ISIRI
9415
1st.Edition

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
Institute of Standards and Industrial Research of Iran

استاندارد ملی ایران
۹۴۱۵
چاپ اول

شیر و فراورده های آن –
روش آماده سازی آزمایه ، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون میکروبیولوژی - راهنمای کلی

Milk and milk products –
Methods for the preparation of test samples , initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination - General guidance

بسمه تعالي» «

آشنايي با مؤسسه استاندارد و تحقيقات صنعتي ايران

مؤسسه استاندارد و تحقيقات صنعتي ايران به موجب قانون، تنها مرجع رسمي كشور است كه عهده دار وظيفه تعيين، تدوين و نشر استانداردهاي ملي (رسمي) ميباشد.

تدوين استاندارد در رشته هاي مختلف توسط كميسيون هاي فني مركب از كارشناسان مؤسسه، صاحبنظران مراكز و مؤسسات علمي، پژوهشي، توليدي واقتصادي آگاه ومرتبط با موضوع صورت ميگيرد. سعي بر اين است كه استانداردهاي ملي، در جهت مطلوبيت ها و مصالح ملي وبا توجه به شرايط توليدي، فني و فن آوري حاصل از مشاركت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع شامل: توليدكنندگان ،مصرف كنندگان، بازرگانان، مراكز علمي و تخصصي و نهادها و سازمانهاي دولتي باشد.پيش نويس استانداردهاي ملي جهت نظرخواهي براي مراجع ذينفع واعضاي كميسيون هاي فني مربوط ارسال ميشود و پس از دريافت نظرات وپيشنهادها در كميته ملي مرتبط با آن رشته طرح ودر صورت تصويب به عنوان استاندارد ملي (رسمي) چاپ و منتشر مي شود.

پيش نويس استانداردهايي كه توسط مؤسسات و سازمانهاي علاقمند و ذيصلاح و با رعايت ضوابط تعيين شده تهيه مي شود نيز پس از طرح و بـررسي در كميته ملي مربوط و در صورت تصويب، به عنوان استاندارد ملي چاپ ومنتشرمي گردد. بدين ترتيب استانداردهايي ملي تلقي مي شود كه بر اساس مفاد مندرج در استاندارد ملي شماره ((۵)) تدوين و در كميته ملي مربوط كه توسط مؤسسه تشكيل ميگردد به تصويب رسيده باشد.

مؤسسه استاندارد و تحقيقات صنعتي ايران از اعضاي اصلي سازمان بين المللي استاندارد ميباشد كه در تدوين استانداردهاي ملي ضمن تـوجه به شرايط كلي ونيازمنديهاي خاص كشور، از آخرين پيشرفتهاي علمي، فني و صنعتي جهان و استانداردهـاي بين المـللي استفـاده مي نمايد.

مؤسسه استاندارد و تحقيقات صنعتي ايران مي تواند با رعايت موازين پيش بيني شده در قانون به منظور حمايت از مصرف كنندگان، حفظ سلامت و ايمني فردي وعمومي، حصول اطمينان از كيفيت محصولات و ملاحظات زيست محيطي و اقتصادي، اجراي بعضي از استانداردها را با تصويب شوراي عالي استاندارد اجباري نمايد. مؤسسه مي تواند به منظور حفظ بازارهاي بين المللي براي محصولات كشور، اجراي استاندارد كالاهاي صادراتي و درجه بندي آنرا اجباري نمايد.

همچنين بمنظور اطمينان بخشيدن به استفاده كنندگان از خدمات سازمانها و مؤسسات فعال در زمينه مشاوره، آموزش، بازرسي، مميزي و گواهي كنندكان سيستم هاي مديريت كيفيت ومديريت زيست محيطي، آزمايشگاهها و كاليبره كنندگان وسايل سنجش، مؤسسه استاندارد اينگونه سازمانها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأييد صلاحيت ايران مورد ارزيابي قرار داده و در صورت احراز شرايط لازم، گواهينامه تأييد صلاحيت به آنها اعطا نموده و بر عملكرد آنها نظارت مي نمايد. ترويج سيستم بين المللي يكاها ، كاليبراسيون وسايل سنجش تعيين عيار فلزات گرانبها و انجام تحقيقات كاربردي براي ارتقاي سطح استانداردهاي ملي از ديگر وظايف اين مؤسسه مي باشد.

نشاني مؤسسه استاندارد و تحقيقات صنعتي ايران : كرج ـ شهر صنعتي، صندوق پستي ۳۱۵۸۵-۱۶۳

دفتر مركزي : تهران ـ ضلع جنوبي ميدان ونك – صندوق پستي : ۱٤۱۵۵-٦۱۳۹

تلفن مؤسسه در كرج: ۸-۲۸۰٦۰۳۱-۰۲٦۱

تلفن مؤسسه در تهران: ۵-۸۸۷۹٤٦۱-۰۲۱

دورنگار: كرج ۲۸۰۸۱۱٤-۰۲٦۱ ـ تهران ۸۸۸۷۱۰۳-۸۸۸۷۰۸۰ -۰۲۱

بخش فروش ـ تلفن: ۲۸۰۷۰٤۵-۰۲٦۱ دورنگار: ۲۸۰۷۰٤۵-۰۲٦۱

پيام نگار: Standard @ isiri.or.ir

بهاء ۲۰۰۰ ريال

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: 2000 RLS

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

« شیر و فراورده های آن-روش آماده سازی آزمایه ، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون میکروبیولوژی- راهنمای کلی »

رئیس:	**سمت و/ یا نمایندگی**
رحیمی فرد ، ناهید (دکترای میکروبیولوژی)	عضو هیئت علمی وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی
دبیر:	
ابراهیمی امام ، غلامحسن (لیسانس صنایع غذایی)	کارشناس گروه پژوهشی میکروبیولوزی - موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
بابائی ، پریسا (فوق لیسانس صنایع غذایی)	کارشناس شرکت شیر پاستوریزه پگاه تهران
حسینی بیوکی ، سید محمد باقر (لیسانس تغذیه)	کارشناس مسئول شرکت صنایع شیر ایران
سیروس ، سحر (لیسانس صنایع غذایی)	کارشناس شرکت بازرگانی مواد غذایی شکّلی
صارمی نائینی ، ساغر (لیسانس صنایع غذایی)	کارشناس قوانین کیفی شرکت نستله ایران
فیاضی ، اکرم سادات (لیسانس تغذیه)	کارشناس گروه پژوهشی میکروبیولوژی- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
قندچی ، آزیتا (لیسانس علوم آزمایشگاهی)	مسئول ایمنی مواد غذایی شرکت نستله ایران
نیاورانی ، طاهره (لیسانس بیولوژی)	کارشناس گروه پژوهشی میکروبیولوژی - موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

