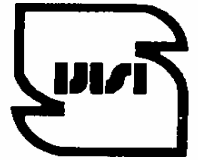




جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

Institute of Standards and Industrial Research of Iran



استاندارد ملی ایران

۹۲۶۳

چاپ اول

ISIRI

9263

1st.edition

میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام –
روش جامع برای شمارش کلیفرم ها –
روش شمارش کلنی

Microbiology of food and animal feeding
stuffs – Horizontal method for the
enumeration of coliforms –
Colony-count technique

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

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

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

بهاء + ۱۲۵ 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

Price: 1250 RLS

به نام خدا

آشنایی با مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

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

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه* صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف کنندگان، صادرکنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادهای در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذیصلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند در کمیته ملی طرح و بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که مؤسسه استاندارد تشکیل می دهد به تصویب رسیده باشد

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)^۱ کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)^۲ و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)^۳ است و به عنوان تنها رابط^۴ کمیسیون کدکس غذایی (CAC)^۵ در کشور فعالیت می کند در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بینالمللی بهره گیری می شود

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای 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 استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و یا اقلام وارداتی، 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 آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سا زمانها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست-محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، مؤسسه استاندارد این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آنها نظارت می کند ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این مؤسسه است

* مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

1- International organization for Standardization

2 - International Electro technical Commission

3- International Organization for Legal Metrology (Organization International de Metrology Legal)

4 - Contact point

5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون استاندارد " میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراکی دام - روش جامع برای شمارش کلیفرم ها - روش شمارش کلنی "

رئیس

اصلانی ، محمد مهدی
(دکترای میکروب شناسی)

سمت یا نمایندگی

انستیتو پاستور ایران

اعضاء

ابراهیمی امام ، غلامحسن
(لیسانس صنایع غذایی)

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

اطهری نیا ، معصومه
(فوق لیسانس بیولوژی)

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

بینای مطلق ، پروین
(فوق لیسانس مهندسی بهسازی)

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی -
مرکز سلامت محیط و کار

پیری آذر هریس ، رسول
(لیسانس میکروبیولوژی)

شرکت صنایع غذایی بهروز نیک

رحیمی فرد ، ناهید
(دکترای میکروب شناسی)

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی -
اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو

زرسازی ، گیتا
(لیسانس صنایع - کنترل کیفیت)

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

زندوکیلی ، فاطمه

(فوق لیسانس علوم بهداشتی در تغذیه)

شرکت صنایع غذایی پارس مینو

شاه حسینی ، مهناز

(فوق لیسانس صنایع غذایی)

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی -

شقایق ، غلامرضا

مرکز سلامت محیط و کار

(فوق لیسانس مهندسی محیط زیست)

شرکت صنایع غذایی پارس مینو

غلامی ، سپیده

(لیسانس میکروبیولوژی)

گروه تولیدی مهram

کهن نیا ، ناصر

(فوق لیسانس میکروبیولوژی)

سازمان حمایت از مصرف کنندگان و تولید کنندگان

مهرائی ، عباس

(فوق لیسانس صنایع غذایی)

دبیر

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

داورزنی ، ساره

(لیسانس علوم تغذیه)

فهرست مندرجات

صفحه

ب	پیش گفتار
پ	مقدمه
۱	هدف
۱	دامنه کاربرد
۱	مراجع الزامی
۲	اصطلاحات و تعاریف
۳	اساس روش
۳	نمونه برداری
۴	مواد لازم
۶	وسایل لازم
۷	روش اجرای آزمون

پیش گفتار

استاندارد " میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جامع برای شمارش کلیفرم ها - روش شمارش کلنی " که بوسیله کمیسیون فنی مربوطه تهیه و تدوین شده و در کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی و بیولوژی مورخ ۸۶/۶/۲۵ مورد تصویب قرار گرفته است، اینک به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاحی قوانین و مقررات موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ به عنوان استاندارد رسمی ایران منتشر می گردد.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفتهای ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدیدنظر خواهد شد و هرگونه پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها ارائه شود، در هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین برای مراجعه به استانداردهای ملی ایران باید همواره از آخرین چاپ و تجدیدنظر آنها استفاده کرد.

