ISIRI

13321-2

1st.Edition

جمهوری اسلامی ایران

Islamic Republic of Iran

سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

Organization of Standards and Industrial Research of Iran

استاندارد ملی ایران

۱۳۳۲۱-۲

چاپ اول

کمپوست- ویژگی های میکروبی و روش های آزمون- قسمت۲ : ویژگی ها و روش های آزمون سالمونلا

Compost – Microbial specification and test methods – Part 2 : Specification and test methods of salmonella

ICS:07.100.99;65.080;13.030

به نام خدا

آشنایی با سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

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

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان سازمان*، 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 تولید کنندگان، مصرف کنندگان، صادر کنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود. پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظر خواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها 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 ذی صلاح و با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند درکمیته ملی طرح و بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شوند که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی شماره ۵ تدوین ودر کمیته ملی استاندارد مربوط که سازمان استاندارد تشکیل می دهد به تصویب رسیده باشند.

سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)[1]، کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک(IEC)[2] و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML) [3]است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی(CAC) [5]در کشور فعالیت می کند. در تدوین استاندارد های ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور، از آخرین پیشرفت های علمی، فنی و صنعتی جهان و استاندارد های بین المللی بهره گیری می شود.

سازمان 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.سازمان می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی ودرجه بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمان ها و موسسات 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، سازمان استاندارد این گونه سازمان ها و موسسات را بر اساس ضوابط نظام تایید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تایید 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 استاندارد های ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

---

* سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

1- International Organization for Standardization
2- International Electrotechnical Commission
3- Organization International de Metrologie Legal (International Organization for Legal Metrology)
4-Contact Point
5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد
" کمپوست – ویژگی های میکروبی و روش های آزمون –
قسمت ۲ : ویژگی ها و روش های آزمون سالمونلا "

رئیس:	سمت و/ یا نمایندگی
قزوینی، کیارش (دکترای میکروبیولوژی)	عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی خراسان رضوی
دبیران:	
آرین نژاد ، محمد رضا (لیسانس علوم آزمایشگاهی)	کارشناس آزمایشگاه کارخانه کمپوست سازمان بازیافت و تبدیل مواد شهرداری مشهد
رضائی، الهام (فوق لیسانس شیمی آلی)	مسئول واحد ساماندهی پسماندهای صنعتی وپزشکی سازمان بازیافت و تبدیل مواد شهرداری مشهد
عابدینی طرقبه ، جواد (دانشجوی دکترای شیمی آلی)	مسئول آزمایشگاه کارخانه کمپوست سازمان بازیافت و تبدیل مواد شهرداری مشهد
اعضا: **(اسامی به ترتیب حروف الفبا)**	
آدینه نیا ، علی (لیسانس برق و الکترونیک)	معاون فنی و عمران سازمان بازیافت و تبدیل مواد شهرداری مشهد
اسماعیلی شاندیز، احمد (لیسانس مهندسی کشاورزی)	کارشناس استاندارد و تحقیقات صنعتی خراسان رضوی
بحرینی ، معصومه (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	عضو هیات علمی دانشگاه فردوسی مشهد
سهرابی، محمد (فوق لیسانس مهندسی صنایع غذایی)	مشاور سازمان بازیافت و تبدیل مواد شهرداری مشهد
جاوید ، نصر ا... (لیسانس طراحی صنعتی)	مدیرکارخانه کمپوست سازمان بازیافت و تبدیل مواد شهرداری مشهد
عباسی ، صغری (دکترای عمومی پزشکی)	مسئول آزمایشگاه میکروبیولوژی اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان خراسان رضوی
نجف پور ، علی اصغر (دکترای بهداشت محیط)	عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان خراسان رضوی
نجفی ، علی (لیسانس جغرافیا)	مدیر عامل سازمان بازیافت و تبدیل مواد شهرداری مشهد
یاور منش ، مسعود (دکترای میکروبیولوژی مواد غذایی)	عضو هیات علمی دانشگاه فردوسی مشهد

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
آشنایی با موسسه استاندارد	ج
کمیسیون فنی تدوین استاندارد	د
پیش گفتار	و
مقدمه	ز
۱ هدف و دامنه کاربرد	۱
۲ مراجع الزامی	۱
۳ اصطلاحات و تعاریف	۲
۴ ویژگی ها	۳
۵ ایمنی	۳
۶ نمونه برداری	۳
۷ اصول آزمون	۶
۸ روش انجام آزمون	۱۷
۹ تجزیه داده ها و محاسبات	۲۰
۱۰کالیبراسیون تجهیزات و استاندارد سازی	۲۵
۱۱ روش محک نمونه	۲۵
۱۲ کنترل کیفیت	۳۵
۱۳ مدیریت پسماند و پیشگیری از آلودگی	۳۹
پیوست الف (الزامی) شکل ها	۴۰
پیوست ب (اطلاعاتی)فهرست کتابشناسی	۴۲

پیش گفتار

استاندارد " کمپوست – ویژگی های میکروبی و روش های آزمون – قسمت ۲: ویژگی ها و روش های آزمون سالمونلا " که پیش نویس آن در کمیسیون های مربوط تهیه و تدوین شده و در دویست و هفتاد و دومین اجلاس کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی و بیولوژی مورخ ۱۳۸۹/۱۱/۲۵ مورد تصویب قرار گرفته است، اینک به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می شود.

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

منبع و ماخذی که برای تهیه این استاندارد بکار رفته به شرح ذیل است:

USEPA , Method 1682 , July 2006 , Salmonella in Swage Sludge (Biosolids), by Modified Semisolid Rappaport – Vassiliadis (MSRV) Medium .

مقدمه

برای سنجش عوامل بیماری زا از روش شناسایی و سنجش میکروارگانیسم های شاخص استفاده می شود. یکی از این میکروارگانیسم های شاخص سالمونلا است. سالمونلا باکتری پاتوژن روده ای است که توانایی ایجاد بیماری سالمونلوز در حیوانات و انسان را دارد. تعداد آن برای ایجاد عفونت و بروز بیماری باید بیش از حد مشخصی باشد. تعداد سالمونلا در کمپوست درجه یک برای استفاده نامحدود باید کمتر ازMPN[1] ۳ در هر چهار گرم از نمونه جامد (بر مبنای وزن خشک) در زمان استفاده یا عرضه باشد.

این استاندارد یک روش کاربردی برای شناسایی و سنجش سالمونلا در کمپوست است . در این روش سالمونلا از طریق غنی سازی انتخابی و تایید بیوشیمیایی و سرولوژیکی ، شناسایی و تعدادآن براساس جداول MPN محاسبه و اندازه گیری می شود.

"این استاندارد یکی از مجموعه استانداردهای ملی ایران شماره ۱۳۳۲۱ است."

1- Most Probable Number(MPN)

کمپوست– ویژگی های میکروبی و روش های آزمون–

قسمت ۲ : ویژگی ها و روش های آزمون سالمونلا

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد تعیین ویژگی ها، روش های نمونه برداری وآزمون سالمونلا در کمپوست با استفاده از روش غنی سازی و شناسایی است. این استاندارد در مورد شناسایی و شمارش سالمونلا بدون افتراق گونه های آن در کمپوست برای مصارف زراعی و کشاورزی کاربرد دارد.

۲ مراجع الزامی

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

۲-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ سال ۱۳۸۶ ، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – راهنمای الزامات کلی برای آزمون
۲-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۷۱۶، سال ۱۳۸۷، کمپوست – ویژگی های فیزیکی و شیمیایی
۲-۳ استاندارد ملی ایران شماره۱-۱۳۳۲۱ ، سال۱۳۹۰ ،کمپوست ویژگی های میکروبی و روش های آزمون- قسمت ۱: ویژگی های عمومی
۲-٤ استاندارد ملی ایران شماره۳-۱۳۳۲۱ ،سال ۱۳۹۰ ، کمپوست– ویژگی های میکروبی و روش های آزمون– قسمت ۳ : ویژگی ها و روش های آزمون کلی فرم های مدفوعی

۳ اصطلاحات و تعاریف

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

۳-۱

سالمونلا

سالمونلا باکتری گرم منفی، عمدتاً متحرک، بی هوازی اختیاری، میله ای شکل و دارای حدود ۲۰۰۰ سرو تیپ[1] است.

۳-۲

کمپوست

برای تعریف کمپوست به استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۷۱۶، کمپوست – ویژگی های فیزیکی و شیمیایی مراجعه کنید.

۳-۳

روش تهی[2]

آزمونه ای از آب مقطر سترون که دقیقاً مانند یک نمونه در شرایط شیشه های آزمایشگاهی، تجهیزات، محیط کشت و روش های آزمون کاربردی در مورد نمونه ها قرار می گیرد. روش تهی برای تصدیق سترون بودن تجهیزات، مواد و مواد اولیه به کار می رود.

۳-۴

کنترل منفی

یک کشت کنترلی، که وقتی دقیقاً مانند نمونه میدانی آزمون شود، نتیجه مشخص منفی برای یک روش آزمون با یک نوع محیط کشت تولید می کند.

۳-۵

کنترل مثبت

یک کشت کنترلی، که وقتی دقیقاً مانند نمونه میدانی آزمون شود، نتیجه مشخص مثبت برای یک روش آزمون با یک نوع محیط کشت تولید می کند.

1- Serotype

2- Blank method

۶-۳

محیط کشت انتخابی

محیط کشتی است که رشد میکروارگانیسم های ناخواسته را متوقف و رشد میکروارگانیسم مورد نظر را تسریع کند.

۷-۳

نمونه های جامد

نمونه هایی که بیش از ۷ درصد مواد جامد بر پایه وزن خشک داشته باشند.

۴ ویژگی ها

میزان سالمونلا در کمپوست درجه یک باید کمتر از MPN ۳ در ۴ گرم براساس وزن خشک باشد. سایر ویژگی های میکروبی در استاندارد ملی ایران شماره سال ،کمپوست – ویژگی های میکروبی و روش های آزمون- قسمت ۱ : ویژگی های عمومی میکروبی و استاندارد ملی ایران شماره ،سال۱۳۹۰،کمپوست ویژگی های میکروبی و روش های آزمون- قسمت۳ : ویژگی ها و روش های آزمون کلی فرم های مدفوعی بیان شده است.

۵ ایمنی

۵-۱ کاربر باید آموزش های مرتبط با روشهای ایمنی مورد نیاز در آزمایشگاه میکروبیولوژی از جمله آماده سازی و استفاده از محیط های کشت، معرف ها، مواد و واکنشگرها و همچنین نحوه بکارگیری تجهیزات سترون سازی را فرا گرفته باشد.

۵-۲ کارکنان آزمایشگاه و نمونه برداران در معرض برخی خطرات از جمله آلودگی با میکروارگانیسم های بیماری زا قرار دارند. از اینروی باید روشهای ایمنی برای مقابله با میکروارگانیسم های بیماری زا و نقل و انتقال نمونه ها را رعایت کنند.

۵-۳ استفاده از دهان برای مکیدن پیپت ممنوع است.

۵-۴ در این استاندارد تمام موارد ایمنی و کاربرد آنها قید نشده و مسئولیت ایجاد ایمنی مناسب و موازین بهداشتی قبل از انجام آزمون ها با آزمایشگاه است. برای اطلاعات بیشتر در مورد وسایل و نکات ایمنی به استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹: سال ۱۳۸۶مراجعه کنید.

۶ نمونه برداری

۶-۱ از محصول نهایی باید نمونه برداری کنید. بهترین محل نمونه برداری انتهای فرآیند تولید ، از روی نوار نقاله ، توده های کمپوست و توده های انبار شده است.

۶-۲ جمع آوری نمونه در ظروف سترون و غیر سمی از جنس شیشه یا پلاستیک و دارای درب بدون نشت صورت پذیرد. همه تجهیزات نمونه برداری باید تمیز و سترون باشند.

۶-۳ وسایل و تجهیزات نمونه برداری

۶-۳-۱ کیسه های پلاستیکی سترون به ظرفیت حدود ۴ کیلوگرم

۶-۳-۲ ظروف شیشه یا پلاستیکی درب دار سترون

۶-۳-۳ مته نمونه برداری سترون

۶-۳-۴ چمچه سترون (از چمچه منحنی (کج بیل) استفاده نشود)

۶-۳-۵ یخدان

۶-۳-۶ یخ

۶-۳-۷ یخ های بسته بندی

۶-۳-۸ بیلچه های باغبانی سترون

۶-۳-۹ فویل آلومینیوم سترون یا کاغذ کرافت[1]

۶-۳-۱۰ محفظه سترون مثل سطل از جنس فولاد ضد زنگ یا پلاستیکی متناسب برای جمع آوری نمونه ها

۶-۳-۱۱ بیل تخت

۶-۴ روش تمیز کردن وسایل و ظروف

۶-۴-۱ ابتدا ظروف نمونه گیری را با شوینده ها و آب بشویید.

۶-۴-۲ با آب شهری آبکشی کنید.

۶-۴-۳ با HCl ۱۰٪ شستشو دهید.

۶-۴-۴ با آب مقطر شستشو دهید.

۶-۴-۵ در معرض هوا خشک کنید.

۶-۴-۶ بوسیله فویل بسته بندی و در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای $۱۲۱^{0}C$ قرار دهید (فشارPSI ۱۵).

1- Kraft paper

۶-۵ روش نمونه گیری از هاضم[2]

۶-۵-۱ لوله خروجی را از کمپوست قدیمی تخلیه کنید واجازه دهید به کمک جریان خروجی کمپوست به محفظه یا دستگاه جمع آوری کننده، درجه حرارت آن تا حد درجه حرارت هاضم افزایش پیدا کند.

۶-۵-۲ بوسیله یک کیسه نایلونی به ظرفیت حدود ۴ کیلو گرم ، نمونه کمپوست را از لوله خروجی جمع آوری و بدون تماس نمونه با سایر قسمت های کیسه به جز قسمت داخلی آن، بسته بندی کنید . دقت شود حتماً حدود ۱/۳ سانتی متر فضای خالی در بسته بندی برای تولید گاز در نظر گرفته شود.

یاد آوری- زمانیکه از کمپوست هاضم بی هوازی نمونه گیری می شود، باقی گذاشتن فضای خالی اهمیت بیشتری می یابد.

۶-۶ روش نمونه برداری از نوار نقاله خروجی

۶-۶-۱ با استفاده از بیلچه سترون، نمونه را مستقیماً از نوار نقاله در ظرف سترون جمع آوری و بدون مخلوط کردن و آلودگی با دیگر نقاط در ظروف سترون بسته بندی کنید. باقی گذاشتن فضای خالی در بسته بندی برای تولید گاز ضروری نیست.

۶-۷ روش نمونه برداری از توده های کمپوست، بار کامیون یا موارد مشابه

۶-۷-۱ مواد سطحی را تا عمق حدود ۱۵ سانتی متر کنار بزنید و سپس مواد زیرین را برای نمونه برداری به ۴ قسمت مساوی[1] تقسیم کنید.

۶-۷-۲ با استفاده از یک بیلچه سترون نمونه برداری کنید. در صورتیکه ارتفاع توده زیاد باشد از یک مته سترون یا لوله تو خالی استفاده کنید.

۶-۷-۳ از هر ۴ قسمت جداگانه نمونه بگیرید و در ظرف سترون جمع کنید.

۶-۷-۴ بعد از اینکه همه نمونه ها برداشته شد، به یک سطح سترون منتقل و با چند بار برگردانیدن، آنها را کاملاً مخلوط کنید.

۶-۷-۵ حجم نمونه را بوسیله مخروط سازی و چهار قسمت کردن کاهش دهید . اگر هنوز حجم نمونه بزرگ است هر یک از چهار قسمت را نیز به چهار قسمت دیگر تقسیم کنید و نیمی از آنها را حذف کنید. نمونه را در داخل ظروف شیشه ای یا پلاستیکی قرار دهید.

۶-۷-۶ روش جایگزین برای بند ۷-۶-۵ این است که به طور تصادفی با یک بیل تخت از توده کمپوست که روی یک سطح سترون کاملاً مخلوط شده، نمونه برداری و در ظرف سترون قرار دهید . از آنجایی که مته های خمیده ذرات با اندازه خاص را نمونه برداری می کنند، استفاده از آنها توصیه نمی شود.

2-Digester

1- Quadrants

۶-۸ موارد زیر را در دفتر ثبت کنید :

۶-۸-۱ نام و موقعیت محل نمونه برداری

۶-۸-۲ تاریخ

۶-۸-۳ زمان ورود

۶-۸-۴ نام و شماره تماس واحد تولید کننده اولیه

۶-۹ موارد زیر را روی ظرف نمونه درج و سپس در دفتر ثبت کنید :

۶-۹-۱شماره نمونه

۶-۹-۲ تاریخ و زمان نمونه برداری

۶-۹-۳ نام نمونه بردار

۶-۹-۴ محل نمونه برداری

۶-۹-۵ عواملی از جمله نوع آزمون، اندازه گیری های میدانی، pH و دما

۶-۹-۶ حجم

۶-۹-۷ مشاهدات

۶-۱۰ انتقال نمونه

نمونه های کمپوست جهت آزمایش باکتری شناسی در طول انتقال به آزمایشگاه باید در دمای کمتر از $۱۰^{0}C$ نگهداری شوند و نباید منجمد شوند. برای اطمینان از دمای انبارش، نمونه ها باید در ظروف عایق شده قرار داده شوند .بلافاصله نمونه ها را در یخچال قرار دهید و در اولین فرصت آزمایش را انجام دهید. دقت کنید قبل از آزمایش درجه حرارت نمونه به دمای محیط رسیده باشد.

۶-۱۱ زمان نگهداری و محدودیت دما

آزمونها باید بلافاصله و یا حداکثر تا ۲ ساعت بعد از جمع آوری شروع شود. در صورتیکه امکان انجام آزمون ظرف مدت ۲ ساعت وجود ندارد، نمونه ها باید تا زمان آزمون در دمای کمتر از $۱۰^{0}C$ نگهداری در عین حال نباید منجمد شوند. در این شرایط آزمون نمونه باید حداکثر تا ۶ ساعت بعد از نمونه برداری شروع شود، مگر اینکه موارد دیگری مشخص شده باشد.

یاد آوری- روش های انتقال نمونه و محدودیت های زمانی ارائه شده، لازم الاجرا هستند. در غیر اینصورت نتایج بدست آمده معتبر نمی باشد.