پیش گفتار

استاندارد" شیر و فراورده های آن – روش آماده سازی آزمایه ، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون میکروبیولوژی –راهنمای کلی " که پیش نویس آن درکمیسیون های مربوط توسط (مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران) تهیه و تدوین شده و در سی و یکمین اجلاس کمیتهٔ ملی استاندارد میکروبیولوژی مورخ ۸۶/۹/۴ مورد تصویب قرار گرفته است ، اینک به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ ، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود .

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت های ملی و جهانی در زمینهٔ صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت . بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی استفاده کرد.

منبع و ماخذی که برای تهیهٔ این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

ISO 8261 IDF 122 : 2001 Milk and milk products – General guidance for the preparation of test samples , initial suspentions and decimal dilutions for microbiological examination

مقدمه

محصولات تشکیل دهنده گروه غذایی شیر وفراورده های آن از تنوع وسیعی در خصوصیات فیزیکی وشیمیایی برخوردارند واین امر نه تنها در ویژگی ها ، بلکه در روش های آزمون میکروبیولوژی فراورده های یاد شده تاثیر زیادی برجای میگذارد . در این گروه فراورده های مایع ، نیمه جامد ، جامد ، پودری شکل ، همچنین با اسیدیته خیلی بالا و / یا نزدیک به خنثی قرار دارند .

در استاندارد حاضر با توجه به خصوصیات یاد شده و برای جلوگیری ازآسیب وارده به میکروارگانیسم های موجود وبا هدف شناسایی وشمارش دقیق آنها ، همچنین بازیابی میکروارگانیسم های آسیب دیده در اثر فرآیند حرارتی و / یااسیدیته حاصل از تخمیر ، تغییرات لازم در ترکیب رقیق کننده ها و روش آماده سازی نمونه ها صورت گرفته است .

مسئله انتخاب مناسب ترین رقیق کننده در آزمون های میکروبیولوژی ، چالشی است که همیشه مطرح بوده وخواهد بود .در این استاندارد برای غلبه بر مشکلات ، برای برخی فراورده ها رقیق کننده اختصاصی تعیین شده است و برای سایر فراورده ها از رقیق کننده های جاری ومرسوم در آزمایشگاه های میکروبیولوژی مواد غذایی استفاده می شود .

عنوان	صفحه
آشنایی با موسسه استاندارد	ه
کمیسیون فنی تدوین استاندارد	و
پیش گفتار	ز
مقدمه	ح
۱ هدف	۱
۲ دامنه کاربرد	۱
۳ مراجع الزامی	۱
۴ اصطلاحات و تعاریف	۲
۵ اساس آزمایش	۳
۶ نمونه برداری	۳
۷ مواد لازم	۳
۷-۱ رقیق کننده ها	۳
۷-۱-۱ کلیات	۳
۷-۱-۲ رقیق کننده های عمومی	۴
۷-۱-۳ رقیق کننده های اختصاصی	۵
۷-۱-۴ توزیع ، سترون کردن و نگهداری رقیق کننده ها	۷
۸ وسایل لازم	۸
۸-۱ کلیات	۸
۹ روش کار	۱۰
۹-۱ کلیات	۱۰
۹-۲ آماده سازی آزمونه و رقت اولیه	۱۰
۹-۲-۱ کلیات	۱۰
۹-۲-۲ شیر وفراورده های مایع شیر	۱۱
۹-۲-۳ شیر خشک ، پودر آب پنیر (شیرین و اسیدی) ، پودر دوغ کره	۱۱
۹-۲-۴ پنیر و پنیر پروسس	۱۲
۹-۲-۵ کازئین (اسیدی ، لاکتیکی و آنزیمی) و کازئینات	۱۲
۹-۲-۶ کره	۱۳
۹-۲-۷ بستنی و سایر فراورده های یخ زده شیر	۱۴
۹-۲-۸ خامه ، کاستارد و دسر	۱۴
۹-۲-۹ شیر تخمیر شده و خامه ترش	۱۴
۹-۲-۱۰ انواع خوراک شیر خواران و غذای کودک	۱۴
۹-۳ رقت های اعشاری	۱۵
۹-۴ مدت زمان اجرای روش کار	۱۶

شیر و فراورده های آن-روش آماده سازی آزمایه[1] ،سوسپانسیون اولیه[2] و رقت های اعشاری[3] برای آزمون میکروبیولوژی – راهنمای کلی

۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد ، تعیین روش آماده سازی آزمایه ، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری به منظور انجام آزمون های میکروبیولوژی می باشد .

۲ دامنه کاربرد

این استاندارد برای شیر و فراورده های آن ، انواع خوراک شیرخواران و غذای کودک کاربرد دارد .

یادآوری- در این استاندارد ، چگونگی آماده سازی برای آزمون چند میکروارگانیسم به طور همزمان تعیین شده است . برای جستجو ، شناسایی و شمارش فقط یک میکروارگانیسم خاص ، به استاندارد مربوطه آن مراجعه کنید .

۳ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد ملی ایران 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 نظر های بعدی آن مورد نظر این استاندارد ملی ایران نیست . در مورد مدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آنها ارجاع داده شده است ، همواره آخرین تجدید نظر واصلاحیه های بعدی آنها مورد نظر است .

