INSO
17163
1st Revision

2022

Identical with
BS EN 15784:
2021

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران
Iran National Standards Organization

استاندارد ملی ایران
۱۷۱۶۳
تجدیدنظر اول

۱۴۰۱

خوراک دام – روش‌های نمونه‌برداری و آنالیز- جستجو و شمارش گونه‌های *باسیلوس* مورد مصرف به عنوان افزودنی خوراک دام

Animal feeding stuffs- Methods of sampling and analysis- Detection and enumeration of *Bacillus* spp. used as feed additive

ICS:65.120

سازمان ملی استاندارد ایران

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

صندوق‌پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران- ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶)

رایانامه: standard@inso.gov.ir

وبگاه: http://www.inso.gov.ir

Iran National Standars 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@inso.gov.ir

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

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک مادهٔ ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد ، ابلاغ‌شده در دی ماه ۱۳۹۶، وظیفهٔ تعیین، تدوین، به‌روزرسانی و نشر استانداردهای ملی را بر عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند درکمیته ملی طرح، بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)[1]، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند 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 زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization
2- International Electrotechnical Commission
3- International Organization of Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)
4- Contact point
5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«خوراک دام – روش‌های نمونه‌برداری و آنالیز- جستجو و شمارش گونه‌های باسیلوس مورد مصرف به عنوان افزودنی خوراک دام»

رئیس:	**سمت و/یا محل اشتغال:**
ایزدی، معصومه (کارشناسی ارشد صنایع غذایی)	کارشناس امور استاندارد- اداره کل استاندارد استان چهارمحال و بختیاری
دبیر:	
پویان، مهوش (کارشناسی‌ارشد میکروبیولوژی)	رئیس اداره استانداردسازی، آموزش و ترویج - اداره کل استاندارد استان چهارمحال و بختیاری
اعضا:(اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
انصاری، فرنوش (دکترای حرفه‌ای دامپزشکی)	مسئول فنی دامپزشکی - شرکت پگاه شهرکرد
پاک نیت جهرمی، امیر (دکترای حرفه‌ای دامپزشکی)	مدیر عامل - مجتمع آزمایشگاهی بیطاران پارسیان شیراز
پویان، مهسا (کارشناسی مهندسی ژنتیک)	عضو مستقل
جعفری دهکردی، امیر (کارشناسی صنایع غذایی)	مدیر کنترل کیفیت - شرکت فراورده‌های غذایی و قند چهارمحال
خلعتبری، سپیده (دکترای بهداشت مواد غذایی)	رئیس آزمایشگاه - شرکت فرآورده‌های زیستی پردیس رشد مهرگان شیراز
خورشیدی، سحر (کارشناسی‌ارشد صنایع غذایی)	مدیر کنترل کیفیت - شرکت غزال نجم
شاهقلیان، لهراسب (دکترای تخصصی فیزیولوژی)	عضو هیأت علمی - دانشگاه آزاد شهرکرد
شکرفروش، شهرام (دکترای دامپزشکی)	عضو هیأت علمی - دانشگاه شیراز

اعضا:(اسامی به ترتیب حروف الفبا)	**سمت و/یا محل اشتغال:**
صفری، اقدس (دکترای داروسازی)	رئیس ثبت و بررسی - سازمان دامپزشکی کشور
طالبیان، سید رضا (دکترای تخصصی فارماکولوژی)	مدیر عامل - شرکت جهان دانه شهرکرد
عسگری، البرز (دکترای تخصصی باکتری شناسی)	رئیس آزمایشگاه - اداره کل دامپزشکی استان چهارمحال و بختیاری
عطایی کچویی، مهرداد (دکترای کشاورزی و منابع طبیعی)	عضو هیأت علمی - دانشگاه آزاد واحد شهرکرد
فتاحیان، آرزو (دکترای بهداشت مواد غذایی)	مدیر کنترل کیفیت - شرکت تولیدی غزال نجم
کریمی، بهرام (دکترای بهداشت مواد غذایی)	مدیر کنترل کیفیت - شرکت تولیدی پگاه شهرکرد
محمدیان، مهشاد (کارشناسی‌ارشد میکروبیولوژی)	کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی - آزمایشگاه همکار کیمیا پژوه البرز
مختاری، فهیمدخت (کارشناسی‌ارشد ایمنولوژی)	دبیر کمیته فنی TC34/SC9 - بازنشسته پژوهشگاه استاندارد
مقدمی، شهپر (کارشناسی‌ارشد میکروبیولوژی)	کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی - پژوهشگاه استاندارد
منتصری، مریم (دکترای تخصصی بهداشت مواد غذایی)	عضو هیأت علمی - دانشگاه شیراز
نادری، حمدالله (کارشناسی‌ارشد میکروبیولوژی)	مدیر کنترل کیفیت - شرکت تولیدی پگاه شهرکرد
نصرت، غلامرضا (دکترای دامپزشکی)	عضو - انجمن تولیدکنندگان خوراک دام استان

ویراستار:	**سمت و/یا محل اشتغال:**
مختاری، فهیمدخت (کارشناسی‌ارشد ایمنولوژی)	دبیر کمیته فنی TC34/SC9 - بازنشسته پژوهشگاه استاندارد

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
پیش‌گفتار	ز
مقدمه	ح
۱ هدف و دامنه کاربرد	۱
۲ مراجع الزامی	۱
۳ اصطلاحات و تعاریف	۱
۴ اصول آزمون	۲
۵ رقیق‌کننده و محیط کشت	۳
۵-۱ رقیق‌کننده سدیم هیدروکسید ۰٫۲ ٪	۳
۵-۲ محیط کشت تریپتون سوی آگار	۳
۶ وسایل	۴
۷ نمونه‌برداری	۶
۸ آماده سازی آزمایه	۶
۹ روش آزمون	۶
۹-۱ آماده سازی پلیت‌های آگار پیش‌ریخته جهت روش کشت سطحی	۶
۹-۲ آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری	۷
۹-۳ تلقیح و گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها	۹
۹-۴ شمارش کلنی‌ها	۹
۹-۵ تأیید	۹
۱۰ بیان نتایج	۱۰
۱۱ دقت	۱۱
۱۱-۱ کلیات	۱۱
۱۱-۲ مطالعات بین آزمایشگاهی	۱۱
۱۱-۳ تکرارپذیری	۱۱
۱۱-۴ تجدیدپذیری	۱۱
۱۲ گزارش آزمون	۱۲
پیوست الف (آگاهی‌دهنده) نکاتی در مورد روش کار	۱۳
پیوست ب (آگاهی‌دهنده) نتایج مطالعات بین آزمایشگاهی	۱۴
کتاب‌نامه	۱۶