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 بین المللی و استاندارد ملی کشورهای صنعتی و پیشرفته هماهنگی ایجاد شود.

این استاندارد جایگزین قسمتی از استاندارد ملی ایران ۴۳۷ : سال ۱۳۷۵ ((روش جداسازی، شناسایی و شمارش کلی فرمها)) می شود و پس از تدوین استاندارد ملی ایران براساس ISO 4831:2006 باطل می شود.

منبع و مأخذی که برای تهیه این استاندارد به کار رفته به شرح زیر است:

1- ISO 4832 : 2006 , Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coliforms - Colony-count technique

مقدمه

کلیفرم ها، گروهی از باکتری های خانواده آنتروباکتریاسه^۱ هستند که گرم منفی، میله ای شکل، غیرمتحرک، هوازی، بی هوازی اختیاری و تخمیر کننده لاکتوز می باشند. این باکتری ها ساکن روده بزرگ انسان و حیوان هستند و دارای منشاء گیاهی و حیوانی می باشند. وجود آن ها در مواد غذایی شاخصی برای کیفیت بهداشتی است.

به منظور پایش کلیفرم ها در فرآورده های غذایی، تهیه روشی جامع برای شمارش آن ها در مواد غذایی ضروری است.

با توجه به تنوع فرآورده های غذایی، روش ارائه شده در این استاندارد ممکن است برای برخی فرآورده های خاص مناسب نباشد. در این موارد در صورت داشتن توجیهات و دلایل فنی کافی، ممکن است از سایر روش ها که خاص آن فرآورده است، استفاده شود.

روش ارائه شده در این استاندارد بسیار دقیق تر از سایر روش های شمارش کلیفرم هاست و در مواردی که تعداد کلیفرم ها در نمونه زیاد است، این روش ترجیح داده می شود.

با کاربرد این روش حدود ۹۰٪ از سویه ها مانند سویه های خاص سیتروباکتر^۲، انتروباکتر^۳ و کلبسیلا^۴ قابل جداسازی می باشد.

-
- 1- Entrobacteriaceae
 - 2- *Citrobacter*
 - 3- *Entrobacter*
 - 4- *Kelebsiella*

میکروبیولوژی مواد غذایی و فویراک دام – روش جامع برای شمارش

کلیفره ها – روش شمارش کلنی

۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد تعیین اصول کلی برای شمارش کلیفرم ها به روش شمارش کلنی^۱ در محیط کشت جامد پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۰ یا ۳۷ درجه سلسیوس است.

۲ دامنه کاربرد

این استاندارد برای مواد غذایی مورد مصرف انسان، خوراک دام، نمونه های محیطی در مکان های تولید مواد غذایی و سایر نمونه های در تماس با مواد غذایی کاربرد دارد.

یادآوری ۱- برای شیر و فرآورده های آن درجه حرارت گرمخانه گذاری ۳۰ درجه سلسیوس می باشد.

یادآوری ۲- این روش در مواردی که انتظار می رود تعداد کلنی های مورد شمارش بیش از ۱۰۰ در هر میلی لیتر یا هر گرم از آزمایش^۲ باشد توصیه می شود.

۳ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی 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 و تجدید نظرهای بعدی این مدرک مورد نظر نیست. معهذاً بهتر است کاربران ذینفع این استاندارد امکان کاربرد آخرین اصلاحیه ها و تجدید نظرهای مدارک الزامی زیر را مورد بررسی قرار دهند. در مورد مراجع بدون تاریخ چاپ و/یا تجدیدنظر، آخرین چاپ و/تجدیدنظر آن مدارک الزامی ارجاع داده شده مورد نظر است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربران این استاندارد الزامی است :

1- Colony-count technique

2- Test sample

۱-۳ استاندارد ملی ایران ۲-۸۶۶۳ میکروبیولوژی خوراک انسان و دام - راهنمای آماده سازی و تولید محیط های کشت - قسمت دوم- راهنمای عملی برای آزمون محیط های کشت

۲-۳ استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵ میکروبیولوژی - آیین کاربرد روش های عمومی آزمایش های میکروبیولوژی

۳-۳ استاندارد ملی ایران ۳۵۶ میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - تهیه سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمایش های میکروبیولوژی