استفاده از مراجع زیر برای این استاندارد الزامی است :

۳-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۲۵ ، میکروبیولوژی- آیین کاربرد روش های عمومی در آزمایش های میکروبیولوژی

۳-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۲۷۴۷ ، میکروبیولوژی- آیین کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

۳-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۳۲۶ ، شیر و فراورده های آن- نمونه برداری

۳-۴ استاندارد ملی ایران شماره ۳۵۶ ، میکروبیولوژی مواد غذایی وخوراک دام – تهیه سوسپانسیون اولیه ورقت های اعشاری برای آزمایش های میکروبیولوژی

1-Test sample
2-Initial suspention
3-Decimal dilution

۴ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد ، اصطلاحات و تعاریف زیر به کار می رود :

۱-۴

سوسپانسیون اولیه (رقت اولیه)[1]

سوسپانسیون ، امولسیون یا محلولی است که بعد از مخلوط و یکنواخت کردن مقدار معین وزنی یا حجمی از نمونه یا آزمایه (فراورده های مایع) با مایع رقیق کننده به نسبت یک به نه و پس از ته نشین شدن ذرات درشت (در صورت موجود بودن) به دست می آید (رقت $۱۰^{-۱}$) .

یادآوری ۱ – در بعضی موارد به ویژه در نمونه هایی که رقت اولیه تهیه شده با نسبت یک به نه خیلی غلیظ است ، و / یا برای آزمون یک ویژگی خاص ، می توان حجم رقیق کننده را افزایش داد . این تغییر باید در عملیات بعدی و بیان نتایج مورد توجه قرار بگیرد .

یادآوری ۲ – با استفاده از اولین رقت امکان شمارش میکروارگانیسم ها به تعداد کمتر از ده در گرم ، وجود ندارد . ولی در بعضی فراورده ها می توان با کاهش حجم رقیق کننده در هنگام تهیه سوسپانسیون به شمارش کمتر از ده در گرم ، نائل شد . در این صورت،سوسپانسیون تلقیحی غلیظ تر بوده و ممکن است کارآیی محیط کشت را تحت تاثیر قرار دهد.

۲ - ۴

رقت های اعشاری

به سوسپانسیون ، امولسیون یا محلول هایی گفته می شود که بعد از مخلوط و یکنواخت کردن حجم معینی از رقت اولیه با نُه برابر حجمی آن از مایع رقیق کننده و تکرار این عمل با هر رقت جدید حاصل می شود .

۳-۴

آزمایه

مقدار مناسبی از نمونه است که با رعایت شرایط بهداشتی از نمونه های ارسال شده به آزمایشگاه جهت انجام آزمایش های گوناگون تهیه می شود . بعضی از نمونه های آزمایشگاهی بدون هیچ تغییری و تنها با مخلوط کردن می توانند به عنوان آزمایه به کار روند .

1-Primary dilution

۴-۴

آزمونه[1]

مقدار منا سبی از نمونه است که برای انجام یک آزمایش یا برای تهیه رقت اولیه به طور وزنی یا حجمی برداشته می شود . قبل از برداشتن آزمونه ، باید آزمایه خوب مخلوط گردد تا توزیع یکنواختی از میکروارگانیسم ها حاصل شود .

۵ اساس آزمایش

آماده سازی آزمایه ، تهیه رقت اولیه و در صورت لزوم رقت های اعشاری ، به منظور کاهش تعداد میکروارگانیسم ها در واحد وزن یا حجم ، برای آسان شدن انجام آزمون های میکروبیولوژی و به دست آوردن نتایج مطلوب

۶ نمونه برداری

برای اطلاع از چگونگی نمونه برداری شیر و فراورده های آن به استاندارد ملی ایران شماره ۳۲۶ مراجعه کنید .

۷ مواد لازم

۷-۱ رقیق کننده ها

۷-۱-۱ کلیات

توصیه می شود که برای افزایش دقت نتایج ، از مواد اولیه بدون آب استفاده شده و دستورالعمل کارخانه سازنده به دقت اجرا شود .

فقط از مواد شیمیایی با درجه خلوص آزمایشگاهی استفاده کنید ، مگر درمواردی که به گونه دیگر توصیه شده باشد و از آب مقطر یا آب بدون یون با کیفیت مشابه آب مقطر استفاده کنید .

برای تنظیم pH ، از محلول های هیدروکسید سدیم یا اسید کلر یدریک با مولاریته مناسب به گونه ای که سبب تغییر حجم و برهم زدن فرمول ترکیب رقیق کننده ها نشود ،استفاده کنید . به طور کلی برای حجم های کمتر ، از محلول های با مولاریته بیشتر استفاده کنید .

برای اطلاع بیشتر از روش های کار در آزمایشگاه میکروبیولژی به استانداردهای ملی ایران شماره ۲۷۴۷ و ۲۳۲۵ مراجعه کنید .

1-Test portion

۷-۱-۲ رقیق کننده های عمومی

۷-۱-۲-۱ محلول پپتون نمکی

مواد تشکیل دهنده	مقدار
پپتون یا هضم شده آنزیمی کازئین	۱/۰ گرم
کلرور سدیم (NaCl)	۸/۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

مواد تشکیل دهنده رادر آب مقطر و در صورت لزوم با حرارت دادن ملایم در دمای ۴۵ تا۵۰ درجه سلسیوس حل کنید . pH را به گونه ای تنظیم کنید که بعد از سترون کردن ، برابر ۷/۰±۰/۲ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باشد .

۷-۱-۲-۲ محلول رینگر یک چهارم

مواد تشکیل دهنده	مقدار
کلرور سدیم (NaCl)	۲/۲۵ گرم
کلرور پتاسیم (KCl)	۰/۱۰۵ گرم
کلرور کلسیم بدون آب ($CaCl_2$)	۰/۰۶ گرم
کربنات هیدروژن سدیم ($NaHCO_3$)	۰/۰۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

مواد تشکیل دهنده رادر آب حل کنید . pH را به گونه ای تنظیم کنید که بعد از سترون کردن برابر ۶/۹ ±۰/۲ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باشد .

۷-۱-۲-۳ محلول پپتون

مواد تشکیل دهنده	مقدار
پپتون	۱/۰ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

پپتون را در آب مقطر حل کنید . pH را به گونه ای تنظیم کنید که بعد از سترون کردن برابر۷/۰±۰/۲ دردمای ۲۵ درجه سلسیوس باشد .

۷-۱-۲-۴ محلول بافر فسفات

مواد تشکیل دهنده	مقدار
فسفات دی هیدروژن پتاسیم (KH_2PO_4)	۴۲/۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

نمک فسفات را ابتدا در۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید . pH رابه گونه ای تنظیم کنید که بعد از سترون کردن برابر ۰/۲± ۷/۲ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باشد .سپس ۵۰۰ میلی لیتر باقیمانده آب مقطر را اضافه نموده ودرشرایط یخچال نگهداری کنید .