پیش‌گفتار

استاندارد «خوراک دام – روش‌های نمونه‌برداری و آنالیز- جستجو و شمارش گونه‌های *باسیلوس* مورد مصرف به عنوان افزودنی خوراک دام» که نخستین‌بار در سال ۱۳۹۲ تدوین و منتشر شد، بر اساس پیشنهادهای دریافتی و بررسی و تأیید کمیسیون‌های مربوط بر مبنای پذیرش استانداردهای بین‌المللی/منطقه‌ای به‌عنوان استاندارد ملی ایران به روش اشاره شده در مورد الف، بند ۷، استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ برای نخستین بار مورد تجدیدنظر قرار گرفت و در پانصد و هفتاد و امین اجلاسیه کمیتهٔ ملی استاندارد میکروبیولوژی مورخ ۱۴۰۱/۰۹/۱۳ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک مادهٔ ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد، ابلاغ‌شده در دی ماه ۱۳۹۶، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران بر اساس استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوهٔ نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت لزوم تجدیدنظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

این استاندارد جایگزین استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۷۱۶۳ : سال ۱۳۹۲ می‌شود.

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

BS EN 15784:2021, Animal feeding stuffs-Methods of sampling and analysis- Detection and enumeration of *Bacillus* spp. as used feed additive.

مقدمه

این روش برای شمارش اسپورهای باسیلوس‌های مورد استفاده به عنوان افزودنی‌های خوراک دام که قابلیت تندش[1]دارند تدوین شده است تا کمیسیون اروپا قادر به کنترل برچسب‌گذاری مناسب محصولات خوراک حیوانات باشد.

این روش اولین بار در طول پروژه اتحادیه اروپا SMT4-CT98-2235 «روش‌های کنترلی مرجع برای پروبیوتیک‌های مورد استفاده به عنوان افزودنی‌های خوراک دام» گردآوری شد.

در طی تجدیدنظر این روش، مراحل مطابق با روش VDLUFA 28-2-2 «شمارش *باسیلوس لیکنی فورمیس* و *باسیلوس سوبتیلیس*» تنظیم شد و روش با داده‌های صحه‌گذاری حاصل از مطالعات بین‌آزمایشگاهی با محصولات خوراک دام تجاری تکمیل شد [۸].

در این پروژه، روش آزمون برای دو سویه *باسیلوس سوبتیلیس* (DSM 5750 و DSM 15544) و یک سویه *باسیلوس لیکنی فورمیس* (DSM 5749) صحه گذاری شده است.

بنظر می‌رسد این روش برای سایر سویه‌های *باسیلوس* که به عنوان افزودنی خوراک دام استفاده می‌شوند، می‌تواند مناسب باشد. با این حال، ممکن است لازم باشد کاربرد این روش برای تعیین گونه‌های *باسیلوس* مورد استفاده در افزودنی خوراک دام مخصوص براساس تصمیم گیری مورد به مورد نشان داده شود. نظر به اینکه در حال حاضر تمام محصولات تأیید شده حاوی گونه‌های *باسیلوس*، اسپور هستند، در این روش سلول‌های رویشی در نظر گرفته نمی‌شود. بقای اسپورهای گونه‌های *باسیلوس* با تیمار با محلول هیدروکسید سدیم ۰٫۲٪ تأمین می‌شود و مشخصات ظاهری کلنی شاخص گونه‌های *باسیلوس* از سویه‌های مجاز منفرد با استفاده از روش پیشنهاد شده، مورد بررسی قرار می‌گیرد [۹].

این روش یک روش انتخابی[2] برای *باسیلوس*هایی که به عنوان افزودنی‌های خوراک دام استفاده می‌شوند، نیست، اما می‌تواند برای شمارش گونه‌های *باسیلوس* در خوراک دام استفاده شود، با فرض اینکه تعداد *باسیلوس*های افزوده شده بسیار بیشتر از سایر *باسیلوس*ها باشد.

این روش برای جستجوی گونه‌های *باسیلوس* موجود[3] یا بیماری‌زا در مواد غذایی و خوراک دام کاربرد ندارد.

1- Germinating
2- Selective
3- Ubiquitous

خوراک دام – روش‌های نمونه‌برداری و آنالیز- جستجو و شمارش گونه‌های *باسیلوس* مورد مصرف به عنوان افزودنی خوراک دام

۱ هدف و دامنهٔ کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین مقررات عمومی برای شمارش باسیلوس‌ها در خوراک دام (افزودنی‌ها، پیش مخلوط‌ها و خوراک‌های دام ترکیبی شامل خوراک‌های معدنی) [۱۰] که حاوی باسیلوس‌ها به تنهایی، یا مخلوط با دیگر میکروارگانیسم‌هاست می‌باشد.

انواع نمونه‌های خوراک دام عبارتند از:

الف- افزودنی‌های حاوی حدود 10^{10} CFU/g؛

ب- پیش مخلوط‌های حاوی حدود 10^{11} CFU/kg؛

پ- خوراک‌های دام ترکیبی، غذا یا پلت‌ها، حاوی حدود 10^{9} CFU/kg.

۲ مراجع الزامی

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

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

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

2-1 EN ISO 6498, Animal feeding stuffs –Guidelines for sample preparation

یادآوری- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳۰۲۱: سال ۱۳۹۱، خوراک دام و طیور- آماده کردن نمونه مورد آزمایش با استفاده از استاندارد ISO 6498: 2014 تدوین شده است.

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، اصطلاحات و تعاریف زیر به‌کار می‌رود[۱]:

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

۱-۳

سویه‌های *باسیلوس*

***Bacillus* strains**

جنسی از باکتری‌های گرم مثبت و میله‌ای شکل

یادآوری۱- این توصیفات بر اساس مشخصات آنها در این استاندارد می‌باشد.

یادآوری۲- گونه‌های *باسیلوس* می‌توانند هوازی اجباری یا بی‌هوازی اختیاری باشند. گونه‌های *باسیلوس* اگر در شرایط وجود اکسیژن کشت داده شوند، کاتالاز مثبت هستند.

یادآوری۳- *باسیلوس‌ها* می‌توانند اندوسپورهای تخم مرغی شکل تشکیل دهند.

