



جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران

Iranian National Standardization Organization



استاندارد ملی ایران
۱۹۹۹۶
چاپ اول
۱۳۹۸

INSO

19996

1st Edition
2019

Identical with
ISO 21703:
2019

عوامل فعال سطحی - میکروبیولوژی -
روش های آزمون میکروبی مایع ظرفشویی
دستی

Surface active agents –Microbiology–
Microbial test methods for liquid hand
dishwashing

ICS:07.100.99;71.100.40

سازمان ملی استاندارد ایران

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

صندوق پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران - ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۱۰۳ و ۸۸۸۸۷۰۸۰

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۸۱۱۴-۳۲۸۰ (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 ماده ۳ قانون اصلاح قوانین ومقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنهامرجع رسمی کشور است که وظیفه 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 منصفانه 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 پیشنهادهای در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهای یک مؤسسه و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند در کمیته ملی طرح، بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهای ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته 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)^۱، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)^۲ و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)^۳ است و به عنوان تنها رابط^۴ کمیسیون کدکس غذایی (CAC)^۵ 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 زمینه 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، گواهینامه 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

«عوامل فعال سطحی - میکروبیولوژی - روش‌های آزمون میکروبی مایع ظرفشویی دستی»

رئیس:

روشن طبری، مژده
(کارشناسی ارشد قارچ شناسی پزشکی)
دبیر کمیته فرآورده های بهداشتی و آرایشی ایزو - سازمان ملی
استاندارد ایران

دبیر:

پویان، مهوش
(کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)
کارشناس مسئول امور استاندارد صنایع غذایی، کشاورزی،
سلولزی- اداره کل استاندارد استان چهارمحال و بختیاری

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

احمدی، آریتا
(کارشناسی میکروبیولوژی)
معاون ارزیابی انطباق - اداره کل استاندارد استان چهارمحال و
بختیاری

ابراهیمی، لیلا
(کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)
مسئول کنترل کیفیت- آزمایشگاه میکروبیولوژی انجمن صنایع
شوینده آرایشی و بهداشتی ایران

بخت، سعید
(کارشناسی میکرو بیولوژی)
رئیس نظارت بر اجرای استاندارد- اداره کل استاندارد استان
چهارمحال و بختیاری

پویان، مهسا
(کارشناسی مهندسی ژنتیک)
عضو مستقل

رسولی، یلدا
(کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)
رئیس گروه سنجش کیفیت- سازمان ملی استاندارد ایران

رحیمی فرد، ناهید
(دکترای میکروبیولوژی)
عضو هیئت علمی- وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

زمانی فرادنبه، لیلا
(کارشناسی ارشد شیمی معدنی)
مسئول کنترل کیفیت- شرکت تولیدی گلرنگ بروجن

سرمرست، الهام
(کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)
مدرس- دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

کاوه، فریده

(کارشناسی ارشد شیمی معدنی)

عطایی کجویی، مهرداد

(دکتری کشاورزی و منابع طبیعی)

مهرپور، رامش

(کارشناسی مهندسی صنایع)

محمدیان، مهشاد

(کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)

نبی الهی، حسین

(کارشناسی ارشد شیمی)

نبوی رضوی، ریحانه

(کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)

همت زاده، سینوش

(کارشناسی ارشد صنایع غذایی)

هاتفی، میترا

(دکترای میکروبیولوژی)

ویراستار:

مهرپور، رامش

(کارشناسی مهندسی صنایع)

سمت و/یا محل اشتغال:

مسئول کنترل کیفیت- شرکت تولیدی راست قلم

عضو هیئت علمی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد

رئیس آزمایشگاه مرجع گروه پژوهشی میکروبیولوژی - پژوهشگاه
استاندارد

کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی- آزمایشگاه همکار کیمیا پژوه
البرز

کارشناس- اداره کل استاندارد چهارمحال و بختیاری

مسئول کنترل کیفیت- شرکت پارس حیان

رئیس امور آزمایشگاه ها- اداره کل استاندارد چهارمحال و
بختیاری

مسئول کنترل کیفیت- شرکت عطرینه سازیا

رئیس آزمایشگاه مرجع گروه پژوهشی میکروبیولوژی - پژوهشگاه
استاندارد

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
ز	پیش‌گفتار
۱	۱ هدف و دامنه کاربرد
۱	۲ مراجع الزامی
۱	۳ اصطلاحات و تعاریف
۳	۴ اصول آزمون
۴	۵ رقیق کننده‌ها و محیط‌های کشت
۱۱	۶ تجهیزات و وسایل شیشه‌ای
۱۱	۷ سوش‌های میکروارگانیزم‌ها
۱۱	۸ نگهداری محصولات و نمونه‌های آزمایشگاهی
۱۱	۹ روش آزمون
۱۶	۱۰ روش جستجو و شناسایی
۱۹	۱۱ خنثی‌سازی خصوصیات ضد میکروبی فرآورده
۲۲	۱۲ گزارش آزمون
۲۳	پیوست الف (آگاهی‌دهنده) خنثی کننده‌های فعالیت ضد میکروبی نگهدارنده‌ها و مایعات شستشو
۲۵	پیوست ب (آگاهی‌دهنده) سایر محیط‌های کشت
۲۸	کتاب‌نامه

پیش‌گفتار

استاندارد «عوامل فعال سطحی- عوامل فعال سطحی - میکروبیولوژی - روش‌های آزمون میکروبی مایع ظرفشویی دستی» که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط بر مبنای پذیرش استانداردهای بین‌المللی به عنوان استاندارد ملی ایران به روش اشاره شده در مورد الف، بند ۷، استاندارد ملی ایران شماره ۵ تهیه و تدوین شده، در پانصد و سی امین اجلاس کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی و بیولوژی مورخ ۱۳۹۸/۹/۱۳ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات سازمان ملی استاندارد ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوه 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 تجدید نظر خواهند شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدید نظر در کمیسیون‌های مربوط، مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدید نظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

این استاندارد ملی بر مبنای پذیرش استاندارد بین‌المللی زیر به روش «معادل یکسان» تهیه و تدوین شده و شامل ترجمه تخصصی کامل متن آن به زبان فارسی می‌باشد و معادل یکسان استاندارد بین‌المللی مزبور است:

ISO 21703: 2019, Surface active agents-Microbiology-Microbiological test methods for liquid hand dishwashing.

عوامل فعال سطحی - میکروبیولوژی - روش‌های آزمون میکروبی مایع ظرفشویی دستی

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، ارائه روش‌های آزمون میکروبیولوژی برای شمارش^۱ و جستجوی^۲ باکتری‌های مزوفیل هوازی^۳، جستجو و شناسایی/شرشیاکلی^۴ و سودوموناس آئروژینوزا^۵ در مایع ظرفشویی دستی می‌باشد.

۲ مراجع الزامی

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

در صورتی که 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 21148, Cosmetics - Microbiology -General instructions for microbiological examination

یادآوری-استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۶۸: سال ۱۳۸۷، میکروبیولوژی فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی -راهنمای کلی برای آزمون‌های میکروبیولوژی، با استفاده از استاندارد ISO 21148:2005 تدوین شده است.

۳ اصطلاحات و تعاریف

۴ در این استاندارد، اصطلاحات و تعاریف زیر به کار می‌رود^۶:

۱-۴

1-Enumeration

2-Detection

3-Aerobic mesophilic bacteria

4-Escherichia

5-Pseudomonas aeruginosa

^۶ - اصطلاحات و تعاریف به کار رفته در استانداردهای ISO و IEC در وبگاه‌های www.iso.org/obp و www.electropedia.org قابل دسترس است.

مایع ظرفشویی دستی

liquid hand dishwashing

مایع شوینده که جهت شستشوی ظروف با دست استفاده می‌شود.

۲-۴

فرآورده

product

قسمتی از فرآورده مایع ظرفشویی دستی مشخص که آزمایشگاه جهت آزمون آن را دریافت می‌کند.

۳-۴

نمونه

sample

قسمتی از فرآورده (حداقل ۱ gr یا ۱ ml) که برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه استفاده می‌شود.

۴-۴

سوسپانسیون اولیه

initial suspension

سوسپانسیونی (یا محلول) از نمونه در حجم معینی از آبگوشت غنی‌کننده مناسب است.

۵-۴

رقت نمونه

sample dilution

رقتی از سوسپانسیون اولیه است.