برای استفاده از این محلول به عنوان رقیق کننده ،یک میلی لیتر از آن را به ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر سترون در دمای ۲۰ درجه سلسیوس اضافه کنید .

۷-۱-۳ رقیق کننده های اختصاصی

این رقیق کننده ها باید فقط برای تهیه سوسپانسیون اولیه (رقت اولیه) به کار برده شوند .

۷-۱-۳-۱ آب پپتونه بافری

این محلول به عنوان رقیق کننده و/یا پیش غنی کننده در آزمون جستجو وشناسایی باکتری های خانواده *انتروباکتریاسه*[1] مانند *سالمونلا*[2] و *انتروباکتر ساکازاکی*[3] به کار می رود .

مواد تشکیل دهنده	مقدار
پپتون حاصل از هضم آنزیمی بافت های حیوانی	۱۰/۰ گرم
کلرور سدیم ($NaCl$)	۵/۰ گرم
دی سدیم هیدروژن فسفات ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	۹/۰ گرم
پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH_2PO_4)	۱/۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

مواد تشکیل دهنده را درآب مقطر ودر صورت نیاز با حرارت دادن ملایم حل کنید . pH را به گونه ای تنظیم کنید که بعد از سترون کردن برابر ۰/۲±۷/۰ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باشد .

۷-۱-۳-۲ محلول سدیم سیترات

این محلول به عنوان رقیق کننده برای پنیر و شیر خشک غلطکی به کار می رود .

1-*Entrobacteriaceae*
2-*Salmonella*
3-*Entrobacter sakazakii*

مواد تشکیل دهنده	مقدار
تری سدیم سیترات ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)	۲۰/۰ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

نمک سیترات را در آب مقطر با دمای ۴۵ تا ۵۰ درجه سلسیوس حل کنید .pH را به گونه ای تنظیم کنید که بعد از سترون کردن برابر ۰/۲± ۷/۵ دردمای ۲۵ درجه سلسیوس باشد .

۷-۱-۳-۳ محلول دی پتاسیم هیدروژن فسفات

این محلول به عنوان رقیق کننده برای پنیر ، شیرخشک غلطکی ، شیر تخمیر شده ، کازئینات ، پودرآب پنیر اسیدی وخامه ترش کاربرد دارد .

مواد تشکیل دهنده	مقدار
دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4)	۲۰/۰ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

نمک فسفات را در آب مقطر در دمای ۴۵ تا ۵۰ درجه سلسیوس حل کنید . pH را به گونه ای تنظیم کنید که بعد از سترون کردن ، برای تهیه رقت اولیه پودر آب پنیر اسیدی برابر ۰/۲±۸/۴ و برای انواع پنیر ، شیر خشک غلطکی ، فراورده های تخمیر شده شیر ، انواع کازئینات و خامه ترش برابر ۰/۲± ۷/۵ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باشد .

۷-۱-۳-۴ محلول دی پتاسیم هیدروژن فسفات همراه با ضد کف[1]

این محلول به عنوان رقیق کننده برای کازئین اسیدی ، لاکتیکی وآنزیمی[2] به کار می رود .

طرز تهیه :

محلول دی پتاسیم هیدروژن فسفات را مطابق بند ۷-۱-۳-۳ تهیه کنید .سپس مقدار یک میلی لیتر از محلول یک در هزار وزن به حجم پلی اتیلن گلیکول[3] در آب مقطر را به آن بیفزایید . pH را به گونه ای تنظیم کنید که بعد از سترون کردن ، برای تهیه رقت اولیه کازئین اسیدی ولاکتیکی برابر ۰/۲± ۸/۴ و برای کازئین آنزیمی برابر ۰/۲± ۷/۵ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باشد .

1-Antifoam
2-Rennet casein
3-Polyethylene glycol

۷-۱-۳-۵ محلول تری سدیم پلی فسفات[1]

این محلول برای کازئین آنزیمی که حل شدن آن به سختی صورت می گیرد ، قابل استفاده است .

مواد تشکیل دهنده	مقدار
تری سدیم پلی فسفات ($Na_3O_{10}P_3$)	۲۰/۰ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

نمک فسفات را در آب مقطر و در صورت لزوم با حرارت ملایم حل کنید . سپس آن را در حجم های ۹۰ میلی لیتری در ارلن های مناسب تقسیم نموده و در اتوکلاو در حرارت ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت زمان ۲۰ دقیقه سترون کنید .این محلول تا یک ماه در دمای صفر تا پنج درجه سلسیوس قابل نگهداری است .

۷-۱-۳-۶ رقیق کننده های عمومی دارای آنزیم آلفا آمیلاز[2]

این رقیق کننده ها برای غذای کودک دارای نشاسته زیاد به کار می روند .

طرز تهیه:

رقیق کننده های عمومی مورد نظر را مطابق بند ۷-۱-۲ آماده کنید . سپس مقدار ۱۲/۵ میلی گرم آلفاآمیلاز (EC ۳,۲,۱,۳)[3]با فعالیت ویژه حدود ۴۰۰ واحد[4] به ازاء هر میلی گرم را به ۲۲۵ میلی لیتر رقیق کننده عمومی بیفزایید .این مقدار رقیق کننده برای ۲۵ گرم آزمایه به کار می رود . برای ۱۰ گرم آزمایه ،پنج میلی گرم آلفا آمیلاز را به ۹۰ میلی لیتر رقیق کننده عمومی بیفزایید .

۷-۱-۴ توزیع ، سترون کردن و نگه داری رقیق کننده ها

رقیق کننده های لازم برای تهیه رقت اولیه ورقت های اعشاری را در صورت لزوم پس از رساندن به دمای ۴۵ درجه سلسیوس در ارلن یا بطری (مطابق بند ۸-۵) و لوله های آزمایش (مطابق بند ۸-۶) توزیع کنید. مقدار محلول ها باید به اندازه ای باشد که بعد از سترون کردن ، در هر ارلن یا بطری ۹۰

1- Sodium tri polyphosphate

2- α - amylase

۳- شناسه طبقه بندی آنزیم ها که توسط کمیته فهرست بندی واژه ها وابسته به اتحادیه بین المللی بیو شیمی تعیین شده است .