یادآوری۴- مشخصات ظاهری کلنی‌های *باسیلوس‌ها* روی سطح محیط کشت تریپتون سوی آگار (TSA) بعد از گرمخانه-گذاری در دمای ۳۷ °C تحت شرایط هوازی به مدت ۱۶ h الی ۲۴ h در زیربند ۹-۵ بیان شده است.

۴ اصول آزمون

الف- آماده‌سازی پلیت‌های پیش‌ریخته خشک و استریل؛

ب- برداشتن آزمایه[1] به عنوان نماینده نمونه، تحت شرایط سترون؛

پ- آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه با رقیق‌کننده سدیم هیدروکسید ۰٫۲ ٪ بافری شده برای به‌دست آوردن توزیع همگنی از سلول‌های باکتریایی از آزمونه[2] و کاهش فلور باکتریایی رویشی در سوسپانسیون؛

ت- آماده‌سازی رقت‌های اعشاری بعدی از سوسپانسیون اولیه، به منظور کاهش تعداد میکروارگانیسم‌ها در واحد حجم می‌باشد تا شمارش کلنی‌ها پس از گرمخانه‌گذاری امکان پذیر باشد.

ث- تلقیح پلیت‌های پیش‌ریخته آماده با حجم معینی از رقت‌های مناسب و پخش ماده تلقیحی با استفاده از یک پخش‌کننده سترون؛

ج- گرمخانه‌گذاری پلیت‌های وارونه در دمای (۳۷±۱) °C تحت شرایط هوازی به مدت ۱۶ h تا ۲۴ h؛

چ- شمارش کلنی‌های شاخص[3] با لحاظ نمودن ویژگی‌های خاص *باسیلوس*‌ها؛

ح- تأیید ویژگی‌های میکروسکوپی یا بیوشیمیایی کلنی‌های تک شاخص در صورت لزوم؛

خ- محاسبه واحدهای تشکیل دهنده کلنی گونه‌های *باسیلوس* در گرم یا کیلوگرم از نمونه خوراک دام.

1- Test sample
2- Test portion
3- Typical

۵ رقیق‌کننده و محیط کشت

۵-۱ رقیق‌کننده سدیم هیدروکسید ۰٫۲ ٪

رقیق‌کننده سدیم هیدروکسید برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه و تهیه رقت‌های اعشاری بعدی استفاده می‌شود. ترکیبات این رقیق‌کننده در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- مواد تشکیل‌دهنده سدیم هیدروکسید ۰٫۲ ٪

نام مواد	مقدار
سدیم هیدروکسید NaOH	۲٫۰ g
پلی اکسی اتیلن (۲۰) سوربیتان مونو اولئات (توویین ۸۰) [۱] $C_{64}H_{124}O_{26}$	۱ ml
آب، مقطر یا دیونیزه H_2O	۱۰۰۰ ml

ترکیبات جدول ۱ را در آب حل کنید سپس آن را در ظروف مناسب (مانند بطری‌ها، ارلن‌ها یا لوله‌های آزمایش) تقسیم و در دمای ºC (۳±۱۲۱) به مدت زمان min ۱۵ استریل کنید. برای جلوگیری از کاهش حجم محلول در طی اتوکلاو کردن، استفاده از بطری‌های سرپوش‌دار پیچی پیشنهاد می‌شود.

برای استفاده بلافاصله می‌توانید ظروف را در حمام آب یا انکوباتور با دمای ºC (۱±۴۰) نگهداری کنید.

۵-۲ محیط کشت تریپتون سوی آگار [۲] (TSA)

۵-۲-۱ مواد تشکیل‌دهنده

ترکیبات محیط کشت تریپتون سوی آگار در جدول ۲ آورده شده است. مقدار pH در دمای ºC ۲۵، ۰٫۲±۷٫۳ می‌باشد.

۱- توویین ۸۰ یک نمونه از محصول تجاری در دسترس می‌باشد. این اطلاعات برای سهولت کار کاربران این استاندارد داده شده و تأییدی برای تولید کننده این محصول نمی‌باشد.

2- Trptone soy agar

محیط کشت TSA از تأمین‌کننده‌های مختلف به طور تجاری در دسترس است.

جدول ۲- ترکیبات محیط کشت تریپتون سوی آگار(TSA)

نام مواد	مقدار
تریپتون	۱۵/۰ g
سدیم کلرید	۵/۰ g
پپتون سویا	۵/۰ g
آگار	۱۲ g-۱۵ g[۱]
آب، مقطر یا دیونیزه	۱۰۰۰ ml

ترکیبات جدول ۲ را با حرارت دادن در آب حل کنید. محیط کشت را در ظروف مناسب (مانند بطری‌ها یا ارلن‌ها با سرپوش‌های پیچی فلزی و غیر سمی) تقسیم نموده و در دمای ºC (۳ ±۱۲۱) به مدت min ۱۵ استریل کنید. در صورت لزوم پس از استریل کردن، pH نهایی را تا ۷/۳±۰/۲ در دمای ºC ۲۵ تنظیم کنید.

۶ وسایل

علاوه بر تجهیزات معمول آزمایشگاه میکروبیولوژی، وسایل زیر نیز مورد نیاز می‌باشد:

۶-۱ تجهیزاتی برای استریل خشک (آون) و استریل مرطوب (اتوکلاو) به استاندارد ISO 7218 مراجعه شود [۲].

۶-۲ انکوباتور، با قابلیت حفظ دما در ºC (۱ ±۳۷) و همچنین به‌طور اختیاری، قابلیت حفظ دما در ºC (۱ ±۴۰) و/یا بین ºC ۴۴ و ºC ۴۷.

۶-۳ حمام آب، با قابلیت حفظ دما در ºC (۱ ±۴۰) و بین ºC ۴۴ و ºC ۴۷.

۶-۴ مخلوط‌کن،

تجهیزات زیر طبق استاندارد ISO 7218 [۲] استفاده شوند.

- مخلوط‌کن چرخشی[۲] (مخلوط کن) با سرعت متغییر تقریبی $3000\ min^{-1}$ تا $10000\ min^{-1}$ همچنین با ظروف درپوش‌دار شیشه‌ای یا فلزی قابل سترون کردن؛ یا

- مخلوط‌کن ضربه‌ای[۳] با کیسه‌های سترون (همگن‌کننده پارویی)، در صورت امکان مجهز به تنظیم‌کننده سرعت و زمان؛ یا

-همزن ارتعاشی[۱] با کیسه‌های استریل؛ یا

۱- بستگی به قدرت ژل شوندگی آگار دارد.