۷ اصول آزمون

ابتدا مقدار مشخصی از نمونه در محیط کشت TSB [1] غنی سازی و بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در صورت رشد میکروبی از این محیط به محیط کشت MSRV [2] تلقیح می شود. در محیط MSRV مواد نووبیوسین و مالاشیت گرین برای مهار گونه های باکتری غیر از سالمونلا و تقویت رشد سالمونلا بکار می روند.
کلنی های مشکوک در روی محیط XLD [3] جداسازی می شوند . برای مرحله تایید بیو شیمیایی از محیط های کشت LIA [4] و TSI [5] و اوره براث [6] و متعاقب آن آزمون سرولوژیکی از آنتی سرم چند ظرفیتی O استفاده می شود. تعداد سالمونلا به صورت MPN در ۴ گرم براساس وزن خشک محاسبه و گزارش می شود.

۷-۱ مواد و شناساگرها

یاد آوری ۱ – باید در تمامی آزمون ها از معرف های با درجه آزمایشگاهی استفاده شود. آگار مورد مصرف برای آماده سازی محیط کشت نیز باید برای مصارف میکروبیولوژیک مناسب باشد.

یاد آوری ۲ – تا حد امکان از محیط کشت های تجاری استفاده شود. درجه حرارت نگهداری ، زمان مصرف، محیط ها و معرف ها در جدول ۱ بند ۷-۱-۱۵ مشخص گردیده است.

یاد آوری ۳ – آب مقطر مورد مصرف باید درجه آزمایشگاهی مطابق با استانداردهای ایران شماره۹۸۹۹ سال ۱۳۸۶، در خصوص آب مورد مصرف در آزمایشگاه، داشته باشد.

۷-۱-۱ محلول ذخیره با فرفسفات رقیق کننده

۳۴ گرم مونو پتاسیم دی هیدروژن فسفات را در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید. بوسیله محلول سود نرمال، pH را در حد ۷٫۲ تنظیم کنید و حجم را بوسیله آب مقطر به یک لیتر برسانید. سپس در دمای $121^{0}C$ و فشار PSI ۱۵ به مدت ۱۵ دقیقه توسط اتوکلاو یا بوسیله عبوردادن از فیلتر ۰٫۲۲ میکرومتر سترون کنید.

۷-۱-۲ محلول ذخیره کلرید منیزیم

۳۸ گرم کلرید منیزیم بی آب ($MgCl_2$) یا ۸۱٫۱ گرم منیزیم کلرید ۶ آبه ($MgCl_2.6H_2o$) را به یک لیتر آب مقطر بیافزایید و در درجه حرارت $121^{0}C$ و فشار PSI ۱۵ به مدت ۱۵ دقیقه توسط اتوکلاو یا بوسیله عبور دادن از فیلتر ۰٫۲۲ میکرومتر سترون کنید.

یادآوری- محلول های آماده را بعد از سترون سازی، تا زمان مصرف در یخچال نگهداری کنید. درصورت مشاهده کپک یا سایر موارد آلودگی، محلول جدیدی تهیه کنید .

1- Tryptic soy broth
2- Modified semisolid Rappaport – Vassiliadis
3- Xylose – lysine desoxycholate agar
4- Lysine – iron agar
5- Tripple sugar iron agar
6- Urea broth

۷-۱-۳ محلول کاری بافر فسفات رقیق کننده

۱/۲۵ میلی لیتر از محلول ذخیره بافرفسفات را با ۵ میلی لیتر از محلول ذخیره منیزیم کلرید در یک لیتر آب مقطر مخلوط ، در حجم های مشخص و مناسب برای استفاده رقیق سازی یا بافر تقسیم و در اتو کلاو در دمای $121^{\circ}C$ و فشار ۱۵PSI به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید. pH نهایی باید۷±۰/۲ باشد.

یاد آوری۱- مدت زمان سترون سازی در اتو کلاو باید متناسب با حجم بافر در گنجایه ها و اندازه بار باشد.

یاد آوری۲- برای سترون سازی، لوله های آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر محلول رقیق کننده را داخل یک محفظه قابل سترون با مقدار کمی آب برای کاهش تبخیر و جلوگیری از شکستگی لوله ها جاسازی کنید.

۷-۱-۴ سرم فیزیولوژی سترون (۸۵٪وزنی – حجمی)

۸/۵ گرم NaCl را در یک لیتر آب مقطر حل کنید .مقدار ۵ تا۱۰ میلی لیتر از آن را در لوله های آزمایش درب دار ریخته و در اتوکلاو در دمای $121^{\circ}C$ و فشار۱۵PSIبه مدت ۱۵ دقیقه سترون و پس از آن در دمای اتاق نگهداری کنید.

۷-۱-۵ محیط کشتTSB

۷-۱-۵-۱ ترکیب

عصاره کازئین هضم شده با پانکراتین	۱۷/۰ g
عصاره سویای هضم شده با آنزیم	۳/۰ g
سدیم کلراید	۵/۰ g
دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4)	۲/۵ g
دکستروز	۲/۵ g
آب مقطر	۱/۰ L

۷-۱-۵-۲ برای تهیه محیط کشت TSB با غلظت معمولی (۱X) مواد بالا را به یک لیتر آب مقطر اضافه و بوسیله حرارت دادن حل کنید . به کمک اسید کلریدریک نرمال یا سدیم هیدروکسید نرمال، pH را در حدود ۰/۲ ± ۷/۳تنظیم کنید.
حجم های ۱۰ میلی لیتری از محیط کشت را در لوله های آزمایش با ابعاد ۱۵۰×۲۵ میلی متر توزیع و در دمای $121^{\circ}C$ و به مدت ۱۵ دقیقه در اتو کلاو سترون کنید (فشار PSI ۱۵). این محیط کشت برای حجم های تلقیح کمتر یا مساوی یک میلی لیتر به کار برده می شود.

۷-۱-۵-۳ محیط کشتTSB با غلظت سه برابر (۳X) ، مطابق بند ۷-۱-۵-۲ تهیه می شود، با این تفاوت که به جای یک لیتر،۳۳۳ میلی لیتر از آب مقطر استفاده و به حجم های ۵ و ۱۰ میلی لیتر در لوله های آزمایش با ابعاد ۱۵۰ ×۲۵ میلی متر توزیع کنید . به مدت ۱۵ دقیقه در دمای$۱۲۱^{\circ}C$ توسط اتوکلاو سترون کنید (۱۵ PSI). لوله های حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشتTSB(۳X) جهت تلقیح ۲۰ میلی لیتر و لوله های حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشتTSB(۳X) جهت تلقیح ۱۰ میلی لیتر از نمونه همگن شده بکار می رود.

یاد آوری ۱ -محیط کشت را قبل از آزمون به دمای اتاق برسانید.

یادآوری۲ - محیط کشت TSB (۳X) به این جهت برای تلقیح های ۱۰ و ۲۰ میلی لیتری لازم است که از رقیق شدن بیش از حد محیط کشت جلوگیری کنید.

۷-۱-۶ محیط کشت MSRV

۷-۱-۶-۱ ترکیب محیط پایه

تریپتوز	۴٫۵۹ g
کازئین هیدرولیز شده با اسید	۴٫۵۹ g
سدیم کلراید	۷٫۳۴ g
مونوپتاسیم هیدروژن فسفات (KH_2PO_4)	۱٫۴۷ g
منیزیم کلرید بدون آب ($MgCl_2$)	۱۰٫۹۳ g
مالاشیت گرین اگزالات	۰٫۰۳۷ g (۳۷mg)
آگار	۲٫۷ g
آب مقطر	۱٫۰ L

۷-۱-۶-۲ محلول ذخیره نووبیوسین(۲٪)

نووبیوسین سدیم	۵۰۰ mg
آب مقطر	۲۵ mL

۷-۱-۶-۲-۱ ۵۰۰ میلی گرم نووبیوسین سدیم را در ۲۵ میلی لیتر آب مقطر حل و با عبور از فیلتر ۰٫۲۲ میکرومتردر شرایط سترون در ظرف جمع آوری کنید، مقدار ۱٫۱ میلی لیتر از این محلول را در کریوویال های ۲ میلی لیتری تقسیم و در ۲۰°C- نگهداری کنید.

۷-۱-۶-۳ ترکیبات محیط پایه را به ۱ لیتر آب مقطر اضافه ، کاملاً مخلوط کنید و برای حل شدن کامل تا دمای جوش حرارت دهید (اتوکلاو نشود). بوسیله اسید کلریدریک نرمال یا سدیم هیدروکسید نرمال ، pH را در حد ۰٫۲ ± ۵٫۲ تنظیم کنید . پس از کاهش دما تا ۵۰°C ، مقدار ۰٫۱ میلی لیتر از محلول ۲٪ ذخیره نووبیوسین به ازای هر لیتر محیط اضافه و به کمک همزن ، محیط را بخوبی مخلوط و بلافاصله در پلیت های سترون با ابعاد ۱۰۰×۱۵ میلی متر، به ازای هر پلیت حدود ۲۵ میلی لیتر توزیع کنید. پلیت ها را هنگام نگهداری وارونه نکنید.

یادآوری – اگر از نوع تجاری مکمل آنتی بیوتیک نووبیوسین استفاده می کنید از مقدار کافی برای رسیدن به غلظت ۰٫۰۰۲٪ در هر لیتر استفاده کنید .

۷-۱-۷ محیط کشت زایلوز- لیزین دزوکسی کولات آگار(XLD)

۷-۱-۷-۱ ترکیب

عصاره مخمر	۳٫۰ g
L- لیزین	۵٫۰ g
زایلوز	۳٫۷۵ g
لاکتوز	۷٫۵ g
ساکاروز	۷٫۵ g
سدیم دزوکسی کولات	۲٫۵ g
فریک آمونیوم سیترات	۰٫۸ g
سدیم تیوسولفات	۶٫۸ g
سدیم کلراید	۵٫۰ g
آگار	۱۵٫۰ g
فنل رد	۰٫۰۸ g
آب مقطر	۱٫۰ L

۷-۱-۷-۲ پس از افزودن مواد به یک لیتر آب مقطر، آنها را کاملاً مخلوط و تا حل شدن کامل بجوشانید (حرارت زیاد نباشد واتوکلاو نیز نشود). با استفاده از اسید کلریدریک نرمال یا سدیم هیدروکسید نرمال، pH را در حد۰٫۲±۷٫۴ تنظیم

کنید و پس از خنک شدن در درجه حرارت حدود $45^{0}C$تا $50^{0}C$ بلافاصله مقدار ۱۲ میلی لیتر از محیط کشت در پلیت های سترون۱۰۰ ×۱۵ میلی متر بریزید. قبل از تلقیح بگذارید که درجه حرارت پلیت به دمای اتاق برسد.

یادآوری- حرارت دادن محیط کشت تا دمای جوش برای سترون سازی آن کافی است. حرارت بیشتر یا اتوکلاو ممکن است باعث ایجاد رسوب شود.

۷-۱-۸ محیط کشت تریپل شوگر آیرون آگار (TSI)

۷-۱-۸-۱ ترکیب

عصاره گوشت گوساله	۳/۰ g
عصاره مخمر	۳/۰ g
عصاره کازئین هضم شده با پانکراتین	۱۵/۰ g
پپتون پروتئوز شماره ۳	۵/۰ g
دکستروز	۱/۰ g
لاکتوز	۱۰/۰ g
ساکاروز	۱۰/۰ g
فروس سولفات	۰/۲ g
سدیم کلراید	۵/۰ g
سدیم تیوسولفات	۰/۳ g
آگار	۱۲/۰ g
فنل رد	۰/۰۲۴ g
آب مقطر	۱/۰ L

۷-۱-۸-۲ پس از افزودن مواد به یک لیتر آب مقطر آنها را مخلوط و به کمک حرارت کاملاً حل کنید. بوسیله اسید کلریدریک نرمال یا سدیم هیدروکسید نرمال، pH را درحد ۷/۴±۰/۲ تنظیم کنید . ۵ تا ۷ میلی لیتر از محیط کشت را در لوله های ۱۰۰×۱۶ میلی متری درب پیچ دار توزیع کنید و پس از بستن درب، آنها را به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو کنید. لوله های حاوی محیط کشت را پس از اتوکلاو در یک جا لوله ای بگذارید و آن را بصورت مورب قراردهید. به طوری که قسمت شیب دار محیط کشت برابر قسمت استوانه ای آن به حالت جامد در آید . دمای محیط کشت را قبل از تلقیح به دمای اتاق برسانید.

۷-۱-۹ محیط کشت لیزین آیرون آگار (LIA)

۷-۱-۹-۱ ترکیب

پپتون	۰/۵ g
عصاره مخمر	۳/۰ g
دکستروز	۱/۰ g
L لیزین هیدروکلراید	۱۰/۰ g
فریک آمونیوم سیترات	۰/۵ g
سدیم تیوسولفات	۰/۰۴ g
برم کروزول ارغوانی	۰/۰۲ g
آگار	۱۵/۰ g
آب مقطر	۱/۰ L

۷-۱-۹-۲ پس از افزودن مواد به یک لیتر آب مقطر آنها را مخلوط و به کمک حرارت کاملاً حل کنید. بوسیله اسید کلریدریک نرمال یا سدیم هیدروکسید نرمال pH را در حد ۶/۷±۰/۲ تنظیم کنید . ۵ تا ۷ میلی لیتر از این محیط کشت را در لوله های ۱۰۰×۱۶ میلی متری درب پیچ دار بریزید و پس از بستن درب، آنها را به مدت۱۲ دقیقه اتوکلاو کنید . لوله های حاوی محیط کشت را پس از اتو کلاو در یک جا لوله ای بگذارید و آن را به صورت مورب قرار دهید به طوری که قسمت شیب دار محیط کشت برابر قسمت استوانه ای آن به حالت جامد در آید. دمای محیط کشت را قبل از تلقیح به دمای اتاق برسانید.

۷-۱-۱۰ محیط کشت اوره براث

ترکیب

عصاره مخمر	۰/۱ g
مونوپتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH_2PO_4)	۹/۱ g
دی پتاسیم مونو هیدروژن فسفات (K_2HPO_4)	۹/۵ g
اوره	۲۰/۰ g
فنل رد	۰/۰۱ g
آب مقطر	۱/۰ L

۷-۱-۱۰-۱ پس از افزودن مواد به یک لیتر آب مقطر آنها را مخلوط نمایید تا حل شود (اتوکلاو و جوشانده نشود). بوسیله اسید کلریدریک نرمال یا سدیم هیدروکسید نرمال، pH را در حد ۶/۸±۰/۱ تنظیم کنید . با گذراندن از فیلتر۰/۲۲ میکرومتری، محلول را سترون کنید. با حفظ شرایط سترون، ۳ میلی لیتر از محلول را در لوله های سترون ۱۰۰×۱۶ میلی متری درب پیچ دار، به کمک یک پیپت سترون توزیع کنید. قبل از تلقیح دمای محیط کشت به دمای اتاق برسد.

۷-۱-۱۱ آگار عصاره قلب [1]

۷-۱-۱۱-۱ ترکیب

عصاره ۵۰۰ گرم از گوشت قلب گوساله	۱۰/۰ g
باکتوتریپتوز	۱۰/۰ g
سدیم کلراید	۵/۰ g
باکتو آگار	۱۵/۰ g
آب مقطر	۱/۰ L

۷-۱-۱۱-۲ پس از افزودن مواد به یک لیتر آب مقطر آنها را مخلوط و به کمک حرارت کاملاً حل کنید. بوسیله اسید کلریدریک نرمال یا سدیم هیدروکسید نرمال، pH را در حد ۷/۴±۰/۲ تنظیم کنید. به مدت ۱۵ دقیقه در$121^{\circ}C$ اتوکلاو و در پلیت های سترون ۱۰۰×۱۵ میلی متر ریخته شود قبل از تلقیح دمای محیط کشت به دمای اتاق برسد. به منظور تضمین کیفیت طبق بند ۱۱ علاوه بر محیط کشت های فوق از سایر محیط کشت ها نیز می توان استفاده کرد.

۷-۱-۱۲ آنتی سرم چند ظرفیتی O گروههای A تا I و i Vسالمونلا

1- Heart Infusion Agar

۷-۱-۱۳ کنترل مثبت

۷-۱-۱۳-۱ یک کشت ذخیره از سالمونلا تیفی موریم ATCC #۱۴۰۲۸ به عنوان کنترل مثبت برای ارزیابی محیط های کشت MSRV و XLD ، TSI ، LIA و آنتی سرم چند ظرفیتی O در نظر گرفته شود.

یادآوری- بیش از ۵ انتقال از کشت اولیه انجام نشود . این کار آلودگی ثانویه را در طول انتقال و تعویض ژنتیکی کشت به حداقل می رساند. از این رو توصیه می شود که در زمان دریافت سویه اولیه باکتری، برای کارهای بعدی تعدادی برای در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شود.

۷-۱-۱۳-۲ کشت ذخیره پروتئوس ولگاریس ATCC #۱۳۳۱۵ به عنوان کنترل مثبت اوره آز تامین شود.

۷-۱-۱۴ کنترل منفی

۷-۱-۱۴-۱ یک کشت ذخیره از اشرشیاکلی ATCC #۲۵۹۲۲ به عنوان کنترل منفی برای محیط کشت های MSRV و XLD ، TSI ، LIA و آنتی سرم چند ظرفیتی O تهیه شود.

۷-۱-۱۴-۲ کشت ذخیره سالمونلا تیفی موریم ATCC #۱۴۰۲۸ به عنوان کنترل منفی اوره آز تهیه شود.

۷-۱-۱۵ دما و زمان نگهداری معرف ها و محلول ها در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- دما و زمان نگهداری برای محیط و معرف های آماده

محیط ها و شناساگرها	دمای نگهداری	زمان ماندگاری
سرم فیزیولوژی استریل (٪۰/۸۵ وزنی- حجمی)	دمای اتاق	۳ ماه ≤
TSB (لوله با درب شل)	دمای اتاق	۲ هفته≤
MSRV (پلیت به حالت وارونه نگهداری نشود)	دمای اتاق	۴۸ ساعت≤
XLD (پلیت به حالت وارونه نگهداری شود)	۱ تا ۵ درجه سانتیگراد	۲ هفته≤
TSI و LIA و اوره براث (لوله با درب محکم)	۱ تا ۵ درجه سانتیگراد	۳ ماه ≤
HIA (پلیت به حالت وارونه نگهداری شود)	۱ تا ۵ درجه سانتیگراد	۲ هفته≤
نووبیوسین ۲ ٪	۲۰ – تا ۱۰ – درجه سانتیگراد	یکسال≤
آنتی سرم چند ظرفیتی O	۲ تا ۸ درجه سانتیگراد لیوفیلیزه	۳ سال ≤
یادآوری- در صورتی که محیط های کشت ، مواد و شناساگرها در یخچال نگهداری می شوند ، قبل از تلقیح باید به دمای اتاق برسند . برای اطمینان از رسیدن به دمای اتاق قبل از استفاده ، آنها را حداقل ۱ تا ۱/۵ ساعت قبل از آزمون از یخچال خارج کنید .		