۴- هر واحد (واحد بین المللی یا واحد استاندارد) ، مقدار آنزیمی است که بتواند در یک دقیقه یک میکرو مول سوبسترا را به محصول تبدیل کند .

میلی لیتر و در هر لوله آزمایش نُه میلی لیتر یا مضربی از آن ها باقی بماند .عدم قطعیت اندازه گیری حجم ها نباید از ۲٪± بیشتر باشد ودر هر حالت حجم ظروف باید متناسب باحجم محلول مورد نیاز باشد . رقیق کننده ها را در اتوکلاو (مطابق بند ۸-۲) در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت زمان ۱۵ دقیقه و برای محلول سدیم تری پلی فسفات به مدت زمان ۲۰ دقیقه سترون کنید . برای رقیق کننده های با حجم زیاد ، مدت زمان طولانی تری در نظر بگیرید . اگر رقیق کننده ها بلا فاصله مورد استفاده قرار نمی گیرند ، آنها را در تاریکی و در دمای صفر تا پنج درجه سلسیوس تا مدت زمان حداکثر یک ماه به گونه ای که هیچ تغییری درحجم وترکیب آنها ایجاد نشود ، نگهداری کنید .اگر نمونه ای برای چند میکروارگانیسم با محیط کشت های مختلف آزمون می شود ، گاهی لازم است که رقیق کننده های بعدی (یا بعضی از آن ها) با حجم بیشتر از نُه میلی لیتر تهیه شوند . در این حالت اندازه لوله های آزمایش باید متناسب با حجم های جدید باشد .

۸ وسایل لازم

۸-۱ کلیات

از لوازم و وسایل معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی که در استاندارد ملی ایران شماره ۲۷۴۷ بیان شده است ، به ویژه لوازم مشروح زیر که مشخصات فنی برخی از آن ها به طور کامل در آن استاندارد ذکر گردیده است ، استفاده کنید .

لوازم یک بار مصرف پلاستیکی سترون به جای لوازم شیشه ای قابل استفاده می باشند .لوازم شیشه ای باید توانایی تحمل چندین بار سترون شدن را دارا بوده و از نظر شیمیایی بی اثر باشند .

۸-۲ دستگاه های سترون کننده خشک (آون)[1] ومرطوب (اتوکلاو)[2]

اتوکلاو می تواند یک دستگاه مجزا یا بخشی از یک دستگاه کامل تر باشد که علاوه بر سترون کردن محیط های کشت و محلول ها ، توزیع آن ها را نیز انجام دهد .

پی پت ها نباید در اتوکلاو سترون شوند زیرا بخار آب هنگام خنک شدن در سطوح داخلی آنها متراکم شده وبر دقت حجم های انتقالی اثر می گذارد . دراین خصوص به توصیه سازنده اتوکلاو توجه کنید .

۸-۳ مخلوط کن

مخلوط کن می تواند ضربه ای (استوماکر)[3] یا چرخشی (بلندر)[4] و/یا انواع دیگر باشد . ظرف بلیندر و کیسه استوماکر باید دارای ظرفیت متناسب با مقدار آزمونه وحجم رقیق کننده باشند و به طور کلی حجم آنها باید حدود دو برابر حجم مواد اضافه شده باشد .

1-Oven
2-Autoclave
3-Stomacher
4- Blender

برای آزمونه های دارای ذرات درشت ، استفاده از کیسه های استوماکر دارای صافی بر کیسه های معمولی ارجحیت دارد .

۸-۴ همزن مکانیکی (هم زن گردابی)[1]

همزن باید قادر به مخلوط کردن یک یا دو میلی لیتر از آزمایه (فراورده های مایع) یا رقت های اعشاری (سایر فراورده ها) با نُه یا ۱۸ میلی لیتر رقیق کننده در لوله های آزمایش دارای ابعاد متناسب برای کسب سوسپانسیون یکنواخت باشد .

۸-۵ ارلن یا بطری

این ظروف باید دارای ظرفیت کافی وفضای خالی متناسب برای مخلوط کردن آزمونه با ۹۰ میلی لیتر رقیق کننده (یا مضربی از آن) ، برای تهیه سوسپانسیون اولیه باشند .

۸-۶ لوله های آزمایش

لوله های آزمایش باید دارای ظرفیت کافی و فضای خالی متناسب برای مخلوط کردن ۱۰ میلی لیتر آزمایه یا مضربی از آن (فراورده های مایع) ، رقت اولیه (سایر فراورده ها) یا رقت های اعشاری باشند . برای حجم های بیشتر ، در صورت لزوم باید از ارلن یا بطری استفاده کرد .

۸-۷ پی پت

با انتهای مسدود شده توسط پنبه و/یا مجهز به وسیله مکانیکی برای پر وخالی کردن ، با دهانه خروجی سالم و قطر دهانه خروجی ۱/۷۵ تا ۳ میلی متر ، دارای درجه بندی قابل تشخیص نسبت به محتویات داخل آن و ظرفیت اسمی یک تا ۲۰ میلی لیتر

۸-۸ گلوله های شیشه ای

با قطر تقریبی شش میلی متر

۸-۹ pH متر

با دقت اندازه گیری ۰/۲ ± واحد و دارای قابلیت تطبیق درجه حرارت

۸-۱۰ ترازوی آزمایشگاهی

با ظرفیت کافی و دقت حدود ۱٪ جرم خالصی که توزین می شود

1-Vortex mixer

۸-۱۱ حمام آب گرم

به تعداد کافی و قابل تنظیم در دما های ۱±۳۷ ، ۱± ۴۵ درجه سلسیوس

۸-۱۲ قاشقک نمونه برداری[1] یا میله شیشه ای

۸-۱۳ اجاق برقی

یا هر وسیله مناسب دیگرکه قادر به حرارت دادن ملایم بوده (غیر از چراغ گاز) وتوانایی کار کردن در دمای مورد نظر را داشته باشد .

۹ روش کار

۹-۱ کلیات

در هنگام اجرای روش کار نباید درجه حرارت آزمونه ،رقت اولیه و رقت های اعشاری از ۲۰ درجه سلسیوس بیشتر شود مگر آن که به گونه دیگر تعیین شده باشد .