۴-۳ استاندارد ملی ایران ۲۷۴۷ میکروبیولوژی - آیین کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

۵-۳ استاندارد ملی ایران ۲-۸۹۲۳ میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - آماده سازی آزمایش، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون میکروبیولوژی- قسمت دوم - مقررات ویژه برای آماده سازی گوشت و فرآورده های آن

۶-۳ استاندارد ملی ایران ۳-۸۹۲۳ میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - آماده سازی آزمایش، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون میکروبیولوژی- قسمت سوم - مقررات ویژه برای آماده سازی ماهی و فرآورده های آن

۷-۳ استاندارد ملی ایران ۴-۸۹۲۳ میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - آماده سازی آزمایش، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون میکروبیولوژی- قسمت چهارم- مقررات ویژه برای آماده سازی محصولات به غیر از شیر، گوشت، ماهی و فرآورده های آن

۱۴ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاح و/یا واژه با تعریف زیر به کار می رود:

۱-۱۴ کلیدها

باسیل های گرم منفی از خانواده آنتروباکتریاسه هستند که در شرایط تعیین شده در این استاندارد در دمای ۳۰ یا ۳۷ درجه سلسیوس روی محیط کشت کریستال ویوله دارای قرمز خنثی، نمک های صفراوی، لاکتوز و آگار (VRBL)^۱، کلنی های مشخص^۱ تشکیل می دهند و در آزمون تاییدی با تخمیر لاکتوز تولید گاز می کنند.

1- Crystal violet neutral red bile lactose agar (VRBL)

۵ اساس روش

۱-۵ مقدار معینی از آزمایش (در مورد فرآورده های مایع) یا سوسپانسیون اولیه و رقت های دهمی^۲ (در مورد سایر فرآورده ها) به پلیت ها به صورت دوتایی^۳ تلقیح می شود و سپس محیط کشت جامد انتخابی به آن تلقیح می شود.

۲-۵ پلیت ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس (در مورد شیر و فرآورده های آن) یا ۳۷ درجه سلسیوس (در مورد سایر مواد غذایی) به مدت زمان ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری می شود.

۳-۵ کلنی های مشخص کلیفرم ها شمارش می شوند و در صورت لزوم تعدادی از کلنی ها با روش تخمیر لاکتوز تایید می شوند.

۴-۵ با شمارش کلنی ها در پلیت های منتخب، تعداد کلنی ها در هر میلی لیتر یا هر گرم از نمونه محاسبه می شود.

۶ نمونه برداری

نمونه هایی که به آزمایشگاه تحویل داده می شوند باید نماینده واقعی کل محموله بوده و در طی حمل، جابجایی و نگهداری آسیب ندیده و یا تغییری در آن ایجاد نشده باشد. برای آگاهی بیشتر از شرایط کلی نمونه برداری و نگهداری نمونه برای آزمون های میکروبیولوژی به استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵ مراجعه کنید.

۷ مواد لازم

۱-۷ کلیات

آماده سازی، تهیه و کنترل عملکرد محیط های کشت و محلول های رقیق کننده را مطابق با استانداردهای ملی ایران ۲-۸۹۲۳، ۳-۸۹۲۳، ۴-۸۹۲۳ و ۲-۸۶۶۳ انجام دهید.

1- Characteristic colonies
2- Decimal
3- Duplicate

در صورت استفاده از محیط‌های کشت قابل دسترس از بازار، آماده سازی آن را مطابق با دستورالعمل سازنده انجام دهید.

آب مقطر مورد استفاده برای تهیه محیط‌های کشت و محلول‌های رقیق کننده باید با استاندارد ملی ایران ۲۷۴۷ مطابقت داشته باشد.