۶-۴

باکتری‌های مزوفیل هوازی

aerobic mesophilic bacteria

باکتری‌های مزوفیل که در شرایط مشخص شده در این استاندارد به صورت هوازی رشد می‌کنند.

۷-۴

سودوموناس آئروژینوزا

pseudomonas aeruginosa

باکتری‌های میله‌ای (باسیل) گرم منفی، متحرک با کلنی‌های صاف همراه با رنگدانه قهوه‌ای روشن یا سبز می‌باشند.

یادآوری - ویژگی‌های اصلی جهت شناسایی، رشد روی محیط کشت انتخابی ستریماید آگار^۱، اکسیداز مثبت، تولید رنگدانه-های فلورسنت پخش شونده و تولید رنگدانه محلول فنازین (پیوسیانین) در محیط کشت مناسب می‌باشد.

۸-۴

اشرشیاکلی

Escherichia coli

باکتری‌های میله‌ای (باسیل)، گرم منفی، متحرک با کلنی‌های صاف هستند.

یادآوری - ویژگی‌های اصلی جهت شناسایی، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، تخمیر لاکتوز، تولید اندول، رشد روی محیط کشت انتخابی حاوی نمک صفراوی با کلنی‌های مشخص می‌باشد.

۹-۴

آبگوشت غنی کننده

enrichment broth

محیط کشت مایع غیر انتخابی که دارای مواد خنثی کننده و/یا عوامل پراکنده کننده مناسب می‌باشند و برای فرآورده مورد آزمون، مناسب بودن آن صحه گذاری شده است.

۵ اصول آزمون

این استاندارد شمارش و جستجو باکتری‌های مزوفیل هوازی را بر روی محیط آگار غیرانتخابی و محیط غنی کننده، جستجو و شناسایی اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا را به صورت وجود یا عدم رشد باکتری پس از غنی سازی فراهم می‌کند.

میکروارگانیزم‌هایی که آزمون می‌شوند ممکن است با توجه به رویه‌ها یا مقررات در هر کشور، متفاوت باشند.

1-Cetrimide agar medium

کاربران می‌توانند روش‌های شمارش و/ یا جستجو و شناسایی را برای آن میکروارگانیسم‌هایی که در این استاندارد ذکر شده بر اساس نیازهایشان انتخاب کنند.

به منظور حصول اطمینان از کیفیت و ایمنی فرآورده برای مصرف کنندگان، توصیه می‌شود که یک تجزیه و تحلیل ریسک میکروبیولوژیکی مناسب به منظور تعیین نوع فرآورده که این استاندارد برای آن‌ها کاربرد دارد انجام شود. برای مثال، فرآورده‌هایی که دارای ریسک میکروبیولوژیکی پایین^۱ هستند، شامل فرآورده‌هایی با فعالیت آبی پایین، با مقادیر pH بسیار پایین یا بسیار بالا و غیره می‌باشند (به استاندارد ISO 29621 مراجعه شود).

از روش‌های میکروبیولوژیکی جایگزین در صورتی که برابری آنها اثبات شده یا روش صحه‌گذاری شده باشد می‌توان به جای آزمون‌های ارائه شده در این استاندارد استفاده کرد.

ممانعت‌کننده احتمالی رشد میکروبی در نمونه به منظور جستجو و شناسایی میکروارگانیسم‌های زنده قابل رشد باید خنثی شده باشد. در همه موارد، باید خنثی‌سازی ویژگی‌های ضد میکروبی فرآورده بررسی شده باشد.

۶ رقیق‌کننده‌ها و محیط‌های کشت

۱-۶ کلیات

توصیه‌های کلی برای آزمون‌های میکروبیولوژی در استاندارد ISO 21148 مشخص شده است. خنثی‌کننده‌ها، رقیق‌کننده‌ها و محیط‌های کشت زیر برای شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی مناسب هستند. از سایر رقیق‌کننده‌ها، خنثی‌کننده‌ها و محیط‌های کشت در صورتی که مناسب بودنشان اثبات شده باشد می‌توان استفاده کرد.

۲-۶ رقیق‌کننده خنثی‌کننده و رقیق‌کننده‌ها

۱-۲-۶ کلیات

رقیق‌کننده برای پراکنده کردن نمونه مورد استفاده قرار می‌گیرد. در صورتی که نمونه مورد آزمون دارای خصوصیات ضد میکروبی باشد رقیق‌کننده می‌تواند حاوی خنثی‌کننده باشد. کارایی خنثی‌کننده باید قبل از تعیین یا جستجو تعداد، اثبات شده باشد. اطلاعات مربوط به خنثی‌کننده‌های مناسب در پیوست الف داده شده است.

1-Low microbiological risk

۲-۲-۶ رقیق کننده خنثی کننده: محیط کشت مایع کازئین دایجست-سوی لسیتین - پلی سوربات ۲۰ (SCDLP 20 broth)^۱

۱-۲-۲-۶ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
هضم شده پانکراتیکی کازئین،	۲۰/۰ g
لسیتین سویا،	۵/۰ g
پلی سوربات ۲۰،	۴۰/۰ ml
آب،	۱۰۰۰ ml

۳-۲-۶ رقیق کننده جهت سوسپانسیون باکتری (محلول تریپتون سدیم کلرید)

۱-۳-۲-۶ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
تریپتون، هضم شده پانکراتیکی کازئین،	۱/۰ g
سدیم کلرید،	۸/۵ g
آب،	۱۰۰۰ ml

۲-۳-۲-۶ آماده سازی

ترکیبات فوق را با حرارت دادن در آب حل کنید. رقیق کننده را در ظروف مناسب تقسیم کرده و در اتوکلاو در دمای °C ۱۲۱ به مدت زمان ۱۵ min سترون کنید. پس از سترون کردن، pH باید معادل 7.0 ± 0.2 در دمای آزمایشگاه باشد.

۳-۶ محیط کشت جهت شمارش

۱-۳-۶ کلیات

محیط های کشت را ممکن است به صورت زیر آماده کرد یا از محیط های کشت های بدون آب بر اساس دستورالعمل سازنده تهیه کرد. محیط کشت های آماده مصرف چنانچه ترکیبات و/یا بازده رشدشان با فرمولاسیونی که در این قسمت ارائه شده قابل مقایسه باشد می توان از آنها استفاده کرد.

1-Fluid Casein Digest-soy Lecithin-Polysorbate 20 medium

۲-۳-۶ محیط کشت سوی بین-کازئین دایجست آگار^۱ (SCDA) یا تریپتیک سوی آگار^۲ (TSA)

۱-۲-۳-۶ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
هضم شده پانکراتیکی کازئین،	۱۵۰ g
هضم شده پاپائیک سویا،	۵۰ g
سدیم کلرید،	۵۰ g
آگار،	۱۵۰ g
آب،	۱۰۰۰ ml

۲-۲-۳-۶ آماده سازی

ترکیبات فوق یا محیط کشت کامل بدون آب را با حرارت دادن در آب مقطر حل کنید. محیط را در ظروف مناسب تقسیم کنید. سپس در اتوکلاو در دمای °C ۱۲۱ به مدت زمان ۱۵ min استرون کنید. پس از استرون کردن و پایین آوردن دما، pH باید معادل 7.3 ± 0.2 در دمای آزمایشگاه باشد.

۳-۲-۳-۶ سایر محیط های کشت جهت شمارش

۴-۲-۳-۶ محیط اگون ال تی ۱۰۰ آگار^۳

۵-۲-۳-۶ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
هضم شده پانکراتیکی کازئین،	۱۵۰ g
هضم شده پاپائیک سویا،	۵۰ g
ال-سیستین،	۰.۷ g
سدیم کلرید،	۴۰ g
سدیم سولفیت،	۰.۲ g
گلوکز،	۵۵ g
لسیتین تخم مرغ،	۱۰ g
پلی سوربات ۸۰،	۵۰ g

1-Soybean-casein digest agar medium

2-Tryptic soy agar

3-Eugon LT 100 agar medium

اکتوکسی نول ۹، ۱/۰ g

آگار، ۱۵/۰ g

آب، ۱۰۰۰ ml

۶-۳-۲ آماده سازی

پلی سوربات ۸۰، اکتوکسی نول ۹ و لسیتین تخم مرغ را به ترتیب در آب جوش تا حل شدن کامل حل کنید. سپس در حالیکه حرارت داده می شود، سایر مواد را در آب حل کنید. به آرامی بهم بزنید تا کف تشکیل نشود. محیط کشت را در ظروف مناسب تقسیم کنید و در اتوکلاو در دمای 121°C به مدت زمان ۱۵ min استرون کنید. پس از استرون کردن و پایین آوردن دما، pH باید معادل 7.0 ± 0.2 در دمای آزمایشگاه باشد.

