سیستم مدیریت ایزو

www.isomanagement.ir

تماس تلفنی جهت دریافت مشاوره:

۱. مشاور دفتر تهران (آقای محسن ممیز)

۰۹۱۲ ۹۶۳ ۹۳۳۶

۲. مشاور دفتر اصفهان (سرکار خانم لیلا ممیز)

۰۹۱۳ ۳۲۲ ۸۲۵۹

مجموعه **سیستم مدیریت ایزو** با هدف بهبود مستمرعملکرد خود و افزایش رضایت مشتریان سعی برآن داشته، کلیه استانداردهای ملی و بین المللی را در فضای مجازی نشر داده و اطلاع رسانی کند، که تمام مردم ایران از حقوق اولیه شهروندی خود آگاهی لازم را کسب نمایند و از طرف دیگر کلیه مراکز و کارخانه جات بتوانند به راحتی به استانداردهای مورد نیاز دسترسی داشته باشند.

این موسسه اعلام می دارد در کلیه گرایشهای سیستم های بین المللی ISO پیشگام بوده و کلیه مشاوره های ایزو به صورت رایگان و صدور گواهینامه ها تحت اعتبارات بین المللی سازمان جهانی IAF و تامین صلاحیت ایران می باشد.

هم اکنون سیستم خود را با معیارهای جهانی سازگارکنید...

ISO

9001
14001
18001

CE

GMP
GAP
22716

IMS
HSE-MS

22000
HACCP

45001

INSO

11169

1st Revision

2018
Identical with
ISO 16212:2017

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

استاندارد ملی ایران

۱۱۱۶۹

تجدیدنظر اول

۱۳۹۷

میکروبیولوژی فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی – شمارش مخمر و کپک

Microbiology of Cosmetics – Enumeration of yeast and mould

ICS:07.100.40

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@isiri.gov.ir

وبگاه: http://www.isiri.gov.ir

Iranian National Standardization Organization (INSO)

No. 2592 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@isiri.gov.ir

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

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک مادهٔ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

نام موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب یکصد و پنجاه و دومین جلسه شورای عالی اداری مورخ ۹۰/۶/۲۹ به سازمان ملی استاندارد ایران تغییر و طی نامه شماره ۲۰۶/۳۵۸۳۸ مورخ ۹۰/۷/۲۴ جهت اجرا ابلاغ شده است .

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 وکوششی 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 وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود . پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال 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 می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذی صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند درکمیتهٔ ملی طرح و بررسی و درصورت 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 ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌دهد به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد 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 استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور ، از آخرین پیشرفت های علمی ، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود .

سازمان ملی استاندارد 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 و درجه-بندی آن را اجباری نماید . همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمان ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره ، آموزش ، بازرسی ، ممیزی و صدور گواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی ، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش ، سازمان ملی استاندارد ایران این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم ، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آن ها نظارت می کند . ترویج دستگاه بین المللی یکاها ، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش ، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

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

کمیسیون فنی تدوین استاندارد
«میکروبیولوژی فرآورده های بهداشتی، آرایشی - شمارش مخمر و کپک»

رئیس:	**سمت و/ یا محل اشتغال**
روشن طبری، مژده (کارشناسی ارشد قارچشناسی پزشکی)	دبیر کمیته فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی ISO
دبیر:	
مسرت، ندا (کارشناسی میکروبیولوژی)	کارشناس استاندارد
اعضا : (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
آتش، امیرفرزین (کارشناسی ارشد شیمی آلی)	شرکت یونیلیور ایران
ابراهیمی، لیلا (کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)	انجمن صنایع شوینده، بهداشتی و آرایشی ایران
اصغری، شهناز (کارشناسی میکروبیولوژی)	اداره کل استاندارد استان تهران
امینی، الدوز (کارشناسی ارشد انگل شناسی)	شرکت آریان کیمیا تک (اکت)
بقایی، عباس (کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)	شرکت آریان کیمیا تک (اکت)
بنایی اصفهانی، زهرا (کارشناسی زیست‌شناسی)	شرکت گلتاش
جلالی، مریم (کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)	دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
جعفری مطلق، مجتبی (کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)	شرکت پاکشو

اعضا : (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	**سمت و/ یا محل اشتغال**
حکاک‌زاده، ستاره (کارشناسی میکروبیولوژی)	اداره کل استاندارد استان کرمان
رسولی، یلدا (کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)	سازمان ملی استاندارد ایران
رحیمی‌فرد، ناهید (دکتری میکروبیولوژی)	مرکز آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا و دارو – وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
سرابندی، فریده (کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)	کارشناسی میکروب شناسی – مرکز بهداشت زاهدان
شاه‌بنده، محمدرضا (دکتری بیوتکنولوژی)	شرکت ایران آوندفر
شهرکی، احمد علی (کارشناسی میکروبیولوژی)	اداره کل استاندارد استان سیستان و بلوچستان
قلی‌زاده دوران محله، رقیه (دکتری میکروبیولوژی)	عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زاهدان
عابدینی، الهه (کارشناسی ارشد بیوشیمی)	آزمایشگاه همکار مهر طاهر و سلامت
عسلی بیشه، آی‌سان (کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)	شرکت یونیلیور ایران
کامرانی ترکستانی، ساقی (کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)	شرکت ساویز
کلانتری، احسان (کارشناسی ارشد مهندسی شیمی)	اداره کل استاندارد استان سیستان و بلوچستان
مهرپور، رامش (کارشناسی مهندسی صنایع)	سازمان ملی استاندارد ایران - پژوهشگاه استاندارد- پژوهشکده غذایی و کشاورزی
نبوی رضوی، ریحانه (کارشناسی تغذیه)	شرکت پارس حیان

ویراستار:

مهرپور، رامش
(کارشناسی مهندسی صنایع)

سازمان ملی استاندارد ایران - پژوهشگاه استاندارد- پژوهشکده غذایی و کشاورزی

فهرست مندرجات

عنوان		صفحه
پیش گفتار		و
۱	هدف و دامنه کاربرد	۱
۲	مراجع الزامی	۱
۳	اصطلاحات و تعاریف	۲
۴	اصول آزمون	۳
۵	محلول رقیق‌کننده، خنثی‌کننده و محیط‌های کشت	۴
۶	وسایل	۸
۷	سویه‌های میکروارگانیسم‌ها	۸
۸	نگهداری فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی و نمونه‌های آزمایشگاهی	۹
۹	روش آزمون	۹
۱۰	شمارش کلنی (روش شمارش در پلیت و صافی غشایی)	۱۲
۱۱	بیان نتایج	۱۲
۱۲	خنثی‌سازی خصوصیات ضدمیکروبی فرآورده	۱۶
۱۳	گزارش آزمون	۱۸
پیوست **الف**	(آگاهی‌دهنده) سایر محلول‌های رقیق‌کننده خنثی‌کننده	۲۰
پیوست **ب**	(آگاهی‌دهنده) سایر محلول‌های رقیق‌کننده	۲۲
پیوست **پ**	(آگاهی‌دهنده) سایر محیط‌های کشت	۲۴
پیوست **ت**	(آگاهی‌دهنده) خنثی‌کننده‌های فعالیت ضدمیکروبی مواد نگهدارنده و مایعات آبکشی	۲۷
کتابنامه		۲۹

پیش‌گفتار

استاندارد «میکروبیولوژی فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی - شمارش مخمر و کپک» که نخستین‌بار در سال ۱۳۸۷ بر مبنای پذیرش استانداردهای بین‌المللی به‌عنوان استاندارد ملی ایران به روش اشاره شده در مورد الف، بند ۷، استاندارد ملی شمارهٔ ۵ تدوین و منتشر شد، بر اساس پیشنهادهای دریافتی و بررسی و تأیید کمیسیون-های مربوط برای اولین بار مورد تجدیدنظر قرار گرفت و در چهارصد و نود و دومین اجلاسیه کمیتهٔ ملی استاندارد میکروبیولوژی و بیولوژی مورخ ۱۳۹۷/۰۱/۲۸ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، 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 ۱۱۱۶۹ : سال ۱۳۸۷ می‌شود.

