می‌شود.

۸-۲ محاسبه APC

تعداد میکروارگانیسم‌های هوازی زنده (شمارشAPC) در پلیت‌ها را در انتهای زمان گرم‌خانه‌گذاری مطابق روش محاسبه داده شده در استاندارد ISO 4833 شمارش کنید. تعداد میکروارگانیسم‌ها در هر گرم ادویه، را با استفاده از تعداد «واحدهای تشکیل‌دهنده پَرگنه» (cfu)[2] به‌دست آمده از پلیت‌ها تقسیم بر فاکتور رقت و

1- Tube magnification
2- Colony forming units

حجم نمونه مورد استفاده، محاسبه کنید. تعداد APC با دو رقم معنی‌دار داده شده و سپس تعداد، به مقیاس لگاریتمی با دو رقم معنی‌دار تبدیل می‌شود.

۸-۳ محاسبه APC/DEFT

نتیجه به‌صورت اختلاف (D_c) بین تعداد DEFT و شمارش APC با استفاده از مقادیر لگاریتمی مطابق فرمول (۳) بیان می‌شود.

$$D_c = A - B \qquad (۳)$$

که در آن:

A لگاریتم شمارش DEFT؛

B لگاریتم شمارشAPC.

تفاوت بزرگ‌تر یا مساوی با ۴٫۰ نشان‌دهنده تیمار پرتودهی نمونه است.

۹ محدودیت‌ها

این روش در مواجهه با تعداد کمی از میکروب‌ها در نمونه ($APC < 10^3$ cfu/g) محدودیت دارد. اگر برای آلودگی‌زدایی از روش‌های تدخینی[1] یا گرما استفاده شود، تفاوت DEFT/APC می‌تواند مشابه تفاوت تعداد شمارش حاصل، پس از پرتودهی باشد. اگرچه، استفاده از روش‌های تدخینی قابل‌تشخیص است.

برخی ادویه‌ها مانند گل میخک، دارچین، سیر و خردل حاوی اجزای بازدارنده با فعالیت ضد میکروبی هستند که ممکن است منجر به کاهش APC (نتیجه مثبت کاذب) شود.

۱۰ صحه‌گذاری

به پیوست **الف** مراجعه شود.

۱۱ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید حداقل، شامل اطلاعات زیر باشد:

۱۱-۱ اطلاعات لازم برای شناسایی نمونه؛

۱۱-۲ ارجاع به این استاندارد ملی؛

۱۱-۳ تاریخ و روش نمونه‌برداری (اگر مشخص است)؛

۱۱-۴ تاریخ پذیرش؛

۱۱-۵ تاریخ آزمون؛

1- Fumigation

۱۱-۶ نتایج آزمون؛

۱۱-۷ نکات خاصی که در طول آزمون دیده می‌شوند؛

۱۱-۸ هر عملیاتی که در این روش مشخص نشده یا اختیاری لحاظ شده است و ممکن است بر نتایج اثر داشته‌باشد؛

۱۱-۹ هرگونه توصیه برای بررسی بیشتر نمونه، به‌عنوان مثال تأیید نتایج غربال‌گری با استفاده از روش خاص در مورد نتیجه مثبت DEFT/APC.

پیوست الف

(الزامی)

صحه‌گذاری

روش ترکیبی DEFT/APC برای گیاهان با مصارف خاص و ادویه‌ها به‌کار رفته است (به منابع [۲] و [۳] کتاب‌نامه مراجعه شود). هنگامی‌که نمونه‌های آل‌اسپایس[1]، فلفل و هِل در دُز کمینه ۱۰ kGy پرتودهی شده، تفاوت‌ها بین DEFT و APC برای آل‌اسپایس و فلفل سفید بیشتر از ۶ واحد لگاریتمی، برای فلفل سیاه بیشتر از ۴٫۵ واحد لگاریتمی و برای هل بیشتر از ۷ واحد لگاریتمی بودند (به منبع [۲] کتاب‌نامه مراجعه شود). هنگامی‌که ادویه‌ها مانند فلفل، پاپریکا، هِل، دارچین و زنجبیل و گیاهان دارویی مانند آویشن، مرزنجوش، ریحان و پونه‌کوهی، پس از پرتودهی در دُزهای kGy ۵ و kGy ۱۰، آنالیز شدند، تفاوت، بین DEFT و APC، به‌ترتیب، بین ۳٫۹ واحد لگاریتمی تا ۶٫۸ واحد لگاریتمی و بین ۵٫۷ و ۷٫۵ واحد لگاریتمی متفاوت است (به منبع [۳] کتاب‌نامه مراجعه شود).