2- Rotary homogenizer
3- Peristaltic homogenizer

- سایر سیستم‌های همگن‌کننده با کارایی مشابه (مانند مخلوط‌کن دستی با ظروف قابل سترون).

۶-۵ همزن مکانیکی

همزن مکانیکی (همزن ورتکس) همگن‌سازی رقت‌های اعشاری را تسهیل می‌کند. همانطور که در استاندارد ISO 7218 توضیح داده شده است [۲].

۶-۶ ترازو، با محدوده و درستی مورد نیاز، طبق استاندارد ISO 7218 [۲]، برای توزین فرآورده‌های مختلف؛

۶-۷ ارلن‌ها یا بطری‌های در پیچ‌دار، با گنجایش‌های مناسب؛

۶-۸ لوله‌های آزمایش، با گنجایش‌های مناسب؛

۶-۹ پیپت‌ها یا پیپتور و سرپیپت‌ها، برای توزیع ml ۰٫۱ تا ml ۱؛

۶-۱۰ پیپت‌های استریل، برای توزیع ml ۵، برای خروج کامل با سرپیپت‌های پهن (تقریبا mm ۳)، (برای مثال پیپت سرولوژیک)؛

یادآوری- بطور جایگزین، می‌توان از پیپت‌های مدرج ml ۵ بدون سرپیپت استفاده کرد.

۶-۱۱ اسپاچول پخش کننده

پخش‌کننده‌های ال شکل (L) یا مثلثی شکل از جنس شیشه یا فلز یا پخش‌کننده‌های پلاستیکی یکبار مصرف؛

یادآوری- بطور جایگزین، می‌توان از اسپیرال پلیتر[۲] با سیستم توزیع سترون یا میکرو سرنگ‌های یک طرفه یکبار مصرف استفاده کرد.

۶-۱۲ پتری دیش‌های سترون، پتری دیش‌های سه تهویه‌ای[۳]، با قطر mm ۹۰.

۶-۱۳ اتاقک جریان هوای لایه‌ای[۴].

۶-۱۴ میکروسکوپ، میکروسکوپ فازکنتراست با قابلیت بزرگنمایی × ۶۰۰ تا × ۱۰۰۰.

۶-۱۵ pH متر، با حد رواداری ۰٫۱± واحد pH در دمای ^{o}C ۲۰ تا ^{o}C ۲۵.

1- Vibrational mixer
2- Spiral plater
3- Triple vents plates
4- Laminar flow cabinet

۷ نمونه‌برداری

روش نمونه‌برداری طبق استاندارد خاص و مناسب برای محصول انجام شود. در صورتی که استاندارد خاصی، برای محصول مورد نظر موجود نباشد، توصیه می‌شود که طبق توافق طرفین انجام شود. مقررات ملی برای کنترل مرجع نمونه‌برداری از خوراک دام اعمال شود.

یادآوری- نمونه‌برداری می‌تواند طبق استاندارد ISO 6497 انجام شود [۶]. اگرچه استاندارد مذکور به طورخاص برای میکروارگانیسم‌ها کاربردی نیست. اما با توجه به اینکه مرجع دیگری وجود ندارد، به نظر می‌رسد مناسب ترین سندی است که می‌تواند برای میکروارگانیسم‌ها به عنوان افزودنی خوراک دام مورد استفاده قرار گیرد.

هشدار- اقدامات احتیاطی برای جلوگیری از آلودگی متقاطع بالقوه نمونه‌ها با میکروارگانیسم‌ها به خصوص پس از نمونه‌برداری از افزودنی‌ها و پیش مخلوط‌های غنی شده با میکروارگانیسم‌ها صورت گیرد. در صورت نیاز، تجهیزات نمونه‌برداری بین هر نمونه، به خصوص پس از نمونه‌برداری از افزودنی‌ها و پیش مخلوط‌های حاوی میکروارگانیسم‌ها، تمیز و گندزدایی شود. نمونه را در ظرف سترون قرار دهید.

۸ آماده‌سازی آزمایه

آماده‌سازی آزمایه باید طبق استاندارد ISO 6498 و استاندارد مرتبط با محصول انجام شود.

یادآوری- استاندارد ISO 6498 راهنمای عمومی برای آماده‌سازی آزمایه می‌باشد.

۹ روش آزمون

۹-۱ آماده‌سازی پلیت‌های آگار پیش‌ریخته جهت روش کشت سطحی

محیط کشت را طبق زیربند ۵-۲-۲ یا طبق دستورالعمل سازنده تهیه کنید. بعد از اتوکلاو کردن در حمام آب در دمای بین ^{o}C ۴۴ و ^{o}C ۴۷ خنک کنید. مقدار ml ۱۵ از محیط کشت را در هر پتری دیش (طبق زیر بند ۶-۱۲) تحت شرایط سترون بریزید و پخش کنید تا یک لایه همگن به دست آید.

پس از جامد شدن محیط کشت، چهار پلیت را به طور وارونه بر روی یکدیگر قرار دهید و در دمای اتاق یا در انکوباتور در دمای ^{o}C (۱±۳۷) حدود h ۱۲ یا در مدت یک شب خشک کنید. به عنوان گزینه‌ای دیگر، پلیت‌ها را در اتاقک جریان لایه‌ای قرار دهید و درب آن‌ها را کمی باز بگذارید، تا سطح آگار، ظرف مدت min ۳۰ خشک شود. پلیت‌های مذکور را از نظر سترون بودن بررسی کنید. اگر این محیط‌های کشت در برابر از

دست دادن آب به طور صحیحی محافظت شوند تا مدت دو هفته در یخچال در دمای ^{o}C (۳±۵) قابل نگهداری هستند. در صورت نگهداری در یخچال، پلیت‌ها را به مدت min ۳۰ پیش از استفاده، به دمای اتاق برسانید.

روی پلیت‌های آگار با سطح مرطوب یا پتری دیش‌های حاوی بیش از ml ۱۵ محیط کشت، گونه‌های *باسیلوس* اغلب کلنی‌های تجمعی در کل پلیت تشکیل می‌دهند و مانع شمارش تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی روی این پلیت‌ها می‌شوند.

۹-۲ آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری

مقادیر پیشنهادی نمونه و حجم‌های مربوط به رقیق‌کننده مناسب برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه برای خوراک‌های مختلف دام و تیمار سوسپانسیون اولیه در جدول ۳ بیان شده است.