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

ISO 16212 :2017, Cosmetics - Microbiology- Enumeration of yeast and mould

میکروبیولوژی فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی – شمارش مخمر وکپک

۱ هدف ودامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد تعیین راهنمای کلی برای روش شمارش مخمر و کپک موجود در فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی با استفاده از شمارش کلنی‌ها بر روی محیط کشت انتخابی، پس از گرمخانه‌گذاری در شرایط هوازی می‌باشد.

به منظور حصول اطمینان از کیفیت و ایمنی فرآورده برای مصرف‌کنندگان، توصیه می‌شود که تجزیه و تحلیل مناسب خطر میکروبیولوژیکی برای تعیین نوع فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی که این استاندارد برای آن‌ها کاربرد دارد، انجام شود. فرآورده‌هایی که از نظر میکروبیولوژیکی کم خطر هستند (به استاندارد ملی ایران شماره ۱۳۵۵۷ مراجعه کنید) شامل فرآورده‌هایی با فعالیت آبی پایین[1]، فرآورده‌های آبی- الکلی[2]، فرآورده‌هایی با pH بسیاربالا[3]، و غیره هستند.
به دلیل تنوع وسیع فرآورده‌های بهداشتی،آرایشی ، این روش نمی تواند برای بعضی از فرآورده‌ها (برای مثال برخی از فرآورده‌های غیرمحلول در آب) مناسب باشد. از سایر روش‌ها (برای مثال روش‌های اتوماتیک[4]) در صورتی‌که برابری آن با روش این استاندارد و یا «مناسب بودن» آن اثبات شده باشد، می توان به عنوان روش جایگزین استفاده کرد.

مخمرهای شمارش‌شده را می‌توان با استفاده از آزمون‌های تشخیصی مناسب مانند آزمون‌های توصیف شده در کتابنامه این استاندارد شناسایی کرد. در صورت لزوم برای شناسایی کپک‌های شمارش‌شده می‌توان از سایر روش‌های مناسب استفاده کرد.

۲ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی نیازمندی هایی است که در متن این استاندارد ملی ایران به آن ها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن نیازمندی ها جزئی از این استاندارد ملی ایران 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. 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:

1- Low water activity
2- Hydro-alcoholic products
3- Extreme pH values
4- Automatic

2-1 ISO 21148, Cosmetics - Microbiology - General instructions for microbiological examination

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۶۸، سال ۱۳۸۷: میکروبیولوژی –فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی-راهنمای کلی برای آزمون های میکروبیولوژی، با استفاده از استاندارد ISO 21148:2005 تدوین‌شده است.

2-2 EN 12353, Chemical disinfectants and antiseptics - Preservation of test organisms used for the determination of bactericidal (including Legionella), mycobactericidal, sporicidal, fungicidal and virucidal (including bacteriophages) activity

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۵۰۵، سال ۱۳۹۵: ضدعفونی کننده‌ها و گندزداهای شیمیایی -نگهداری ارگانیسم‌های آزمون مورد استفاده در تعیین فعالیت باکتری‌کشی (شامل لژیونلا)،مایکوباکتری‌کشی ،اسپورکشی ،قارچ‌کشی و ویروس‌کشی (شامل باکتریوفاژها)، با استفاده از استاندارد EN 12353 تدوین‌شده است.

۳ اصطلاحات وتعاریف

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

۳-۱

مخمر

yeast

قارچ‌های تک‌سلولی هستندکه عمدتا از طریق جوانه زدن تکثیر می‌یابند و قادر به رشد تحت شرایط تعیین شده در این استاندارد می‌باشند.

۳-۲

کپک

mould

قارچ‌های میکروسکوپی تولیدکننده میسلیوم و دارای اسپورها یا کنیدی‌ها هستند که قادر به رشد تحت شرایط تعیین شده در این استاندارد می‌باشند.

۳-۳

فرآورده

product

قسمتی از فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی معین است که آزمایشگاه برای آزمون آن را دریافت می‌کند.

۴-۳

نمونه

sample

قسمتی از فرآورده است (طبق زیربند ۳-۳) (حداقل۱g یا۱ml) که برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه استفاده می‌شود.

۵-۳

سوسپانسیون اولیه

initial suspension

منظور از سوسپانسیون (یا محلولی) از نمونه (طبق زیربند ۳-۴) در حجم معینی از آبگوشت غنی‌کننده می‌باشد.

۶-۳

رقت نمونه

sample dilution

منظور رقتی از سوسپانسیون اولیه (طبق زیربند ۳-۵) است.

۴ اصول آزمون

۴-۱ کلیات

این روش براساس شمارش کلنی‌ها بر روی محیط جامد انتخابی می‌باشد. برای پیشگیری از احتمال ممانعت رشد قارچی بوسیله نمونه و امکان‌پذیر شدن جستجوی میکروارگانیسم‌های زنده (به منبع شماره ۵ ارائه شده در کتابنامه مراجعه شود). در تمام موارد، خنثی‌سازی خصوصیات ضد قارچی باید بررسی و اثبات شود (به بندهای منابع با شماره های ۶، ۸ و ۹ ارائه شده در کتابنامه مراجعه شود).

۴-۲ روش شمارش در پلیت

روش شمارش در پلیت شامل مراحل تعیین‌شده در زیربندهای ۴-۲-۱ تا ۴-۲-۳ می‌باشد.

۴-۲-۱ پلیت‌ها را با استفاده از محیط کشت معین، به روش کشت آمیخته یا سطحی، آماده شده و سپس با مقدار مشخصی از سوسپانسیون اولیه یا رقتی از فرآورده، تلقیح می‌شود.

۴-۲-۲ پلیت‌ها در دمای $(۲۵ \pm ۲/۵)^{\circ}C$ به مدت ۳ روز تا ۵ روز در شرایط هوازی، گرمخانه‌گذاری می شود.

۴-۲-۳ تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی(CFU)[1] شمارش‌شده و تعداد کپک و مخمر در هر میلی‌لیتر یا هر گرم فرآورده محاسبه می‌شود.

یادآوری- شرایط جایگزین دیگر، برای گرمخانه‌گذاری، $^{\circ}C$ (۲/۵± ۲۲/۵) به مدت ۵ روز تا ۷ روز و استفاده از محیط کشت بدون آنتی‌بیوتیک است.

۴-۳ روش صافی غشایی

روش صافی غشایی شامل مراحل تعیین‌شده در زیربندهای ۴-۳-۱ تا ۴-۳-۳ می باشد.

۴-۳-۱ مقدار مناسبی از نمونه که با روش توصیف شده در بند ۱۲ آماده شده است را به دستگاه صافی غشایی که از قبل با مقدار کمی از محلول رقیق‌کننده سترون و مناسب مرطوب شده است، منتقل و بلافاصله با استفاده از روش توصیف‌شده (طبق زیربند ۱۲-۳-۴) صاف و شستشو نمایید. سپس، صافی غشایی را ، بر روی سطح محیط کشت جامد مشخص شده در استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۶۸ قرار داده دهید.

۴-۳-۲ صافی‌ها را در دمای $^{\circ}C$ (۲/۵± ۲۵) به مدت ۳ روز تا ۵ روز در شرایط هوازی گرمخانه‌گذاری نمایید

۴-۳-۳ تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی (CFU) شمارش شده و تعداد کپک و مخمر در هر میلی‌لیتر یا در هر گرم فرآورده محاسبه کنید.