۷-۲ وسایل و تجهیزات

از وسایل و تجهیزات موجود در آزمایشگاه میکروبیولوژی مطابق استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ و همچنین از وسایل زیر استفاده کنید:

۷-۲-۱ لوله های شیشه ای بروسیلیکات با ابعاد ۲۵×۱۵۰ میلی متر و درب آلومینیوم ، فولاد ضد زنگ یا هرگونه درب قابل اتو کلاو شدن

۷-۲-۲ لوله های شیشه ای بروسیلیکات با ابعاد ۱۶×۱۰۰ میلی متر و درب پلاستیکی پیچی قابل اتو کلاو شدن

۷-۲-۳ جا لوله ای برای نگهداری لوله های سترون

۷-۲-۴ جا پیپتی از جنس فولاد ضد زنگ ، آلومینیوم یا شیشه بروسیلیکات برای پیپت های شیشه ای

۷-۲-۵ پیپت سترون شیشه ای یا پلاستیکی سرگشاد با حجم های مناسب

۷-۲-۶ پیپت حباب دار یا پیپتور اتوماتیک

۷-۲-۷ لوپ های تلقیح پلاتینی ، با حداقل قطر ۳ میلی متر ، یا لوپ های سترون پلاستیکی

۷-۲-۸ چوب اپلیکاتور سترون یکبار مصرف

۷-۲-۹ چراغ آزمایشگاهی[1] یا چراغ الکلی

۷-۲-۱۰ سرنگ کورن وال سترون[2]

۷-۲-۱۱ پمپ پخش محیط های کشت

۷-۲-۱۲ انکوباتور میکروبیولوژیکی با رطوبت کنترل شده و قابلیت تنظیم درجه حرارت در ۳۶°C±۱٫۵°C و ۴۲°C±۰٫۵°C

۷-۲-۱۳ پلیت پلاستیکی سترون میکروبیولوژی در ابعاد ۱۰۰×۱۵ میلی متر

۷-۲-۱۴ اسلاید شیشه ای برای آزمایش آگلوتیناسیون

۷-۲-۱۵ ارلن مایر ۱ و ۲ لیتری

۷-۲-۱۶ همزن مغناطیسی

۷-۲-۱۷ همزن پلیت

۷-۲-۱۸ مخلوط کن با قابلیت سترون شدن محفظه

۷-۲-۱۹ حمام آب گرم[3] با قابلیت نگهداری دما در ۵۰°C

۷-۲-۲۰ تجهیزات فیلتراسیون محیط کشت و فیلترسرنگی با اندازه روزنه ۰٫۲۲ میکرومتری

1- Bunsen burner

2- Cornwall Syringe

3-Water bath

4- Crucible

۷-۲-۲۱ ذره بین

۷-۲-۲۲ دستکش لاتکس برای کار با نمونه ها

۷-۲-۲۳ pH متر

۷-۲-۲۴ کروسیبل[۴] یا ظرف تبخیر آلومینیومی

۷-۲-۲۵ مخلوط کن ورتکس

۷-۲-۲۶ میکرو پیپتور

۷-۲-۲۷ نوک سمپلر برای برداشت ۳۰ میکرولیتر

۷-۲-۲۸ آون با قابلیت تنظیم دما از ۱۰۳°C تا ۱۰۵°C

۷-۲-۲۹ بشر شیشه ای یا پلاستیکی با اندازه های مناسب

۷-۲-۳۰ دستمال های کاغذی بدون پرز

۷-۲-۳۱ تشت استیل با ابعاد ۲۵×۶۶×۷۶ سانتی متر

۷-۲-۳۲ اتو کلاو با قابلیت تنظیم دمای۱۲۱°C و فشار ۱۵ PSI

۷-۳ آماده سازی نمونه ها

۷-۳-۱ همگن سازی

همگن سازی بر پایه جامد یا مایع بودن نمونه انجام می شود. نمونه های مایع عموماً به نمونه هایی گفته می شود که حداکثر ۷ درصد جامدات کل براساس وزن خشک داشته باشند.

۷-۳-۱-۱ نمونه های مایع

۳۰۰ میلی لیتر از نمونه را در مخلوط کن سترون ریخته با دور بالا به مدت ۱ تا ۲ دقیقه همگن کنید. pH باید در حدود ۷ تا ۷/۵ تنظیم شود. در صورت نیاز با افزودن اسید کلریدریک نرمال یا هیدروکسید سدیم نرمال این کار انجام می شود. این نمونه از این پس به عنوان همگن اصلی در نظر گرفته می شود. هنگام تنظیم pH حجم نمونه همگن نباید بیش از ۵٪ افزایش یابد (۱۵میلی لیتر).

۷-۳-۱-۲ نمونه های جامد

۰/۱ ±۳۰ گرم از نمونه (خوب مخلوط شده) را در پلیت سترون توزین کنید. نمونه حتی الامکان باید شامل کل مواد موجود در کمپوست جامد باشد. برای مثال اگر بخشی از کمپوست خرده چوب است، ممکن است لازم باشد مخلوط کردن یا خرد کردن قبل از آزمایش انجام شود. قطعات بزرگ چوب که براحتی خرد نمی شوند را می توان قبل از همگن سازی دور انداخت. نمونه را به آسیاب مخلوط کن سترون منتقل و برای جداکردن باقی مانده نمونه از آسیاب مخلوط کن از ۲۷۰ میلی لیتر آب بافرسترون مطابق بند (۷-۱-۳) استفاده کنید. نمونه را می توانید مستقیماً در مخزن سترون آسیاب وزن کنید. درب آسیاب مخلوط کن را بپوشانید و آن را روی سرعت بالا به مدت یک تا دو دقیقه تنظیم کنید. این نمونه از این پس به عنوان همگن اصلی در نظر گرفته می شود. حجم ۱/۰ میلی لیتر از نمونه همگن حاوی ۰/۱ گرم از نمونه اصلی است. pH باید بین ۷-۷/۵ باشد و در صورت نیاز بوسیله افزودن اسید کلریدریک نرمال یا سود نرمال تنظیم شود.

یاد آوری- سوسپانسیون باکتری را در دمای اتاق بیش از ۳۰ دقیقه نگهداری نکنید . برای جلوگیری از تکثیر نمونه های محـک زده شـده از یـخ مرطوب یا نگهداری در دمای $۴^{0}C \pm ۱^{0}C$ استفاده کنید.

۷-۳-۲ تلقیح

روش های تلقیح محیط کشت براساس مایع یا جامد بودن نمونه اصلی متفاوت می باشند. برای انتقال بعضی نمونه هـا بهتـر است از پیپت سترون با خروجی بزرگ که قادر است ذرات معلق را منتقل کند، استفاده کنید. اگر نمونه ها محـک هسـتند، حداکثر ۱ ساعت بین همگن سازی نمونه های محک زده نشده و آزمون نمونه های محک زده شده وقت سپری می شود.

۷-۳-۲-۱ نمونه های مایع

برای نمونه های محک زده شده و محک زده نشده، سه سری ۵ لوله ای برای آزمایش ۲۰ ، ۱۰ و ۱ میلی لیتر از نمونه اصلی استفاده می شود. شکل شماره ۱ در پیوست الف را برای مروری بر طرح تلقیح مشاهده کنید.

۷-۳-۲-۱-۱ تلقیح

(الف) یک پیپت سترون برای تلقیح ۲۰ میلی لیتر از نمونه همگن شده اصلی به هر یک از ۵ لوله سری اول (حاوی ۱۰ میلی لیتر TSB (۳X))استفاده شود.

(ب) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱۰ میلی لیتر از نمونه همگن شده اصلی به هر یک از ۵ لوله سری دوم (حاوی ۵ میلی لیتر TSB (۳X))استفاده شود.

(ج) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از نمونه همگن شده اصلی به هر یک از ۵ لوله سری سوم (حاوی ۱۰ میلی لیتر TSB (۱X)) استفاده شود.

۷-۳-۲-۱-۲ برای نمونه های مایع باقیمانده بند ۷-۳-۲-۱-۱ را تکرار و زمانیکه تلقیح به پایان رسید برای ادامه آزمایش به بند ۸ مراجعه کنید.

۷-۳-۲-۲ نمونه های جامد

برای نمونه های محک زده شده و محک زده نشده، ۳ سری ۵ لوله ای برای آزمایش ۲و۱و۰/۱ گرم از نمونه اصلی استفاده شود. (معادل ۲۰/۰، ۱۰/۰ و ۱ میلی لیتر از نمونه همگن شده) دو سری اول لوله ها باید حاوی TSB (۳X) باشد. شکل شماره ۲ در پیوست الف را برای مروری بر طرح تلقیح مشاهده کنید.

۷-۳-۲-۲-۱ تلقیح

(الف) در هر یک از لوله های سری اول (حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت TSB (۳X)) با استفاده از پیپت سترون ۲۰ میلی لیتر از نمونه همگن بریزید. این حجم حاوی ۲ گرم از نمونه اصلی است . جامداتی که براحتی جدا نمی شوند یا ممکن است شناور باشند را بوسیله لوپ سترون در مایع فرو برید.

(ب) در هر یک از لوله های سری دوم (حاوی ۵ میلی لیتر، محیط کشتTSB (۳X)) با استفاده از یک پیپت سترون ۱۰ میلی لیتر از نمونه همگن بریزید. این حجم حاوی ۱ گرم از نمونه اصلی می باشد.

(ج) در هر یک از لوله های سری سوم (حاوی ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت TSB (۱X)) با استفاده از پیپت سترون یک میلی لیتر نمونه همگن بریزید. این حجم حاوی ۰/۱ گرم از نمونه اصلی می باشد.

۷-۳-۲-۲-۲ برای نمونه های جامد باقی مانده بند ۷-۳-۲-۲-۱ را تکرار و زمانیکه تلقیح به پایان رسید برای ادامه آزمایش به بند ۸ مراجعه کنید.

یادآوری- در کمپوست درجه یک کنترل سالمونلا مطابق مراحل فوق الزامی است . در سایر کمپوست ها، ممکن است رقت های دیگری قبل از آزمون مورد نیاز باشد. اگر شمارش سالمونلا در نمونه های با تعداد بیشتر از آنچه که بتوان با مقیاس ۲۰، ۱۰ و ۱ ارزیابی نمود باشد ، ممکن است لازم باشد از رقت های ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میلی لیتر استفاده کرد . در اینجا باید از جدول MPN به جای جدول ۲ در بند ۱۰ استفاده نمود. اگر چه از رقت ها و مقیاس های دیگر برای تعداد بالای سالمونلا می توان استفاده کرد ، اولین انتقال نمونه همگن باید ۱۰ میلی لیتر نمونه همگن به

۹۰ میلی لیتر آب رقیق سازی باشد . این کار باعث اطمینان از این می گردد که مقدار کافی کمپوست اصلی در ابتدای مقیاس رقت سازی انتقال داده شده است.

۸ روش انجام آزمون

۸-۱ روش آزمون محیط MSRV

در این روش، از محیط (MSRV) برای تعیین تعداد سالمونلا به روش MPNدر نمونه های کمپوست درجه یک استفاده می شود. اگر چه تعداد کل نمونه ها برای کمپوست درجه یک مشخص نیست اما توصیه می شود که نمونه برداری در طول دو هفته انجام شود و تعداد نمونه ها حداقل هفت باشد. هفت نمونه باعث افزایش دقت آزمایش، از طریق کاهش خطای استاندارد با حذف اثر تنوع در کیفیت ذاتی کمپوست می گردد. دقت آزمایش با افزایش تعداد تکرار در هر نمونه افزایش می یابد. برای اطلاع کلی از روش MPN به شکل ۳ در پیوست الف مراجعه شود.

۸-۱-۱ مرحله غنی سازی

۸-۱-۱-۱ محیط کشت TSB را طبق بند ۷-۱-۵ آماده کرده و در لوله های آزمایش تقسیم کنید.

یادآوری- اگر محیط کشت در یخچال نگهداری می شود، ۱ تا ۱/۵ ساعت قبل از تلقیح از یخچال خارج شود، به طوریکه قبل از استفاده به دمای اتاق برسد.

۸-۱-۱-۲ برای هر نمونه، لوله های آزمایش در ۳ ردیف ۵ تایی مرتب شود. به لوله های حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت TSB(۳X)، ۲۰ میلی لیتر از نمونه همگن تلقیح کنید، به لوله های حاوی۵ میلی لیترTSB(۳X)، ۱۰ میلی لیتر از نمونه همگن تلقیح کنید و به لوله های حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت TSB (۱X)، ۱ میلی لیتر از نمونه همگن تلقیح کنید.

یاد آوری- برای اطمینان از اینکه محیط TSB بیش از حد رقیق نشده باشد از TSB (۳X)برای تلقیح ۲۰ و ۱۰ میلی لیتر نمونه استفاده می شود.

۸-۱-۱-۳ تلقیح نمونه ها بسته به مایع یا جامد بودن آنها براساس بند۷-۳-۲ انجام شود.

۸-۱-۱-۴ لوله های TSB و کنترل های مربوط در درجه حرارت $۳۶^{\circ}C \pm ۱/۵^{\circ}C$ بمدت ۲±۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شوند.

۸-۱-۱-۵ تمام لوله های کدر به عنوان مثبت، ثبت شود. با توجه به ماهیت غیر مهار کننده ای که محیط غنی سازی دارد، تمام لوله ها مثبت خواهد شد. اگر در هیچ یک از لوله ها نتیجه مثبت ظاهر نشده باشد، نشان دهنده حضور مواد سمی یا نشانه عدم تلقیح لوله ها است.

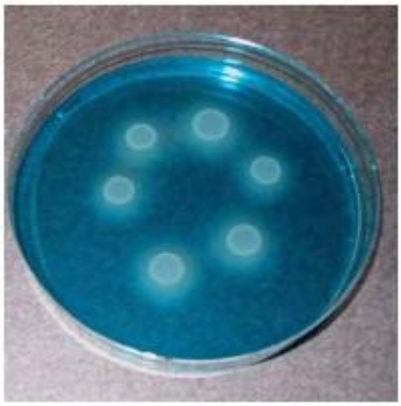
۸-۱-۲ مرحله انتخاب

۸-۱-۲-۱ شش قطره جداگانه۳۰ میکرولیتری از هر لوله TSB بردارید و روی پلیت MSRV مشابه که روی هر یک مشخصات، تاریخ و حجم تلقیح اولیه (مثلاً ۲۰ ، ۱۰ یا ۱ میلی لیتر) درج شده است، بریزید . قطره ها را به طور یکنواخت روی تمامی پلیت قرار دهید. پلیتی از MSRV را با کنترل های مثبت و منفی تلقیح کنید . پلیت ها وارونه نشوند. پلیت ها برای جذب قطرات در حدود یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شوند و سپس به مدت ۱۶ الی ۱۸ ساعت در دمای

۴۲°C±۰/۵°C با رطوبت کنترل شده در گرمخانه با هوای گرم مرطوب قرار داده شوند و اگر امکان تولید هوای گرم و مرطوب نبود، قرار دادن یک ظرف آب در قسمت پایین گرمخانه کافی می باشد.

۸-۱-۲-۲ پلیت ها را از نظر ظهور حرکت اطراف محل تلقیح به شکل هاله ای سفید رنگ با شعاع حدود ۲ سانتی متری از مرکز تلقیح، بررسی کنید.

۸-۱-۲-۳ یک لوپ سترون را به لبه بیرونی هاله اطراف یک پرگنه هدف بر روی محیط MSRV فرو ببرید و بر روی پلیت XLD به صورت خطی کشت کنید. از آنجاییکه سالمونلا عمدتاً در درون محیط MSRV جایگزین شده است، لوپ باید حداقل تا نیمی از محیط نفوذ کند. این عمل را با پرگنه هدف دیگری از پلیت MSRV تکرار کنید. علاوه بر این برای هر تلقیح یک کنترل مثبت و منفی گذاشته شود. (تصویر ۱)



تصویر ۱- ایجاد هاله توسط گونه های سالمونلا در محیط MSRV ، که بیانگر حرکت میکروارگانیسم می باشد

۸-۱-۲-۴ پلیت های XLD به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت در دمای ۳۶°C±۱/۵°C گرمخانه گذاری شود. بعد از این مدت یکی از پلیت های XLD را در یخچال در دمای ۱°C تا ۵°C قرار دهید و دیگری را برای تایید بیوشیمیایی اختصاص دهید. اگر در مراحل بعدی کار مشکلاتی بروز کند، آزمایشگاه ممکن است نیاز به پلیت های XLD درون یخچال پیدا کند.

یادآوری- می توان پلیت های XLD را قبل از تایید بیو شیمیایی در طول روزهای تعطیل هفته در یخچال نگهداری کرد.

۸-۱-۲-۵ پرگنه های سالمونلا به رنگ سیاه و صورتی تا قرمز با مراکز سیاه می باشند. (تصویر ۲)

تصویر ۲- ایجاد پرگنه های صورتی تا قرمز با مراکز سیاه توسط گونه های سالمونلا درمحیط XLD

۸-۱-۳ مرحله تایید بیوشیمیایی

۸-۱-۳-۱ بر روی همه لوله ها برچسب دارای تاریخ ؛ مشخصات نمونه و حجم تلقیح اصلی به عنوان مثال نصب شود (۲۰/۰، ۱۰/۰ یا ۱/۰ میلی لیتر). پرگنه هایی که دارای مشخصات ظاهری پرگنه های سالمونلا (پرگنه های صورتی تا قرمز با مراکز سیاه) هستند را انتخاب و در لوله های شیب دار محیط کشت TSI، LIA و لوله حاوی محیط کشت اوره براث تلقیح کنید. تلقیح لوله های شیب دار به این صورت است که ابتدا لوپ تا عمق لوله وارد می شود و بعد به روش خطی در روی سطح محیط، کشت می شود. برای تلقیح هر ۳ محیط کشت از یک پرگنه مشکوک در XLD استفاده شود. برای اینکار لازم است که چند بار از همان پرگنه مشکوک در روی XLD برداشت و به محیط های کشت تلقیح کرد. علاوه بر این هر محیط با کنترل مثبت و منفی مناسب تلقیح شود . برای مدت ۲۴ ساعت در دمای $۳۶^{\circ}C \pm ۱/۵^{\circ}C$ گرمخانه گذاری شود . اگر صرفاً پرگنه های نا معمول[1] در پلیت های XLD مشاهده می شود ، از آن پرگنه برداشت و در لوله های شیب دار TSI و LIA و لوله محیط کشت اوره براث همانند بالا کشت داده شود.