۲-۷ محیط‌های کشت

۱-۲-۷ محیط کشت انتخابی جامد: کریستال ویوله، دارای قرمز فنثی، نمک‌های صفرای، لاکتوز و آگار (VRBL)

مقدار	مواد تشکیل دهنده
۷/۰ گرم	هضم شده آنزیمی بافت‌های حیوانی ^۱
۳/۰ گرم	عصاره مخمر
۱۰/۰ گرم	لاکتوز
۵/۰ گرم	سدیم کلراید
۱/۵۰ گرم	نمک‌های صفرای
۰/۰۳ گرم	قرمز خنثی
۰/۰۰۲ گرم	کریستال ویوله
۱۲ تا ۱۸ گرم ^۲	آگار
۱۰۰۰ میلی لیتر	آب مقطر

روش تهیه:

برای حفظ قدرت انتخابی^۳ و اختصاصی بودن^۴ محیط کشت، آماده سازی را به شرح زیر انجام دهید: مواد فوق را کاملاً مخلوط کرده، در آب مقطر حل کنید و برای چند دقیقه آن را در حالت سکون قرار دهید. سپس محیط کشت را به مدت ۲ دقیقه بجوشانید و در حین جوشاندن آن را تکان دهید. pH را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از جوشاندن برابر با $7/4 \pm 0/2$ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باشد. بلافاصله محیط کشت را در حمام آب با دمای ۴۴ تا ۴۷ درجه سلسیوس خنک کنید.

1- Enzymatic digest of animal tissues

۲- مقدار آگار به قدرت ژله‌ای شدن آن بستگی دارد.

3- Selectivity

4- Specificity

برای پیشگیری از حرارت زیاد، محیط را به مدت طولانی نجوشانید و آن را حرارت مجدد ندهید. از سترون بودن محیط کشت در هنگام استفاده نیز اطمینان حاصل کنید. محیط کشت فوق را در اتوکلاو سترون نکنید و آن را حداکثر تا ۴ ساعت پس از تهیه، مصرف کنید.

۲-۲-۷ محیط کشت تاییدی : محیط کشت آبگوشت سبز درخشان دارای لاکتوز و صفرا^۱

مقدار	مواد تشکیل دهنده
۱۰/۰ گرم	کازئین هضم شده آنزیمی ^۲
۱۰/۰ گرم	لاکتوز
۲۰/۰ گرم	پودر صفرای گاوی ^۳
۰/۰۱۳۳ گرم	سبز درخشان
۱۰۰۰ میلی لیتر	آب مقطر

روش تهیه:

مواد فوق را کاملاً مخلوط کرده و در آب مقطر حل کنید. در صورت لزوم برای حل کردن از حرارت ملایم استفاده کنید. pH را به گونه ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی برابر با 7.2 ± 0.2 در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باشد.

محیط کشت را در مقادیر ۱۰ میلی لیتری در لوله های آزمایش (طبق بند ۸-۷) که حاوی لوله دورهام (طبق بند ۸-۸) می باشد، تقسیم کنید. سپس آن را در اتوکلاو (طبق بند ۸-۱) با دمای 121 ± 3 درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید.

لوله های دورهام^۴ نباید پس از سترون سازی، حباب هوا داشته باشد.

۸ وسایل لازم

از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی مطابق با استاندارد ملی ایران ۲۷۴۷ و همچنین وسایل زیر استفاده کنید :

-
- 1- Brilliant green lactose bile broth
 - 2- Enzymatic digest of casein
 - 3- Dehydrated ox bile
 - 4- Durham tubes

- ۱-۸ آون^۱ برای سترون سازی خشک و اتوکلاو برای سترون سازی مرطوب
- ۲-۸ گرمخانه قابل تنظیم در دمای 30 ± 1 درجه سلسیوس و 37 ± 1 درجه سلسیوس
- ۳-۸ پلیت شیشه ای یا پلاستیکی با قطر ۹۰ میلی متر تا ۱۰۰ میلی متر
- ۴-۸ پیپت یک و ده میلی لیتری
- ۵-۸ حمام آب^۲ با قابلیت تنظیم در دمای ۴۴ تا ۴۷ درجه سلسیوس و دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس
- ۶-۸ دستگاه شمارش کلنی^۳ دارای یک منبع نورانی و یک شمارشگر الکترونیکی یا مکانیکی
- ۷-۸ لوله های آزمایش به ابعاد ۱۶×۱۶۰ میلی متر و ۲۰×۲۰۰ میلی متر
- ۸-۸ لوله دورهام
- ۹-۸ ارلن با گنجایش مناسب
- ۱۰-۸ pH متر با دقت ± 0.1 واحد در دمای ۲۵ درجه سلسیوس
- ۱۱-۸ حلقه کشت از جنس پلاتین ایریدیوم^۴ یا نیکل کرومیوم^۵ با قطر تقریبی ۳ میلی متر یا حلقه کشت یکبار مصرف

۹ روش اجرای آزمون

۱-۹ تهیه آزمون، سوسپانسیون اولیه و رقت ها

تهیه آزمون، سوسپانسیون اولیه و رقت های بعدی را مطابق با استانداردهای ملی ایران ۳۵۶، ۸۹۲۳-۲، ۸۹۲۳-۳ و ۸۹۲۳-۴ انجام دهید.