یادآوری ۱ – در انجام برخی آزمون ها نظیر آزمون جستجو وشناسایی *سالمونلا* عملیات و احتیاط های خاصی ضرورت دارد که در استاندارد های مربوطه ذکر شده است .

یادآوری ۲ – عملیاتی که در بند های ۹-۲ و ۹-۳ شرح داده می شوند نباید درمعرض تابش نور مستقیم خورشید انجام گیرد .

یادآوری ۳ – در اجرای روش کار رعایت شرایط اسپتیک[2] الزامی است .

۹-۲ آماده سازی آزمونه و رقت اولیه

۹-۲-۱ کلیات

میکروارگانیسم های موجود در برخی از فراورده های شیر بر اثر فرایند حرارتی یا اسیدی شدن ، آسیب دیده وممکن است در محیط کشت ظاهر نشوند . برای فعال شدن مجدد آنها ، رقت اولیه را قبل از تهیه رقت های اعشاری یا تلقیح آن به محیط کشت انتخابی ، به مدت ۴۵ دقیقه در محیط آزمایشگاه در دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سلسیوس قرار دهید .

از آسیب رساندن به میکروارگانیسم ها در اثر تغییر ناگهانی درجه حرارت اجتناب کنید .

دمای رقیق کننده هنگام اجرای روش کار باید نزدیک به دمای آزمایه باشد ، مگر در موارد خاص که به گونه دیگر تعیین شده است .

1-Spatula
2-Aseptic

۹-۲-۲ شیر وفراورده های مایع شیر

ظرف محتوی آزمایه را با ۲۵ مرتبه سر وته کردن سریع کاملا مخلوط کنید تا میکروارگانیسم های موجود تا حد امکان به صورت یکنواخت در آن پخش شوند . از ایجاد کف خودداری کرده و یا اجازه دهید کف های تشکیل شده برطرف گردد .فاصله زمانی بین مخلوط کردن و برداشت آزمونه نباید از سه دقیقه بیشتر باشد .

یک میلی لیتر آزمایه را با پی پت سترون برداشته و به نُه میلی لیتر رقیق کننده عمومی (مطابق بند ۷-۱-۲) اضافه کنید (یا ۱۰ میلی لیتر آزمایه به ۹۰ میلی لیتر رقیق کننده و / یا ۱۱ میلی لیتر آزمایه به ۹۹ میلی لیتر رقیق کننده) . مخلوط حاصل را با تکان دادن یکنواخت کنید (مثل ۲۵ مرتبه چرخاندن به صورت دستی حول محور ۳۰۰ میلیمتری در مدت هفت ثانیه ، یا استفاده از همزن مکانیکی در مدت پنج تا هفت ثانیه) .

به این ترتیب رقت اولیه به دست می آید . سایر رقت های اعشاری را طبق بند ۹-۳ تهیه کنید .

۹-۲-۳ شیر خشک ، پودرآب پنیر (شیرین و اسیدی) ، پودر دوغ کره و لاکتوز

محتویات ظروف دربسته را با تکان دادن وسر وته نمودن مخلوط کنید .

اگر ظروف کاملا پر شده اند و مخلوط کردن کامل امکان پذیر نیست ، محتویات آن را به یک ظرف سترون بزرگتر انتقال داده و مخلوط کنید . ظروف محتوی آزمایه را در شرایط سترون باز کرده ، آزمونه را به کمک قاشقک نمونه برداری برداشته و بلافاصله در ظرف را ببندید .

۱۰ گرم از آزمایه را به صورت مستقیم یا پس از توزین در یک بشر سترون به ارلن یا بطری دارای ۹۰ میلی لیتر رقیق کننده عمومی بند ۷-۱-۲ که در حمام آب گرم به دمای ۴۵ درجه سلسیوس رسیده است ، بیفزایید .

برای پودر آب پنیر اسیدی از رقیق کننده (مطابق بند ۷-۱-۳-۳)با pH مساوی ۰/۲± ۸/۴ و برای شیر خشک غلطکی نیز از رقیق کننده های (مطابق بند ۷-۱-۳-۲ و بند ۷-۱-۳-۳) با pH مساوی۲ /۰± ۷/۵ استفاده کنید.

یاد آوری – برای کمک به مخلوط ویکنواخت شدن کامل ، به ویژه در مورد شیر خشک غلطکی می توان از گلوله های شیشه ای (مطابق بند ۸-۸) که قبل از سترون کردن رقیق کننده به آن افزوده شده اند ، استفاده کرد .

برای حل شدن ، ابتدا ارلن یا بطری را به آهستگی بچرخانید تا پودرها نم گیری کنند . سپس آن را ۲۵ مرتبه حول محور ۳۰۰ میلی متری به صورت دستی در حدود هفت ثانیه تکان دهید .می توانید از استوماکر استفاده کنید ، به شرط آن که محلول فاقد گلوله های شیشه ای باشد .

ارلن یا بطری دارای آزمونه یکنواخت شده را دوباره به مدت پنج دقیقه در حمام آب گرم ۴۵ درجه سلسیوس قرار داده و به تناوب آن را تکان دهید .

به این ترتیب رقت اولیه به دست می آید . سایر رقت های اعشاری را طبق بند ۹-۳ تهیه کنید .

۹-۲-۴ پنیر وپنیر پروسس[1]

۱۰ گرم از آزمایه را به صورت مستقیم یا پس از توزین در یک بشر سترون به ظرف بلیندر یا کیسه استوماکر وارد کنید .سپس آن را با ۹۰ میلی لیتر از رقیق کننده های (مطابق بند ۷-۱-۳-۲ یا ۷-۱-۳-۳) با pH مساوی ۰/۲± ۷/۵ را که در حمام آب گرم به دمای ۴۵ درجه سلسیوس رسیده است ، مخلوط کنید . مخلوط شدن را تا یکنواخت شدن کامل ادامه دهید (یک تا سه دقیقه) .
هنگام استفاده از بلیندر ، عملیات راتا رسیدن به دور ۱۵۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه ادامه دهید ولی دقت کنید که زمان مخلوط کردن ،حتی درکم ترین سرعت ، از ۲/۵ دقیقه بیشتر نشود .
بهترین دمای یکنواخت شدن زیر۴۰ درجه سلسیوس است ودر هیچ حالتی نباید دما از ۴۵ درجه سلسیوس بیشتر شود .
به این ترتیب رقت اولیه به دست می آید . سایر رقت های اعشاری را طبق بند ۹-۳ تهیه کنید .