۶-۴ محیط کشت جهت جستجو و شناسایی

۶-۴-۱ کلیات

برای جستجو باکتری باید از آبگوشت غنی کننده استفاده شود. آبگوشت غنی کننده برای پراکنده کردن نمونه و افزایش جمعیت اولیه میکروبی استفاده می شود. چنانچه نمونه مورد آزمون دارای خصوصیات ضد میکروبی باشد. این مایع ممکن است حاوی خنثی کننده هایی باشد.

۶-۴-۲ آبگوشت غنی کننده: آبگوشت اگون ال تی ۱۰۰

۶-۴-۲-۱ آبگوشت اگون ال تی ۱۰۰

۶-۴-۲-۲ کلیات

این محیط دارای ترکیبات لسیتین و پلی سوربات ۸۰ به عنوان خنثی کننده مواد ممانعت کننده موجود در نمونه و عامل پراکنده کننده اکتوکسی نول ۹ می باشد.

۶-۴-۳ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
هضم شده پانکراتیکی کارئین،	۱۵/۰ g
هضم شده پاپائیک سویا،	۵/۰ g
ال-سیستین،	۰/۷ g
سدیم کلرید،	۴/۰ g

سدیم سولفیت،	۰/۲ g
گلوکز،	۵/۵ g
لسیتین تخم مرغ،	۱/۰ g
پلی سوربات ۸۰،	۵/۰ g
اکتوکسی نول ۹،	۱/۰ g
آب،	۱۰۰۰ ml

۴-۲-۴-۶ آماده سازی

پلی سوربات ۸۰، اکتوکسی نول ۹ و لسیتین تخم مرغ را به ترتیب در آب جوش تا حل شدن کامل حل کنید. سپس در حالیکه حرارت داده می شود، سایر مواد را در آب حل کنید. محیط کشت را در ظروف مناسب تقسیم کنید و در اتوکلاو در دمای 121°C به مدت زمان ۱۵ min استرون کنید. پس از سترون کردن و پایین آوردن دما، pH باید معادل 7.0 ± 0.2 در دمای آزمایشگاه باشد.

۵-۶ محیط های کشت برای جداسازی و شناسایی

۱-۵-۶ محیط کشت مک کانکی آگار^۱

۱-۱-۵-۶ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
هضم شده پانکراتیک ژلاتین،	۱۷/۰ g
هضم شده پانکراتیک کازئین،	۱/۵ g
هضم شده پپتیک بافت حیوانی،	۱/۵ g
لاکتوز،	۱۰/۰ g
مخلوط نمک های صفراوی،	۱/۵ g
سدیم کلرید،	۵/۰ g
آگار،	۱۳/۵ g
قرمز خنثی،	۳۰/۰ mg
کریستال ویوله،	۱/۰ mg

1-Mac conkey agar medium

آب، ۱۰۰۰ ml

۲-۱-۵-۶ آماده سازی

کلیه ترکیبات جامد فوق را در آب حل کنید و به مدت ۱ min بجوشانید تا کاملاً حل شود. محلول را در ظروف مناسب تقسیم کنید. و در اتوکلاو در دمای 121°C به مدت زمان ۱۵ min استرون کنید. پس از استرون کردن و پایین آوردن دما، pH باید معادل 7.1 ± 0.2 در دمای آزمایشگاه باشد.

۲-۵-۶ محیط کشت لوین ائوزین متیلن بلو آگار^۱

۱-۲-۵-۶ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
هضم شده پانکراتیک ژلاتین،	۱۳/۵ g
دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4)،	۲/۰ g
آگار،	۱۵/۰ g
لاکتوز،	۱۰/۰ g
ائوزین Y،	۴۰۰ mg
متیلن بلو،	۶۵ mg
آب،	۱۰۰۰ ml

یادآوری-در صورتیکه از محیط غیرتجاری استفاده شود می توان به جای ترکیب پتاسیم دی هیدروژن فسفات از دی پتاسیم هیدروژن فسفات K_2HPO_4 به همان مقدار استفاده کرد.

۲-۲-۵-۶ آماده سازی

هضم شده پانکراتیک ژلاتین، دی پتاسیم هیدروژن فسفات و آگار را با گرم کردن در آب حل کنید. بگذارید تا سرد شود. درست قبل از استفاده، محلول آگار ژله‌ای شده را به صورت مایع درآورید. سپس به ازای هر ۱۰۰ میلی لیتر محلول آگار مایع شده بقیه مواد مانند محلول‌ها را در مقادیر تعیین شده به شرح زیر به آن اضافه نموده و مخلوط کنید.

- ۵ ml محلول لاکتوز ۲۰٪،

- ۲ ml محلول ائوزین Y ۲٪، و

- ۲ ml محلول متیلن بلو ۰/۰۳۳٪.

1-Levine eosin-methylene blue agar medium (EMB agar medium)

محیط کشت نهایی ممکن است شفاف نباشد. محیط را در ظروف مناسب تقسیم کرده و در اتوکلاو در دمای 121°C به مدت زمان ۱۵min سترون کنید. پس از سترون کردن و پایین آوردن دما، pH باید معادل 7.2 ± 0.2 در دمای آزمایشگاه باشد.

۳-۵-۶ محیط کشت ستریماید آگار^۱

۱-۳-۵-۶ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
هضم شده پانکراتیک ژلاتین،	۲۰/۰ g
منیزیم کلرید،	۱/۴ g
پتاسیم سولفات،	۱۰/۰ g
ستریماید (ستیل تری متیل آمونیوم بروماید)،	۰/۳ g
آگار،	۱۳/۶ g
گلسیرین،	۱۰/۰ ml
آب،	۱۰۰۰ ml

۲-۳-۵-۶ آماده سازی

کلیه ترکیبات جامد فوق را در آب حل کنید و گلسیرین را اضافه نمایید. با همزدن مکرر حرارت دهید و به مدت ۱ min بجوشانید تا حل شود. در فلاسک‌های مناسب تقسیم کرده و در اتوکلاو در دمای 121°C به مدت زمان ۱۵ min سترون کنید. پس از سترون کردن و پایین آوردن دما، pH باید معادل 7.2 ± 0.2 در دمای آزمایشگاه باشد.

۴-۵-۶ محیط کشت سودوموناس آگار برای شناسایی پیوسیانی (سودوموناس آگار P)^۲

۱-۴-۵-۶ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
هضم شده پانکراتیک ژلاتین،	۲۰/۰ g
منیزیم کلرید بدون آب،	۱/۴ g
پتاسیم سولفات بدون آب،	۱۰/۰ g
آگار،	۱۵/۰ g
گلسیرین،	۱۰/۰ ml

1-Cetrimide agar medium

2-Pseudomonas agar medium for detection of pyocyanin (Pseudomonas agar P)

آب، ۱۰۰۰ ml

۶-۴-۲ آماده سازی

کلیه ترکیبات جامد فوق را در آب حل کنید و گلیسرین را اضافه نمایید. با همزدن مکرر حرارت دهید و به مدت زمان ۱ min بجوشانید تا حل شود. سپس در اتوکلاو در دمای 121°C به مدت زمان ۱۵ min استرون کنید. پس از استرون کردن و پایین آوردن دما، pH باید معادل 7.2 ± 0.2 در دمای آزمایشگاه باشد.

۷ تجهیزات و وسایل شیشه‌ای

از تجهیزات آزمایشگاهی، دستگاه‌ها و وسایل شیشه‌ای مطابق استاندارد ISO 21148 استفاده کنید.

۸ سویه‌های میکروارگانیزم‌ها

برای آزمون کارایی خنثی‌کننده‌ها، به عنوان نماینده باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوز / ATCC 9027^۱ یا/شرشیاکلی ATCC 8739 یا معادل آن ممکن است استفاده شود. کشت سویه‌ها باید مطابق با روش‌های تعیین شده توسط تأمین‌کننده سویه مرجع انجام شود.

۹ نگهداری فرآورده‌ها و نمونه‌های آزمایشگاهی

در صورت لزوم، فرآورده‌های مورد آزمون را در دمای آزمایشگاه نگهداری کنید. قبل یا بعد از انجام آزمون از قرار دادن فرآورده‌ها و نمونه‌ها در گرمخانه، یخچال یا فریزر خودداری کنید. نمونه‌برداری از فرآورده‌های آرایشی و بهداشتی را باید مطابق با استاندارد ISO 21148 انجام دهید. آزمون نمونه‌ها را همانطور که در استاندارد ISO 21148 مشخص شده و طبق روش بند ۹ این استاندارد انجام دهید.