۸-۱-۳-۱-۱ TSI

واکنش مثبت در محیط کشت TSI عبارت است از قاعده لوله اسیدی (زرد رنگ) و سطح شیب دار قلیایی (رنگ قرمز) همراه با وجود یا عدم وجود واکنش تولید گاز H_2S. زمانی که H_2S تولید می شود، قاعده در دو محیط TSI و LIA ممکن است سیاه باشد که این حالت به عنوان واکنش مثبت سالمونلا محسوب می شود . اغلب وجود H_2S معمول است ولی وجود قاعده اسیدی زرد رنگ نیز به ندرت احتمال دارد.

۸-۱-۳-۱-۲ LIA

در یک واکنش مثبت LIA عبارت است از قاعده لوله قلیایی (بنفش رنگ) و سطح شیب دار نیز قلیایی (بنفش رنگ) همراه با وجود یا عدم وجود واکنش تولید گاز H_2S . زمانی که H_2S تولید می شود، قاعده هر دو محیط LIA و TSI ممکن است سیاه باشد که این حالت به عنوان واکنش مثبت سالمونلا محسوب می شود.

۸-۱-۳-۱-۳ اوره براث

محیط کشت اوره به رنگ نارنجی است و اگر واکنش مثبت باشد رنگ آن تبدیل به صورتی تا قرمز ارغوانی می شود. زمانیکه تغییر رنگ بوجود نیاید آزمایش اوره آز منفی تلقی می گردد. آزمایش اوره آز در مورد سالمونلا منفی است.

یاد آوری- اگر پرگنه های صورتی تا قرمز مورد آزمایشات بیو شیمیایی و سرولوژیکی قرار نگیرند، سالمونلاهای H_2S منفی از قلم خواهند افتاد.

۸-۱-۳-۲ آزمایش تایید از طریق آنتی سرم چند ظرفیتی O

از کلنی های رشد کرده در سطح شیب دار TSI (صرف نظر از اینکه TSI مثبت یا منفی باشد) با استفاده از سرم فیزیولوژی سترون (بند ۷-۱-۴) سوسپانسیون تهیه کنید. دو قطره جداگانه از سوسپانسیون را با فاصله روی یک اسلاید قرار دهید. به اولین قطره یک قطره آنتی سرم چند ظرفیتی O و به قطره دیگر سرم فیزیولوژی سترون (برای مقایسه چشمی)

1- Atypical Colonies

اضافه کنید . نتیجه واکنش آگلوتیناسیون را با بزرگ نمایی مشاهده کنید. کنترل های مثبت و منفی مناسب از (TSI) باید برای هر بهر از نمونه ها آزمون شود.

۸-۱-۳-۳ زمانی لوله اصلی محیط کشت TSB از نظر سالمونلا مثبت در نظر گرفته شود که تلقیح های انجام شده در محیط های کشت MSRV مثبت، XLD مثبت، TSI یا LIA مثبت، اوره آز منفی و آنتی سرم چند ظرفیتیO مثبت باشد (جدول ۱۳). نتایج همه پلیت ها و لوله ها را به لوله TSB اصلی نسبت دهید و نتایج مثبت را ثبت کنید، MPN را توسط این اطلاعات تعیین و اطلاعات به دست آمده را به دقت در دفتر آزمایشگاه ثبت کنید.

یادآوری – در بعضی از نمونه ها به علت حضور میکروارگانیسم های رقیب و باز دارنده و یا مواد سمی مانند فلزات و ترکیبات آلی باشد. تعداد سالمونلا کمتر از حد واقعی تخمین زده می شود.

۸-۱-۴ تعیین کل مواد جامد

۸-۱-۴-۱ تعیین درصد وزن خشک

آزمونه دیگری از نمونه همزمان به عنوان نمونه مورد آزمون برداشته شود.

هشدار– آون باید زیر هود یا تهویه باشد .نمونه های بشدت آلوده ممکن است باعث ایجاد آلودگی شدید در آزمایشگاه شوند.

۸-۱-۴-۲ بلافاصله پس از توزین نمونه جهت بررسی میکروبیولوژی، ۱۰تا۳۰ گرم از نمونه را در یک کروسیبل یا ظرف تبخیر آلومینیومی و در آون و در دمای $۱۰۳^{0}C$ تا $۱۰۵^{0}C$ بمدت یک شبانه روز قرار دهید. نمونه خشک شده قبل از توزین در دسیکاتور خنک شود. درصد ماده خشک را از فرمول زیر محاسبه کنید.

فرمول (۱)

$$\text{درصد وزن خشک} = \frac{\text{وزن نمونه خشک بر حسب گرم}}{\text{وزن نمونه بر حسب گرم}} \times ۱۰۰$$

۹ تجزیه داده ها و محاسبات

تعداداحتمالی باکتری سالمونلا به روشMPN محاسبه و تعداد سالمونلای کمپوست براساس MPN/۴g کل مواد جامد (بر پایه وزن خشک)گزارش و از طریق مراحل زیر محاسبه شود.

۱) انتخاب MPN/mL وزن مرطوب

۲) تبدیل به MPN/g وزن خشک و محاسبه MPN/4g کل مواد جامد (وزن خشک)

۹-۱ مرحله ۱ بدست آوردن MPN/mL (وزن مرطوب)

میزان شاخص MPN بوسیله شمارش تعداد لوله های مثبت در۳ سری رقت های مشخص از جدول شماره ۲ استخراج شود.
از آنجایی که در جدول ۲ فرض براین است که مقادیر ۲۰/۰، ۱۰/۰ و ۱/۰ میلی لیتر از نمونه همگن در TSB تلقیح شـده و نمونه های مایع در مرحله همگن سازی رقیق نشده اند،
پس :
MPN/mL معادل شاخص MPN است.

از آنجاییکه نمونه های جامد در مرحله همگن سازی (بند ۷-۳-۱) رقیق شده اند ، در هنگام محاسبه MPN/mL رقت باید در نظر گرفته شود (وزن مرطوب). در نتیجه مقدار شاخص MPN از جدول ۲ برای به حساب آوردن رقـت نمونـه در طـول مرحله همگن سازی باید بر ۰/۱ تقسیم شود.

جدول ۲ – شاخص MPN و حدود اطمینان ۹۵٪ برای مجموعه های مختلف نتایج مثبت در روش ۵ لوله ای نمونه های همگن تلقیحی به حجم های ۲۰/۰ ، ۱۰/۰ و ۱/۰ میلی لیتر

مجموعه مثبت ها	شاخص MPN	حدود اطمینان ۹۵٪		مجموعه مثبت ها	شاخص MPN	حدود اطمینان ۹۵٪	
		پایین تر	بالاتر			بالاتر	پایین تر
۰-۰-۰	<۰/۰۰۶۴۷۳	-----	۰/۰۲۲۳	۱-۳-۰	۰/۰۳۱۲	۰/۰۶۷۸	۰/۰۰۵۵
۰-۰-۱	۰/۰۰۶۵	۰/۰۰۱۲	۰/۰۲۳۲	۱-۳-۱	۰/۰۳۹۳	۰/۰۸۲۱	۰/۰۰۹۲
۰-۰-۲	۰/۰۱۳۰	۰/۰۰۱۲	۰/۰۳۵۲	۱-۳-۲	۰/۰۴۷۵	۰/۰۹۶۷	۰/۰۱۳۲
۰-۰-۳	۰/۰۱۹۵	۰/۰۰۱۲	۰/۰۴۷۲	۱-۳-۳	۰/۰۵۵۹	۰/۱۱۱۹	۰/۰۱۷۳
۰-۰-۴	۰/۰۲۶۲	۰/۰۰۳۳	۰/۰۵۸۹	۱-۳-۴	۰/۶۴۴۰	۰/۱۲۷۷	۰/۰۲۱۶
۰-۰-۵	۰/۰۳۲۸	۰/۰۰۶۲	۰/۰۷۰۶	۱-۳-۵	۰/۰۷۳۰	۰/۱۴۴۴	۰/۰۲۶۰
۰-۱-۰	۰/۰۰۶۷	۰۰۱۲/۰	۰/۰۲۲۸	۱-۴-۰	۰/۰۴۰۹	۰/۰۸۴۹	۰/۰۰۹۹
۰-۱-۱	۰/۰۱۳۴	۰/۰۰۱۲	۰/۰۳۶۰	۱-۴-۱	۰/۰۴۹۵	۰/۱۰۰۲	۰/۰۱۴۱
۰-۱-۲	۰/۰۲۰۲	۰/۰۰۱۲	۰/۰۴۸۳	۱-۴-۲	۰/۰۵۸۳	۰/۱۱۶۳	۰/۰۱۸۵
۰-۱-۳	۰/۰۲۷۰	۰/۰۰۳۷	۰/۰۶۰۴	۱-۴-۳	۰/۰۶۷۲	۰/۱۳۳۱	۰/۰۲۳۱
۰-۱-۴	۰/۰۳۳۹	۰/۰۰۶۷	۰/۰۷۲۵	۱-۴-۴	۰/۰۷۶۳	۰/۱۵۰۹	۰/۰۲۷۷
۰-۱-۵	۰/۰۴۰۸	۰/۰۰۹۹	۰/۰۸۴۷	۱-۴-۵	۰/۰۸۵۵	۰/۱۷۰۰	۰/۰۳۲۴
۰-۲-۰	۰/۰۱۳۸	۰/۰۳۶۷	۰/۰۰۱۲	۱-۵-۰	۰/۰۵۱۷	۰/۱۰۴۲	۰/۰۱۵۲
۰-۲-۱	۰/۰۲۰۸	۰/۰۴۹۵	۰/۰۰۱۲	۱-۵-۱	۰/۰۶۰۹	۰/۱۲۱۲	۰/۰۱۹۹
۰-۲-۲	۰/۰۲۷۹	۰/۰۶۱۹	۰/۰۰۴۰	۱-۵-۲	۰/۰۷۰۳	۰/۱۳۹۱	۰/۰۲۴۷
۰-۲-۳	۰/۰۳۵۰	۰/۰۷۴۵	۰/۰۰۷۲	۱-۵-۳	۰/۰۷۹۹	۰/۱۵۸۳	۰/۰۲۹۶
۰-۲-۴	۰/۰۴۲۲	۰/۰۸۷۱	۰/۰۱۰۶	۱-۵-۴	۰/۰۸۹۷	۰/۱۷۹۰	۰/۰۳۴۶
۰-۲-۵	۰/۰۴۹۴	۱/۰۰۰۱	۰/۰۱۴۱	۱-۵-۵	۰/۰۹۹۸	۰/۲۰۱۵	۰/۰۳۹۷
۰-۳-۰	۰/۰۲۱۵	۰/۰۵۰۷	۰/۰۰۱۲	۲-۰-۰	۰/۰۱۵۵	۰/۰۴۰۴	۰/۰۰۱۲
۰-۳-۱	۰/۰۲۸۸	۰/۰۶۳۶	۰/۰۰۴۴	۲-۰-۱	۰/۰۲۶۶	۰/۰۵۲۶	۰/۰۰۱۸
۰-۳-۲	۰/۰۳۶۲	۰/۰۷۶۶	۰/۰۰۷۷	۲-۰-۲	۰/۰۳۰۳	۰/۰۶۶۲	۰/۰۰۵۱
۰-۳-۳	۰/۰۴۳۷	۰/۰۸۹۸	۰/۰۱۱۳	۲-۰-۳	۰/۰۳۸۲	۰/۰۸۰۱	۰/۰۰۸۷
۰-۳-۴	۰/۰۵۱۲	۰/۱۲۴۳	۰/۰۰۵۱	۲-۰-۴	۰/۰۴۶۲	۰/۰۹۴۳	۰/۰۱۲۵
۰-۳-۵	۰/۰۵۸۸	۰/۱۴۲۸	۰/۰۰۹۵	۲-۰-۵	۰/۰۵۴۳	۰/۱۰۹۰	۰/۰۱۶۵
۰-۴-۰	۰/۰۲۹۹	۰/۰۶۵۴	۰/۰۰۴۹	۲-۱-۰	۰/۰۲۳۴	۰/۰۵۴۰	۰/۰۰۲۲
۰-۴-۱	۰/۰۳۷۵	۰/۰۷۸۹	۰/۰۰۸۴	۲-۱-۱	۰/۰۳۱۵	۰/۰۶۸۳	۰/۰۰۵۶
۰-۴-۲	۰/۰۴۵۳	۰/۰۹۲۷	۰/۰۱۲۱	۲-۱-۲	۰/۰۳۹۷	۰/۰۸۲۷	۰/۰۰۹۴
۰-۴-۳	۰/۰۵۳۱	۰/۱۰۶۹	۰/۰۱۶۰	۲-۱-۳	۰/۰۴۸۰	۰/۰۹۷۶	۰/۰۱۳۴

۰/۰۱۷۷	۰/۱۱۳۱	۰/۰۵۶۵	۲-۱-۴	۰/۰۲۰۰	۰/۱۲۱۶	۰/۰۶۱۱	۰-۴-۴
۰/۰۲۲۱	۰/۱۲۹۳	۰/۰۶۵۲	۲-۱-۵	۰/۰۲۴۱	۰/۱۳۶۹	۰/۰۶۹۱	۰-۴-۵
۰/۰۰۶۲	۰/۰۷۰۵	۰/۰۳۲۷	۲-۲-۰	۰/۰۰۹۰	۰/۰۸۱۴	۰/۰۳۹۰	۰-۵-۰
۰/۰۱۰۱	۰/۰۸۵۶	۰/۰۴۱۳	۲-۲-۱	۰/۰۱۲۹	۰/۰۹۵۸	۰/۰۴۷۰	۰-۵-۱
۰/۰۱۴۴	۰/۱۰۱۳	۰/۰۵۰۱	۲-۲-۲	۰/۰۱۷۰	۰/۱۱۰۷	۰/۰۵۵۳	۰-۵-۲
۰/۰۱۸۹	۰/۱۱۷۶	۰/۰۵۹۰	۲-۲-۳	۰/۰۲۱۲	۰/۱۲۶۲	۰/۰۶۳۶	۰-۵-۳
۰/۰۲۳۶	۰/۱۳۴۹	۰/۰۶۸۱	۲-۲-۴	۰/۰۲۵۵	۰/۱۴۲۵	۰/۰۷۲۰	۰-۵-۴
۰/۰۲۸۳	۰/۱۵۳۳	۰/۰۷۷۴	۲-۲-۵	۰/۰۲۹۹	۰/۱۵۹۶	۰/۰۸۰۶	۰-۵-۵
۰/۰۱۱۰	۰/۰۸۸۷	۰/۰۴۳۱	۲-۳-۰	۰/۰۰۱۲	۰/۰۲۴۱	۰/۰۰۷۲	۱-۰-۰
۰/۰۱۵۵	۰/۱۰۵۳	۰/۰۵۲۳	۲-۳-۱	۰/۰۰۱۲	۰/۰۳۶۹	۰/۰۱۳۹	۱-۰-۱
۰/۰۲۰۳	۰/۱۲۲۷	۰/۰۶۱۷	۲-۳-۲	۰/۰۰۱۲	۰/۰۴۹۷	۰/۰۲۰۹	۱-۰-۲
۰/۰۲۵۲	۰/۱۴۱۲	۰/۰۷۱۴	۲-۳-۳	۰/۰۰۴۱	۰/۰۶۲۳	۰/۰۲۸۱	۱-۰-۳
۰/۰۳۰۳	۰/۱۶۱۱	۰/۰۸۱۳	۲-۳-۴	۰/۰۰۷۳	۰/۰۷۴۹	۰/۰۳۵۳	۱-۰-۴
۰/۰۳۵۴	۰/۱۸۲۶	۰/۰۹۱۴	۲-۳-۵	۰/۰۱۰۷	۰/۰۸۷۸	۰/۰۴۲۵	۱-۰-۵
۰/۰۱۶۸	۰/۱۰۹۸	۰/۰۵۴۷	۲-۴-۰	۰/۰۰۱۲	۰/۰۳۷۷	۰/۰۱۴۴	۱-۱-۰
۰/۰۲۱۸	۰/۱۲۸۴	۰/۰۶۴۷	۲-۴-۱	۰/۰۰۱۳	۰/۰۵۰۹	۰/۰۲۱۷	۱-۱-۱
۰/۰۲۷۱	۰/۱۴۸۴	۰/۰۷۵۰	۲-۴-۲	۰/۰۰۴۵	۰/۰۶۴۰	۰/۰۲۹۰	۱-۱-۲
۰/۰۳۲۵	۰/۱۷۰۰	۰/۰۸۵۵	۲-۴-۳	۰/۰۰۷۹	۰/۰۷۷۱	۰/۰۳۶۵	۱-۱-۳
۰/۰۳۸۰	۰/۱۹۳۷	۰/۰۹۶۴	۲-۴-۴	۰/۰۱۱۵	۰/۰۹۰۵	۰/۰۴۴۱	۱-۱-۴
۰/۰۴۳۶	۰/۲۲۰۱	۰/۱۰۷۶	۲-۴-۵	۰/۰۱۵۳	۰/۱۰۴۳	۰/۰۵۱۷	۱-۱-۵
۰/۰۲۳۵	۰/۱۳۴۹	۰/۰۶۸۱	۲-۵-۰	۰/۰۰۱۷	۰/۰۵۲۳	۰/۰۲۲۴	۱-۲-۰
۰/۰۲۹۲	۰/۱۵۶۶	۰/۰۷۹۱	۲-۵-۱	۰/۰۰۵۰	۰/۰۶۵۸	۰/۰۳۰۱	۱-۲-۱
۰/۰۳۴۹	۰/۱۸۰۵	۰/۰۹۰۴	۲-۵-۲	۰/۰۰۸۵	۰/۰۷۹۵	۰/۰۳۷۹	۱-۲-۲
۰/۰۴۰۹	۰/۲۰۷۰	۰/۱۰۲۱	۲-۵-۳	۰/۰۱۲۳	۰/۰۹۳۵	۰/۰۴۵۷	۱-۲-۳
۰/۰۴۶۹	۰/۲۳۷۲	۰/۱۱۴۳	۲-۵-۴	۰/۰۱۶۲	۰/۱۰۷۹	۰/۰۵۳۷	۱-۲-۴
۰/۰۵۳۱	۰/۲۷۲۵	۰/۱۲۶۸	۲-۵-۵	۰/۰۲۰۳	۰/۱۲۲۹	۰/۰۶۱۸	۱-۲-۵
۰/۰۲۹۵	۰/۱۵۷۹	۰/۰۷۹۷	۴-۳-۰	۰/۰۰۲۸	۰/۰۵۸۵	۰/۰۲۵۵	۳-۰-۰
۰/۰۳۶۶	۰/۱۸۷۷	۰/۰۹۳۷	۴-۳-۱	۰/۰۰۶۳	۰/۰۷۱۰	۰/۰۳۳۰	۳-۰-۱
۰/۰۴۴۱	۰/۲۲۲۸	۰/۱۰۸۶	۴-۳-۲	۰/۰۱۰۳	۰/۰۸۶۳	۰/۰۴۱۷	۳-۰-۲
۰/۰۵۲۰	۰/۲۶۵۶	۰/۱۲۴۵	۴-۳-۳	۰/۰۱۴۷	۰/۱۰۲۳	۰/۰۵۰۶	۳-۰-۳
۰/۰۶۰۲	۰/۳۲۱۸	۰/۱۴۱۴	۴-۳-۴	۰/۰۱۹۳	۰/۱۱۹۱	۰/۰۵۹۸	۳-۰-۴
۰/۰۶۸۶	۰/۴۰۶۷	۰/۱۵۹۵	۴-۳-۵	۰/۰۲۴۱	۰/۱۳۶۸	۰/۰۶۹۱	۳-۰-۵
۰/۰۴۰۴	۰/۲۰۴۹	۰/۱۰۱۲	۴-۴-۰	۰/۰۰۶۹	۰/۰۷۳۴	۰/۰۳۴۴	۳-۱-۰
۰/۰۴۸۹	۰/۲۴۷۶	۰/۱۱۸۱	۴-۴-۱	۰/۰۱۱۲	۰/۸۹۶۰	۰/۰۴۳۵	۳-۱-۱
۰/۰۵۷۸	۰/۳۰۳۸	۰/۱۳۶۴	۴-۴-۲	۰/۰۱۵۹	۰/۱۰۶۵	۰/۰۵۲۹	۳-۱-۲
۰/۰۶۷۲	۰/۳۸۹۰	۰/۱۵۶۳	۴-۴-۳	۰/۰۲۰۷	۰/۱۲۴۴	۰/۰۶۲۶	۳-۱-۳
۰/۰۷۷۰	۰/۵۲۷۳	۰/۱۷۸۰	۴-۴-۴	۰/۰۲۵۸	۰/۱۶۳۴	۰/۰۷۲۵	۳-۱-۴