۹-۲-۵ کازئین (اسیدی ، لاکتیکی وآنزیمی) و کازئینات

محتویات ظرف دربسته را با تکان دادن و سر وته کردن کاملا مخلوط کنید .۱۰ گرم ازآزمایه را داخل کیسه استوماکر توزین کرده ، ۹۰ میلی لیتر از رقیق کننده های منا سب به شرح زیر را که به دمای آزمایشگاه رسیده است ، به آن بیفزایید :
الف - برای کازئین اسیدی و لاکتیکی از محلول رقیق کننده فسفات هیدروژن دی پتاسیم دارای ضد کف (مطابق بند ۷-۱-۳-۴) با pH مساوی ۰/۲ ± ۸/۴ استفاده کنید .
ب – برای کازئینات از محلول فسفات هیدروژن دی پتاسیم (مطابق بند ۷-۱-۳- ۳) با pH مساوی ۰/۲ ± ۷/۵ استفاده کنید .
ج- برای کازئین آنزیمی از محلول رقیق کننده فسفات هیدروژن دی پتاسیم دارای ضد کف (مطابق بند ۷-۱-۳-۴) با pH مساوی ۰/۲ ± ۷/۵ استفاده کنید .
آزمونه ورقیق کننده را خوب مخلوط نموده و برای ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه بی حرکت بگذارید . سوسپانسیون حاصله رابه مدت دو دقیقه در استوماکر مخلوط کنید . برای آزمونه های دانه ای[2] از دو کیسه استفاده کنید .
به این ترتیب رقت اولیه به دست می آید . سایر رقت های اعشاری را طبق بند ۹-۳ تهیه کنید .
از آنجا که محلول رقیق کننده فسفات هیدروژن دی پتاسیم نمی تواند دانه های کازئین آنزیمی را کاملاً حل نماید ودرنتیجه سبب بروز مشکلاتی در شمارش میکروارگانیسم ها می گردد ، بنا بر این می توانید از روش کارجا یگزین که در ادامه شرح داده می شود ، استفاده کنید :

1-Processed cheese
2-Grain

کازئین خشک را پیش از برداشت آزمونه ، آسیاب کنید . برای این کار ۲۰ گرم از آزمایه را در یک ظرف مناسب (یا آسیاب برقی) سترون بریزید وبا وسیله ای که دارای تیغه هایی با قابلیت دوران تا ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه و مجهز به امکاناتی برای جلوگیری از گرم شدن محتویات ظرف می باشد ، آسیاب کنید .

پنج گرم از آزمایه کاملا آسیاب شده را دریک ارلن یا بطری سترون با ظرفیت ۲۵۰ میلی لیتر بریزید . مقدار ۹۵ میلی لیترمحلول رقیق کننده تری سدیم پلی فسفات (مطابق بند ۷-۱-۳-۵) دارای دمای ۳۷ درجه سلسیوس و تعدادی گلوله های شیشه ای را به ارلن یا بطری بیفزایید . به کمک مخلوط کن محتویات آن را به مدت ۱۵ دقیقه مخلوط کرده ، سپس آن را در حمام آب گرم ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه دیگر قرار داده و به تناوب عمل مخلوط کردن راتکرار کنید .

به این ترتیب رقت اولیه به دست می آید . سایر رقت های اعشاری را طبق بند ۹-۳ تهیه کنید .

۹-۲-۶ کره

۱۰ گرم آزمایه را در یک ارلن یا بطری سترون توزین کرده وآن را در حمام آب گرم ۴۵ درجه سلسیوس قرار دهید تا کاملا ذوب شود . ۹۰ میلی لیتر رقیق کننده عمومی(مطابق بند ۷-۱-۲) دارای دمای ۴۵ درجه سلسیوس را به آن افزوده و خوب مخلوط کنید . برای سهولت بیشتر این عمل را توسط استوماکر انجام دهید .

به این ترتیب رقت اولیه به دست می آید . سایر رقت های اعشاری را طبق بند ۹-۳ تهیه کنید .

به عنوان یک روش جایگزین فقط از فاز آبی کره برای تهیه رقت اولیه به شرح زیر می توان استفاده کرد:

آزمونه ای به وزن ۵۰ گرم کره (با احتساب ۱۶٪ رطوبت کره ، آزمونه هشت میلی لیتر آب دارد) را در ارلن یا بطری سترون وارد کرده وبه آن ۴۲ = ۸ – ۵۰ میلی لیتر رقیق کننده (مطابق بند ۷-۱-۲-۴) با دمای ۴۵ درجه سلسیوس بیفزایید .

مخلوط حاصل را حداکثر به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم ۴۵ درجه سلسیوس قرار داده وخوب تکان دهید تا فاز آبی از چربی جدا شود .در صورت لزوم فاز چربی را به کمک قاشقک نمونه برداری یا میله شیشه ای برداشته ، دور بریزید .

هم چنین برای جدا سازی کامل فاز های چربی و آب ، آزمونه ذوب شده را به یک لوله سانتریفوژ سترون منتقل کرده (یا آزمونه را به طور مستقیم در لوله سانتریفوژ سترون ذوب کنید) و آن را با سرعت ۱۰۰۰ تا۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ کنید . درصورت لزوم می توان با رعایت شرایط اسپتیک فاز چربی (فاز بالایی) را توسط لوله سترون متصل به پمپ خلأ حذف نمود .

هر میلی لیتر از فاز آبی معادل یک گرم کره می باشد وبا اضافه کردن ۱۰ میلی لیتر از فاز آبی به ۹۰ میلی لیتر رقیق کننده عمومی (مطابق بند ۷-۱-۲) ، رقت اولیه (10^{-1}) به دست می آید . سایر رقت های اعشاری را طبق بند ۹-۳ تهیه کنید .