یک مطالعه مشترک BCR[2] (به منبع [۱] کتاب‌نامه مراجعه شود) شامل ۱۹۲ نمونه از آل‌اسپایس کامل، فلفل سیاه کامل و پودر شده، فلفل سفید کامل، پودر پاپریکا، شاخه ریحان، شاخه مرزنجوش و هِل سابیده شده، پرتودهی‌نشده یا پرتودهی‌شده در دُزهای kGy ۵ و kGy ۱۰ بوده، که به‌وسیله هشت آزمایشگاه تجزیه و تحلیل شدند. مقادیر میانگین تفاوت بین DEFT و APC نمونه‌های پرتودهی شده در دزهای kGy ۵ و kGy ۱۰، به‌ترتیب ۵٫۱ واحد لگاریتمی و ۶٫۱ واحد لگاریتمی بود. برای تمام نمونه‌های پرتودهی‌شده مورد بررسی، تفاوت بین تعداد DEFT و APC به‌طور کلی حداقل به ۳٫۵ واحد لگاریتمی افزایش‌یافته، در حالی‌که تفاوت در مورد ادویه‌ها پرتودهی‌نشده، معنی‌دار نبود. انحراف معیار تفاوت‌ها، به‌ترتیب ٪ ۱۲٫۳، ٪ ۱۹٫۹ و ٪ ۲۰٫۷ برای نمونه‌های پرتودهی‌شده در دُزهای kGy ۱۰ و kGy ۵ و پرتودهی‌نشده، بوده است که نشان‌دهنده تغییرپذیری بین آزمایشگاه‌ها است.

احتمال قضاوت نمونه پرتودهی‌نشده به‌عنوان پرتودهی‌شده (نتیجه مثبت کاذب) با استفاده از حد ۴٫۰ واحد لگاریتمی کم است (به منبع [۱] کتاب‌نامه مراجعه شود). از سوی دیگر، حد ۴٫۰ واحد لگاریتمی، گاهی منجر به نتیجه منفی کاذب خواهد شد. این نتیجه، برای نمونه ریحان (به منبع [۱] و [۱۱] کتاب‌نامه مراجعه شود) نشان داده شده است.