۲-۹ تلقیح و گرمخانه گذاری

-
- 1- Oven
 - 2- Water bath
 - 3- Colony-counter
 - 4- Platinum-iridium
 - 5- Nickel-chromium

۱-۲-۹ برای هر یک از فرآورده‌های مایع و/یا رقت انتخاب شده، دو پلیت را آماده کنید. با استفاده از پیپت سترون (طبق بند ۸-۴) مقدار یک میلی لیتر از فرآورده مایع یا رقت مناسب را در مرکز هر پلیت بریزید.

برای تلقیح هر رقت از پیپت جداگانه استفاده کنید.

۲-۲-۹ حدود ۱۵ میلی لیتر از محیط کشت جامد VRBL (طبق بند ۷-۲-۱) با دمای حدود ۴۴ تا ۴۷ درجه سلسیوس را در هر پلیت بریزید. پس از مخلوط کردن کامل محیط کشت با ماده تلقیح شده، پلیت‌ها را روی سطح افقی و خنک قرار دهید تا ببندد. برای کنترل سترونی محیط کشت، یک پلیت شاهد را که فقط حاوی ۱۵ میلی لیتر محیط کشت است، تهیه کنید.

مدت زمان بین تهیه سوسپانسیون اولیه تا هنگام ریختن محیط کشت در پلیت‌ها نباید از ۱۵ دقیقه بیشتر شود.

۳-۲-۹ پس از بسته شدن کامل محیط کشت مجدداً حدود ۴ میلی لیتر از محیط کشت VRBL (طبق بند ۷-۲-۱) با دمای حدود ۴۴ تا ۴۷ درجه سلسیوس را روی آن بریزید. سپس پلیت‌ها را روی سطح افقی و خنک قرار دهید تا ببندد.

۴-۲-۹ پلیت‌ها را به صورت وارونه در دمای ۳۰ یا ۳۷ درجه سلسیوس به مدت زمان 2 ± 2 ساعت گرمخانه‌گذاری کنید.

۹-۳ شمارش

پس از پایان زمان گرمخانه‌گذاری (طبق بند ۹-۲-۳) پلیت‌های دارای بیشتر ۱۰ کلنی و کمتر از ۱۵۰ کلنی را برای شمارش انتخاب کنید. کلنی‌های قرمز ارغوانی با قطر حداقل ۰/۵ میلی متر (گاهی با هاله مایل به قرمز ناشی از رسوب صفر) کلنی‌های شاخص^۱ کلیفرم هستند که نیازی به انجام آزمون‌های تاییدی ندارند. با استفاده از دستگاه شمارش کلنی (طبق بند ۸-۶) آن‌ها را شمارش کنید. همچنین بلافاصله پس از دوره گرمخانه‌گذاری، کلنی‌های غیرشاخص^۲ کلیفرم (برای مثال با اندازه کوچکتر) و همه کلنی‌های به دست آمده از فرآورده‌های شیری حاوی قند غیر از لاکتوز را شمارش و مطابق با بند ۹-۴ تایید کنید. تخمیر سایر قندها به غیر از قند لاکتوز ممکن است باعث ایجاد کلنی‌هایی با ظاهر مشابه کلیفرم‌های شاخص شود.

1- Typical
2- Atypical

یادآوری - پیدایش هاله مایل به قرمز ناشی از رسوب صفرا در اطراف کلنی به نوع کلی فرم و کیفیت محیط کشت بستگی دارد.