۱۰ روش آزمون

۱۰-۱ توصیه کلی

برای آماده‌سازی نمونه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها، از مواد، تجهیزات استرون و روش‌های آسپتیک استفاده کنید.

برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه، مدت زمان بین پایان آماده‌سازی و تماس مایه تلقیحی با محیط کشت، نباید بیشتر از ۴۵ min باشد، مگر آن که به طور خاص در روش‌های آزمون یا استانداردها تعیین شده باشد.

۱۰-۲ آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه

سوسپانسیون اولیه را با اضافه نمودن حداقل ۱ g یا ۱ ml از فرآورده‌ای که بطور کامل مخلوط شده به حداقل ۹ ml رقیق‌کننده‌های خنثی‌کننده (طبق زیربند ۵-۲-۲) یا رقیق‌کننده (طبق زیربند ۵-۲-۳) تهیه کنید. به طور معمول سوسپانسیون اولیه رقت ۱ به ۱۰ می‌باشد. چنانچه سطوح بالای آلودگی مورد انتظار باشد و/ یا خصوصیات ضد میکروبی در رقت ۱ به ۱۰ هنوز وجود داشته باشد ممکن است رقت‌های بیشتری مورد نیاز باشد.

از تشکیل کف جلوگیری کنید زیرا ممکن است نتایج نهایی را تحت تأثیر قرار دهد.

۱۰-۳ روش‌ها برای شمارش

۱۰-۳-۱ رقت‌های شمارش

به طور معمول سوسپانسیون اولیه به عنوان اولین رقت برای شمارش به کار می‌رود. در صورت لزوم، ممکن است از سوسپانسیون اولیه با استفاده از همان رقیق‌کننده (با توجه به سطح مورد انتظار از آلودگی فرآورده) سری رقت‌های بیشتر (برای مثال رقت ۱ به ۱۰) تهیه کرد. به طور کلی شمارش با استفاده از حداقل دو پلیت انجام می‌شود. اما در آزمون معمول یا چنانچه شمارش بر روی رقت‌های متوالی از همان نمونه انجام می‌شود یا با توجه به نتایج آزمون‌های قبلی، ممکن است فقط از یک پلیت استفاده شود.

۱۰-۳-۲ روش‌های شمارش در پلیت

۱۰-۳-۲-۱ روش کشت آمیخته^۱

۱ ml از سوسپانسیون اولیه و/ یا رقت تهیه شده از نمونه را در پتری دیش‌هایی با قطر ۸۵ mm تا ۱۰۰ mm اضافه کنید و ۱۵ ml تا ۲۰ ml از محیط کشت آگار ذوب شده (طبق زیربند ۵-۳-۲) که در حمام آب با دمای حداکثر ۴۸ °C نگهداری شده است، بریزید. در صورت استفاده از پتری دیش‌های بزرگتر به همان نسبت مقدار محیط آگار بیشتری استفاده کنید.

با چرخش پلیت‌ها، سوسپانسیون اولیه و/ یا رقت نمونه را به دقت با محیط کشت مخلوط کنید تا به خوبی در کل محیط کشت پخش شود و اجازه دهید محتویات پتری دیش‌ها روی سطح افقی در دمای آزمایشگاه به صورت جامد درآیند.

1-Pour-plate method

۱۰-۳-۲ روش کشت سطحی^۱

به پتری دیش‌هایی با قطر ۸۵ mm تا ۱۰۰ mm، مقدار ۱۵ ml تا ۲۰ ml از محیط کشت آگار ذوب شده (طبق زیربند ۵-۳-۲) که در حمام آب با دمای حداکثر ۴۸°C نگهداری شده است، بریزید. در صورت استفاده از پتری دیش‌های بزرگتر به همان نسبت مقدار محیط آگار بیشتری استفاده کنید. اجازه دهید پلیت‌ها برای مثال در کابینت میکروبیولوژی یا انکوباتور، سرد شده و به صورت جامد درآیند. روی سطح محیط کشت حداقل ۰/۱ ml از سوسپانسیون اولیه و/یا رقتی از نمونه که طبق بند ۱۱ تهیه شده است، پخش کنید.

۱۰-۳-۳ روش فیلتر غشایی^۲

از غشاهایی با حداکثر اندازه اسمی منافذ ۰/۴۵ µm استفاده کنید. مقدار مناسبی از سوسپانسیون اولیه یا رقت نمونه که طبق بند ۱۱ آماده شده است (ترجیحاً نمایانگر حداقل ۱ g یا ۱ ml از فرآورده) را روی غشاء منتقل کرده و بلافاصله نمونه را صاف کنید و غشاها را شستشو دهید (مطابق روش آزمون «مناسب بودن»^۳ بند ۱۱). سپس غشاها را بر روی سطح محیط کشت آگاردار (طبق زیربند ۵-۳-۲) انتقال دهید.

۱۰-۳-۴ گرمخانه‌گذاری

بجز در مواردی که بیان شده، پلیت‌ها را به صورت وارونه در دمای ۲/۵°C ± ۳۲/۵°C به مدت ۷۲ h ± ۶ h گرمخانه‌گذاری کنید. در صورت امکان پس از گرمخانه‌گذاری، باید پلیت‌ها را بلافاصله مورد بررسی قرار دهید. در صورتی که بررسی پلیت‌ها پس از گرمخانه‌گذاری امکان‌پذیر نباشد می‌توانید آن‌ها را به مدت حداکثر ۲۴ h در یخچال نگهداری کنید.

یادآوری- در موارد خاص که امکان اشتباه گرفتن بین ذرات فرآورده با کلنی‌های شمارش شده وجود دارد، می‌توانید دو پلیت حاوی رقت یکسان از نمونه و محیط کشت آگار را جهت مقایسه با پلیت‌های گرمخانه‌گذاری شده تهیه و در یخچال نگهداری کنید.

۱۰-۳-۵ بیان نتایج

تعداد N میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه را طبق فرمول‌های (۱)، (۲) و (۳) محاسبه کنید:

$$N = m / (V \times d) \quad (۱)$$

$$N = c / (V \times d) \quad (۲)$$

1-Surface spread method
2-Membrane filtration method
3-Suitability

$$N = wm / (V \times d) \quad (۳)$$

که در آن:

m	میانگین حسابی شمارش‌های حاصل از پلیت‌های دوتایی؛
V	حجم تلقیحی به هر پلیت، برحسب میلی‌لیتر؛
d	ضریب رقت مربوط به رقیق کننده آماده شده برای تهیه سوسپانسیون اولیه (طبق زیر بند ۹-۲) یا برای اولین رقت شمارش شده؛
c	تعداد کلنی‌های شمارش شده بر روی یک پلیت؛
wm	میانگین وزنی کلنی‌ها شمارش شده از دو رقت متوالی با $wm = \Sigma c / (n_1 + 0.1n_2)$ ؛
Σc	مجموع کلنی‌های شمارش شده بر روی همه پلیت‌های حاصل از دو رقت متوالی؛
n_1	تعداد پلیت‌های شمارش شده برای سوسپانسیون اولیه (یا برای اولین رقت شمارش شده)؛
n_2	تعداد پلیت‌های شمارش شده برای رقت ۱/۱۰ سوسپانسیون اولیه (یا برای دومین رقت شمارش شده).

نتیجه محاسبه شده راتا دو رقم معنی دار گرد کنید. به این ترتیب که، چنانچه رقم آخر کمتر از ۵ باشد، رقم قبلی تغییر نمی‌کند و چنانچه رقم آخر عدد ۵ یا بیشتر از آن باشد، یک واحد به رقم قبلی اضافه می‌شود. مرحله به مرحله ادامه دهید تا دو رقم معنی دار به دست آید. تعداد N به دست آمده را یادداشت کنید.

۱۰-۳-۲-۶ تفسیر نتایج

در روش شمارش توصیه می‌شود تغییرپذیری ذاتی شمارش در پلیت، در نظر گرفته شود. دو نتیجه تنها زمانی متفاوت در نظر گرفته شوند که تفاوتشان بیش از ۵۰٪ باشد یا هنگامی که برحسب $\log$ بیان می‌شود، تفاوتشان بیش از $\log ۰.۳$ باشد.