---

1 -Allspice

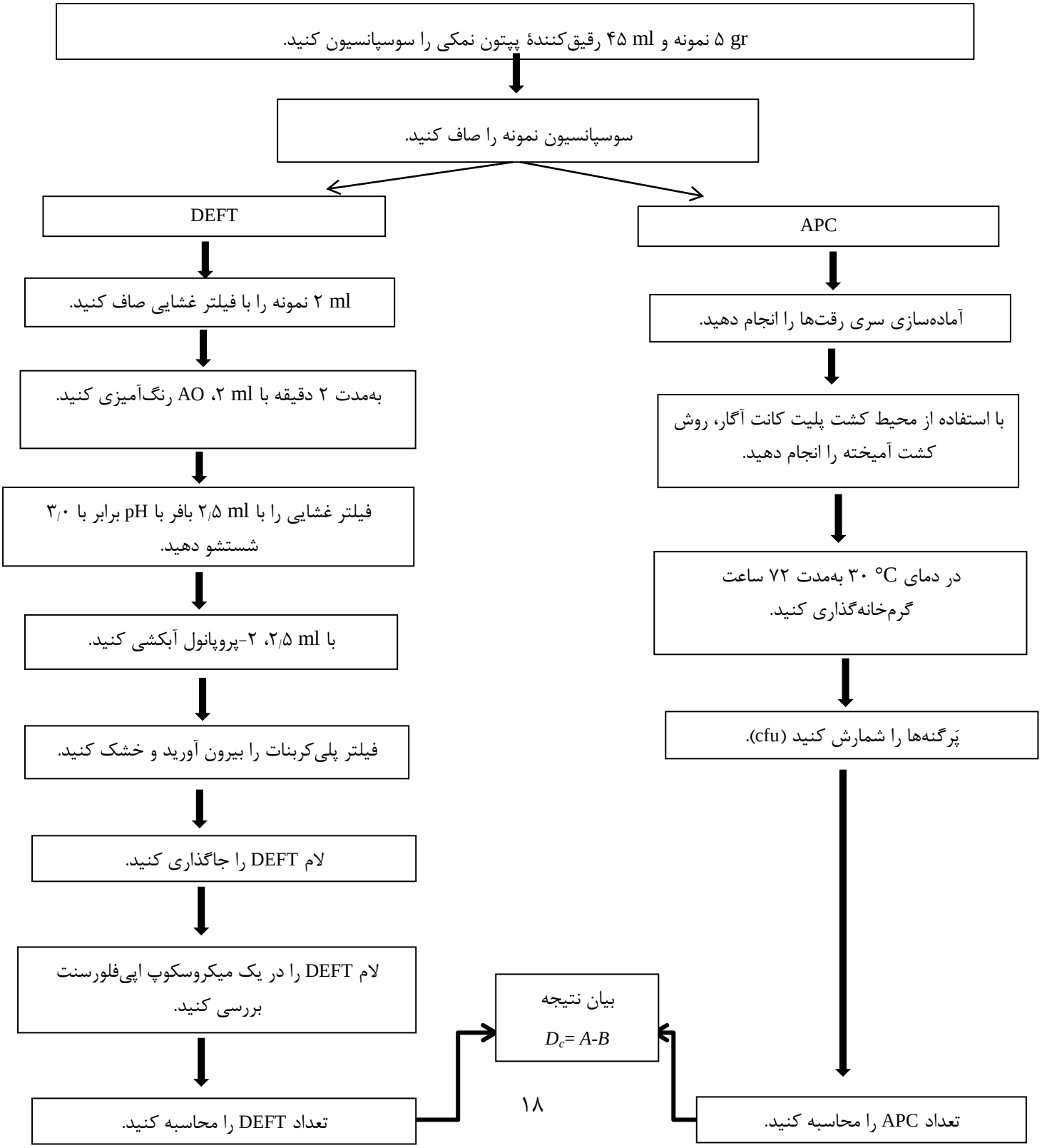
آل‌اسپایس همچنین به نام pimenta، جامائیکا پیتمن یا فلفل myrtle، میوه خشخاش خشک شده (انواع توت‌ها، به‌عنوان یک ادویه) از Pimenta dioica، یک درخت کوهی متوسط که بومی آنتیل‌های بزرگ، مکزیک جنوبی و آمریکای مرکزی است و اکنون در بسیاری از مناطق گرم جهان کشت می‌شود. نام انگلیسی آل‌اسپایس در اوایل سال ۱۶۲۱ توسط انگلیسی‌ها به‌کار رفته بود، که تصور می‌کردند عطر و بوی مصرف دارچین، ماکارونی و میخک را ترکیب کرده است.

2- Community Bureau of Reference

پیوست ب

(آگاهی‌دهنده)

نمودار گردش کار انجام آزمون



پیوست پ

(آگاهی‌دهنده)

مثال عملی برای محاسبه فاکتور میکروسکوپ

فاکتور میکروسکوپ، M، بر اساس فرمول (۲) محاسبه می‌شود (به بند ۸ مراجعه شود). M مختص هر آزمایشگاه است و به تجهیزات برای فیلتر کردن (به زیربند ۵-۱ مراجعه شود) و میکروسکوپ (به زیربندهای ۵-۷ و ۵-۸ مراجعه شود)، بستگی دارد.

برای مثال اگر:

F برابر با $۲۰۱\ mm^2$؛

A برابر با $۰/۰۲۰۱\ mm^2$ و

V برابر با $۲/۰\ ml$ باشد،

آن‌گاه، M برابر است با:

$$M = \frac{۲۰۱}{۰/۰۲۰۱ \times ۲} = ۵۰۰۰ \qquad \text{(الف-۱)}$$

پیوست ت

(الزامی)

تغییرات اعمال شده در این استاندارد ملی در مقایسه با استاندارد منبع

ت-۱ کلیات

تغییرات اعمال شده در متن استاندارد منبع در زیر بندهای زیر ارائه شده است.

ت- ۱-۱ بخش‌های جایگزین شده

- هشدار پیش‌گفتار منبع، با «هشدار ۱» قبل از هدف و دامنه کاربرد استاندارد جایگزین شده است.