۹-۱۴ آزمون تاییدی

تعداد ۵ کلنی غیر شاخص را در لوله های حاوی محیط کشت آبگوشت سبز درخشان دارای لاکتوز و صفرا (طبق بند ۷-۲-۲) کشت دهید. سپس لوله ها را در گرمخانه با دمای ۳۰ یا ۳۷ درجه سلسیوس به مدت زمان 24 ± 2 ساعت گرمخانه گذاری کنید. کلیفرم ها با تخمیر لاکتوز در لوله دورهام ایجاد گاز می کنند. کلنی های تایید شده را نیز در شمارش منظور کنید. (طبق بند ۱۰)

۱۰ شمارش

تعداد کلیفرم ها (N) در هر میلی لیتر یا هر گرم از نمونه را طبق فرمول ۱ محاسبه کنید:

$$N = \frac{\sum a + \sum a'}{V(n_1 + 0.1n_2)d} \quad \text{فرمول ۱}$$

که در آن:

N تعداد کلیفرم ها در هر میلی لیتر یا هر گرم از نمونه؛

V حجم آزمایش تلقیح شده در هر پلیت؛

n_1 تعداد ظروف پلیت شمارش شده در اولین رقت (وقتی که دارای مقدار بیشتری از نمونه است)؛

n_2 تعداد ظروف پلیت شمارش شده در دومین رقت (وقتی که دارای مقدار کمتری از نمونه است)؛

d ضریب رقت بر حسب اولین رقت؛

$\sum a$ مجموع کلنی های شاخص شمارش شده در تمام پلیت ها و

$\sum a'$ مجموع کلنی های غیر شاخص شمارش و تایید شده در تمام پلیت ها (طبق فرمول ۲).

با استفاده از فرمول ۲ کلنی های غیر شاخص را در هر پلیت محاسبه کنید:

$$a' = \frac{b}{A} \times C$$

که در آن:

a' تعداد کلنی های غیر شاخص شمارش و تایید شده در هر پلیت؛

A تعداد کلنی های غیر شاخص انتخاب شده در هر پلیت؛

b تعداد کلنی های غیر شاخص تایید شده در هر پلیت و

C تعداد کل کلنی های غیر شاخص شمارش شده در هر پلیت.

عدد محاسبه شده (N) را تا دو رقم معنی دار گرد کنید. برای این منظور، اگر آخرین رقم سمت راست زیر ۵ بود رقم قبلی تغییری نمی کند و اگر آخرین رقم مساوی یا بیشتر از ۵ بود، به رقم قبلی یک واحد اضافه می شود.

برای کسب آگاهی های بیشتر به استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵ مراجعه کنید.

۱۱ بیان نتایج

نتایج را به صورت تعداد کلنی در هر میلی لیتر یا هر گرم از نمونه بیان کنید.

۱۲ دقت

بر اساس داده های توزیع آماری پواسون^۱ میکروارگانسیم ها در نمونه های آزمایش شده، حدود اطمینان^۲ این روش برای شمارش کلنی های کلیفرم بین $\pm 16\%$ تا $\pm 52\%$ متغیر است. در عمل حتی ممکن است تغییرات بیشتری مشاهده شود.

در مطالعات مختلف گروهی^۳ به نظر می رسد که انحراف معیار تکرارپذیری^۴، $0/2$ واحد لگاریتم و انحراف معیار تجدیدپذیری^۵ $0/35$ واحد لگاریتم باشد.

-
- 1- Poisson distribution
 - 2- Confidence limits
 - 3- Collaborative
 - 4- Repeatability
 - 5- Reproducibility

برای کسب آگاهی های بیشتر درباره حدود اطمینان به استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵ مراجعه کنید.

۱۳ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی های زیر باشد :

- | | |
|--|------|
| مشخصات کامل نمونه | ۱-۱۳ |
| تاریخ و محل نمونه برداری | ۲-۱۳ |
| تاریخ ارسال نمونه به آزمایشگاه | ۳-۱۳ |
| تاریخ انجام آزمون | ۴-۱۳ |
| روش آزمون مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۹۲۶۳ سال ۱۳۸۶ | ۵-۱۳ |
| بیان نتایج طبق بند ۱۱ استاندارد ملی ایران ۹۲۶۳ | ۶-۱۳ |
| سایر اطلاعات مربوط به روش آزمون | ۷-۱۳ |
| نام، نام خانوادگی و امضای آزمایش کننده | ۸-۱۳ |

ICS: 07.100.30

صفحة : ٩