برای شمارش دقت شود فقط پلیت‌های بیشتر از ۳۰ کلنی و کمتر از ۳۰۰ کلنی در نظر بگیرید. شمارش‌های حاصل از رقت‌های صحه گذاری شده طبق روش انتخاب شده (به بند ۱۱ مراجعه شود) را بررسی کنید. هنگامیکه تعداد CFU بیشتر از ۳۰ و کمتر از ۳۰۰ روی پلیت باشد و یا بیشتر از ۱۵، نتیجه را به صورت زیر بیان کنید:

- چنانچه S حداقل ۱ g یا ۱ ml باشد و V حداقل ۱ ml باشد: تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی در هر میلی‌لیتر یا هر گرم نمونه برابر N/S است؛

- چنانچه S کمتر از ۱ g یا ۱ ml باشد و/یا V کمتر از ۱ ml باشد: تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی در نمونه برابر N است.

هنگامی که S جرم یا حجم نمونه (طبق زیر بند ۹-۲) است.

نتیجه را به صورت عددی بین ۱/۰ و ۹/۹ ضرب در توان مناسبی از ۱۰ بیان کنید (به مثال‌های ۱، ۲، ۳ مراجعه شود).

چنانچه تعداد CFU بر روی پلیت‌ها کمتر از ۳۰ باشد، نتیجه را به صورت زیر بیان کنید:

- چنانچه S حداقل ۱ g یا ۱ ml باشد و V حداقل ۱ ml باشد: تعداد تخمینی باکتری‌های مزوفیل هوازی در هر میلی‌لیتر یا هر گرم نمونه برابر N/S است؛

- چنانچه S کمتر از ۱ g یا ۱ ml باشد و V کمتر از ۱ ml باشد: تعداد تخمینی باکتری مزوفیل هوازی در نمونه برابر N است.

هنگامی که S جرم یا حجم نمونه (طبق زیربند ۹-۲) است.

نتیجه را به صورت عددی بین ۱/۰ و ۹/۹ ضرب در توان مناسبی از ۱۰ بیان کنید (به مثال‌های ۱، ۲، ۳ مراجعه شود).

در صورتیکه هیچ کلنی مشاهده نشود، نتیجه را به شرح زیر گزارش کنید:

- کمتر از $1/d \times V \times S$ باکتری‌های مزوفیل هوازی در گرم یا میلی‌لیتر محصول (S حداقل ۱ g یا ۱ ml است)؛

- کمتر از $1/d \times V$ باکتری‌های مزوفیل هوازی در نمونه (S کمتر از ۱ g یا ۱ ml است).

که در آن، d ضریب رقت سوسپانسیون اولیه (طبق زیربند ۹-۲) و V که برابر یک (برای شمارش با روش کشت آمیخته) می‌باشد.

مثال ۱:

دو پلیت برای یک رقت

$S=1$ g؛ $V=1$ ؛ شمارش بدست آمده برای رقت 10^{-1} : ۳۸ و ۴۲

$$(1) N = m/(V \times d) = 40 / (1 \times 10^{-1}) = 400 \text{ یا } 4 \times 10^2$$

تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی برابر با 4×10^2 در هر میلی‌لیتر یا در هر گرم نمونه می‌باشد.

مثال ۲:

یک پلیت برای یک رقت

$S=1$ g؛ $V=1$ ؛ شمارش بدست آمده برای رقت 10^{-1} : ۶۰

$$(2) N = c/(V \times d) = 60 / (1 \times 10^{-1}) = 600 \text{ یا } 6 \times 10^2$$

تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی 6×10^2 در هر میلی‌لیتر یا در هر گرم نمونه می‌باشد.

مثال ۳:

دو پلیت برای دو رقت

$S=1$ ؛ $V=1$ ؛ شمارش بدست آمده برای رقت 10^{-2} : ۲۳۵ و ۲۸۲؛ برای رقت 10^{-3} : ۳۱ و ۳۹

$$(3) N = \frac{wm}{(V \times d)} = \frac{(235+282+31+39)}{1(2+0.1 \times 2)} \times 10^{-2} = 587/0.22 = 26682$$

نتیجه را به صورت مشخص شده در بالا گرد کنید. تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی ۲۷۰۰۰ یا 2.7×10^4 در هر میلی‌لیتر یا در هر گرم نمونه می‌باشد.

۱۱ روش جستجو و شناسایی

۱-۱۱ غنی‌کننده

حداقل ۱ g یا ۱ ml از فرآورده که به خوبی مخلوط شده را به حداقل ۹ ml محیط کشت غنی‌کننده اضافه (طبق زیربند ۵-۳-۳) کنید و آن را در دمای $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ به مدت زمان حداقل ۲۰ h گرمخانه‌گذاری کنید.

۲-۱۱ جداسازی

با استفاده از پی‌پت سترون، ۰/۱ ml تا ۰/۵ ml از سوسپانسیون گرمخانه‌گذاری شده را روی سطح پلیت (با قطر ۸۵ mm تا ۱۰۰ mm) حاوی ۱۵ ml تا ۲۰ ml محیط کشت سوی‌بین‌کازئین‌دایجست آگار (SCDA) یا تریپتیک‌سوی آگار (TSA) برای باکتری‌های مزوفیل هوازی و محیط کشت مک‌کانکی آگار برای /شرشیاکلی و ستریماید آگار برای سودوموناس /آئروژینوزا جهت تشکیل کلنی‌های مجزا انتقال دهید.

پلیت‌های تلقیح شده را وارونه نکنید (یا قبل از وارونه کردن تا جذب سوسپانسیون گرمخانه‌گذاری شده توسط آگار صبر کنید) و در دمای $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ به مدت زمان ۴۸ h تا ۷۲ h گرمخانه‌گذاری کنید.

۳-۱۱ جستجو باکتری‌های مزوفیل هوازی

پس از گرمخانه‌گذاری، سطح آگار را بررسی کنید و وجود یا عدم رشد باکتری‌های مزوفیل هوازی را پس از مدت زمان ۷۲ h ثبت کنید. نتایج «وجود و/یا عدم وجود باکتری‌های مزوفیل هوازی» را در نمونه S فرآورده بیان کنید.

۴-۱۱ جستجو و شناسایی /شرشیاکلی

۱-۴-۱۱ کلیات

ویژگی‌های کلنی‌های روی پلیت مک‌کانکی آگار گرمخانه‌گذاری شده را (طبق زیربند ۱۰-۲) بررسی کنید، به جدول ۱ مراجعه شود.

جدول ۱ - ویژگی‌های ظاهری/شرشیاکلی روی محیط کشت مک کانکی آگار

ویژگی‌های ظاهری کلنی اشرشیاکلی	محیط کشت انتخابی
قرمز آجری؛ که ممکن است با هاله‌ای از رسوب نمک‌های صفراوی احاطه شده باشد.	محیط کشت مک کانکی آگار

برای کلنی‌های مشکوک جدا شده از محیط کشت مک کانکی آگار آزمون‌های زیر را انجام دهید.

۱۱-۴-۲ رنگ آمیزی گرم

آزمون مطابق استاندارد ISO 21148 انجام شود. وجود باکتری‌های میله‌ای (باسیل‌ها) گرم منفی را بررسی کنید.

۱۱-۴-۳ کشت روی محیط کشت لوین ائوزین متیلن بلو آگار (محیط کشت EMB آگار)^۱

از کلنی‌های مجزا و مشکوک رشد یافته روی محیط کشت مکانکی آگار روی سطح محیط کشت لوین ائوزین متیلن بلو آگار تلقیح کنید بطوریکه کلنی‌های مجزا ایجاد شود. پلیت را وارونه کنید و سپس در دمای $37 \pm 2^\circ\text{C}$ به مدت زمان حداقل ۲۴ h (حداکثر ۴۸ h) گرمخانه‌گذاری کنید. برای بررسی ویژگی‌های کلنی‌ها به جدول ۲ مراجعه شود.

جدول ۲ - ویژگی‌های ظاهری/شرشیاکلی بر روی محیط کشت لوین ائوزین متیلن بلو آگار

ویژگی‌های ظاهری کلنی/شرشیاکلی	محیط کشت انتخابی
جلای فلزی زیر نور بازتابی ^۲ و ظاهر آبی-تیره زیر نور عبوری ^۳ ،	محیط کشت لوین ائوزین متیلن بلو آگار

۱۱-۴-۴ بیان نتایج

چنانچه شناسایی کلنی‌ها، وجود این گونه را تأیید کند، نتیجه را به صورت «وجود/شرشیاکلی در نمونه، S» بیان کنید.