جدول ۳- مقادیر پیشنهادی نمونه و حجم‌های مربوط به رقیق‌کننده مناسب برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه برای خوراک‌های مختلف دام و تیمار سوسپانسیون اولیه

ماهیت نمونه	مقدار نمونه ml یا g	حجم رقیق کننده برای سوسپانسیون (۱-۵)	فاکتور رقیق سازی سوسپانسیون اولیه	تیمار سوسپانسیون اولیه
افزودنی ها	۵٫۰±۰٫۲۵	(۴۹۵±۹٫۹) ml	۱:۱۰۰	همزن یا مخلوط‌کن پارویی ۵ min
پیش مخلوط ها				
خوراک های دام معدنی	۲۰٫۰±۱٫۰	(۳۸۰±۷٫۶) ml	۱:۲۰	
خوراک های دام ترکیبی	۵۰٫۰±۲٫۵	(۴۵۰±۹) ml	۱:۱۰	
جایگزین های شیر	۵۰٫۰±۲٫۵	(۴۵۰±۹) ml	۱:۱۰	
خوراک های دام خمیری شکل و چرب	۵٫۰±۰٫۲۵	(۹۰±۱٫۸) ml ۵ g توین ۸۰ [۶]	۱:۲۰	مخلوط‌کن پارویی ۵ min

طبق جدول ۳، مقدار نمونه پیشنهاد شده را در ظرف سترون مخلوط‌کن، ظرف آزمایشگاه یا کیسه پلاستیکی وزن کنید. مقداری از رقیق‌کننده مناسب مربوطه را اضافه کنید (طبق زیربند ۵-۱). در صورتیکه *باسیلوس*-های کپسوله شده بررسی می‌شوند، بسته به اندازه کپسول‌ها مقداری کافی از ماده نمونه باید برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه به‌کار رود. برای تکرار خوب آزمون و به‌دست آوردن انحراف استاندارد[1] کمتر از ۲۰ ٪، بهتر است تعداد کپسول‌ها بیشتر از ۲۵ عدد باشد.

اگر در اولین آنالیز به طور قابل توجهی مقداری کمتر از حد انتظار بدست آمد، پیشنهاد می‌شود آنالیز با نسبت بیشتری از جرم نمونه به حجم رقیق کننده (طبق زیربند ۵-۱) جهت تهیه سوسپانسیون اولیه تکرار شود یا نمونه با سبوس دانه غله کم‌جوانه‌زده[2] یا هر حامل خنثی دیگری مخلوط شود تا اثر مواد مداخله‌گر کاهش یابد.

برای خوراک دام ترکیبی اکیدا پیشنهاد می‌شود که برای به حداقل رساندن مغایرت، آنالیز در دو تکرار انجام شود تا تغییرات کاهش یابد. میانگین نتایج هر دو نمونه، نتیجه حاصله خواهد بود. برای خوراک‌های دام

1- Standard deviation
2- Low - germ grain bran

ترکیبی پلت شده، آسیاب کردن خشک با سرعت کم به مدت ۳۰ s جهت تهیه پودر درشت[1] پیشنهاد می‌شود. از ایجاد گرمای شدید که می‌تواند به میکروارگانیسم‌ها آسیب بزند، اجتناب کنید. طبق روش‌های مشخص در استاندارد ISO 6887-4 [۳] برای محصولات بدون آب و محصولات با فعالیت آبی کم، نمونه با دقت به حجم معینی از رقیق کننده (طبق زیربند ۵-۱) اضافه شود تا شوک اسمزی به میکروفلور میکروبی به حداقل برسد.

نمونه‌ها را در همزن با سرعت $3000\ min^{-1}$ تا $5000\ min^{-1}$ به مدت ۵ min (طبق زیربند ۶-۴) مخلوط کنید یا در مخلوط‌کن پارویی با سرعت بالا همگن نمایید.

برای بازیابی میکروارگانیسم‌ها، شکست کف و جذب آب پیشنهاد می‌شود سوسپانسیون اولیه قبل از تهیه رقت‌های بعدی به مدت ۱۵ min در دمای آزمایشگاه (۱۸ °C تا ۲۸ °C) قرار گیرد.

یادآوری- می‌توان با استفاده از چند قطره ماده ضد کف مناسب (مانند ماده ضد کف سیلیکون یا مشابه آن) از کف کردن شدید سوسپانسیون اولیه در حین مخلوط کردن جلوگیری کرد.

اولین رقت را از سوسپانسیون اولیه فوق تهیه کنید. برای افزودنی‌ها از پیپت ۱ ml (طبق زیربند ۶-۹) و برای خوراک‌های دام ترکیبی و پیش مخلوط‌ها از پیپت ۵ ml (طبق زیربند ۶-۱۰) استفاده کنید. از سوسپانسیون اولیه به میزان ۱ ml یا ۵ ml به لوله‌های حاوی ۹ ml یا ۴۵ ml محلول سدیم هیدروکسید ۰٫۲٪ استریل که هم دمای محیط شده، منتقل کرده و با همزن مکانیکی مخلوط نمایید. میزان حجم کشیده شده توسط پیپت را وزن کنید، تا ضریب تصحیح جرم برای محاسبه تعداد گونه‌های *باسیلوس* به‌دست آید.

سوسپانسیون‌های حاوی افزودنی‌های میکروبی به سرعت ته نشین می‌شوند. به پیوست الف مراجعه شود. قبل از تهیه رقت‌های بعدی اطمینان حاصل کنید که سوسپانسیون اولیه همگن باشد. این همگن‌سازی را با استفاده از دور کند دستگاه همزن انجام می‌شود.

سایر رقت‌های اعشاری (رقت‌های متوالی) را با استفاده از یک پیپت ۱ ml استریل مانند یک توزیع کننده کوچک (سمپلر) که روی ۱ ml تنظیم شده است، تهیه نمائید. ۱ ml از رقت اولیه را در لوله حاوی ۹ ml محلول سدیم هیدروکسید ۰٫۲ ٪ استریل (طبق زیربند ۵-۱) انتقال داده و با همزن مکانیکی مخلوط کنید. این روش را تا زمانی تکرار کنید که تخمین مناسبی از تعداد سلول‌ها به‌دست آید.

۹-۳ تلقیح و گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها

مدت زمان بین شروع آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه و زمان تلقیح پلیت‌ها نباید بیشتر از ۴۵ min باشد.