یادآوری- شرایط جایگزین دیگر، برای گرمخانه‌گذاری، دمای $^{\circ}C$(۲/۵± ۲۲/۵) برای مدت ۵ روز تا ۷ روز و استفاده از محیط کشت بدون آنتی بیوتیک[2] است.

۵ محلول رقیق‌کننده، خنثی‌کننده و محیط‌های کشت

۵-۱ کلیات

دستورالعمل‌های کلی در استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۶۸، تعیین شده است. آب مورد استفاده در این استاندارد باید آب مقطر و یا خالص مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۶۸ باشد.

محلول‌های رقیق‌کننده، خنثی‌کننده‌ها و محیط‌های کشت تعیین‌شده در این استاندارد برای شمارش مخمر و کپک مناسب هستند. کاربرد سایر محلول‌های رقیق‌کننده، خنثی‌کننده‌ها و محیط‌های کشت، در صورت اثبات «مناسب بودن» آن‌ها برای استفاده، ممکن است استفاده شوند.

1- Colony-forming units
2- Antibiotic

۵-۲ محلول‌های رقیق‌کننده و رقیق‌کننده‌های خنثی‌کننده

۵-۲-۱ کلیات

محلول‌های رقیق‌کننده برای پراکنده‌سازی نمونه به کار می‌رود. چنانچه نمونه مورد آزمون دارای خصوصیات ضد قارچی باشد، می‌توان از رقیق‌کننده‌های حاوی مواد خنثی‌کننده استفاده کرد. کارائی روش خنثی‌سازی باید پیش از شمارش، اثبات شود (به بند ۱۲ مراجعه شود). اطلاعات مربوط به خنثی‌کننده‌های مناسب در پیوست **ت** ارائه شده است.

۵-۲-۲ محلول‌های رقیق‌کننده خنثی‌کننده

۵-۲-۲-۱ محیط مایع کازئین دایجست- سوی لسیتین-پلی سوربات ۲۰ (SCDLP 20)[1]

۵-۲-۲-۱-۱ مواد تشکیل‌دهنده

نام مواد	مقدار
هضم‌شده پانکراتیک کازئین[2]	۲۰٫۰ g
لسیتین سویا	۵٫۰ g
پلی‌سوربات ۲۰	۴۰ ml
آب	۹۶۰ ml

۵-۲-۲-۱-۲ آماده‌سازی

پلی‌سوربات ۲۰ را در ml ۹۶۰ آب حل کنید و ضمن هم زدن آن را در حمام آب با دمای $^{\circ}$C(۲± ۴۹) حرارت دهید تا به‌طور کامل حل شود. هضم‌شده پانکراتیک کازئین و لسیتین سویا را به آن اضافه کنید. سپس، آن را به مدت حدود ۳۰ دقیقه حرارت دهید تا به صورت محلول در آید. پس از تقسیم محیط کشت در ظروف مناسب، آن را در دمای $^{\circ}$C۱۲۱به مدت زمان ۱۵ دقیقه سترون کنید.

پس ازسترون‌سازی محیط کشت،pH باید برابر ۰٫۲±۷٫۳ در دمای آزمایشگاه باشد.

۵-۲-۲-۲ سایر محلول‌های رقیق‌کننده و خنثی‌کننده

سایر محلول‌های رقیق‌کننده خنثی‌کننده در صورت «مناسب بودن» می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد. (به پیوست **الف** و **ت** مراجعه کنید).

1- Soybean-casein-digest-lecithin-polysorbate 20 medium
2- Pancreatic digest of casein

۵-۲-۳ محلول های رقیق‌کننده

۵-۲-۳-۱ محلول‌های رقیق‌کننده A

۵-۲-۳-۱-۱ مواد تشکیل‌دهنده

نام مواد	مقدار
هضم‌شده پپتیک بافت حیوانی	۱٫۰ g
آب	۱۰۰۰ ml

۵-۲-۳-۱-۲ آماده‌سازی

یک گرم، هضم‌شده پپتیک بافت حیوانی را در آب حل نموده و به حجم یک لیتر برسانید. همراه با هم زدن حرارت دهید. پس از تقسیم محیط کشت در ظروف مناسب، آن را در اتوکلاو با دمای ۱۲۱°C به مدت زمان ۱۵ دقیقه سترون کنید.

pH نهایی محیط کشت پس از سترون‌سازی باید برابر ۷٫۱±۰٫۲ در دمای آزمایشگاه باشد.

۵-۲-۳-۲ سایر محلول‌های رقیق‌کننده و خنثی‌کننده

در صورت لزوم، سایر محلول‌های رقیق‌کننده را مطابق با پیوست **ب** استفاده کنید.

۵-۳ محلول‌های رقیق‌کننده برای سوسپانسیون مخمر (محلول تریپتون سدیم کلراید)

۵-۳-۱ مواد تشکیل‌دهنده

نام مواد	مقدار
تریپتون، هضم‌شده پانکراتیک کازئین	۱٫۰۰ g
سدیم کلرید	۸٫۵۰ g
آب	۱۰۰۰ ml

۵-۳-۲ آماده‌سازی

مواد فوق را با هم زن و حرارت دادن در آب حل کنید. سپس آن را در ظروف مناسب تقسیم و در اتوکلاو با دمای ۱۲۱°C به مدت زمان ۱۵ دقیقه سترون کنید. پس از سترون‌سازی، pH نهایی باید برابر ۷٫۰±۰٫۲ در دمای آزمایشگاه باشد.

۵-۴ محیط‌های کشت

۵-۴-۱ کلیات

محیط‌های کشت را با استفاده از روش‌های تعیین‌شده، مطابق با این استاندارد یا محیط های کشت بـدون آب را مطابق دستورالعمل سازنده آماده کنید.
چنانچه از محیط‌های کشت آماده مصرف[1] استفاده می‌شود، مواد تشکیل‌دهنده آن باید قابل مقایسه با فرمولاسیون داده‌شده در این استاندارد باشد.

۵-۴-۲ سابورود دکستروز کلرامفنیکل آگار (SDCA) [2]

۵-۴-۲-۱ مواد تشکیل‌دهنده

نام مواد	مقدار
دکستروز	۴۰/۰ g
هضم‌شده پپتیک بافت حیوانی	۵/۰ g
هضم شده پانکراتیک کازئین	۵/۰ g
کلرامفنیکل	۰/۰۵۰ g
آگار	۱۵/۰ g
آب	۱۰۰۰ml

۵-۴-۲-۲ آماده‌سازی

مواد فوق (شامل کلرامفنیکل) یا محیط کشت کامل بدون آب را با حرارت دادن در آب حل کنید. پس از تقسیم محیط کشت در ظروف مناسب، آن را در اتوکلاو با دمای ۱۲۱°C به مدت زمـان ۱۵ دقیقـه سـترون کنیـد. pH نهایی محیط کشت پس از سترون‌سازی باید برابر ۰/۲±۶/۵ در دمای آزمایشگاه باشد.

یادآوری- برای فرآورده‌های شناخته‌شده وغیرآلوده (با باکتری‌ها)، از محیط کشت بدون کلرامفنیکل استفاده می‌شود.

۵-۴-۳ سایر محیط‌های کشت

در صورت لزوم از سایر محیطهای کشت، مطابق با پیوست **پ** استفاده کنید.