۳-۱-۵	۰/۰۸۲۷	۰/۱۶۴۰	۰/۰۳۱۰	۴-۴-۵	۰/۲۰۱۵	۰/۶۴۱۱	۰/۰۸۷۳
۳-۲-۰	۰/۰۴۵۶	۰/۰۹۳۲	۰/۰۱۲۲	۴-۵-۰	۰/۱۳۰۴	۰/۲۸۳۶	۰/۰۵۴۹
۳-۲-۱	۰/۰۵۵۵	۰/۱۱۱۲	۰/۰۱۷۱	۴-۵-۱	۰/۱۵۲۴	۰/۳۶۸۷	۰/۰۶۵۳
۳-۲-۲	۰/۰۶۵۷	۰/۱۳۰۳	۰/۰۲۲۳	۴-۵-۲	۰/۱۷۶۹	۰/۵۲۱۰	۰/۰۷۶۶
۳-۲-۳	۰/۰۷۶۳	۰/۱۵۱۰	۰/۰۲۷۷	۴-۵-۳	۰/۲۰۴۶	۰/۶۵۲۸	۰/۰۸۸۶
۳-۲-۴	۰/۰۸۷۲	۰/۱۷۳۵	۰/۰۳۳۳	۴-۵-۴	۰/۲۳۵۷	۰/۷۵۱۶	۰/۱۰۱۵
۳-۲-۵	۰/۰۹۸۴	۰/۱۹۸۴	۰/۰۳۹۰	۴-۵-۵	۰/۲۷۰۸	۰/۸۴۲۶	۰/۱۱۵۰
۳-۳-۰	۰/۰۵۸۳	۰/۱۱۶۴	۰/۰۱۸۶	۵-۰-۰	۰/۰۵۴۹	۰/۱۱۱۶	۰/۰۱۶۲
۳-۳-۱	۰/۰۶۹۳	۰/۱۳۷۱	۰/۰۲۴۱	۵-۰-۱	۰/۰۶۳۷	۰/۱۲۶۵	۰/۰۲۱۳
۳-۳-۲	۰/۰۸۰۶	۰/۱۵۹۷	۰/۰۲۹۹	۵-۰-۲	۰/۰۷۶۳	۰/۱۵۱۰	۰/۰۲۷۷
۳-۳-۳	۰/۰۹۲۴	۰/۱۸۴۷	۰/۰۳۵۹	۵-۰-۳	۰/۰۵۹۶	۰/۱۷۸۷	۰/۰۳۴۵
۳-۳-۴	۰/۱۰۴۶	۰/۲۱۲۸	۰/۰۴۲۱	۵-۰-۴	۰/۱۰۳۷	۰/۲۱۰۷	۰/۰۴۱۷
۳-۳-۵	۰/۱۱۷۳	۰/۲۴۵۲	۰/۰۴۸۴	۵-۰-۵	۰/۰۹۵۳	۰/۲۲۳۴	۰/۰۱۶۵
۳-۴-۰	۰/۰۷۳۳	۰/۱۴۵۰	۰/۰۲۶۲	۵-۱-۰	۰/۰۶۷۸	۰/۱۳۴۴	۰/۰۲۳۴
۳-۴-۱	۰/۰۸۵۶	۰/۱۷۰۰	۰/۰۳۲۵	۵-۱-۱	۰/۰۸۱۶	۰/۱۶۱۸	۰/۰۳۰۴
۳-۴-۲	۰/۰۹۸۴	۰/۱۹۸۲	۰/۰۳۹۰	۵-۱-۲	۰/۰۹۶۳	۰/۱۹۳۶	۰/۰۳۷۹
۳-۴-۳	۰/۱۱۱۸	۰/۲۳۰۷	۰/۰۴۵۷	۵-۱-۳	۰/۱۱۲۱	۰/۲۳۱۶	۰/۰۴۵۹
۳-۴-۴	۰/۱۲۵۸	۰/۲۶۹۵	۰/۰۵۲۶	۵-۱-۴	۰/۱۲۹۱	۰/۲۷۹۶	۰/۰۵۴۲
۳-۴-۵	۰/۱۴۰۵	۰/۳۱۸۴	۰/۰۵۹۷	۵-۱-۵	۰/۱۲۹۳	۰/۳۰۹۰	۰/۰۳۰۴
۳-۵-۰	۰/۰۹۱۳	۰/۱۸۲۵	۰/۰۳۵۴	۵-۲-۰	۰/۰۸۷۹	۰/۱۷۵۱	۰/۰۳۳۷
۳-۵-۱	۰/۱۰۵۵۰	۰/۲۱۵۰	۰/۰۴۲۶	۵-۲-۱	۰/۱۰۴۶	۰/۲۱۲۸	۰/۰۴۲۱
۳-۵-۲	۰/۱۲۰۴	۰/۲۵۳۸	۰/۰۵۰۰	۵-۲-۲	۰/۱۲۲۷	۰/۲۶۰۵	۰/۰۵۱۱
۳-۵-۳	۰/۱۳۶۲	۰/۳۰۲۹	۰/۰۵۷۷	۵-۲-۳	۰/۱۴۲۷	۰/۳۲۶۷	۰/۰۶۰۸
۳-۵-۴	۰/۱۵۲۹	۰/۳۷۱۵	۰/۰۶۵۶	۵-۲-۴	۰/۱۶۴۶	۰/۴۳۸۵	۰/۰۷۱۰
۳-۵-۵	۰/۱۷۰۷	۰/۴۷۹۵	۰/۰۷۳۸	۵-۲-۵	۰/۱۷۶۷	۰/۵۲۳۰	۰/۰۵۰۳
۴-۰-۰	۰/۰۳۸۱	۰/۰۸۰۹	۰/۰۰۸۲	۵-۳-۰	۰/۱۱۵۱	۰/۲۳۹۴	۰/۰۴۷۴
۴-۰-۱	۰/۰۴۶۱	۰/۰۹۴۲	۰/۰۱۲۵	۵-۳-۱	۰/۱۳۶۸	۰/۳۰۵۰	۰/۰۵۸۰
۴-۰-۲	۰/۰۵۶۳	۰/۱۱۲۶	۰/۰۱۷۵	۵-۳-۲	۰/۱۶۱۴	۰/۴۱۸۳	۰/۰۶۹۵
۴-۰-۳	۰/۰۶۶۸	۰/۱۳۲۳	۰/۰۲۲۹	۵-۳-۳	۰/۱۸۹۵	۰/۵۸۹۹	۰/۰۸۲۱
۴-۰-۴	۰/۰۷۷۷	۰/۱۵۳۷	۰/۰۲۸۴	۵-۳-۴	۰/۲۲۱۶	۰/۷۱۰۱	۰/۰۹۵۷
۴-۰-۵	۰/۰۸۹۰	۰/۱۷۷۳	۰/۰۳۴۲	۵-۳-۵	۰/۲۵۲۷	۰/۷۹۷۱	۰/۰۸۱۴
۴-۱-۰	۰/۰۴۸۴	۰/۰۹۸۳	۰/۰۱۳۶	۵-۴-۰	۰/۱۵۷۱	۰/۳۹۳۵	۰/۰۶۷۶
۴-۱-۱	۰/۰۵۹۲	۰/۱۱۸۱	۰/۰۱۹۰	۵-۴-۱	۰/۱۹۰۷	۰/۵۹۵۴	۰/۰۸۲۶
۴-۱-۲	۰/۰۷۰۵	۰/۱۳۹۵	۰/۰۲۴۸	۵-۴-۲	۰/۲۳۱۹	۰/۷۴۰۹	۰/۰۹۹۹
۴-۱-۳	۰/۰۸۲۲	۰/۱۶۳۱	۰/۰۳۰۸	۵-۴-۳	۰/۲۸۳۴	۰/۸۷۲۶	۰/۱۱۹۶
۴-۱-۴	۰/۰۹۴۵	۰/۱۸۹۴	۰/۰۳۷۰	۵-۴-۴	۰/۳۴۷۵	۱/۰۱۶۰	۰/۱۴۱۷
۴-۱-۵	۰/۱۰۷۲	۰/۲۱۹۳	۰/۰۴۳۴	۵-۴-۵	۰/۴۲۵۶	۱/۱۸۰۰	۰/۱۴۳۷

۴-۲-۰	۰/۰۶۲۶	۰/۱۲۴۴	۰/۰۲۰۷	۵-۵-۰	۰/۲۳۹۸	۰/۷۶۲۹	۰/۰۷۶۲
۴-۲-۱	۰/۰۷۴۸	۰/۱۴۷۹	۰/۰۲۶۹	۵-۵-۱	۰/۳۴۷۷	۱/۰۱۶۰	۰/۱۱۷۲
۴-۲-۲	۰/۰۸۷۵	۰/۱۷۴۲	۰/۰۳۳۵	۵-۵-۲	۰/۵۴۲۲	۱/۴۱۹۰	۰/۱۷۹۱
۴-۲-۳	۰/۱۰۰۹	۰/۲۰۴۱	۰/۰۴۰۳	۵-۵-۳	۰/۹۱۷۸	۲/۲۰۱۰	۰/۲۶۷۲
۴-۲-۴	۰/۱۱۵۰	۰/۲۳۹۲	۰/۰۴۷۳	۵-۵-۴	۱/۶۰۹۰	۴/۱۰۳۰	۰/۳۸۳۷
۴-۲-۵	۰/۱۲۹۹	۰/۲۸۲۰	۰/۰۵۴۶	۵-۵-۵	>۱/۶۰۹۰۰۰	-----	۰/۳۸۳۷

۹-۲ مرحله ۲ تبدیل MPN/mL وزن مرطوب به MPN/g براساس وزن خشک و محاسبه MPN/۴g کل مـواد جامد براساس وزن خشک:

برای تحلیل و محاسبات درصد کل مواد جامد به بند ۸-۱-۴ مراجعه شود.

برای تبدیل به MPN/g کل مواد جامد براساس وزن خشک فرض بر این است که؛

MPN/mL (وزن مرطوب) = MPN/g (وزن مرطوب)

بنابراین امکان محاسبهMPN/۴g کل مواد جامد براساس وزن خشک برای نمونه مایع از طریق فرمول زیر فراهم می شود.

فرمول (۲)

$$\text{MPN/۴g(وزن خشک)} = \frac{\text{[MPN/mL وزن مرطوب مرحله یک]} \times ۴}{\text{درصدکل مواد جامد (به صورت یک عدد اعشاری بیان می شود)}}$$

مثال هایی با محاسبات مربوط در جدول ۳ ارایه شده است.

جدول ۳ - مثال برای محاسبه تعداد سالمونلا

مثال	حجم نمونه همگن مورد استفاده در تلقیح TSB			مرحله ۱ MPN/mL براساس وزن مرطوب	درصد کل مواد جامد براساس وزن خشک	مرحله ۲ MPN/۴g (براساس وزن خشک)
	۲۰٫۰ mL	۱۰٫۰ mL	۱٫۰ mL			
مایع A	۰٫۵	۱٫۵	۰٫۵	۰٫۰۰۶۷	٪۱	(۰٫۰۰۶۷)(۴) ÷ (۰٫۰۱) = ۲٫۶۸ MPN/۴g
مایع B	۳٫۵	۱٫۵	۱٫۵	۰٫۰۴۳۵	٪۲	(۰٫۰۴۳۵)(۴) ÷ (۰٫۰۲) = ۸٫۷ MPN/۴g
مایع C	۵٫۵	۵٫۵	۲٫۵	۰٫۵۴۲۲	٪۳	(۰٫۵۴۲۲)(۴) ÷ (۰٫۰۳) = ۷۲ MPN/۴g
جامد D	۰٫۵	۱٫۵	۰٫۵	۰٫۰۰۶۷÷۰٫۱* =۰٫۰۶۷	٪۹۶	(۰٫۰۶۷)(۴) ÷ (۰٫۹۶) = ۰٫۲۸ MPN/۴g
جامد E	۴٫۵	۴٫۵	۴٫۵	۰٫۱۱۸۱÷۰٫۱* =۱٫۱۸۱	٪۱۸	(۱٫۱۸۱)(۴) ÷ (۰٫۱۸) = ۲۶ MPN/۴g
جامد F	۵٫۵	۵٫۵	۲٫۵	۰٫۵۴۲۲÷۰٫۱* =۵٫۴۲۲	٪۴۳	(۵٫۴۲۲)(۴) ÷ (۰٫۴۳) = ۵۰ MPN/۴g

❋ فاکتور رقت (۱:۱۰) برای نمونه های جامد است .

۱۰ کالیبراسیون تجهیزات و استاندارد سازی

۱۰-۱ دمای داخل گرمخانه ها و حمام های جوش (بن ماری ها) دوبار در روز به فاصله حداقل ۴ ساعت بررسی شود. این کار برای اطمینان از عملکرد صحیح در محدوده های اعلام شده روش آزمون می باشد. اندازه گیری ها در دفتر وقایع دستگاه ثبت شود.

۱۰-۲ دمای داخل یخچال و فریزر حداقل روزی یکبار برای اطمینان از عملکرد صحیح در محدوده های اعلام شده روش آزمون بررسی و اندازه گیری ها در دفتر ثبت وقایع یخچال و فریز ثبت شود.

۱۰-۳ دما سنج ها و گرمخانه ها را هر شش ماه با دماسنج های قابل ردیابی و معتبر کالیبره کنید. مخزن جیوه از لحاظ شکستگی بررسی شود.

۱۰-۴ pH متر را قبل از هر بار استفاده با محلول های استاندارد (۴٫۰، ۷٫۰ و ۱۰٫۰) تا نزدیکترین دامنه مورد آزمون کالیبره کنید.

۱۰-۵ ترازوهای دارای سطح بارگیر را ماهی یک بار با وزنه های قابل ردیابی و تایید شده رده F2 کالیبره کنید.

۱۱ روش محک نمونه [1]

۱۱-۱ به منظور پایش کارایی اولیه و مستمر روش ، تهیه و آزمون نمونه های مرجع محک جهت برآوردن الزامات کنترل کیفیت در این استاندارد انجام می گیرد .برای آزمونهای IPR[2](بند ۱۲- ۴) و OPR[3] (بند ۱۲- ۵) لازم است نمونه ها را با سوسپانسیون محک تهیه شده در آزمایشگاه به شرح ذیل محک بزنید:

۱۱-۲ تهیه سوسپانسیون های محک آماده آزمایشگاهی

۱۱-۲-۱ آماده سازی

۱۱-۲-۱-۱ کشت ذخیره

با تلقیح سالمونلا تیفی موریم ATCC #۱۴۰۲۸ در محیط آگار عصاره قلب و گرمخانه گذاری در ۳۶°C±۱٫۵°C به مدت ۴± ۲۰ ساعت یک کشت ذخیره آماده کنید. کشت ذخیره در تاریکی و دمای اتاق به مدت ۳۰ روز می تواند نگهداری شود.

۱۱-۲-۱-۲ TSB (۱ ٪)

1- Sample Spiking Procedure

2- Interal precision and recovery

3- Ongoing precision and recovery

محلول یک درصد TSB را از ترکیب ۹۹ میلی لیتر محلول بافرفسفات سترون و ۱ میلی لیتر TSB اصلی را در یک بطری با درب پیچی یا ظرف رقیق سازی آب قابل مهروموم تهیه کنید. این محلول را به خوبی هم بزنید.