یادآوری ۱- مدت زمان ۱۵ min جذب آب (ذکر شده برای سوسپانسیون اولیه) نیز در کل مدت زمان ۴۵ min قرار می‌گیرد.

برای بررسی شرایط سترون بودن از یک پلیت شاهد استفاده کنید.

رقت‌های انتخابی باید قبل از انتقال به پلیت‌ها همگن باشند. برای هر رقت حداقل دو پلیت آماده کنید. استفاده از سه یا چهار پلیت برای هر رقت، اختلاف را کاهش و سطح اطمینان را افزایش می‌دهد. مطابق پیشنهادات استاندارد ISO 7218 حد پایین تعداد کلنی مورد انتظار در هر پلیت ۱۰ کلنی در نظر گرفته شده

1- Unrefined

است [۲]. برای دقت بالاتر و افزایش سطح اطمینان حد پایین تعداد کلنی مورد انتظار در هر پلیت ۲۰ کلنی پیشنهاد شده است.

۰٫۱ ml تا ۰٫۲۵ ml از هر رقت مناسب را روی حداقل دو پلیت انتقال دهید. بعد از تلقیح (طبق زیربند ۵-۲-۱) آن را با استفاده از یک پخش‌کننده سترون یا یک اسپیرال پلیتر پخش کنید. بنابراین در هر پلیت تعداد کمتر از ۱۰ کلنی و بیشتر از ۱۰۰ کلنی مورد انتظار نیست. برای گرمخانه‌گذاری می‌توان چهار پلیت را روی یکدیگر قرار داد.

پلیت‌های وارونه شده را در شرایط هوازی در دمای (۳۷±۱) °C به مدت ۱۶ h تا ۲۴ h گرمخانه‌گذاری کنید.

یادآوری ۲- بسته به سرعت رشد گونه‌های خاص *باسیلوس*، مدت زمان گرمخانه‌گذاری ممکن است با اندازه مناسب کلنی‌ها جهت شمارش بستگی داشته باشد.

۹-۴ شمارش کلنی‌ها

بعد از گرمخانه‌گذاری طبق شرایط فوق، کلیه پلیت‌های دارای بیشتر از ۱۰ کلنی و کمتر از ۱۰۰ کلنی *باسیلوس* احتمالی، بر اساس مشخصات ظاهری (طبق زیربند ۹-۵) شمارش می‌شوند. برای محاسبه تعداد باسیلوس‌ها در واحد نمونه (CFU/g یا CFU/ml)، طبق توصیه‌های استاندارد ISO 7218 حد پایین تعداد کلنی در هر پلیت ۱۰ کلنی در نظر گرفته شده است [۲]. برای دقت بالاتر و افزایش سطح اطمینان حد پایین تعداد کلنی مورد انتظار در هر پلیت ۲۰ کلنی پیشنهاد می‌شود.

در صورت امکان، حداقل تعداد چهار پلیت (از دو رقت متوالی) یا سه پلیت (از یک رقت) را شمارش نمایید. اگر تعداد کلنی پلیت‌های گرمخانه‌گذاری شده بین ۱۰ ≤ (۱۰ کلنی یا بیشتر از ۱۰ کلنی) و ۱۰۰ ≤ (۱۰۰ کلنی یا کمتر از ۱۰۰ کلنی) نباشد، آزمون باید با رقت‌های مناسب تکرار شود.

۹-۵ تأیید

شکل کلنی سویه‌های مختلف *باسیلوس* متعلق به گونه‌های یکسان می‌تواند بسیار مختلف باشد.

این روش آزمون با استفاده از سویه‌های *باسیلوس لیکنی فورمیس* DSM ۵۷۴۹ (CH ۲۰۰) همچنین *باسیلوس سوبتیلیس* DSM ۵۷۵۰ (CH ۲۰۱) و *باسیلوس سوبتیلیس* ۳۱۰۲ - C (DSM ۱۵۵۴۴) صحه گذاری شده است.

شکل کلنی سویه‌های *باسیلوس* فوق روی محیط کشت TSA به شرح زیر می‌باشد:

الف- *باسیلوس سوبتیلیس*: کلنی‌ها با قطر ۳ mm تا ۸ mm، گرد، سطح کدر، مات، چین خورده، کرم یا قهوه‌ای رنگ؛ کلنی سویه DSMZ ۵۷۵۰ اغلب دو شکل متفاوت نشان می‌دهد.

ب- *باسیلوس لیکنی فورمیس*: کلنی‌ها با قطر ۴ mm تا ۸ mm، محدب، از مات تا اشکال زائده دار بسیار مخاطی، احاطه شده با کلنی‌های فرعی کوچکتر. ممکن است بخش مخاطی مرکز یک کلنی، خشک شود و

صاف، سفید و مات گردد در حالیکه کلنی‌ها هنوز با کلنی‌های فرعی کوچک و مخاطی احاطه شده‌اند. برخی قسمت‌های یک کلنی قوی‌تر از بقیه قسمت‌ها به بستر محیط کشت می‌چسبد.

بسته به شکل‌های مختلف کلنی که بعد از گرمخانه‌گذاری ظاهر می‌شوند، دو تا پنج کلنی از هر شکل کلنی برای رنگ آمیزی گرم انتخاب شود.

باکتری‌ها با مشاهده میکروسکوپی میکروارگانیسم رنگ‌آمیزی شده به روش گرم، تأیید می‌شوند. صرفا باکتری‌های میله‌ای شکل گرم مثبت با توانایی تشکیل اندوسپور (یا فاقد توانایی)، *باسیلوس* محسوب می‌شوند.

در موارد مشکوک، وجود باسیلوس‌ها با خصوصیات بیوشیمیایی (برای مثال کیت‌های آزمون تجاری در دسترس)، آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز[1] یا از طریق طیف سنجی جرمی یونیزاسیون واجذبی لیزری به کمک ماتریس[2] کلنی‌ها تأیید می‌شود.

۱۰ بیان نتایج

تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی (CFU) در گرم یا میلی لیتر خوراک دام (N) طبق پیشنهاد استاندارد ISO 7218 با استفاده از فرمول (۱) محاسبه می‌شود:

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0.1n_2)d} \qquad (۱)$$

که در آن:

N تعداد واحد تشکیل‌دهنده کلنی (CFU) در گرم یا میلی لیتر خوراک دام؛

$\sum C$ مجموع کلنی‌های شمارش‌شده روی کل پلیت‌ها؛

V حجم تلقیحی بکار رفته برای هر پلیت، برحسب میلی لیتر؛

n_1 تعداد پلیت‌های انتخابی در اولین رقت قابل شمارش؛

n_2 تعداد پلیت‌های انتخابی در دومین رقت قابل شمارش؛

d ضریب رقت در اولین شمارش.