۵-۴-۴ محیط کشت جامد برای کشت سویه‌های مرجع: سابورود دکستروز آگار (SDA)

۵-۴-۴-۱ مواد تشکیل‌دهنده

1- Ready-to-use
2- Sabouraud dextrose chloramphenicol agar medium

نام مواد	مقدار
دکستروز	۴۰٫۰ g
هضم شده پپتیک بافت حیوانی[1]	۵٫۰ g
هضم شده پانکراتیک کازئین	۵٫۰ g
آگار	۱۵٫۰ g
آب	۱۰۰۰ml

۵-۴-۴-۲ آماده‌سازی

مواد فوق یا محیط کشت کامل بدون آب را با حرارت دادن در آب حل کنید. پس از تقسیم محیط کشت در ظروف مناسب، آن را در اتوکلاو با دمای $121\ ^{\circ}C$ به مدت زمان ۱۵ دقیقه سترون کنید. pH نهایی محیط کشت پس از سترون‌سازی باید برابر۰٫۲±۵٫۶ در دمای آزمایشگاه باشد.

۶ وسایل

از وسایل و تجهیزات آزمایشگاهی، مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۶۸استفاده کنید.

۷ سویه‌های میکروارگانیسم‌ها

برای آزمون کارایی مواد خنثی‌کننده، از یک سویه مخمر مرجع استفاده می شود:

- *کاندیدا آلبیکنس*[2] ATCC 10231[3] یا سویه معادل آن: 48.72IP[4] یاNCPF 3179[5]یا NBRC 1594[6] یا KCTC 17025[7] یا TISTR[8]5779 یا سایر سویه‌های معادل در کلکسیون میکروارگانیسم‌های ایران PTCC[9]

برای روش «مناسب بودن» می‌توان از سویه مخمر انتخاب شده که نسبت به کپک‌ها حساسیت بیشتری به فعالیت ضدقارچی دارد، به عنوان نماینده قارچ‌ها (کپک و مخمر) استفاده کرد. اگر چه در موارد خاص ممکن است، آزمون کارایی مواد خنثی‌کننده با سویه کپک مرجع با استفاده از روش مناسب برای

1- Peptic digest of animal tissue
2- *Candida albicans*
3- American Type Culture Collection
4- Institute Pasteur
5- National Collection of Pathogenic Fungi
6- National Biological Resource Center
7- Korean Collection for Type Culture
8- Thailand Institute of Scientific and TechnologicalResearch
9- Persian Type Culture Collection

آماده‌سازی مایه تلقیحی کالیبره‌شده انجام شود (برای مثال به زیربند ۵-۴-۱-۴ استاندارد ملی ایران شماره ۱۹۸۵۱ مراجعه شود). (به منبع شماره ۳ ارائه شده در کتابنامه مراجعه کنید)

کشت سویه‌ها باید مطابق با دستورالعمل تعیین‌شده توسط تامین‌کننده سویه‌های مرجع انجام شود. نگهداری سویه‌ها در آزمایشگاه باید مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۵۰۵ باشد.

۸ نگهداری فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی و نمونه‌های آزمایشگاهی

در صورت لزوم نمونه‌های مورد آزمون را در دمای آزمایشگاه نگهداری کنید.

پیش یا پس از انجام آزمون، از قرار دادن فرآورده‌ها (طبق زیربند ۳-۳) و نمونه‌ها (طبق زیربند ۳-۴) در گرمخانه، یخچال یا فریزر خودداری کنید.

نمونه‌برداری از فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی را مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۶۸ انجام دهید. آنالیز نمونه‌ها را مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۶۸ و بند ۹ این استاندارد انجام دهید.

۹ روش آزمون

۹-۱ توصیه‌های کلی

برای آماده‌سازی نمونه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌ها از مواد و تجهیزات سترون و روش‌های اسپتیک[1] استفاده کنید. برای آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه، زمان بین پایان آماده‌سازی و تماس مایه تلقیحی با آبگوشت غنی‌کننده نباید بیشتر از ۴۵ دقیقه باشد. مگر آن که به طور خاص در روش آزمون تعیین شده باشد.

۹-۲ آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه

۹-۲-۱ کلیات

سوسپانسیون اولیه با حداقل g ۱ یا ml ۱ فرآورده مورد آزمون که کاملاً مخلوط شده، آماده می‌شود.

وزن یا حجم دقیق نمونه ، s را یادداشت کنید.

سوسپانسیون اولیه به طور معمول رقت ۱به ۱۰ می‌باشد. چنانچه مقادیر آلودگی زیاد مورد انتظار باشد ویا خصوصیات ضدقارچی همچنان در رقت ۱ به ۱۰ وجود داشته باشد، حجم‌های بالاتری از محلول رقیق‌کننده مورد نیاز است.

1- Aseptic technique

۹-۲-۲ فرآورده‌های محلول در آب

نمونه S از فرآورده را بـه ظـروف دارای مقـدار مناسـب (بـرای مثـال ۹ ml) محلـول رقیـق‌کننـده خنثـی‌کننـده (طبق زیربند۵-۲-۲) یا رقیق‌کننده (طبق زیربند ۵-۲-۳) منتقل کنید.

فاکتور رقت d را یادداشت کنید..

۹-۲-۳ فرآورده‌های غیرمحلول در آب

نمونه S از فرآورده را به ظروف مناسب دارای مقدار کافی از مواد محلول‌کننده مناسب (برای مثال پلـی سـوربات ۸۰) منتقل کنید.

با استفاده از مواد محلول‌کننده، نمونه را پراکنده کنیـد و بـه آن مقـدار مناسـب (بـرای مثـال ۹ ml) از محلـول رقیق‌کننده خنثی‌کننده (طبق زیربند ۵-۲-۲) یا رقیق کننده (طبق زیربند ۵-۲-۳) را بیافزایید.

فاکتور رقت d را یادداشت کنید.

۹-۳ روش‌های شمارش

۹-۳-۱ تهیه رقت برای روش‌های شمارش

به‌طور معمول سوسپانسیون اولیه اولین رقت شمارش شده است. در صورت لزوم، رقت‌های متوالی بیشتر (بـرای مثال رقت ۱ به ۱۰) از سوسپانسیون اولیه با استفاده از همان رقیق‌کننده (با توجه به میزان آلودگی مورد انتظـار فرآورده)، تهیه می‌شود.

به طور کلی شمارش با استفاده از حداقل دو پلیت انجام می‌شود. اما در آزمـون‌هـای روزمـره، یـا در صـورتی‌کـه شمارش در دو رقت متوالی از همان نمونه انجام شود و یا با استناد به نتایج آزمون‌های قبلی فقط استفاده از یک پلیت امکان‌پذیر است.

۹-۳-۲ روش‌های شمارش در پلیت

۹-۳-۲-۱ روش کشت آمیخته[1]

یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اولیه و/ یا رقتی از نمونه که «مناسب بودن» آن (طبق بند ۱۲) اثبات شـده اسـت را به پتری دیش‌های با قطر ۸۵ mm تا ۱۰۰ mm منتقل کنید. سپس مقدار ۱۵ ml تا ۲۰ml از محـیط کشـت جامد (طبق زیربند ۵-۴-۲) ذوب‌شده را که در حمام آب با دمای حـداکثر ۴۸°C نگهـداری شـده اسـت، بـه آن بیافزایید. چنانچه از پتری دیش‌های بزرگتر استفاده می‌شود ، بـه همـان نسـبت مقـدار محـیط کشـت افـزایش می‌یابد.

1- Pour-plate metod

با حرکت یا چرخش پلیت، سوسپانسیون اولیه و/یا رقتی از نمونه را با محیط کشت مخلوط کنید تا به خوبی در کل محیط کشت پخش شود. پلیت‌ها را روی سطح افقی، در دمای آزمایشگاه قرار دهید تا محتویات پلیت‌ها جامد شود.

۹-۳-۲-۲ روش کشت سطحی[1]

به پلیت با قطر ۸۵ mm تا ۱۰۰ mm مقدار ۱۵ ml تا ۲۰ ml از محیط کشت آگار ذوب‌شده[2] (طبق زیربند ۵-۴-۲) را که در حمام آب با دمای حداکثر ۴۸°C نگهداری شده است، اضافه کنید. چنانچه از پتری دیش‌های بزرگتر استفاده می‌شود، به همان نسبت مقدار محیط کشت افزایش می یابد.