۱۱-۲-۱-۳ سوسپانسیون رقیق نشده محک

یک لوپ پر از سوسپانسیون سالمونلا تیفی موریم ATCC #۱۴۰۲۸ را در شرایط سترون بـه محلـول ۱ ٪ تریپتیـک سـوی براث منتقل و حداقل ۲۵ مرتبه همزنی و در دمای $۳۶^{0}C \pm ۱/۵^{0}C$ به مدت ۴±۲۰ ساعت گرمخانه گذاری شود. سوسپانسیون محک حاصل حاوی تعداد (CFU/mL) $۱/۰ \times ۱۰^{۷}$ تا $۱/۰ \times ۱۰^{۸}$ سالمونلا تیفی موریم می باشد. که به آن، سوسپانسیون رقیق نشده محک می گویند.

۱۱-۳ نمونه آماده محک آزمایشگاهی (کمپوست درجه یک)

از آنجاییکه هدف از نمونه کمپوست محک بالا بردن درصد بازیابی است، ضروری است که تعـداد سـالمونلا تیفـی مـوریم در سوسپانسیون رقیق نشده محک تعیین شود.

۱۱-۳-۱ نمونه محک

۱۱-۳-۱-۱ سوسپانسیون رقیق محک

حداقل ۲۵ مرتبه بطری سوسپانسیون رقیق نشده محک را به شدت تکان دهید. توسط یک پیپت سترون ۱ میلی لیتر از این سوسپانسیون به ۹۹ میلی لیتر محلول آبی بافرفسفات (بند ۷-۱-۳) اضافه و پس از بستن در بطـری حـداقل ۲۵ مرتبـه بـه خوبی تکان داده شود .این سوسپانسیون رقیق شده محک «الف»نامگذاری شود. ۱میلی لیتر از رقت «الف»معادل $۱۰^{-۲}$ میلی لیتر از سوسپانسیون رقیق نشده محک اصلی است.

۱۱-۳-۱-۲ توسط یک پیپت سترون ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون رقیق محک «الف» به ۹۹ میلی لیتـر محلـول آبـی بـافر فسفات اضافه و پس از بستن درب بطری حـداقل ۲۵ مرتبـه بـه خـوبی تکـان داده شـود. ایـن سوسپانسـیون رقیـق محـک «ب»نامگذاری شود. ۱میلی لیتر از رقت«ب»حاوی $۱۰^{-۴}$ میلی لیتر از سوسپانسیون رقیق نشده محک اصلی است.

۱۱-۳-۱-۳ توسط یک پیپت سترون ۱۱ میلی لیتر از سوسپانسیون رقیق محک «ب» به ۹۹ میلی لیتر محلول آبی سترون بافر فسفات اضافه و پس از بستن درب بطری حداقل ۲۵ مرتبه به خوبی تکان داده شـود . ایـن سوسپانسـیون رقیـق محـک «ج»نامگذاری شود . ۱ میلی لیتر از رقت «ج» معادل $۱۰^{-۵}$ میلی لیتر از سوسپانسیون رقیق نشده محک اصلی است.

۱۱-۳-۱-۴ توسط یک پیپت سترون ۱۱ میلی لیتر از سوسپانسیون رقیق محک «ج» به ۹۹ میلی لیتر محلول آبی اسـتریل بافرفسفات اضافه و پس از بستن درب بطری حداقل ۲۵ مرتبه به خوبی تکان داده شود. این سوسپانسیون رقیـق محـک «د» نامگذاری شود. ۱ میلی لیتر از رقت «د» معادل $۱۰^{-۶}$ میلی لیتر از سوسپانسیون رقیق نشده محک اصلی است.

۱۱-۳-۲ محک زدن نمونه ها

از آنجاییکه روش همگن سازی نمونه در این اسـتاندارد مخصـوص نمونـه هـای مـایع و جامـد اسـت، روش محـک زدن نیـز مخصوص نمونه های مایع و جامد می باشد.

۱۱-۳-۲-۱ نمونه های مایع

نمونه کمپوست درجه یک همگن شود (بند۷-۳-۱). برای محک نمونه های مایع ، ۰/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون رقیق محک « د» به ۳۰۰ میلی لیتر نمونه همگن شده دارای pH تنظیم شده اضافه و پس از بستن درب با سرعت بالا به مدت ۱ تا ۲ دقیقه مخلوط شود. این نمونه محک است. حجم (بر حسب میلی لیتر) سوسپانسیون رقیق نشده محک اضافه شده به هر میلی لیتر نمونه همگن کمپوست $۱/۶۷ \times ۱۰^{-۹}$ میلی لیتر در هر میلی لیتر است.[$(۰/۵\ mL \times ۱۰^{-۶}\ mL)/۳۰۰ mL$)کمپوست] که به آن حجم تلقیح در هر واحد کمپوست (V) گفته می شود. (به بند ۷-۳-۲ تلقیح مراجعه شود).

۱۱-۳-۲-۲ نمونه جامد

نمونه کمپوست درجه یک همگن شود (بند ۷-۳-۱). برای محک زدن نمونه های جامد ، ۰/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون رقیق محک «د» به ۳۰۰ میلی لیتر نمونه همگن شده (۳۰ گرم نمونه در ۲۷۰ میلی لیتر محلول آبی با فرفسفات) با pH تنظیم شده اضافه و پس از بستن درب با سرعت بالا به مدت ۱ تا ۲ دقیقه مخلوط شود . این نمونه محک اصلی است.حجم (برحسب میلی لیتر) سوسپانسیون رقیق نشده محک اضافه شده به هر گرم (وزن مرطوب) نمونه همگن کمپوست برابر $۱/۶۷ \times ۱۰^{-۸}$ میلی لیتر است [$(۰/۵\ mL \times ۱۰^{-۶}\ mL) / ۳۰\ g$ کمپوست] که به آن حجم تلقیح در هر واحد کمپوست (V) گفته می شود. (به بند ۷-۳-۲ تلقیح مراجعه شود).

۱۱-۴ شمارش سوسپانسیون رقیق نشده محک

۱۱-۴-۱ آگار عصاره قلب را طبق بند ۷-۱-۱۱ آماده و ۱۰تا ۱۵ میلی لیتر در هر پلیت بریزید و اجازه دهید به حالت جامد در آید.از خشک بودن سطح آگار اطمینان حاصل کنید.

یاد آوری- برای اطمینان از اینکه سطح آگار قبل از استفاده خشک است ، پلیت ها را ترجیحاً چند روز قبل تهیه و در دمای اتاق به حالت وارونه قرار دهید یا با استفاده از یک هود لامینار و جریان هوا آنها را خشک کنید.

۱۱-۴-۲ هر یک از موارد زیر را در سه تکرار انجام دهید که منجر به ارزیابی ۹ پلیت کشت شده می شود:

* با پیپت ۰/۱ میلی لیتر از رقت «ب» را بر روی سطح از قبل خشک پلیت HIA بریزید ($۱۰^{-۵}$ میلی لیتر از سوسپانسیون محک اصلی).
* با پیپت ۰/۱ میلی لیتر از رقت «ج» را بر روی سطح از قبل خشک پلیت HIA بریزید ($۱۰^{-۶}$ میلی لیتر از سوسپانسیون محک اصلی).
* با پیپت ۰/۱ میلی لیتر از رقت «د» را بر روی سطح از قبل خشک پلیت HIA بریزید ($۱۰^{-۷}$ میلی لیتر از سوسپانسیون محک اصلی).

۱۱-۴-۳ برای هر یک از پلیت های پخش شده با استفاده از میله شیشه ای یا پخش کننده، مایع تلقیح را در سطح محیط کشت با گردانیدن پلیت پخش کنید.

۱۱-۴-۴ اجازه دهید تا مایع تلقیح کاملاً در محیط کشت جذب شود.

۱۱-۴-۵ پلیت ها را به حالت وارونه در دمای $۳۶^{\circ}C \pm ۱/۵^{\circ}C$ بمدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری کنید.

۱۱-۴-۶ پرگنه های هر پلیت را شمارش و ثبت کنید.

۱۱-۵ محاسبه درصد بازیابی محک آماده آزمایشگاهی

درصد بازیابی سالمونلا تیفی موریم محک طی چهار مرحله زیر انجام می شود:

یاد آوری – مثال اعداد محاسبه شده در جداول زیر در انتهای هر مرحله گرد شده است. اگر آزمایشگاه شما دوباره این مثال ها را با استفاده از یک صفحه تصادفی محاسبه کند، ممکن است اندکی تفاوت بدست آید.

۱۱-۵-۱ مرحله ۱ : محاسبه تعداد سالمونلا تیفی موریم (بر حسب CFU/mL) در سوسپانسیون رقیق نشده محک

۱۱-۵-۱-۱ تعداد سالمونلا تیفی موریم بر حسب CFU/mL در سوسپانسیون رقیق نشده محک با محاسبه همه پلیت های HIA که شمارش آنها بین دامنه قابل قبول ۳۰ تا ۳۰۰ پرگنه در هر پلیت است ، معین می شود.

۱۱-۵-۱-۲ اگر تعداد پرگنه ها از محدوده مورد قبول بیشتر باشد، (یعنی ۳۰۰ <) یا اینکه پرگنه ها از یکدیگر مجزا نباشند نتایج باید تحت عنوان غیر قابل شمارش (TNTC)[1] تلقی شود.

۱۱-۵-۱-۳ تعداد سالمونلا تیفی موریم (بر حسب CFU/mL) در سوسپانسیون رقیق نشده محک از فرمول زیر محاسبه شود (مثالی از محاسبات در جدول ۴ ارایه شده است):

$$\text{Salmonella}_{\text{Undiluted Spiked}} = (CFU_1+CFU_2+\ldots+CFU_n)/(V_1+V_2+\ldots+V_n) \qquad \text{فرمول (۳)}$$

که در آن :

$\text{Salmonella}_{\text{Undiluted Spiked}}$ سالمونلا تیفی موریم (CFU/mL) در سوسپانسیون رقیق نشده محک؛

CFU تعداد پرگنه های تشکیل شده در هر پلیت HIA قابل شمارش(۳۰ CFU تا ۳۰۰CFU) ؛

V حجم نمونه رقیق نشده تلقیح شده در هر پلیت HIA قابل شمارش (۳۰ CFU تا ۳۰۰ CFU) ؛

n تعداد پلیت های شمارش شده در محدوده قابل قبول می باشند.

جدول ۴– مثالی برای محاسبه تراکم سالمونلا تیفی موریم در سوسپانسیون محک

مثال ها	آزمایش سه نسخه ای CFU/plate از پلیت های HIA	CFU/mL سالمونلا در سوسپانسیون محک رقیق نشده

1- Too Numerous To Count

	پلیتهای $۱۰^{-۵}$mL	پلیتهای $۱۰^{-۶}$mL	پلیتهای $۱۰^{-۷}$mL	(Salmonella $_{\text{Undiluted spike}}$)
مثال ۱	۳۰۱،۲۵۰،۲۷۵	۵،۱۰،۳۰	۰،۰،۰	(۲۷۵+۲۵۰+۳۰)/($۱۰^{-۵}$ +$۱۰^{-۵}$+ $۱۰^{-۶}$) = ۵۵۵/(۲/۱×$۱۰^{-۵}$)=۲۶۴۲۸۵۷۱= ۲/۶×$۱۰^{۷}$ CFU/mL
مثال ۲	غیر قابل شمارش، غیر قابل شمارش، غیر قابل شمارش	۲۹۹، غیر قابل شمارش ، غیر قابل شمارش	۳۲،۱۰۹،۱۳	(۲۹۹+۱۰۹+۳۲)/($۱۰^{-۶}$ +$۱۰^{-۷}$+ $۱۰^{-۷}$) = ۴۴۰/(۱/۲×$۱۰^{-۶}$)=۳۶۶۶۶۶۶۶۷= ۳/۷×$۱۰^{۸}$ CFU/mL
یاد آوری- تعداد سالمونلا محک رقیق نشده براساس پلیت های در محدوده قابل شمارش (۳۰ تا ۳۰۰ در هر پلیت) محاسبه شده است .				

۱۱-۵-۲ مرحله ۲ : محاسبه تعداد سالمونلای محک بر حسب CFU/mL یا CFU/g (وزن مرطوب)

۱۱-۵-۲-۱ حجم سوسپانسیون رقیق نشده محک در هر واحد (بر حسب mL یا g) از نمونه های محک کمپوست درجدول ۵ ارایه شده است.

جدول ۵ – حجم سوسپانسیون رقیق نشده محک رقیق سازی نشده در هر واحد (mL یا g) از نمونه های محک کمپوست

نوع نمونه محک	حجم محک در هر واحد کمپوست
درجه یک مایع	۱/۶۷×$۱۰^{-۹}$ mL به ازای هر میلی لیتر کمپوست
درجه یک جامد	۱/۶۷×$۱۰^{-۸}$ mL به ازای هر گرم کمپوست (وزن مرطوب)

۱۱-۵-۲-۲ تعداد سالمونلا محک بر حسب CFU/mL یا CFU/g وزن مرطوب از فرمول زیر محاسبه می شود. مثالی از محاسبات در جدول ۵ ارایه شده است.

فرمول (۴)

$$\text{Spiked Salmonella}_{\text{Wet weight}} = (\text{Salmonella}_{\text{undiluted spike}}) \times (V_{\text{spiked per unit compost}})$$

که در آن:

Spiked Salmonella $_{Wet\ weight}$ تعداد سالمونلا محک بر حسب CFU در هر میلی لیتر یا گرم از کمپوست (وزن مرطوب)؛

Salmonella $_{undiluted\ spike}$ سالمونلا بر حسب CFU در میلی لیتر از سوسپانسیون محک رقیق نشده؛

$V_{spiked\ per\ unit\ compost}$ میلی لیتر از سوسپانسیون محک رقیق نشده به ازای هر میلی لیتر یا گرم ازکمپوست محک زده شده می باشند.

جدول ۶- مثال محاسبات سالمونلای محک

سالمونلا رقیق نشده محک	حجم نمونه محک (براساس جدول ۸)	سالمونلای محک [CFU/g یا CFU/mL وزن مرطوب]
مثال ۱ : $۲/۶\times۱۰^{۷}$CFU/mL	مایع : $۱/۶۷\times۱۰^{-۹}$ میلی لیتر در هر میلی لیتر کمپوست	$(۲/۶\times۱۰^{۷}$CFU/mL$)$ $\times(۱/۶۷\times۱۰^{-۹}$ mL/mL$)$ = ۰/۰۴۳ CFU/ mL
	جامد : $۱/۶۷\times۱۰^{-۸}$ میلی لیتر در هر گرم کمپوست (وزن مرطوب)	$(۲/۶\times۱۰^{۷}$CFU/mL$)$ $\times(۱/۶۷\times۱۰^{-۸}$ mL/g$)$ = ۰/۴۳ CFU/ g (وزن مرطوب)
مثال ۲ : $۳/۷\times۱۰^{۸}$CFU/mL	مایع : $۱/۶۷\times۱۰^{-۹}$ میلی لیتر در هر میلی لیتر کمپوست	$(۳/۷\times۱۰^{۸}$CFU/mL$)$ $\times(۱/۶۷\times۱۰^{-۹}$ mL/mL$)$ = ۰/۶۲ CFU/ mL

	جامد : $۱/۶۷\times۱۰^{-۸}$ میلی لیتر در هر گرم از کمپوست (وزن مرطوب)	$(۳/۷\times۱۰^{۸}$CFU/mL) $\times(۱/۶۷\times۱۰^{-۸}$ mL/g) = ۶/۲ CFU/ g (وزن مرطوب)

۱۱-۵-۳ مرحله ۳ : تبدیل به تعداد واقعی سالمونلای محک CFU/ ۴g در کل مواد جامد (وزن خشک)

۱۱-۵-۳-۱ تعداد واقعی سالمونلا محک بر حسب CFU/ ۴g در کل مواد جامد (وزن خشک) (T) را با استفاده از سالمونلا محک mL یا g (وزن مرطوب) به عنوان صورت کسر در فرمول تبدیل کنید، در ادامه و در جدول ۷ مثالهایی ارایه شده است.

جدول ۷- مثالهای تبدیل به تعداد واقعی سالمونلای محک بر حسب CFU/ ۴g درکل مواد جامد (وزن خشک)

مثال کل مواد جامد		وزن خشک CFU/ ۴g سالمونلا محک واقعی = ۴× (وزن مرطوب)سالمونلا محک یک درصد کل مواد جامد
مثال ۱	درجه یک مایع : ۵ ٪	وزن خشک CFU/ ۴g ۳/۵ = ۴×(۰/۰۴۳÷۰/۰۵)
	درجه یک جامد: ۸۲ ٪	وزن خشک CFU/ ۴g ۲/۱ = ۴×(۰/۴۳÷۰/۸۲)
مثال ۲	درجه یک مایع : ۷ ٪	وزن خشک CFU/ ۴g ۳۵ = ۴×(۰/۶۲÷۰/۰۷)
	درجه یک جامد : ۸۸ ٪	وزن خشک CFU/ ۴g ۲۸ = ۴×(۶/۲÷۰/۸۸)

۱۱-۵-۴ مرحله۴ : محاسبه درصد بازیابی

۱۱-۵-۴-۱ درصد بازیابی از فرمول زیر محاسبه می شود:

$$R = 100 \times \frac{(Ns-Nu)}{T}$$ فرمول (۵)

که در آن:

R درصد بازیابی؛

N_s سالمونلا بر حسب MPN/۴g وزن خشک در نمونه محک زده شده؛

N_u سالمونلا بر حسب MPN/۴g وزن خشک در نمونه محک زده نشده؛

T تعداد واقعی سالمونلای محک بر حسبCFU/ ۴g وزن خشک در نمونه محک زده شده می باشند.

۱۱-۵-۴-۲ مثالی از محاسبات درصد بازیابی در جدول ۸ ارایه شده است.