اگر تعداد کلنی شمارش شده روی یک پلیت با تعداد کلنی‌ها روی پلیت‌های دیگر در نظر گرفته همخوانی نداشته باشد نتایج ناسازگار باید کنار گذاشته شود. با این وجود برای محاسبه، حداقل سه پلیت ($n_1+n_2\geq3$) باید در نظر گرفته شود. بنابراین در چنین مواردی باید در فرمول مطابقت ایجاد شود، به عنوان مثال با $n_1=1$ و $n_2=2$ یا $n_1=2$ و $n_2=1$.

1- Polymerase Chain Reaction (PCR)

2- Matrix assisted laser desorption ionization time of flight (MALDI-TOF)

از طرف دیگر، تعداد CFU در گرم یا میلی لیتر نمونه (N) می‌تواند تنها با یک رقت محاسبه شود. در این مورد طبق فرمول، n_1 باید بزرگتر یا مساوی۳ و n_2 صفر باشد[۷]. سپس نتایج محاسبه شده گرد شود. طبق آنچه که در استاندارد ISO 7218 توضیح داده شده است[۲].

نتایج به صورت تعداد میکروارگانیسم‌ها در هر گرم یا هر میلی لیتر نمونه می‌باشد و بصورت عددی بین ۱٫۰ و ۹٫۹ ضرب در توان مناسبی از ۱۰ بیان می‌شود. پیشنهاد می‌شود برای پیش مخلوط‌ها و خوراک دام ترکیبی. نتایج بر اساس اظهارنامه به CFU/Kg تبدیل شود.

۱۱ دقت

۱۱-۱ کلیات

دقت روش براساس تکرارپذیری و تجدیدپذیری مطالعات بین‌آزمایشگاهی تعیین شده است [۸].

۱۱-۲ مطالعات بین‌آزمایشگاهی

جزئیات مطالعات بین‌آزمایشگاهی مؤثر بر دقت روش، در منبع [۸] چاپ شده است و به طور خلاصه در پیوست ب ارائه شده است. داده‌های دقت با استفاده از نه نمونه (دو افزودنی، دو پیش مخلوط، دو خوراک دام معدنی و سه خوراک دام ترکیبی) مشخص شده است. مقادیر بدست آمده از مطالعات بین‌آزمایشگاهی برای آنچه در این استاندارد آورده شده کاربرد دارد و برای گستره‌های غلظت و ماتریکس‌های دیگر کاربرد ندارد.

۱۱-۳ تکرارپذیری

تفاوت مطلق بین دو نتیجه آزمون مستقل (تعداد *باسیلوس* در هر گرم یا در هر میلی‌لیتر) به دست آمده با استفاده از یک روش بر روی نمونه‌های آزمایشگاهی یکسان در یک آزمایشگاه، به‌وسیله یک کاربر و با استفاده از تجهیزات یکسان، در کوتاه‌ترین فاصله زمانی ممکن، حداکثر در ۵ ٪ موارد بیش از حد تکرارپذیری r خواهد بود.

۱۱-۴ تجدیدپذیری

تفاوت مطلق بین دو نتیجه آزمون منفرد (تعداد *باسیلوس* در گرم یا در میلی‌لیتر) به دست آمده با استفاده از یک روش بر روی نمونه‌های آزمایشگاهی یکسان در آزمایشگاه‌های مختلف به‌وسیله کاربرهای مختلف و با استفاده از تجهیزات متفاوت، حداکثر در ۵ ٪ موارد بیش از حد تجدیدپذیری R خواهد بود.

۱۲ گزارش آزمون

در گزارش آزمون باید موارد زیر مشخص شده باشد:

الف- اطلاعات لازم برای شناسایی کامل نمونه؛

ب- روش آزمون به کار رفته، با ارجاع به شماره این استاندارد (شامل سال چاپ)؛

ت- روش نمونه‌برداری بکار رفته، در صورت معلوم بودن؛

ث- جزئیات عملیاتی که در این استاندارد مشخص نشده است، و یا اختیاری بوده است؛

ج- جزئیات هر حادثه‌ای که ممکن است بر نتایج آزمون تأثیر گذاشته باشد؛

چ- نتایج آزمون به‌دست آمده یا در صورت انجام تکرارپذیری، نتایج نهایی بدست آمده از آن (شامل یک مرجع برای بندی که توضیح می‌دهد چگونه نتایج محاسبه شده است)؛

ح- هر ویژگی غیرمعمولی که مشاهده شده است؛

خ- تاریخ آزمون

پیوست الف

(آگاهی‌دهنده)

نکاتی در مورد روش کار

بیشتر سلول‌های رویشی میکروارگانیسم‌ها با تیمار قلیایی مورد استفاده در این روش غیرفعال خواهند شد.در سوسپانسیون اولیه با مقادیر pH قلیایی ممکن است رسوبات کلوئیدی ایجاد شود. این رسوبات به دلیل لخته سازی که توسط هیدروکسیدها و فسفات‌های کاتیون‌های چند ظرفیتی صورت می‌گیرد تشکیل می‌شود. در این لخته‌ها ممکن است بخشی از اسپورها محصور شده یا توسط جذب محدود شوند و در نتیجه رسوبی ایجاد شود که –در مقایسه با مایع رویی- با اسپورهای باکتریایی غنی شده است. از آنجایی که لخته‌ها می-توانند به سرعت ته نشین شوند، توصیه می‌شود سوسپانسیون‌های اولیه در طی پیپت کردن با استفاده از اقدامات مناسب به صورت همگن نگه‌داشته شوند.

توصیه می‌شود که مقادیر بالای مس و سایر مواد سمی بر بقایای اسپورهای باکتری در سوسپانسیون‌های اولیه تأثیر نگذارد. بنابراین، اگر در آنالیز اولیه به طور قابل توجهی مقداری کمتر از حد انتظار باشد، پیشنهاد می‌شود که آنالیز با سوسپانسیون اولیه‌ای با نسبت بیشتری از جرم نمونه به حجم رقیق کننده (طبق زیربند ۱-۵) تکرار شود، یا نمونه با سبوس دانه غله کم‌جوانه‌زده یا هر حامل خنثی دیگری مخلوط شود تا اثر مواد مداخله‌گر کاهش یابد.