صبر کنید تا محیط جامد شود برای مثال در کابینت میکروبیولوژی یا در یک گرمخانه. روی سطح محیط کشت حداقل ۰٫۱ ml از سوسپانسیون اولیه و/ یا رقتی از نمونه را که مطابق با بند ۱۲ این استاندارد آماده شده است، پخش کنید.

۹-۳-۲-۳ روش صافی غشایی[3]

از صافی غشایی با اندازه روزنه کمتر یا برابر با ۰٫۴۵ µm استفاده کنید.

مقدار مناسبی از سوسپانسیون اولیه یا رقتی از نمونه که مطابق با بند ۱۲ آماده و «مناسب بودن» آن اثبات شده باشد را به صافی غشایی منتقل نمائید.

بلافاصله نمونه را صاف کنید و صافی غشایی را (طبق روش «مناسب بودن» آزمون مطابق با بند ۱۲) شستشو دهید.

صافی غشایی را بر روی سطح محیط کشت آگار (طبق زیربند ۵-۴-۲) منتقل کنید.

۹-۳-۲-۴ گرمخانه‌گذاری

پلیت‌ها را به صورت وارونه در دمای°C (۲٫۵± ۲۵) به مدت ۳ روز تا ۵ روز گرمخانه‌گذاری کنید (طبق زیربندهای ۴-۲ و ۴-۳) یا از شرایط جایگزین (طبق زیربند ۴-۲ و ۴-۳) استفاده کنید.

پس از پایان زمان گرمخانه‌گذاری، در صورت امکان پلیت‌ها را بلافاصله بررسی کنید.

در صورتی که بررسی پلیت‌ها پس از گرمخانه‌گذاری امکان‌پذیر نباشد، می‌توانید آن‌ها را به مدت حداکثر ۲۴ ساعت دردمای °C (۳± ۵) در یخچال نگهداری کنید.

1- Surface spread method
2- Melted agar medium
3- Membrane filtration method

یادآوری۱- در صورتی که در موارد خاص، احتمال اشتباه گرفتن ذرات فرآورده با کلنی وجود دارد، به منظور پیشگیری از ایجاد در شمارش، بهتر است برای مقایسه با پلیت‌های گرمخانه‌گذاری شده، دو پلیت حاوی همان رقت و محیط کشت را تهیه و در یخچال نگهداری کنید.

یادآوری ۲- در صورت مشکوک بودن به وجود مخمر و کپک، می‌توان پلیت‌ها را در مدت زمان کمتر از ۲۴ ساعت نیز بررسی کرد.

۱۰ شمارش کلنی (روش‌های شمارش در پلیت و صافی غشایی)

پس از گرمخانه‌گذاری پلیت‌هایی را برای شمارش انتخاب کنید که:

- حاوی ۱۵ کلنی تا ۱۵۰ کلنی در هر پلیت باشند. چنانچه کمتر از ۱۵ کلنی شمارش شود به زیربند ۱۱-۲-۳ مراجعه کنید .
- حاوی ۱۵ کلنی تا ۱۵۰ کلنی بر روی هر صافی غشایی باشند. چنانچه کمتر از ۱۵ کلنی شمارش شود به زیربند ۱۱-۲-۳ مراجعه کنید .

۱۱ بیان نتایج

۱۱-۱ روش محاسبه برای شمارش در پلیت

تعداد (N)میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه S را با استفاده از پارامترهای زیر محاسبه کنید:

m میانگین حسابی شمارش‌های به‌دست آمده از دو پلیت در فرمول شماره ۱؛

c تعداد کلنی‌های شمارش‌شده بر روی یک پلیت در فرمول شماره ۲ ، یا

wm میانگین ارزیابی‌شده شمارش‌های به‌دست آمده از دو رقت متوالی در فرمول شماره ۳ .

مطابق با فرمول های ۱، ۲ و ۳، تعداد میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه را محاسبه کنید:

$$N=m/(V.d) \quad (۱)$$

$$N=c/(V.d) \quad (۲)$$

$$N=wm/(V.d) \quad (۳)$$

که در آن:

m میانگین حسابی شمارش‌های به‌دست آمده از دو پلیت؛

V حجم ماده تلقیحی به هر پلیت، برحسب میلی‌لیتر؛

d ضریب رقت مربوط به رقت آماده‌شده برای تهیه سوسپانسیون اولیه (طبق زیربند ۹-۲) یا برای اولین رقت شمارش شده؛

c تعداد کلنی‌های شمارش‌شده روی یک پلیت است؛

$\bar{X}_c$ میانگین ارزیابی شده شمارش کلنی‌ها، از دو رقت متوالی می‌باشدکه با استفاده از فرمول شماره ۴ محاسبه می‌شود:

$$\bar{X}_c = \frac{\sum c}{(n_1 + 0.1 n_2)} \qquad (۴)$$

که در آن:

$\sum c$ مجموع کلنی‌های شمارش‌شده برروی تمام پلیت‌های حاصل از دو رقت متوالی؛

n_1 تعداد پلیت‌های شمارش‌شده برای سوسپانسیون اولیه (یا اولین رقت شمارش‌شده)؛

n_2 تعداد پلیت‌های شمارش‌شده برای رقت ۱ به ۱۰ از سوسپانسیون اولیه (یا دومین رقت شمارش‌شده) می‌باشد.

نتیجه را تا دو رقم معنی‌دار گرد کنید. برای انجام این کار، چنانچه رقم آخر کمتر از ۵ باشد، عدد مورد نظر تغییر نمی‌کند. چنانچه رقم آخر عدد ۵ یا بیشتر از آن باشد، یک واحد به آن اضافه می‌شود. گرد کردن عدد را تا به‌دست آوردن دو رقم معنی دار تکرار کنید. تعداد Nبه‌دست آمده را یادداشت کنید.

۱۱-۲ تفسیر نتایج

۱۱-۲-۱ در روش شمارش، تغییرات ذاتی شمارش در پلیت باید در نظر گرفته شود. چنانچه تفاوت از ٪ ۵۰ و یا لگاریتم آن از ۰٫۳ بیشتر باشد، باید دو نتیجه را متفاوت در نظر گرفت.

برای دقیق بودن شمارش، فقط پلیت‌ها یا صافی غشایی‌هایی که بیشتر از ۱۵ کلنی و کمتر از ۱۵۰ کلنی دارند را برای شمارش در نظر بگیرید. دقت کنید که شمارش از رقت‌هایی که «مناسب بودن» آن برای روش انتخاب شده اثبات شده باشد انجام شود. (به بند ۱۲ مراجعه کنید)

۱۱-۲-۲ زمانی که تعداد واحد های تشکیل دهنده کلنی یا CFU بر روی پلیت‌ها و صافی‌ها بین ۱۵ کلنی تا ۱۵۰ کلنی باشد، نتایج را مطابق زیربندهای ۱۱-۲-۲-۱ و ۱۱-۲-۲-۲ بیان کنید.

۱۱-۲-۲-۱ چنانچه S حداقل ۱ g یا۱ ml و V حداقل ۱ ml باشد تعداد مخمر و کپک در هر میلی‌لیتر یا در هرگرم نمونه برابر N/S است.

۱۱-۲-۲-۲ چنانچه S کمتر از g ۱یا ml ۱ و/ یا V کمتر از ml ۱ باشد، تعداد مخمر و کپک در نمونه (مقدار آزمون شده از نمونه با در نظر گرفتن S و Vباشد) برابر $\boldsymbol{N}$ است

که s وزن یا حجم نمونه (طبق زیربند ۹-۲) است.