چنانچه بعد از غنی‌سازی رشدی مشاهده نشود و/یا شناسایی کلنی‌ها وجود این گونه را تأیید نکند نتیجه را به صورت «عدم وجود اشرشیاکلی در نمونه، S» بیان کنید.

1-EMB agar
2-Reflected light
3-Transmitted light

۱۱-۵ جستجو و شناسایی سودوموناس آئروژینوزا

۱۱-۵-۱ کلیات

ویژگی کلنی‌ها را روی پلیت گرمخانه‌گذاری شده ستریماید آگار (طبق زیربند ۱۰-۲) بررسی کنید (به جدول ۳ مراجعه شود).

جدول ۳-ویژگی‌های ظاهری سودوموناس آئروژینوزا روی محیط کشت ستریماید آگار

محیط کشت انتخابی	ویژگی‌های ظاهری کلنی سودوموناس آئروژینوزا
محیط کشت ستریماید آگار	رنگدانه زرد و سبز (پیوسیانین)، که در معرض اشعه ماوراء بنفش دارای فلوروسانس می‌باشد.

آزمون‌های زیر را برای کلنی‌های مشکوک جدا شده روی محیط ستریماید آگار انجام دهید.

۱۱-۵-۲ رنگ آمیزی گرم

آزمون مطابق با استاندارد ISO21148 انجام شود. باکتری‌های میله‌ای گرم منفی را بررسی کنید.

۱۱-۵-۳ آزمون اکسیداز

آزمون مطابق استاندارد ISO21148 انجام شود. آزمون اکسیداز مثبت را بررسی کنید.

۱۱-۵-۴ کشت روی محیط کشت سودوموناس آگار جهت شناسایی پیوسیانین

کلنی‌های مشکوک جدا شده روی محیط کشت ستریماید آگار را روی سطح محیط کشت سودوموناس آگار جهت تشخیص پیوسیانین تلقیح کنید بطوریکه کلنی‌های تک رشد کنند. سپس در دمای $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ گرمخانه‌گذاری کنید. رشد باکتری‌ها را پس از ۲۴ h، ۴۸ h و ۷۲ h، بررسی کنید. سودوموناس آئروژینوزا، کلنی‌های احاطه شده با هاله آبی تا سبز را به علت تشکیل پیوسیانین یا کلنی‌های با هاله قرمز تا قهوه‌ای تیره به دلیل تولید پیوروبین ایجاد می‌کند.

۱۱-۵-۵ بیان نتایج

چنانچه با تشخیص کلنی‌ها، وجود این گونه‌ها تأیید شود، نتیجه را به این صورت بیان کنید:

وجود سودوموناس آئروژینوزا در نمونه، S.

چنانچه بعد از غنی‌سازی هیچ‌گونه رشدی مشاهده نشود و/ یا چنانچه با تشخیص کلنی‌ها وجود این گونه، تأیید نشود نتیجه را به این صورت بیان کنید:

عدم وجود سودوموناس آئروژینوزا در نمونه، S.

۱۲ خنثی سازی خصوصیات ضد میکروبی فرآورده

۱-۱۲ کلیات

آزمون‌های مختلف شرح داده شده در زیربندهای زیر نشان می‌دهند که میکروارگانیسم‌ها می‌توانند تحت شرایط خاص آزمون رشد کنند.

۲-۱۲ آماده سازی مایه تلقیح

قبل از انجام آزمون و برای هر نوع سویه سطح محیط کشت سوی بین کازئین دایجست آگار (SCDA) یا هر محیط کشت مناسب دیگر (غیر انتخابی، غیر خنثی کننده) را با اشرشیاکلی یا سودوموناس آئروژینوزا تلقیح کنید و پلیت را به مدت زمان ۱۸ h تا ۲۴ h در دمای $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ گرمخانه گذاری کنید.

با استفاده از یک لوپ سترون از سطح محیط کشت مقداری از باکتری‌ها را برداشته و آنها را مجدداً در رقیق کننده به حالت سوسپانسیون در آورید تا سوسپانسیون تنظیم شده‌ای در حدود 1×10^8 CFU/ml به دست آید (برای مثال با استفاده از اسپکتروفتومتر؛ به پیوست پ استاندارد ISO 21148 مراجعه شود). از این سوسپانسیون و رقت‌های آن در مدت زمان ۲h استفاده کنید.

۳-۱۲ «مناسب بودن» روش‌های شمارش

۱-۳-۱۲ اصول آزمون

برای هر سویه، نمونه خنثی شده را (سوسپانسیون اولیه یا رقت نمونه را با توجه به فعالیت ضد میکروبی و یا حلالیت کم فرآورده) با رقتی از میکروارگانیسم مخلوط کنید. سپس آن را روی یک پلیت کشت بدهید. پس از گرمخانه گذاری، خصوصیات کلنی‌ها را بررسی کنید و تعداد را با یک شاهد (بدون نمونه) مقایسه کنید.

چنانچه شمارش کمتر از 5.0×10^3 (log ۰/۳) نمونه شاهد باشد، روش را تغییر دهید (رقیق کننده‌ها، عوامل خنثی کننده یا ترکیب هر دو؛ به پیوست الف مراجعه شود). توصیه می‌شود تغییرپذیری ذاتی شمارش در پلیت در محاسبه در نظر گرفته شود. بهتر است دو نتیجه فقط زمانی متفاوت در نظر گرفته شوند که تفاوتشان بیشتر از ۵۰٪ باشد و یا هنگامی که بر حسب log بیان می‌شود، تفاوتشان بیشتر از ۰/۳ باشد. در صورت عدم رشد مایه تلقیح، روش آزمون تأیید نشده است. در غیر این صورت، می‌توان در نظر گرفت که احتمال آلودگی فرآورده با این میکروارگانیسم وجود ندارد.

۲-۳-۱۲ آزمون «مناسب بودن» روش کشت آمیخته

۹ ml از سوسپانسیون اولیه و/ یا رقت (هایی) از نمونه در رقیق کننده خنثی شده (یا سایر؛ به زیربند ۵-۲ مراجعه شود) را با ۱ ml از سوسپانسیون میکروارگانیسم‌های حاوی 1000 CFU/ml تا 3000 CFU/ml مخلوط کنید. ۱ ml را به یک پلیت (ترجیحاً به صورت دوتایی) انتقال دهید و ۱۵ ml تا ۲۰ ml محیط

کشت آگار ذوب شده (طبق زیربند ۵-۳-۲) که در یک حمام آب با دمای حداکثر 48°C نگهداری شده است، بریزید و همزمان، پلیت شاهد را با همان رقیق کننده و همان سوسپانسیون میکروارگانیسم‌ها، اما بدون نمونه تهیه کنید.

پس از گرمخانه‌گذاری به مدت زمان ۲۴ h تا ۷۲ h در دمای $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ ، کلنی‌ها را بر روی پلیت‌ها شمارش کنید و شمارش به‌دست آمده از پلیت‌های آزمون و شاهد را با هم مقایسه کنید. رقیق کننده و روش شمارش در رقت ۱ به ۱۰ (هنگامی که ۱ ml از سوسپانسیون اولیه استفاده می‌شود) قابل قبول هستند چنانچه شمارش آزمون «مناسب بودن» حداقل ۵۰٪ شمارش در پلیت شاهد باشد.

۱۲-۳-۳ «مناسب بودن» روش کشت سطحی

۹ ml سوسپانسیون اولیه در رقیق کننده خنثی شده را (یا دیگر؛ به زیربند ۵-۲ مراجعه شود) با ۱ ml سوسپانسیون میکروارگانیسم‌های حاوی 10000 CFU/ml تا 30000 CFU/ml (یا کمتر از آن، در صورتیکه 1 ml یا 0.5 ml روی سطح پلیت پخش می‌شود) مخلوط کنید. حداقل 1 ml از آن را به پلیت آگار جامد (طبق زیربند ۵-۳-۲) ترجیحاً به صورت دوتایی انتقال دهید. همزمان، یک پلیت شاهد را با همان رقیق کننده و همان سوسپانسیون میکروارگانیسم‌ها، اما بدون نمونه تهیه کنید. به مدت زمان ۲۴ h تا ۷۲ h در دمای $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ گرمخانه‌گذاری کنید. پس از گرمخانه‌گذاری کلنی‌ها را بر روی پلیت‌ها شمارش کنید و شمارش به‌دست آمده از پلیت آزمون و شاهد را با هم مقایسه کنید. رقیق کننده و روش شمارش در رقت ۱ به ۱۰ (هنگامی که ۱ ml از سوسپانسیون اولیه استفاده می‌شود) قابل قبول هستند چنانچه شمارش «آزمون مناسب بودن» حداقل ۵۰٪ شمارش در پلیت شاهد باشد.