- پاراگراف آخر بند ۱ منبع، با «یادآوری» هدف و دامنه کاربرد استاندارد جایگزین شده است.

- بند ۱۰ منبع با عنوان «صحه‌گذاری»، به پیوست **الف** منتقل شده است.

- پیوست آگاهی‌دهنده A منبع با عنوان «اطلاعات بیشتر درباره کاربرد»، به انتهای مقدمه استاندارد منتقل شده است.

-در بند ۷- ۹ منبع، شماره جدول از ۱ به ۹ تغییر پیدا کرده است.

ت- ۱-۲ بخش‌های اضافه شده

- «مقدمه» اضافه شده است.

- «هشدار ۲» قبل از هدف و دامنه کاربرد استاندارد، اضافه شده است.

- پیوست الزامی **پ** اضافه شده است.

- پیوست الزامی **ت** اضافه شده است.

کتاب‌نامه

[1] Wirtanen, G., Sjöberg, A-M., Boisen, F. and Alanko, T.: *Microbiological Screening method for Indication of Irradiation of Spices and Herbs: A BCR Collaborative Study*. Journal of AOAC International, 1993, 76, 674-681

[2] Sjöberg, A-M., Manninen, M., Pinnioja, S. and Harmala, P.Z.: *Methods for detection of irradiation of spices*. Zeitsch. Lebensm. Unters. Forsch., 1990, 190, 99-103

[3] Manninen, M. and Sjöberg, A.-M.: *Evaluation of a microbiological method for detection of irradiation of spices*. Zeitsch. Lebensm. Unters. Forsch., 1991, 192, 226-229

[4] Wirtanen, G. and Sjöberg, A-M.: *A microbiological method (DEFT/APC) for the identification of irradiation of spices and seafood.: Recent Advances on detection of irradiated food*. Edited by Leonardi, M., Raffi, J.J., and Belliardo, J.-J. BCR-Information. 1993, Luxembourg: Commission of the European Communities, 1993, (Report EUR/14315/en), 25-34

[5] Boisen, F. and Leth, T.: *Screening of imported spices for irradiation using the combined DEFT/APC method*. Internal report CLA 1993.2. (Danish version). Published by the Danish National Food Agency, 1993

[6] Betts, R. P., Farr, L., Bankes, P. and Stringer, M.F.: *Detection of irradiated foods using the Direct Epifluorescent Filter Technique*. Journal of Applied Bacteriology, 1988, 64, 329-335

[7] Boisen, F., Skovgaard, N., Ewald, S., Olsson, G. and Wirtanen, G.: *Quantitation of Microorganisms in Raw Minced Meat using the Direct Epifluorescent Filter Technique: NMKL Collaborative Study*. Journal of AOAC International, 1992, 75, 465-473

[8] Boisen, F.: Nordic Committee on Food Analysis (NMKL) standard, no. 137. *Bacterial count. Determination by Direct Epifluorescent Filter Technique (DEFT) in raw minced meat*, 1990

[9] Pettipher, G.L.: *The direct epifluorescent filter technique for the rapid enumeration of micro-organisms*. Research Studies Press LTD, 1983

[10] Copin, M-P., Jehanno, D. and Bourgeois C.M.: *Detection of irradiated deepfrozen foodstuffs by comparison of DEFT and APC counts. Journal of Applied Bacteriology*, 1993, 75, 254-258

[11] Hammerton, K.M. and Banos. C.: *Detection of irradiated spices with a microbiological method, DEFT/APC method: Detection Methods for Irradiated Foods - Current Status*. Edited by McMurray, C.H., Stewart, E.M., Gray, R., and Pearce, J. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1996, 392-396

[12] EN 1788, Foodstuffs — Thermoluminescence detection of irradiated food from which silicate minerals can be isolated

یادآوری- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۵۸۳: سال ۱۳۸۴، میکروبیولوژی مواد غذایی- آشکارسازی مواد غذایی پرتودهی شده حاوی مواد معدنی سیلیکاتی قابل تفکیک با استفاده از ترمولومینسانس- روش آزمون، با استفاده از استاندارد DIN/EN 1788 : 1997-03 تدوین شده است.

[13] EN 13751, Foodstuffs— Detection of irradiated food using photostimulated luminescence