نتیجه را به صورت عددی بین ۱/۰ تا ۹/۹ ضرب در توان مناسبی از۱۰ گزارش کنید (به مثال‌ها مراجعه شود).

۱۱-۲-۳ چنانچه تعداد واحد های تشکیل دهنده کلنی یا CFU بر روی پلیت ها و صافی‌ها کمتر از ۱۵ کلنی باشد، نتایج را مطابق با زیربندهای ۱۱-۲-۳-۱ و ۱۱-۲-۳-۲ بیان کنید.

۱۱-۲-۳-۱ چنانچه S حداقل g ۱ یا ml ۱ و V حداقل ml ۱ باشد، تعداد تخمینی مخمر و کپک در هر میلی‌لیتر یا در هرگرم نمونه برابر N/S است.

۱۱-۲-۳-۲ چنانچه S کمتر از g ۱ یا ml ۱ و/ یا V کمتر از ml ۱ باشد، تعداد تخمینی مخمر و کپک در نمونه برابر $\boldsymbol{N}$ است

که در آن s وزن یا حجم نمونه (طبق زیربند ۹-۲) است.

نتیجه را به صورت عددی بین ۱/۰ تا ۹/۹ ضرب در توان مناسبی از ۱۰ گزارش کنید (به مثال‌ها مراجعه شود)

۱۱-۲-۴ چنانچه هیچ کلنی مشاهده نشود، نتایج را به صورت زیر گزارش کنید:

کمتر از 1/d.v.s مخمر و کپک در هر گرم یا در هر میلی لیتر فرآورده ($\boldsymbol{S}$ حداقل g ۱ یا ml ۱ می‌باشد)؛

کمتر از 1/d.v مخمر و کپک در نمونه $\boldsymbol{S}$ (توجه داشته باشید مقدار آزمون شده از نمونه در محاسبه **S** و **V** آورده شود) ($\boldsymbol{S}$ کمتر از g ۱ یا ml ۱ می‌باشد).

که در آن:

d ضریب رقت سوسپانسیون اولیه (طبق زیربند ۹-۲)؛

V که برابر یک می‌باشد (برای شمارش به روش کشت آمیخته و روش صافی غشایی) یا ۰/۱ (برای روش کشت سطحی) می‌باشد (به مثال مراجعه شود).

مثال۱: دو پلیت برای یک رقت

1ml یا S=1g ؛ V=1 شمارش به‌دست آمده: برای رقت $۱۰^{-۱}$، ۳۸ و۴۲.

برای فرمول (۱):

$$N = m/(V \cdot d) = 40/(1 \cdot 10^{-1}) = 40/0{,}1 = 400 \text{ or } 4 \cdot 10^2$$

۴×۱۰^{۲} تعداد مخمر و کپک در هر میلی‌لیتر یا در هر گرم نمونه است.

مثال ۲: یک پلیت برای یک رقت

1ml یا S=1g ؛ V=1 شمارش به‌دست آمده: برای رقت $۱۰^{-۱}$، ۶۰ .

برای فرمول (۲):

$$N = c/(V \cdot d) = 60/(1 \cdot 10^{-1}) = 60/0{,}1 = 600 \text{ or } 6 \cdot 10^2$$

۶×۱۰^{۲} تعداد مخمر و کپک در هر میلی‌لیتر یا هر گرم نمونه است.

مثال ۳: دو پلیت برای دو رقت

1ml یا S=1g ؛ V=1 شمارش به‌دست آمده: برای رقت $۱۰^{-۲}$، ۲۳۵ و ۲۸۲ ،

1ml یا S=1g ؛ V=1 شمارش به‌دست آمده: برای رقت $۱۰^{-۳}$، ۳۱ و ۳۹ .

برای فرمول (۳):

$$N = \bar{x}_c/(V \cdot d) = 235 + 282 + 31 + 39/1(2 + 0{,}1 \cdot 2) \cdot 10^{-2} = 587/0{,}022 = 26\,682$$

نتیجه را به صورت ۲۷۰۰۰ یا $۲٫۷\times۱۰^{۴}$ مخمر و کپک در هر میلی‌لیتر یا هر گرم نمونه گرد کنید.

مثال ۴ : دو صافی غشایی برای یک رقت

1ml یا S=1g ؛ V=1 شمارش به‌دست آمده: برای رقت $۱۰^{-۱}$ ، ۱۸، ۲۲ .

برای فرمول (۱):

$$N = m/(V \cdot d) = 20/(1 \cdot 10^{-1}) = 20/0{,}1 = 200 \text{ or } 2 \cdot 10^2$$

۲×۱۰^{۲} تعداد مخمر و کپک در میلی‌لیتر یا گرم نمونه است.

مثال ۵: یک صافی غشایی برای یک رقت

1ml یا S=1g ؛ V=1 شمارش به دست آمده: برای رقت $۱۰^{-۱}$، ۶۵ .

برای فرمول (۲):

$$N = c/(V \cdot d) = 65/(1 \cdot 10^{-1}) = 65/0{,}1 = 650 \text{ or } 6{,}5 \cdot 10^2$$

$۶٫۵\times۱۰^{۲}$ تعداد مخمر و کپک در هر میلی‌لیتر یا هر گرم نمونه است.

مثال ۶: دو صافی غشایی برای دو رقت

1ml یا S=1g ؛ V=1 شمارش به‌دست آمده: برای رقت $۱۰^{-۱}$، ۱۲۱ و ۱۰۵.

1ml یا S=1g ؛ V=1 شمارش به‌دست آمده: برای رقت $۱۰^{-۲}$، ۱۵ و ۲۵.

برای فرمول (۳):

$$N = \bar{x}_c/(V \cdot d) = (121 + 105 + 15 + 25)/1\ (2 + 0{,}1 \cdot 2) \cdot 10^{-1} = 266/0{,}22 = 1\ 209$$

نتیجه را به صورت ۱۲۰۰ یا $۱٫۲\times۱۰^{۳}$ مخمر و کپک در هر میلی‌لیتر یا هر گرم نمونه گرد کنید.

مثال ۷ : دو پلیت برای یک رقت

1ml یا S=1g ؛ V=1 شمارش به‌دست آمده: برای رقت $۱۰^{-۱}$، ۲۸ و ۲۲.

برای فرمول (۱):

$$N = m/(V \cdot d) = 25/(1 \cdot 10^{-1}) = 25/0{,}1 = 250$$

تعداد تخمینی ۲۵۰ یا $۲٫۵\times۱۰^{۲}$ مخمر و کپک در هر میلی‌لیتر یا هر گرم نمونه می‌باشد.

مثال ۸: 1ml یا S=1g ؛ V=1 شمارش به دست آمده: برای رقت $۱۰^{-۱}$، صفر و صفر.

برای فرمول (۱):

$$N = \leq 1/d \cdot V \cdot S, \leq (1/0{,}1) \cdot 1 \cdot 1 \leq 10$$

تعداد تخمینی کمتر از ۱۰ مخمر و کپک در هر میلی‌لیتر یا هر گرم فرآورده می‌باشد.

۱۲ خنثی‌سازی خصوصیات ضدقارچی فرآورده

۱-۱۲ کلیات

آزمون‌های مختلف شرح داده‌شده در زیرنشان می‌دهد که این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند تحت شرایط آزمون رشد کنند.

۲-۱۲ آماده‌سازی مایه تلقیحی

پیش از انجام آزمون، سطح محیط کشت جامد غیر انتخابی سابورود دکستروز آگار (SDA) را با *کاندیدا آلبیکنس* تلقیح کنید.