۱۲-۳-۴ «مناسب بودن» روش فیلتراسیون

حجمی از سوسپانسیون اولیه یا رقتی از نمونه مورد آزمون (به بند ۹ مراجعه شود) را با مقدار مناسبی از سوسپانسیون تنظیم شده میکروارگانیسم‌ها تقریباً 100 CFU مخلوط کنید.

بلافاصله تمام حجم را فیلتر کرده و غشا را با استفاده از حجم مشخصی رقیق کننده خنثی شده (طبق زیربند ۵-۲-۲) یا رقیق کننده (طبق زیربند ۵-۲-۳) شستشو دهید. سپس غشا را بر روی سطح محیط آگاردار مناسب قرار دهید. همزمان، یک شاهد را با شرایط شرح داده شده در بالا اما بدون نمونه تهیه کنید. شاهد را فیلتر کرده و تحت همان شرایط شستشو دهید.

پس از گرمخانه‌گذاری به مدت زمان ۲۴ h تا ۷۲ h در دمای $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ کلنی‌های روی فیلترهای غشایی را شمارش کنید و شمارش به‌دست آمده از پلیت آزمون و شاهد را با هم مقایسه کنید. روش فیلتراسیون و رقیق کننده قابل قبول هستند چنانچه شمارش حداقل ۵۰٪ شمارش در پلیت شاهد باشد.

۴-۱۲ «مناسب بودن» روش جستجو

۱-۴-۱۲ روش آزمون

۱-۴-۱۲-۱ برای به دست آوردن شمارش نهایی بین ۱۰۰ CFU/ml و ۵۰۰ CFU/ml رقت‌های سوسپانسیون تنظیم شده رادر لوله‌های حاوی ۹ ml رقیق‌کننده (طبق زیربند ۵-۳-۲) تهیه کنید. برای شمارش میکروارگانیسم‌های زنده در غلظت نهایی سوسپانسیون تنظیم شده رقیق شده، ۱ ml از سوسپانسیون را به پتری دیش انتقال دهید. سپس مقدار ۱۵ ml تا ۲۰ ml محیط کشت آگار ذوب شده (طبق زیربند ۵-۳-۲) که در حمام آب با دمای حداکثر ۴۸°C نگهداری شده است را به آن اضافه کنید و اجازه دهید به صورت جامد درآید. سپس در دمای ۳۲/۵°C±۲/۵°C به مدت زمان ۲۰ h تا ۲۴ h گرمخانه‌گذاری کنید.

۱-۴-۱۲-۲ تحت شرایط انتخاب شده برای آزمون (حداقل ۱ g یا ۱ ml از فرآورده مورد آزمون در حجم معین آبگوشت غنی‌کننده)، سوسپانسیون اولیه (طبق زیربند ۹-۲) را به صورت دوتایی در لوله آزمایش یا ارلن تهیه کنید.

۱-۴-۱۲-۳ با رعایت شرایط آسپتیک مقدار ۰/۱ ml از سوسپانسیون تنظیم‌شده رقیق‌شده میکروارگانیسم‌ها را به یک لوله یا ارلن (آزمون مناسب بودن) منتقل کنید. پس از مخلوط کردن، هر دو لوله یا ارلن (آزمون مناسب بودن و شاهد تلقیح نشده) را در دمای ۳۲/۵°C±۲/۵°C به مدت زمان ۲۰ h تا ۲۴ h گرمخانه‌گذاری کنید.

۱-۴-۱۲-۴ برای هر لوله یا ارلن (آزمون مناسب بودن و شاهد تلقیح نشده)، با استفاده از یک لوپ سترون (تحت شرایط یکسان آزمون) مقداری از مخلوط گرمخانه‌گذاری شده را روی سطح محیط کشت مک‌کانکی آگار یا ستریماید آگار (حاوی تقریباً ۱۵ ml تا ۲۰ ml) در پتری دیش (با قطر ۸۵ mm تا ۱۰۰ mm) به صورت خطی کشت دهید. پلیت‌ها را در دمای ۳۲/۵°C±۲/۵°C به مدت زمان ۲۴ h تا ۴۸ h گرمخانه‌گذاری کنید.

۲-۴-۱۲ تفسیر نتایج

رقت نهایی سوسپانسیون تنظیم شده باکتری‌ها را که دارای تعداد باکتری بین ۱۰۰ CFU/ml و ۵۰۰ CFU/ml است بررسی کنید.

چنانچه خصوصیات رشد/شرشپاکلی یا سودوموناس/آئروژینوزا بر روی پلیت آزمون «مناسب بودن» مشاهده شود و هیچ رشدی در پلیت شاهد مشاهده نشود، روش خنثی‌سازی و روش جستجو و شناسایی قابل قبول است.

هنگامی که رشد در پلیت شاهد (فرآورده‌های آلوده) مشاهده شود، خنثی‌سازی و روش جستجو و شناسایی قابل قبول است چنانچه /شرشیاکلی یا سودوموناس آئروژینوز/ روی پلیت‌های آزمون «مناسب بودن» بازیابی شوند.

عدم رشد روی پلیت‌های آزمون مناسب بودن نشان‌دهنده این است که فعالیت ضد میکروبی هنوز وجود دارد و تغییر شرایط روش آزمون بوسیله افزایش حجم آبگوشت مغذی با مقدار ثابت فرآورده یا افزودن مقدار کافی ماده غیرفعال‌کننده در آبگوشت غنی‌کننده، یا با ترکیب مناسبی از این تغییرات به طوری که اجازه رشد به /شرشیاکلی یا سودوموناس آئروژینوز/ بدهد، لازم است.

چنانچه علیرغم افزودن مقدار کافی ماده غیرفعال‌کننده و افزایش قابل توجه در حجم آبگوشت غنی‌کننده، همچنان امکان بازیابی کشت‌های زنده به شرح فوق وجود نداشت، نشان‌دهنده این است که احتمالاً فرآورده با /شرشیاکلی یا سودوموناس آئروژینوز/ وجود ندارد.

۱۳ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی‌های زیر باشد:

- الف- تمام اطلاعات لازم برای شناسایی کامل فرآورده؛
- ب- روش آزمون مورد استفاده مطابق با استاندارد ملی ایران؛
- پ- نتایج بدست آمده؛
- ت- تمام جزئیات کار برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه؛
- ث- شرح روش خنثی‌کننده‌ها و محیط‌های کشت استفاده شده؛
- ج- مناسب بودن روش، حتی چنانچه آزمایش به صورت جداگانه انجام شده است؛
- چ- هر نکته‌ای که در این استاندارد مشخص نشده یا اختیاری در نظر گرفته شده است، همراه با جزئیات هر رویدادی که ممکن است روی نتایج تأثیرگذار باشد.

پیوست الف

(آگاهی دهنده)