جدول ۸– مثال محاسبات درصد بازیابی

Ns	Nu	T	درصد بازیابی (R)
۲٫۶	۰٫۲۶۸	مثال ۱ : ۳٫۵	۱۰۰×(۲٫۶-۰٫۲۶۸)/۳٫۵=٪۶۷
۲٫۴		مثال ۱ : ۲٫۱	۱۰۰×(۲٫۴-۰٫۲۶۸)/۲٫۱=٪۱۰۱
۴۶		مثال ۲ : ۳۵	۱۰۰×(۴۶-۰٫۲۶۸)/۳۵=٪۱۳۰
۱۶		مثال ۲ : ۲۸	۱۰۰×(۱۶-۰٫۲۶۸)/۲۸=٪۵۶

۱۱-۶ محک و شمارش نمونه زیست گوی (کمپوست درجه یک)

۱۱-۶-۱ محک نمونه

روش همگن سازی و محک زدن نمونه برای نمونه های مایع و جامد، اختصاصی و مجزا است.

۱۱-۶-۱-۱ نمونه های مایع

یک نمونه کمپوست درجه یک را همگن کنید . درب و سر پیچ ویال زیست گوی را باز کنید. برای آماده سازی نمونه محک، جهت کمپوست مایع، در شرایط سترون یک زیست گوی به ۳۰۰ میلی لیتر از نمونه همگن با pH تنظیم شده اضافه و پس از بستن درب، با سرعت بالا به مدت ۱ تا ۲ دقیقه مخلوط کنید . این نمونه محک اصلی است . برای بقیه کار از روش ذکر شده در بند ۷-۳-۲ استفاده کنید.

۱۱-۶-۱-۲ نمونه جامد

یک نمونه کمپوست درجه یک را همگن کنید (بند ۷-۳-۱) درب و سر پیچ ویال زیست گوی باز شود. برای آماده سازی نمونه محک جهت کمپوست جامد، در شرایط سترون یک زیست گوی به ۳۰۰ میلی لیتر از نمونه همگن با pH تنظیم شده اضافه و پس از بستن درب با سرعت بالا به مدت ۱ تا ۲ دقیقه مخلوط شود. برای بقیه کار از روش ذکر شده در بند ۷-۳-۲ استفاده شود.

۱۱-۷ شمارش زیست گوی

۱۱-۷-۱ محیط کشت آگار عصاره قلب را طبق بند ۷-۱-۱۱ آماده کنید و ۱۰ تا۱۵ میلی لیتر در هر پلیت ۱۵×۱۰۰ میلی متر و در پلیت های بزرگتر مقدار بیشتری بریزید. قبل از آزمایش از خشک بودن سطح آگار مطمئن شوید.

یاد آوری - برای اطمینان از خشکی سطح آگار ، محیط کشت چند روز قبل از آزمایش تهیه شود و پس از تقسیم محیط کشت، پلیت ها را زیر هود لامینار قرار دهید و توسط جریان هوا آنها را خشک کنید.

۱۱-۷-۲ هر یک از موارد زیر را در سه تکرار انجام دهید که منجر به ارزیابی۹ پلیت کشت داده شده می شود.

* درب و سر پیچ ویال زیست گوی را باز کنید. در شرایط سترون یک زیست گوی در سطح محیط کشت و در مرکز هر پلیت HIA قرار دهید.
* بلافاصله ۲۰۰ میکرولیتر از محلول سرم فیزیولوژی سترون(۰/۸۵٪) را به صورت مستقیم بر روی زیست گوی بریزید.
* اجازه دهید تا زیست گوی حل شود.

۱۱-۷-۳ برای پخش کردن هر کدام در سطح پلیت از یک میله همزن شیشه ای سترون یا پخش کننده استفاده کنید، مایع تلقیحی را در سطح محیط پخش کنید.

۱۱-۷-۴ اجازه دهید تا مایع تلقیحی کاملاً در محیط کشت جذب شود.

۱۱-۷-۵ پلیت ها را به حالت وارونه در دمای $۳۶\ ^{0}C \pm ۱/۵\ ^{0}C$ بمدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری کنید.

۱۱-۷-۶ پرگنه های هر پلیت شمارش و ثبت شود.

۱۱-۸ محاسبه درصد بازیابی محک زیست گوی

درصد بازیابی محک زیست گوی در چهار مرحله محاسبه می شود:

یاد آوری - مثال محاسبه اعداد ارائه شده در جداول زیر در انتهای هر مرحله گرد شده است. اگر آزمایشگاه شما گرد کردن تنها را پس از محاسبه نهایی (مرحله ۴) انجام دهد. ممکن است درصد بازیابی ها کمی تفاوت داشته باشد.

۱۱-۸-۱ مرحله ۱ : محاسبه تعداد سالمونلا تیفی موریم (CFU) به ازای هر زیست گوی

۱۱-۸-۱-۱ تعداد سالمونلا تیفی موریم (CFU) در زیست گوی ها بااستفاده از تمام پلیت های HIA محاسبه خواهد شد. تعداد پرگنه ها در هر سه پلیت شمارش و میانگین آنها محاسبه شود. (یک مثال در جدول ۹ ارائه شده است)

جدول ۹ – مثال محاسبه برای میانگین شمارش CFU سالمونلا به ازای هر زیست گوی

میانگین تعداد سالمونلا در هر زیست گوی	تعداد پرگنه ها در هر پلیت		
	شمارش پلیت۳ HIA	شمارش پلیت۲ HIA	شمارش پلیت۱ HIA
(۴۰+۳۸+۴۸)/۳=۴۲	۴۸	۳۸	۴۰

۱۱-۸-۲ مرحله ۲ : محاسبه تعداد سالمونلای محک در نمونه همگن [(وزن مرطوب) CFU/g یا CFU/mL]

۱۱-۸-۲-۱ از آنجاییکه روش همگن سازی نمونه در مورد نمونه های مایع و جامد اختصاصی است، تعداد سالمونلا محک در نمونه همگن را براساس CFU/mL برای نمونه های مایع یا CFU/g برای نمونه های جامد گزارش کنید. تعداد سالمونلا محک در نمونه همگن را با استفاده از فرمول زیر محاسبه کنید . مثالها در جدول۱۰ ارائه شده است.

فرمول (۶)

$$\text{Spiked Salmonella}_{\text{wet weight}} = \frac{\text{Salmonella}_{\text{mean CFU}}}{V_{\text{homogenized Sample}}}$$

که در آن :

$\textit{Spiked Sallmonella}_{\textit{wet weight}}$ تعداد سالمونلا محک برحسب CFU/mL یا CFU/g وزن مرطوب کمپوست؛

$\textit{Salmonella}_{\textit{mean CFU}}$ میانگین CFU سالمونلا در زیست گوی؛

$V_{\textit{homogenized Sample}}$ نمونه کمپوست محک بر حسب میلی لیتر یا گرم می باشند.

۱۱-۸-۲-۲ مثالی از محاسبه سالمونلا محک در نمونه همگن (وزن مرطوب) در جدول ۱۰ ارائه شده است.

جدول ۱۰ – محاسبه سالمونلا محک در نمونه همگن (وزن مرطوب)

میانگین تعداد سالمونلا در هر زیست گوی	(حجم نمونه همگن) $V_{homogenized\ Sample}$	سالمونلا محک (وزن مرطوب) [(وزن مرطوب) CFU/g یا CFU/mL]
۴۲ CFU	مایع : ۳۰۰ میلی لیتر	۴۲ CFU/۳۰۰ mL=۰/۱۴ CFU/mL (وزن مرطوب)
	جامد : ۳۰ گرم	۴۲ CFU/۳۰g=۰/۱۴ CFU/mL (وزن مرطوب)

۱۱-۸-۳ مرحله ۳ : تبدیل کردن به تعداد واقعی سالمونلا محک در ۴ گرم کل مواد جامد(CFU/ ۴g) (وزن خشک)

۱۱-۸-۳-۱ با تقسیم کردن تعداد سالمونلای محک به ازای هر میلی لیتر یا گرم وزن مرطوب بر درصد کل مواد جامد و چهار برابر کردن عدد حاصل، تعداد واقعی سالمونلا در نمونه محک براساس CFU/ ۴g وزن خشک بدست می آید؛ مثالها در جدول ۱۱ ارایه شده اند.

جدول ۱۱ – مثالهای تبدیل به سالمونلا محک زده شده CFU/ ۴g جامدات کل (وزن خشک)

مثال جامدات کل	(وزن خشک) CFU/ ۴g سالمونلا محک زده شده = ۴×[درصد جامدات / سالمونلا محک زده شده (وزن مرطوب)CFU/g یا CFU/mL]
درجه یک مایع : ۵٪	وزن خشک CFU/ ۴g ۱۱/۲ =۴×(۰/۱۴÷۰/۰۵)
درجه یک جامد : ۸۲٪	وزن خشک CFU/ ۴g ۶/۸ =۴×(۱/۴÷۰/۸۲)

۱۱-۸-۴ محاسبه درصد بازیابی

۱۱-۸-۴-۱ درصد بازیابی از فرمول زیر محاسبه می شود:

$$R = 100 \times \frac{(Ns-Nu)}{T}$$ فرمول (۷)

که در آن:

R درصد بازیابی؛

N_s سالمونلا بر حسب MPN/۴g وزن خشک در نمونه محک زده شده؛

N_u سالمونلا بر حسب MPN/۴g وزن خشک در نمونه محک زده نشده؛

T تعداد واقعی سالمونلای محک بر حسبCFU/ ۴g وزن خشک در نمونه محک زده شده می باشند.

۱۱-۸-۴-۲ مثال محاسبه درصد بازیابی در جدول ۱۲ بیان شده است.

جدول ۱۲- مثال محاسبه درصد بازیابی

N_s	N_u	T	درصد بازیابی (R)
۱۲	۰٫۲۶۸	۱۱٫۲	۱۰۰×(۱۲-۰٫۲۶۸)/۱۱٫۲=٪۱۰۵
۴٫۸		۶٫۸	۱۰۰×(۴٫۸-۰٫۲۶۸)/۶٫۸=٪۶۷

۱۲ کنترل کیفیت

کمینه الزامات برای برنامه کنترل کیفیت آزمون نمونه ها در این استاندارد شامل: تایید توانمندی اولیه آزمایشگاه از طریق عملکرد صحت و بازیابی اولیه آزمونها (IPR) (بند ۱۲-۴)،تایید توانمندی مستمر آزمایشگاه از طریق عملکرد آزمون های صحت و بازیابی مستمر(OPR) (بند ۱۲-۵)، آزمونهای محک ماده اولیه (MS)[1] (بند ۱۲-۶) آزمونهای روزانه کنترل های مثبت و منفی (بند ۱۲-۱)، روش های شاهد (بند ۱۲-۲) و بررسی سترون بودن محیط های کشت (بند ۱۲-۳) می باشند. برای آزمونهای IPR ، OPR و آزمونهای محک لازم است نمونه ها با هر دو محلول سوسپانسیون های محک آماده آزمایشگاهی ذکر شده در بند ۱۱ آزمون شود.

۱۲-۱ کنترلهای کشت

۱۲-۱-۱ کنترلهای منفی : آزمایشگاه برای اطمینان از کارایی صحیح محیط های کشت MSRV ، XLD ، TSI ، LIA ، اوره براث و آنتی سرم چند ظرفیتی O باید کنترلهای منفی را در نظر بگیرید. زمانیکه یک بهر[2] جدید از محیط کشت یا معرف مورد استفاده قرار می گیرد،کنترلهای منفی باید آزمایش شوند. در آزمایشگاه به طور مستمر، هر روزی که نمونه ها آزمایش می شوند باید یک کنترل منفی آزمایش شود . نتایج کنترلهای مثبت و منفی در جدول ۱۳ بیان شده است.

۱۲-۱-۱-۱ همانطور که در بند ۱۱ توصیف شده است کنترل های منفی توسط تلقیح یک نمونه کنترل منفی مشخص و شناخته شده(به عنوان مثال E.Coli ATCC #۲۵۹۲۲) درمحیط های کشت MSRV، XLD، TSI، LIA و آنتی سرم چند ظرفیتی O انجام می شوند.

۱۲-۱-۱-۲ همانطور که در بند ۱۱ توصیف شده است، کنترلهای منفی بوسیله تلقیح در اوره براث با یک نمونه کنترل منفی مشخص و شناخته شده (به عنوان مثال سالمونلا تیفی موریم ATCC #۱۴۰۲۸) آزمایش می شوند.

۱۲-۱-۱-۳ اگر کنترل منفی پاسخ مناسب را نشان نداد، محیط کشت یا معرف همراه و یا کنترل منفی را بررسی و یا تعویض و کنترل منفی مناسب را دوباره آزمایش کنید.

۱۲-۱-۲ کنترلهای مثبت : آزمایشگاه برای اطمینان از کارایی صحیح محیط های کشت MSRV، XLD، TSI، LIA، اوره براث و آنتی سرم چند ظرفیتیO باید کنترلهای مثبت را آزمون نماید. زمانی که یک بهر جدید از محیط کشت ویا معرف مورد استفاده قرار می گیرد باید کنترلهای مثبت آزمایش شوند در آزمایشگاه به طور مستمر، هر روزی که نمونه ها آزمایش می شوند باید یک کنترل مثبت آزمایش شود. نتایج کنترلهای مثبت و منفی در جدول ۱۳ بیان شده است.

1-Matrix Spike

2-Batch

۱۲-۱-۲-۱ همانطور که در بند ۱۱ توصیف شده، کنترلهای مثبت بوسیله تلقیح یک کنترل مثبت مشخص و شناخته شده (به عنوان مثال سالمونلا تیفی موریم ۱۴۰۲۸# ATCC) در محیط های کشت MSRV ، XLD ، TSI ، LIA و آنتی سرم چند ظرفیتیO انجام می شوند.

۱۲-۱-۲-۲ همانطور که در بند ۱۱ توصیف شده، کنترلهای مثبت بوسیله تلقیح در اوره براث با یک کنترل مثبت مشخص و شناخته شده (به عنوان مثال پروتئوس ولگاریس ۱۳۳۱۵# ATCC) انجام می شوند.

۱۲-۱-۲-۳ اگر کنترل مثبت پاسخ مناسب را نشان نداد، محیط کشت یا معرف همراه و یا کنترل مثبت را بررسی و یا تعویض و سپس کنترل مثبت مناسب را دوباره آزمایش کنید.

۱۲-۲ روش شاهد

در این روش ۲۰ میلی لیتر آب مقطر سترون برای تایید سترون بودن تجهیزات، مواد و ملزومات آزمایش می گردد و فقدان رشد دلیل عدم آلودگی به ارگانیسم مورد نظر است . درآزمایشگاه به طور مستمر باید، هر روزی که نمونه ها آزمایش می شوند، روش شاهد انجام شود.

۱۲-۳ بررسی سترون بودن محیط کشت

برای بررسی سترون بودن محیط های کشت تعدادی از محیط های موجود از هر بهر محیط کشت را در دمای$۳۶^{o}C \pm ۱/۵^{o}C$ (در مورد محیط های کشت TSB،HIA، XLD، TSI، LIA و اوره براث) یا $۴۲^{o}C \pm ۰/۵^{o}C$ (در مورد MSRV) برای مدت ۲±۲۴ساعت انکوباسیون و از نظر رشد نمونه بررسی کنید. به ازای هر ۵۰ عدد در هر بهر یک عدد و اگر کمتر از ۵۰ عدد باشد نیز یکی در نظر گرفته شود.

جدول ۱۳ – نتایج کنترلهای مثبت و منفی

محیط کشت	نتیجه سالمونلا	واکنش مثبت	واکنش منفی
TSB	مثبت	دارای کدورت	بدون کدورت
MSRV	مثبت	هاله خاکستری سفید در هم در اطراف محل تلقیح مشاهده می شوند.	محیط به صورت آبی – سبز بدون هاله خاکستری سفید اطراف محل تلقیح مشاهده می شود. (E.Coli متوقف است)
XLD	مثبت	کلنی های صورتی تا قرمز با مراکز سیاه	رنگ های دیگر بدون مراکز سیاه (به عنوان مثال E.Coli زرد و بدون مراکز سیاه است.)
TSI	مثبت	رشد خوب در سطح شیب دار قلیایی (قرمز) و انتهای لوله اسیدی (زرد) همراه یا بدون تولید H_2S (ممکن است انتهای لوله سیاه شود)	رنگ های دیگر(به عنوان مثال E.Coli سطح شیب دار و قاعده لوله زرد رنگ)
LIA	مثبت	سطح شیب دار قلیایی (بنفش) همراه یا انتهای لوله قلیایی (بنفش)همراه یا بدون تولید H_2S (ممکن است انتهای لوله سیاه شود)	رنگهای دیگر (به عنوان مثالE.Coli سطح شیب دار و قاعده قرمز تا بنفش بدون تولید H_2S است)

اوره براث	منفی	ارغوانی	تغییر رنگ ندارد (سالمونلا اوره آز منفی است)
آنتی سرم چند ظرفیتی O	مثبت	آگلوتیناسیون	بدون آگلوتیناسیون

۱۲-۴ صحت و بازیابی اولیه IPR

آزمونهای IPR برای نشان دادن عملکرد قابل قبول روش (بازیابی و صحت) استفاده می شوند و باید بوسیله هر آزمایشگاه قبل از به کار گیری روش برای پایش نمونه های میدانی به کار گرفته شوند. این استاندارد به کار گیری این آزمون ها را برای هر آزمون توصیه می کند اما الزام نمی نماید .نمونه های IPR باید همراه با یک روش شاهد مناسب(بند۱۲-۲) و بررسی سترون بودن محیط کشت (بند ۱۲-۳) انجام شوند. آزمونهای IPR باید به شرح زیر انجام شوند:

۱۲-۴-۱ ۴ نمونه ۳۰ گرمی ازکمپوست استاندارد تهیه و نمونه ها را با سالمونلا تیفی موریم ATCC #۱۴۰۲۸ طبق بند۱۱ تلقیح کنید. تلقیح کردن با سوسپانسیون های آماده آزمایشگاهی در بند ۱۱-۳ و تلقیح کردن با زیست- گوی در بند ۱۱-۶ شرح داده شده است. هر نمونه IPR با توجه به روش ارائه شده در بند های ۷-۳ و ۸ فرآوری و آزمون و میزان سالمونلا طبق بند ۹ به صورت MPN/۴g در (براساس ماده خشک) محاسبه شود.

۱۲-۴-۲ درصد بازیابی همه نمونه های IPR با استفاده از معادله مناسب طبق بند ۱۱-۵ یا ۱۱-۸ برای نمونه های تهیه شده در آزمایشگاه و نیز محک زده شده با زیست – گوی محاسبه شود.