پلیت‌ها را در دمای $^{\circ}$C (۳۲٫۵ ±۲٫۵) به مدت زمان h ۱۸تا h ۲۴ گرمخانه‌گذاری کنید. با استفاده از حلقه کشت سترون مقداری از کپک یا مخمر را از سطح محیط کشت برداشت کرده و آن را در محلول رقیق‌کننده (طبق زیربند ۵-۲) حل کنید تا سوسپانسیون تنظیم شده‌ای در حدود۱×۱۰^{۶} CFU/ml به‌دست آید (برای مثال با استفاده از اسپکتروفتومتر مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۶۸)

از سوسپانسیون تنظیم‌شده فوق و رقت های آن در مدت h ۲ استفاده کنید.

۱۲-۳ «مناسب بودن» روش های شمارش

۱۲-۳-۱ اصول آزمون

نمونه خنثی‌شده (سوسپانسیون اولیه یا رقتی از نمونه بر اساس فعالیت ضد قارچی یا حلالیت کم فرآورده) را با رقتی از سویه مرجع، مخلوط کنید. سپس آن را روی یک پلیت یا صافی غشایی منتقل کنید. پس از گرمخانه-گذاری، ویژگی کلنی‌ها را بررسی کنید و تعداد کلنی را با یک کنترل (بدون نمونه) مقایسه کنید.

چنانچه شمارش کمتر از ٪۵۰ (لگاریتم ۰٫۳) در پلیت کنترل باشد، روش آزمون (مواد رقیق‌کننده، عوامل خنثی‌کننده یا ترکیبی از هر دو) را تغییر دهید (به پیوست **ت** مراجعه شود). در صورت عدم رشد ماده تلقیحی، روش آزمون تایید نشده است. در غیر این صورت، می‌توان در نظر گرفت که احتمال آلودگی فرآورده با این میکروارگانیسم وجود ندارد.

۱۲-۳-۲ «مناسب بودن» روش کشت آمیخته

۹ml سوسپانسیون اولیه و/یا رقت(هایی) از نمونه در محلول رقیق‌کننده خنثی‌کننده (یا سایر رقیق کننده‌ها مطابق با زیربند ۵-۲) را با ۱ ml از سوسپانسیون میکروارگانیسم حاوی CFU/ml ۱۰۰۰ تا CFU/ml ۳۰۰۰ مخلوط کنید.۱ ml از آن را به یک پتری دیش (ترجیحا دو پلیت) منتقل کنید و مقدار ۱۵ ml تا ۲۰ ml از محیط کشت آگار ذوب‌شده (طبق زیربند ۵-۴-۲) را که در حمام آب با دمای حداکثر $^{\circ}$C ۴۸ نگهداری شده است، به آن اضافه کنید. همزمان، پلیت کنترل را با همان محلول رقیق‌کننده وهمان سوسپانسیون میکروارگانیسم، بدون تلقیح نمونه، تهیه کنید. پس از گرمخانه‌گذاری در دمای $^{\circ}$C (۲٫۵± ۲۵) به مدت ۳ روز تا ۵ روز یا شرایط جایگزین دیگر (مطابق با یادآوری‌های زیربندهای ۴-۲ و ۴-۳)، کلنی‌های ایجادشده بر روی پلیت‌ها را شمارش کنید و شمارش به‌دست آمده از پلیت‌های آزمون و کنترل را با هم مقایسه کنید. چنانچه شمارش آزمون «مناسب بودن» حداقل، ٪۵۰ شمارش پلیت کنترل باشد، محلول رقیق‌کننده و روش شمارش در رقت ۱ به ۱۰ (زمانی که ۱ ml از سوسپانسیون اولیه مورد استفاده قرار می‌گیرد)، رضایت‌بخش است.

۱۲-۳-۳ «مناسب بودن» روش کشت سطحی

۹ml سوسپانسیون اولیه در رقیق‌کننده خنثی‌کننده (یا سایر رقیق کننده‌ها مطابق با زیربند ۵-۲) با ۱ml از سوسپانسیون میکروارگانیسم حاوی CFU/ml ۱۰۰۰۰ تا CFU/ml ۳۰۰۰۰ (یا کمتر از آن، چنانچه ۰٫۵ml یا ۱ml بر روی سطح پلیت گسترده می‌شود)، مخلوط کنید. حداقل ۰٫۱ml از آن را بر روی سطح آگار ذوب‌شده (طبق زیربند ۵-۴-۲) (ترجیحا دو پلیت) پخش کنید و همزمان پلیت کنترل را با همان رقیق‌کننده و همان سوسپانسیون میکروارگانیسم بدون تلقیح نمونه تهیه کنید. پس از گرمخانه‌گذاری در دمای $^{\circ}$C (۲٫۵± ۲۵) به مدت ۳ روز تا ۵ روز یا شرایط جایگزین دیگر (مطابق با یادآوری‌های زیربندهای ۴-۲ و ۴-۳)، کلنی‌های تشکیل‌شده روی پلیت‌ها را شمارش کنید و شمارش به‌دست آمده از پلیت آزمون و کنترل را با هم مقایسه کنید.

چنانچه شمارش آزمون «مناسب بودن» حداقل، ٪۵۰ (لگاریتم ۰٫۳) شمارش پلیت کنترل باشد، محلول رقیق کننده و روش شمارش در رقت ۱ به ۱۰ (زمانی که 1ml از سوسپانسیون اولیه مورد استفاده قرار می‌گیرد) رضایت بخش می باشد.

۱۲-۳-۴ «مناسب بودن» روش صافی غشایی

به حجمی از سوسپانسیون اولیه یا رقتی از نمونه مورد آزمون (طبق زیربند ۹-۳-۲-۳)، مقدار مناسبی (تقریباً ۱۰۰CFU) از سوسپانسیون تنظیم شده میکروارگانیسم را بیافزایید.

بلافاصله صاف کنید و با حجم مشخصی از آب (طبق زیربند ۵-۱)، رقیق‌کننده (طبق زیربند ۵-۲-۳) یا رقیق-کننده خنثی‌کننده (طبق زیربند ۵-۲-۲) صافی غشایی را شستشو دهید. (طبق زیربند ۵-۱)، سپس صافی غشایی را بر روی سطح محیط کشت مناسب جامد منتقل کنید (طبق زیربند ۵-۴-۲).

بطور همزمان، نمونه کنترل را با شرایط شرح داده‌شده در بالا (بدون نمونه) تهیه کنید. سپس آن را صاف کنید و تحت همان شرایط شستشو دهید.

پس از گرمخانه‌گذاری در دمای $^{\circ}C$ (۲٫۵± ۲۵) به مدت ۳ روز تا ۵ روز یا شرایط جایگزین دیگر (مطابق با یادآوری‌های زیربندهای ۴-۲ و ۴-۳)، کلنی‌های ایجادشده بر روی صافی غشایی‌ها را شمارش کنید و شمارش به‌دست آمده از پلیت‌های آزمون و کنترل را با هم مقایسه کنید. چنانچه شمارش در پلیت‌های آزمون «مناسب بودن» حداقل، ٪۵۰ (لگاریتم ۰٫۳) شمارش پلیت‌های کنترل باشد، محلول رقیق‌کننده و روش صافی غشایی رضایت‌بخش می‌باشد.

۱۳ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی‌های زیر باشد:

۱۳-۱ کلیه اطلاعات لازم برای شناسائی کامل فرآورده؛

۱۳-۲ روش آزمون طبق استاندارد ملی ایران ؛

۱۳-۳ نتایج به‌دست آمده؛

۱۳-۴ تمام جزئیات کار برای تهیه سوسپانسیون اولیه؛

۱۳-۵ شرح روش خنثی‌سازی و محیط های کشت استفاده شده؛

۱۳-۶ «مناسب بودن» روش، حتی اگر آزمون به صورت جداگانه انجام شده است؛

۱۳-۷ هر نکته‌ای که در این استاندارد مشخص‌نشده و یا اختیاری در نظر گرفته شده است و جزئیات هر رویدادی که ممکن است روی نتایج آزمون تاثیرگذار باشد؛

۱۳-۸ تاریخ انجام آزمون؛

۱۳-۹ نام و نام خانوادگی و امضای آزمایش کننده.