خنثی کننده های فعالیت ضد میکروبی نگهدارنده ها^۱ و مایعات شستشو^۲

جدول الف - ۱ - خنثی کننده های فعالیت ضد میکروبی نگهدارنده ها و مایعات شستشو

نگهدارنده ها	ترکیبات شیمیایی که قادر به خنثی کردن فعالیت ضد میکروبی نگهدارنده ها می باشند	مثال هایی از خنثی کننده های مناسب و مایعات شستشو (برای روش های فیلتراسیون غشایی)
ترکیبات فنولیک: پارابن ها، فنوکسی اتانول، فنیل اتانول، غیره. آنیلیدها	لسیتین پلی سوربات ۸۰ اتیلن اکساید متراکم شده حاصل از الکل چرب سورفکتانت غیر یونی	پلی سوربات ۸۰، ۳۰ g/l + لسیتین، ۳ g/l. اتیلن اکساید متراکم شده حاصل از الکل چرب، ۷ g/l + لسیتین، ۲۰ g/l + پلی سوربات ۸۰، ۴ g/l. آبگوشت خنثی کننده D/E ^{الف} . مایع شستشو: آب مقطر؛ تریپتون ۱ g/l + سدیم کلرید ۹ g/l؛ پلی سوربات ۸۰، ۵ g/l.
ترکیبات چهارتایی نمک های آمونیوم سورفکتانت های کاتیونی	لسیتین، ساپونین، پلی سوربات ۸۰، سدیم دودسیل سولفات اتیلن اکساید متراکم شده حاصل از الکل چرب	پلی سوربات ۸۰، ۳۰ g/l + سدیم دودسیل سولفات، ۴ g/l + لسیتین، ۳ g/l. پلی سوربات ۸۰، ۳۰ g/l + ساپونین، ۳۰ g/l + لسیتین، ۳ g/l. آبگوشت خنثی کننده D/E مایع شستشو: آب مقطر؛ تریپتون، ۱ g/l + سدیم کلرید، ۹ g/l؛ پلی سوربات ۸۰، ۵ g/l.
آلدئیدها عوامل آزادکننده فرمالدئید	گلیسین، هیستیدین	لسیتین، ۳ g/l + پلی سوربات ۸۰، ۳۰ g/l + ال - هیستیدین، ۱ g/l. پلی سوربات ۸۰، ۳۰ g/l + ساپونین، ۳۰ g/l + ال هیستیدین، ۱ g/l. ۱ + ال - سیستین، ۱ g/l. آبگوشت خنثی کننده D/E مایع شستشو: پلی سوربات ۸۰، ۳ g/l + ال هیستیدین، ۵ g/l.
ترکیبات اکسید کننده	تیوسولفات سدیم	سدیم تیوسولفات، ۵ g/l. ۳. g/l مایع شستشو: سدیم تیوسولفات،
ایزوتیازولینون ها ایمیدازول ها	لسیتین، ساپونین، آمین ها، سولفات ها، مرکاپتان ها، سدیم بی سولفیت، سدیم تیوگلیکلات	پلی سوربات ۸۰، ۳۰ g/l + ساپونین، ۳۰ g/l + لسیتین، ۳ g/l. مایع شستشو: تریپتون، ۱ g/l + سدیم کلرید، ۹ g/l؛ پلی سوربات ۸۰، ۵ g/l.

1-Preservation
2-Rising liquid

جدول الف - ۱- خنثی کننده های فعالیت ضد میکروبی نگهدارنده ها و مایعات شستشو (ادامه)

نگهدارنده ها	ترکیبات شیمیایی که قادر به خنثی کردن فعالیت ضد میکروبی نگهدارنده ها می باشند	نمونه هایی از خنثی کننده های مناسب و مایعات شستشو (برای روش های فیلتراسیون غشایی)
گوانیدهای دوتایی	لسیتین، ساپونین، پلی سوربات ۸۰	پلی سوربات ۸۰، ۳۰ g/l + ساپونین، ۳۰ g/l + لسیتین، ۳ g/l. مایع شستشو: تریپتون، ۱ g/l + کلرید سدیم، ۹ g/l؛ پلی سوربات ۸۰، ۵ g/l.
نمک های متالیک (Hg, Zn, Cu) ترکیبات آلی جیوه	سدیم بی سولفات، ال - سیستین، ترکیبات سولفیدریل، تیوگلیکولیک اسید	سدیم تیوگلیکلات، ۰/۵ g/l یا ۵ g/l. ال لسیتین، ۰/۸ g/l یا ۱/۵ g/l. آبگوشت خنثی کننده D/E مایع شستشو: سدیم تیوگلیکلات، ۰/۵ g/l.
الف- آبگوشت خنثی کننده D/E؛ به پیوست ب مراجعه شود.		

پیوست ب

(آگاهی دهنده)

سایر محیط‌های کشت

ب- ۱ محیط غنی کننده

ب- ۱-۱ آبگوشت خنثی کننده D/E (Dey/Engley neutralizing broth)^۱

ب- ۱-۱-۱ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
گلوکز،	۱۰/۰ g
لسیتین لوبیای سویا،	۷/۰ g
سدیم تیوسولفات با ۵ مولکول آب،	۶/۰ g
پلی سوربات ۸۰،	۵/۰ g
هضم شده پانکراتیکی کارئین،	۵/۰ g
سدیم سولفیت،	۲/۵ g
عصاره مخمر،	۲/۵ g
سدیم تیوگلیکلات،	۱/۰ g
بروموکرزول ارغوانی،	۰/۰۲ g
آب،	۱۰۰۰ ml

ب- ۱-۱-۲ آماده سازی

ترکیبات فوق یا محیط کشت تجاری بدون آب را در آب در حال جوش اضافه کرده تا به طور کامل حل شوند. محیط کشت را در ظروف مناسب تقسیم کرده و در اتوکلاو در دمای 121°C به مدت زمان ۱۵ min استرون کنید. پس از استرون کردن و پایین آوردن دما، pH باید معادل 7.2 ± 0.2 در دمای آزمایشگاه باشد.

1-D/E neutralizing broth (Dey/Engley neutralizing broth)

ب-۱-۲ محیط سوی بین کازئین دایجست - لسیتین - پلی سوربات ۸۰^۱ (آبگوشت SCDLP 80)

ب-۱-۲-۱ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
پپتون کازئین،	۱۷۰ g
پپتون لوبیای سویا،	۳۰ g
سدیم کلرید،	۵۰ g
دی پتاسیم هیدروژن فسفات،	۲۵ g
گلوکز،	۲۵ g
لسیتین،	۱۰ g
پلی سوربات ۸۰،	۷۰ g
آب،	۱۰۰۰ ml

ب-۱-۲-۲ آماده سازی

ترکیبات فوق یا محیط کشت تجاری بدون آب را به ترتیب در آبدر حال جوش اضافه کرده تا بطور کامل حل شوند. سپس محیط کشت را در ظروف مناسب تقسیم کنید و در اتوکلاو در دمای 121°C به مدت زمان ۱۵ min استرون کنید. پس از استرون کردن و پایین آوردن دما، pH باید معادل 7.0 ± 0.2 در دمای آزمایشگاه باشد.

ب-۲ محیط آگار

ب-۱-۲-۱ محیط کشت آگار سوی بین کازئین دایجست - لسیتین - پلی سوربات ۸۰^۲ (آگار SCDLP 80)

ب-۱-۲-۱-۱ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
پپتون کازئین،	۱۵۰ g
پپتون سویا،	۵۰ g
سدیم کلرید،	۵۰ g
لسیتین تخم مرغ،	۱۰ g
پلی سوربات ۸۰،	۷۰ g
آگار،	۱۵۰ g

1-Soybean- Casein- Digest- Lecithin- Polysorbate 80 medium

2-Soybean- Casein- Digest- Lecithin- Polysorbate 80 agar medium

آب، ۱۰۰۰ ml

ب-۲-۱-۲ آماده سازی

ترکیبات فوق را مخلوط کرده و با حرارت دادن بطور کامل حل کنید. سپس محیط کشت را در ظروف مناسب تقسیم کنید و در اتوکلاو در دمای 121°C به مدت زمان ۱۵ min استرون کنید. پس از سترون کردن و پایین آوردن دما، pH باید معادل 7.3 ± 0.2 در دمای آزمایشگاه باشد.

کتابنامه

[1] ISO 21149, Cosmetics – Microbiology-Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۸۰۴: سال ۱۳۹۷، میکروبیولوژی فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی- جستجو و شناسایی باکتری‌های مزوفیل هوازی با استفاده از استاندارد ISO 21149:2017 تدوین شده است.

[2] ISO 21150, Cosmetics – Microbiology – Detection of *Escherichia coli*

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۹۹۳۳: سال ۱۳۹۵، میکروبیولوژی فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی- جستجو و شناسایی باکتری‌های مزوفیل هوازی با استفاده از استاندارد ISO 21150:2015 تدوین شده است.

[3] ISO 22717, Cosmetics – Microbiology – Detection of *Pseudomonas aeruginosa*

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۹۷۹۳: سال ۱۳۹۲، میکروبیولوژی فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی- جستجو و شناسایی سودوموناس ائروجینوزا با استفاده از استاندارد ISO 22717:2006 تدوین شده است.

[4] ISO 29621, Cosmetics – Microbiology – Guidelines for the risk assessment and identification of microbiologically low-risk products

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۳۵۵۷: سال ۱۳۹۶، میکروبیولوژی فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی- ارزیابی ریسک و شناسایی فرآورده‌های کم ریسک از نظر میکروبیولوژی-راهنما، با استفاده از استاندارد ISO 29621: 2017 تدوین شده است.