۱۲-۴-۳ با استفاده از درصد بازیابی های ۴ آزمون، میانگین درصد و انحراف معیار نسبی (RSD) بازیابی ها را محاسبه، آن را بر میانگین تقسیم و در ۱۰۰ ضرب کنید. متوسط بازیابی و انحراف معیار را با ضوابط مربوطه IPR در جدول ۱۴ مقایسه کنید. اگر میانگین و انحراف معیار برای بازیابی سالمونلا دارای ضوابط قابل قبول باشد، کارایی سیستم قابل قبول و آزمون نمونه های میدانی می تواند شروع شود. اگر میانگین انحراف معیار بازیابی خارج از دامنه مورد پذیرش باشد، کارایی سیستم غیر قابل قبول است. در این صورت شناسایی مشکل بوسیله ارزیابی هر مرحله از فرآیند آزمایش، (محیط کشت ، معرف ها و کنترلها) انجام و پس از رفع مشکل آزمونهای IPR را تکرار کنید.

جدول ۱۴ – ضوابط مورد قبول دقت و بازیابی اولیه و مستمر (IPR , OPR)

آزمون کارایی	ضوابط پذیرش محک اولیه تهیه شده در آزمایشگاه	ضوابط پذیرش زیست گوی
دقت اولیه و بازیابی (IPR) • میانگین درصد بازیابی • صحت (به عنوان حداکثر انحراف معیار نسبی)	٪۰ - ٪۲۵۴ ٪۹۲	٪۲۲-٪۱۲۶ ٪۶۹
دقت و بهبود مستمر OPR به عنوان درصد بازیابی	٪۰ -٪۲۸۷	٪۱-٪۱۴۷

۱۲-۵ صحت و بازیابی مستمر (OPR)

برای اثبات توانمندی مستمر سیستم آزمایشگاهی، آزمایشگاه باید به صورت روزمره نمونه های تلقیح شده کمپوست استاندارد را پردازش و آزمایش کند. آزمایشگاه به ازاء هر ۲۰ نمونه میدانی یا محک و یا هفته ای یک نوبت (هر کدام که

فراوان تر باشد) یک نمونه OPR را آزمون کند. نمونه های OPR باید همراه با روش شاهد مناسب (بند ۱۲-۲) و بررسی سترون بودن محیط کشت (بند ۱۲-۳) باشند . آزمونهای OPR عبارتند از:

۱۲-۵-۱ یک نمونه ۳۰ گرمی کمپوست استاندارد به روش محک نمونه مطابق بند ۱۱ با سالمونلا تیفی موریم ATCC #۱۴۰۲۸، تلقیح شود. محک با سوسپانسیونهای آماده آزمایشگاهی در بند ۱۱-۳ و تلقیح با زیست-گوی در بند ۱۱-۶ شرح داده شده است. هر نمونه OPR را با توجه به روش ارائه شده در بندهای ۷-۳ و ۸ فرآوری و آزمون سالمونلا طبق بند ۹ به صورت MPN/۴g در (براساس ماده خشک) محاسبه شود.

۱۲-۵-۲ درصد بازیابی نمونه OPR با استفاده از معادله مناسب طبق بند۱۱-۵ یا ۱۱-۸ برای نمونه های تهیه شده با سوسپانسیون فعال درآزمایشگاه یا زیست – گوی محاسبه شود.

۱۲-۵-۳ نتیجه درصد بازیابی(OPR) را با ضوابط مربوطه OPR در جدول ۱۴ مقایسه کنید. اگر نتیجه OPR با ضوابط قابل قبول بازیابی مطابقت داشته باشد، کارایی سیستم قابل قبول و آزمایش نمونه های میدانی می تواند ادامه یابد. اگر نتیجهOPR خارج از ضوابط قابل قبول باشد، کارایی سیستم غیر قابل قبول است. در اینصورت شناسایی مشکل بوسیله ارزیابی هر مرحله از فرآیند آزمون(محیط کشت، معرف ها و کنترل دما) انجام وپس از رفع مشکل آزمونهای OPR تکرار شود.

۱۲-۵-۴ نتایج نمونه های OPR و IPR به عنوان بخشی از برنامه تضمین کیفیت آزمایشگاه باید به صورت بروز شده به منظور پایش روش کارایی مستمر در جداول و سوابق نگهداری شود. آزمایشگاه همچنین باید بیانیه ای مبنی بر دقت روش ارائه شده در این استاندارد را بوسیله محاسبه میانگین درصد بازیابی (R) و انحراف معیار از درصد بازیابی (S_r) ارائه نماید.

۱۲-۶ آزمون های محک اولیه (MS)

آزمون MS برای تعیین اثر یک ماده اولیه خاص بر بازیابی سالمونلا انجام می گیرد. آزمایشگاه باید زمانیکه یک نمونه کمپوست بدون سابقه آزمایش قبلی در آزمایشگاه آنالیز می شود، نمونه MS را مورد آزمون قرار دهد. پس از آن ۵ درصد نمونه های میدانی هر توده کمپوست (یک نمونه از هر ۲۰ نمونه) باید شامل یک نمونه MS باشد. بایستی همراه با نمونه مورد آزمایش جهت ماده اولیه نمونه ای نیز از همان محل برداشته شده و به عنوان نمونه شاهد با استفاده از یک روش شاهد مناسب (بند ۱۲-۲) و بررسی سترون بودن محیط کشت مورد آزمون قرار گیرد (بند۱۲-۳).

در صورت امکان آزمون MS باید همراه یک نمونه OPR(بند ۱۲-۵) با استفاده از رویه تلقیح (سوسپانسیون محک تهیه شده در آزمایشگاه یا زیست – گوی) باشد. انجام آزمون MS به شرح زیر است:

۱۲-۶-۱ دو نمونه میدانی ۳۰ گرمی پی در پی از یک محل جمع آوری و آماده سازی شوند. یک نمونه تلقیح نمی شود و برای تعیین غلظت زمینه یا محیطی سالمونلا برای محاسبه بازیابی های MS آزمایش خواهد شد. نمونه دیگر با سالمونلا تیفی موریم ATCC #۱۴۰۲۸ به روش محک ذکر شده در بند ۱۱، تلقیح و به عنوان نمونه MS به کار می رود.

۱۲-۶-۲ به منظور برآورد دقیق غلظت سالمونلا رقت هایی را براساس نتایج قبلی یا میزان مورد انتظار سالمونلا در نمونه های میدانی، انتخاب کنید . این رقت ها باید در محدوده شناسایی روش باشند.

۱۲-۶-۳ نمونه MS را با سوسپانسیون آماده آزمایشگاهی تعریف شده در بند ۱۱-۳ یا به وسیله زیست گوی های تعریف شده در بند ۱۱-۶، محک بزنید . نمونه های میدانی محک زده نشده و محک زده شده را مطابق روشهای بند ۷-۳ و ۸ فرآوری و آزمایش کنید.

۱۲-۶-۴ برای نمونه MS سالمونلا،MPN/۴g را برحسب ماده خشک مطابق بند ۹ محاسبه کنید و تعداد MPN را در چهار گرم وزن خشک براساس غلظت محیطی سالمونلای مشاهده شده در نمونه های محک زده نشده تنظیم کنید.

۱۲-۶-۵ پس از تنظیم بر مبنای سالمونلای محیطی سه نمونه محک زده نشده درصد بازیابی (R) برای نمونه MS با استفاده از معادله مناسب طبق بند ۱۱-۵ یا۱۱-۸ را به ترتیب برای نمونه های تلقیح شده ، سوسپانسیون تهیه شده درآزمایشگاه یا زیست گوی ها محاسبه کنید.

۱۲-۶-۶ درصد بازیابیMS را با ضوابط معیارهای کارایی روش در جدول ۱۵ مقایسه کنید. اگر بازیابی MS با معیارهای قابل قبول بازیابی مطابقت داشته باشد کارایی سیستم مورد تأیید است و آزمایش نمونه های میدانی کمپوست می تواند ادامه یابد. اگر بازیابی MS غیر قابل قبول و نتیجه نمونهOPRمرتبط با این بهراز نمونه ها مورد تائید باشد ، ممکن است تداخل یک ماده اولیه باعث حصول نتایج ضعیف باشد. اگر بازیابی MS غیر قابل قبول است ، تمام داده های مربوط به عملیات میدانی را اصلاح کنید.

جدول۱۵– صحت آزمون محک و ضوابط پذیرش بازیابی

آزمون عملکرد	معیارهای پذیرش BioBalls	معیارهای پذیرش سوسپانسیون آزمایشگاهی
درصد بازیابی برای MS یا MS/ MSD	٪۰-٪۱۵۸	٪۰-٪۲۴۶
صحت (اختلاف MS/ MSD به عنوان درصد نسبی بیشینه)	٪۱۷۷	٪۱۷۲

۱۲-۶-۷ آزمایشگاه ها باید نمودار کنترل مقایسه بازیابی های MS برای تمام مواد اولیه و مربوط به هر بهر و نیز نتایج تجمیعی نمونه OPRرا ثبت و نگهداری کنند. این نمودار آزمایشگاه ها را در شناسایی اثرات ماده اولیه روی روش بازیابی کمک می نماید. همچنین ممکن است برای شناسایی اثرات موقتی یا موردی ماده اولیه از یک منبع خاص کمک نماید.

۱۳ مدیریت پسماند و پیشگیری از آلودگی

۱۳-۱ در صورت مدیریت صحیح و بازیافت محلول ها و معرف های مصرفی در این روش تهدید کلی برای محیط زیست در بر نخواهد داشت.

۱۳-۲ محلول ها و معرف ها را باید در حجم های لازم برای هر آزمایش تهیه کنید تا ضایعات مواد به حداقل برسد.

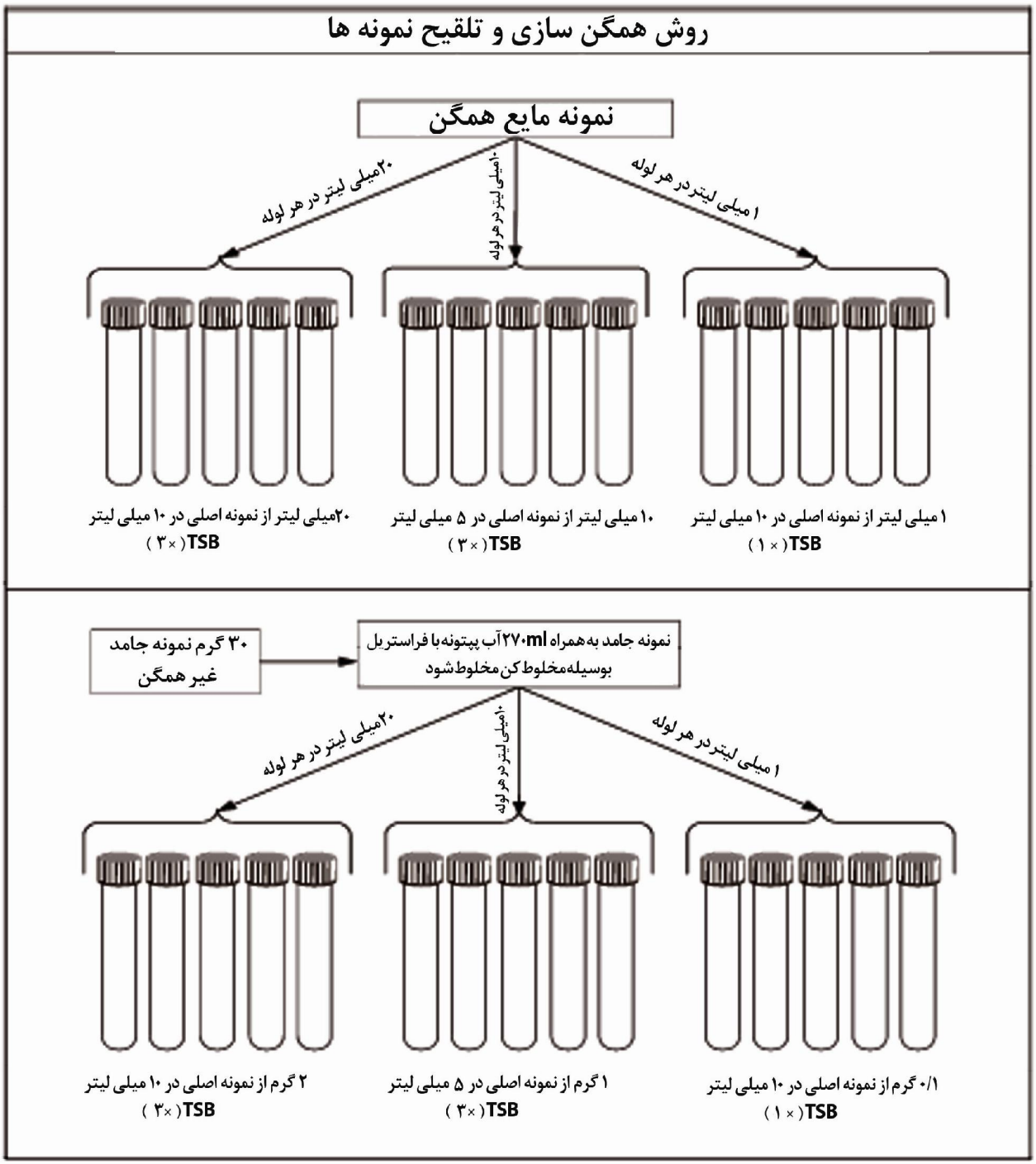
۱۳-۳ نمونه ها، مواد مرجع ، لوازم آلوده یا مشکوک به آلودگی با باکتری زنده یا ویروس باید قبل از دفـع بـی خطـر سـازی شوند.

پیوست الف

(الزامی)

شکل ها

شکل های ۱ و ۲ - نمونه های مایع و جامد



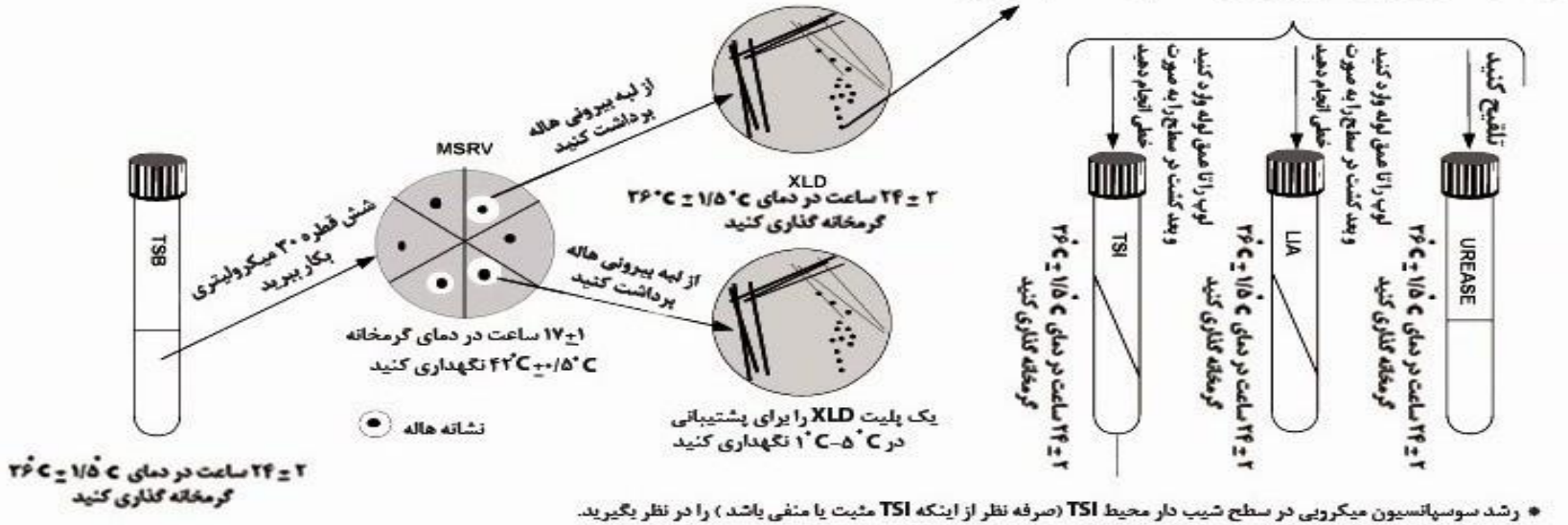
شکل ۳ – روش استاندارد آزمون سالمونلا در کمپوست

(مراحل زیر را برای هر لوله **TSB** تکرار کنید)

مرحله تایید بیوشیمیایی
بند ۱۱ – ۱ – ۳

مرحله انتخاب
بند ۱۱ – ۱ – ۲

مرحله غنی سازی
بند ۱۱ – ۱ – ۱



- رشد سوسپانسیون میکروبی در سطح شیب دار محیط **TSI** (صرفه نظر از اینکه **TSI** مثبت یا منفی باشد) را در نظر بگیرید.
- دو قطره جداگانه از رشد سوسپانسیون میکروبی را بر روی اسلاید قرار دهید.
- به اولین قطره سوسپانسیون میکروبی یک قطره آنتی سرم چند ظرفیتی **O** اضافه کنید.
- به قطره دیگر سوسپانسیون میکروبی یک قطره سرم فیزیولوژیکی استریل به عنوان کنترل اضافه کنید.

آنتی سرم چند ظرفیتی **O**

پیوست ب

(اطلاعاتی)

فهرست کتاب شناسی

1- American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation . 1998 , Standard Methosd for Water Wastewater . 20th Edition . Sections 9020, 9030, 9050, and 9221.
2- USEPA.EPA-821-B-04-008:September 2004,Results of the Interlaboratory Validation of EPA Method 1682 (MSRV) for Salmonella in Biosolids .
3- Bordner, R.,J. A. Winter and P.V . Scarpino (esd.), Microbiological Methods for Monitoring the Environment, Water and Wastes , EPA-600/8-78-017 . Office of Research and Development, USEPA .
4- American Chemical Society (ACS),2000, Reagent Chemicals, American Chmical Society Specifications. American Chemical Society, New York. For suggestions of the testing of reagents not listed by the American Chemical Society, see AnalaR Standards for Laboratory Chemicals, BDH, Poole, Dorset, UK and the United States Pharmacopeia .
5- Klee,A. J. A computer program for the determination of the most probable number and its confidence limits, 1993, Journal of Microbiological Methods. 18:91-98.