پیوست ب

(آگاهی‌دهنده)

نتایج مطالعات بین‌آزمایشگاهی

ب-۱ کلیات

داده‌های زیر در مطالعات بین‌آزمایشگاهی سازمان دهی شده توسط VDLUFA بین سال‌های ۲۰۰۴ و ۲۰۱۰ به دست آمد. که در آن مطالعه، یک آزمایشگاه استرالیایی، یک آزمایشگاه سوئیسی و هشت تا یازده آزمایشگاه آلمانی شرکت داشتند. آنها طبق استاندارد ISO 5725-2 ارزیابی شدند [۵].

ب-۲ داده‌های به‌دست آمده از مطالعات مشارکتی VDLUFA

آزمون‌های بین‌آزمایشگاهی با محصولات تجاری خوراک دام که از نظر پایداری و همگنی بررسی شده بودند انجام شد. هر نمونه توسط آزمایشگاه‌های شرکت کننده سه مرتبه آنالیز شد. با توجه به توزیع نرمال داده‌های بدست آمده، مشخصه‌های روش به صورت غیرلگاریتمی محاسبه شدند. داده‌های دقیق بدست آمده از مطالعه در جدول ب ۱ ارائه شده است.

جدول ب ۱ – داده‌های دقیق بدست آمده از مطالعات مشارکتی VDLUFA

	محیط TSA								
شماره آزمون	335 M-d	381 Q	335 M-a	353 Q-a	328 Q-a	360 Q-c	353 Q-b	353 Q-c	384 Q
سال	2004	2010	2004	2006	2004	2007	2006	2006	2010
ماتریکس	افزودنی		پیش مخلوط		خوراک معدنی		غذای بوقلمون	خوراک پلت شده بوقلمون	غذای پلت شده خوکچه
تعداد آزمایشگاه	9	13	12	13	13	13	13	12	14
تعداد مقادیر تکی	25	39	36	39	39	39	39	36	42
واحد	CFU/g		CFU/kg						
غلظت	E+11	E+10	E+11	E+12	E+10	E+10	E+09	E+09	E+09
مقدار میانگین	4,45	0,92	5,54	2,03	3,23	3,62	1,46	1,27	0,90
انحراف استاندارد تکرارپذیری S_r	0,50	0,14	0,67	0,40	0,30	0,39	0,21	0,19	0,08
محدوده تکرارپذیری r ($=2.8\times s_r$)	1,40	0,39	1,88	1,12	0,84	1,09	0,59	0,53	0,22
انحراف استاندارد تجدیدپذیری S_R	1,24	0,21	1,88	0,64	0,87	0,71	0,34	0,22	0,17
محدوده تجدیدپذیری R ($=2.8\times s_R$)	3,47	0,59	5,26	1,79	2,44	1,99	0,95	0,62	0,48
انحراف استاندارد نسبی تکرارپذیری RSD_r (درصد)	11,1	14,9	12,1	19,6	9,4	10,6	14,1	15,2	9,1
انحراف استاندارد نسبی تجدیدپذیری RSD_R (درصد)	27,9	22,5	33,9	31,4	26,9	19,6	23,0	17,1	18,5

کتاب‌نامه

[1] EN ISO 11133, Microbiology of food, animal feed and water- preparation, production, storage and performance testing of culture media.

یادآوری- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۶۶۳: سال ۱۳۹۴، میکروبیولوژی مواد غذایی، خوراک دام و آب –آماده‌سازی، ساخت، ذخیره‌سازی و آزمون عملکرد محیط‌های کشت با استفاده از استاندارد ISO 11133: 2014 تدوین شده است.

[2] EN ISO 7218, Microbiology of food and animal feeding stuffs-General requirements and guidance for microbiological examinations.

یادآوری- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۶۶۳: سال ۱۳۹۴، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- راهنمای الزامات کلی برای آزمون با استفاده از استاندارد ISO 7218:2007+Amd 1:2013 تدوین شده است.

[3] EN ISO 6887-4, Microbiology of the food chain – preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examinations-part 4: specific rules for the preparation of miscellaneous products.

یادآوری- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴-۸۹۲۳: سال ۱۳۹۴، میکروبیولوژی مواد غذایی ،خوراک دام و آب –آماده‌سازی ،ساخت، ذخیره‌سازی و آزمون عملکرد محیط‌های کشت با استفاده از استاندارد EN ISO 6887-4:2017 تدوین شده است.

[4] EN ISO 6887-1, Microbiology of the food chain – preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examinations-part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.

یادآوری- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۸۹۲۳: سال ۱۳۹۶، میکروبیولوژی زنجیره غذایی- آماده‌سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی- قسمت ۱: مقررات کلی برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه و رقت-های اعشاری با استفاده از استاندارد ISO 6887-1: 2017 تدوین شده است.

[5] EN ISO 5725-2, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results-part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.

یادآوری- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲-۷۴۴۲: سال ۱۳۸۴، درستی (صحت و دقت) روشها و نتایج اندازه گیری-قسمت دوم: روش پایه برای تعیین تکرارپذیری و تجدیدپذیری روش اندازه گیری استاندارد با استفاده از استاندارد ISO 5727-2: 1994 تدوین شده است.

[6] EN ISO 6497, Animal feeding stuffs-sampling.

[7] European community project SMT4-CT98-2235, methods for the official control of probiotics used as feed additives (vol.1-3).2004. Report EUR 20873/1-3. Office for official Publications of the European communities.ISBN 92-894-6249-3(set).

[8] Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs-und Forschungsanstalten(VDLUFA) Method 28.2.2: Enumeration of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*,in: Methods book Vol. III-28.2.2.

[9] Leuschner R.G.K., Bew J., Cruc A., Enumeration of probiotic bacilli spores in animal feed: A collaborative study. In: J, AOAC.2003, 86 pp.568-575.

[10] Regulation (EC) NO767/2009 of the European Parliament and of the council of 13 July 2009 on the placing on the market and use of feed,amending European Parliament and Council Regulation (EC) NO 1831/2003 and repealing council Directive 79/373/EEC,

Commission Directive 80/511/EEC, Council Directive 82/471/EEC,83/228/EEC, 93/74/EEC,93/113/EC and 96/25/EC Commission Decision 2004/217/EC, Official Journal of the European Union,L 229/1,1.9.2009. Available at https://data.europa.eu/eli/reg/2009/767/oj.