۹-۲-۷ بستنی و سایر فراورده های یخ زده شیر

آزمونه ای به وزن ۱۰ گرم را در یک ارلن یا بطری سترون وارد کرده ، سپس ۹۰ میلی لیتر رقیق کننده عمومی (مطابق بند ۷-۱-۲) را در دمای آزمایشگاه به آن بیفزایید . آزمونه و رقیق کننده را پس از ذوب کامل با برهم زدن مخلوط کنید .
به این ترتیب رقت اولیه به دست می آید . سایر رقت های اعشاری را طبق بند ۹-۳ تهیه کنید .

۹-۲-۸ خامه ،کاستارد[1] و دسر[2]

۱۰ گرم از آزمایه را در یک ارلن یا بطری سترون دارای گلوله های شیشه ای توزین کنید .۹۰ میلی لیتر از رقیق کننده های عمومی (مطابق بند ۷-۱-۲) را در دمای آزمایشگاه به آن بیفزایید وتا یکنواخت شدن کامل آن را تکان دهید .
به این ترتیب رقت اولیه به دست می آید . سایر رقت های اعشاری را طبق بند ۹-۳ تهیه کنید .

۹-۲-۹ شیر تخمیر شده و خامه ترش

برای این فراورده ها نیز همانند بند ۹-۲-۸ عمل کنید ، با این تفاوت که فقط از رقیق کننده (مطابق بند ۷-۱-۳-۳) استفاده کنید . در صورت استفاده از استوماکر ، مخلوط نباید حاوی گلوله های شیشه ای باشد .

۹-۲-۱۰ انواع خوراک شیرخواران و غذای کودک

محتویات ظرف دربسته را با تکان دادن وسر و ته کردن کاملاً مخلوط کنید . اگر ظروف آن قدر پُر شده اند که مخلوط کردن کامل امکان پذیر نیست ، محتویات آن را به ظرف سترون بزرگ تر انتقال داده و مخلوط کنید . ظرف را درشرایط اسپتیک باز کرده ، آزمونه مورد نیاز را با کمک قاشقک نمونه برداری برداشته و بی درنگ درب ظرف را ببندید .
۱۰ گرم از آزمایه را مستقیماً یا پس از توزین در یک بشر سترون به ارلن یا بطری دارای ۹۰ میلی لیتر رقیق کننده عمومی (مطابق بند ۷-۱-۲) و / یا رقیق کننده (مطابق بند ۷-۱-۳-۵) با دمای ۴۵ درجه سلسیوس وارد کنید .

1-Custard
2-Dessert

یادآوری – برای مخلوط و یکنواخت شدن کامل می توان از گلوله های شیشه ای که قبل از سترون کردن رقیق کننده به آن افزوده شده اند ، استفاده کرد .

رقت اولیه حاصل از نمونه های دارای نشاسته زیاد ، قوام بالایی داشته وغیر قابل استفاده می باشند . برای این نمونه ها از رقیق کننده های عمومی(مطابق بند ۷-۱-۲) با غلظت دو برابر ، یا از رقیق کننده دارای آنزیم آلفا آمیلاز (مطابق بند ۷-۱-۳-۵) استفاده کنید .

در صورت به کار گیری رقیق کننده با حجم دو برابر ، این نسبت را هنگام تهیه رقت های اعشاری در نظر داشته باشید . به منظور یک نواخت شدن کامل ، ارلن یا بطری را به آهستگی بچرخانید تا پودرها نم گیری کنند ، سپس۲۵ مرتبه با حرکت دورانی حول محور ۳۰۰ میلی متری در حدود هفت ثانیه با دست بچرخانید . روش دیگر یکنواخت کردن استفاده از استوماکر است .

به این ترتیب رقت اولیه به دست می آید . سایر رقت های اعشاری را طبق بند ۹-۳ تهیه کنید .

۹-۳ رقت های اعشاری

برای اطلاع از چگونگی تهیه رقت های اعشاری به استاندارد ملی ایران شماره ۳۵۶ مراجعه کنید .

در آزمون جستجو و شناسایی میکروارگانیسم ها دریک دهم گرم یا میلی لیتر نمونه ، تهیه سایر رقت های اعشاری ضرورتی ندارد .

اگر حجم زیادی از رقت های اعشاری مورد نیاز باشد ، با پی پت سترون مقدار ۱۰ یا ۱۱ میلی لیتراز رقت اولیه را به ترتیب به ۹۰ یا ۹۹ میلی لیتر رقیق کننده عمومی سترون (مطابق بند ۷-۱-۲) انتقال دهید . در انجام آزمون های روزمره[1] برای دست یابی به رقت $۱۰^{-۳}$ ، یک میلی لیتر از رقت اولیه را به ۹۹ میلی لیتر رقیق کننده عمومی سترون بیفزایید .

برای کازئین اسیدی وآنزیمی که رقت اولیه آن ها غلیظ است ، پی پت را باچند بار پُر وخالی کردن با رقیق کننده بعدی شستشو دهید . این عمل باید در مورد رقت های اولیه غلیظ حتماً انجام گیرد ، زیرا بدون شستشو دادن پی پت ها مقدار دقیقی از رقت اولیه برای تهیه سایر رقت های اعشاری منتقل نمی شود .

چنانچه ۱۰ یا ۱۱ میلی لیتر از رقت اولیه به ترتیب به ۹۰ یا ۹۹ میلی لیتر از رقیق کننده ها اضافه می شود ،ارلن یا بطری مورد نظر را به صورت دستی و حدود ۲۵ مرتبه حول محور۳۰۰ میلی متری در مدت هفت ثانیه بچرخانید تا عمل یکنواخت شدن کامل انجام گیرد .

1-Routine

۹-۴ مدت زمان اجرای روش کار

به طور کلی رقت ها باید بلا فاصله قبل از انجام آزمون تهیه شوند . پس از تهیه سوسپانسیون اولیه ، حداکثر تا ۴۵ دقیقه می توان از آن در تلقیح محیط کشت استفاده کرد . در هر حال مدت زمان پس از تهیه سوسپانسیون اولیه تا شروع تهیه رقت های اعشاری نباید از ۳۰ دقیقه بیشتر شود ، مگر در موارد خاص که در استاندارد های مربوطه ذکر شده است .

یادآوری – در صورت بالا بودن دمای محیط آزمایشگاه ، عملیات یاد شده باید سریع تر و در مدت زمان کوتاه تری انجام شود .

ICS: 07.100.30

صفحه : ۱٦