پیوست الف

(آگاهی دهنده)

سایر محلول‌های رقیق‌کننده خنثی‌کننده

الف-۱ کلیات

برای تهیه سوسپانسیون اولیه، استفاده از هر رقیق‌کننده خنثی‌کننده دیگری که «مناسب بودن» آن اثبات شده باشد، می توان استفاده کرد. محلول‌های رقیق‌کننده‌های خنثی‌کننده تعیین‌شده در بندهای الف-۲ و الف-۳، مثال‌هایی از ترکیبات مناسب برای استفاده می‌باشد. برای دریافت آگاهی بیشتر از ترکیبات خنثی‌کننده، به پیوست **ت** مراجعه کنید.

الف-۲ آبگوشت مایع اگون LT100[1]

الف-۲-۱ کلیات

این محلول رقیق‌کننده دارای ترکیباتی است که باعث خنثی شدن مواد ممانعت‌کننده موجود در نمونه می‌شود: لستین و پلی‌سوربات ۸۰ و ماده پراکنده‌کننده اکتوکسی‌نول ۹[2].

الف-۲-۲ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
هضم‌شده پانکراتیک کازئین	۱۵/۰g
هضم‌شده پاپائیک سویا[3]	۵/۰g
ال - سیستین	۰/۷g
سدیم کلراید	۴/۰g
سدیم سولفیت	۰/۲g
گلوکز	۵/۵g
لسیتین تخم‌مرغ	۱/۰g
پلی‌سوربات ۸۰	۵/۰g
اکتوکسی‌نول ۹	۱/۰g
آب	۱۰۰۰ml

1- Eugon LT100 liquid broth
2- Octoxynol 9
3- Papaic digest of soybean meal

الف-۲-۳ آماده‌سازی

پلی سوربات ۸۰، اکتوکسی نول ۹ و لسیتین زردهٔ تخم‌مرغ را یکی پس از دیگری در آب جوش بریزید و به طور کامل حل کنید. سپس در حالی که محلول فوق حرارت داده می‌شود، سایر مواد را در آب حل کنید. محیط کشت را پس از تقسیم در ظروف مناسب در اتوکلاو با دمای $121^{\circ}C$ به مدت زمان ۱۵min سترون کنید.

پس از سترون‌سازی ، pH نهایی باید برابر ۰/۲±۷/۰ در دمای آزمایشگاه باشد.

الف-۳ رقیق‌کننده لسیتین پلی سوربات[1] (LP)

الف-۳-۱ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
پلی‌پپتون	۱/۰g
لسیتین تخم‌مرغ	۰/۷g
پلی‌سوربات ۸۰	۲۰/۰g
آب	۹۸۰ml

الف-۳-۲ آماده‌سازی

مواد فوق را با هم زدن و حرارت دادن در آب حل کنید. قبل از تقسیم محیط کشت در ظروف مناسب آن را تا دمای $25^{\circ}C$ سرد کنید. سپس در اتوکلاو با دمای $121^{\circ}C$ به مدت زمان ۱۵min سترون کنید.

پس از سترون سازی، pH نهایی باید برابر ۰/۲±۷/۲ در دمای آزمایشگاه باشد.

1- Lecithin polysorbate diluent

پیوست ب
(آگاهی دهنده)
سایر محلول‌های رقیق‌کننده

ب-۱ کلیات

برای تهیه سوسپانسیون اولیه، از هر محلول رقیق‌کننده دیگر که «مناسب بودن» آن اثبات شده باشد، می توان استفاده نمود. مثالی از رقیق‌کننده مناسب در بند ب-۲ ارائه شده است.

ب-۲ محلول پپتون بافری[1] (pH = 7)

ب-۲-۱ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
پپتون گوشت	۱/۰g
سدیم کلراید	۴/۳g
مونو پتاسیم فسفات	۳/۶g
دی سدیم فسفات بدون آب	۷/۲g
آب	۱۰۰۰ml

ب-۲-۲ آماده‌سازی

مواد فوق را در آب جوش حل کنید. قبل از تقسیم محیط کشت در ظروف مناسب آن را تا دمای ۲۵°C سرد کنید. سپس در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ °C به مدت زمان ۱۵min سترون کنید.
پس از سترون‌سازی، pH نهایی باید برابر ۷/۱±۰/۲ در دمای آزمایشگاه باشد.

ب-۳ بافر فسفات[2] (pH =7.2)

ب-۳-۱ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
پتاسیم دی هیدروژن فسفات	۳۴g
آب	۵۰۰ml

1- Buffered peptone solution
2- Phosphate buffer

ب-۳-۲ آماده‌سازی

مواد فوق را در آب در یک ارلن مدرج با گنجایش ۱۰۰۰ ml حل کنید. pH را با استفاده از حدود ۱۷۵ ml سدیم هیدروکساید (۴٫۳g در۱۰۰ml) برابر ۷٫۲±۰٫۱ تنظیم کنید. سپس آب را تا حجم ۱۰۰۰ ml به آن بیافزایید غلظت نهائی محلول۰٫۰۵ mol/l می باشد. محلول فوق محلول ذخیره[1] است، آن را در یخچال نگهداری کنید. پیش از استفاده محلول ذخیره را به نسبت ۱ به ۸۰۰ با آب، رقیق کنید و آن را در اتوکلاو با دمای$^{\circ}$C ۱۲۱ به مدت زمان ۱۵ دقیقه سترون کنید.

1- Stock solution

پیوست پ
(آگاهی‌دهنده)
سایر محیط‌های کشت

پ-۱ کلیات

از هر محیط کشتی که «مناسب بودن» آن اثبات شده باشد، می‌توان استفاده نمود. محیط‌های کشت تعیین شده در بندهای پ-۲ و پ-۳، مثال هایی از محیط کشت مناسب برای استفاده می باشند.

پ-۲ محیط های کشت جامد برای شمارش

پ-۲-۱ سیب زمینی دکستروز آگار[1] با آنتی‌بیوتیک

پ-۲-۱-۱ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
عصاره سیب زمینی	۴/۰g
دکستروز	۲۰/۰g
آگار	۱۵/۰g
کلرامفنیکل	۰/۰۵g
آب	۱۰۰۰ml

پ-۲-۲-۱-۲ آماده‌سازی

مواد فوق را در آب حل کنید. پس از تقسیم محیط کشت در ظروف مناسب آن را در اتوکلاو با دمای ۱۲۱°C به مدت زمان ۱۵min سترون کنید.

پس از سترون‌سازی و سرد کردن محیط کشت، pH نهایی را برابر ۵/۶±۰/۲ در دمای آزمایشگاه تنظیم کنید.

به جای کلرامفنیکل می‌توان از ۰/۱۰ g بنزیل پنی‌سیلین پتاسیم[2] و ۰/۱۰ g تتراسایکلین[3] در هر لیتر محیط کشت استفاده کرد. آنتی‌بیوتیک‌های فوق باید به صورت سترون و درست پیش از استفاده به محیط کشت اضافه شود.

1- Potato dextrose agar
2- Benzylpenicillin potassium
3- Tetracycline

پ-۲-۲ محیط کشت گلوکز پپتون (GP) آگار با آنتی بیوتیک[1]

پ-۲-۲-۱ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
گلوکز	۲۰/۰g
عصاره مخمر	۲/۰g
سولفات منیزیم	۰/۵g
پپتون	۵/۰g
مونوبازیک پتاسیم فسفات	۱/۰g
آگار	۱۵/۰g
کلرامفنیکل	۰/۰۵g
آب	۱۰۰۰ml

پ-۲-۲-۲ آماده‌سازی

مواد فوق را در آب حل کنید. پس از تقسیم محیط کشت در ظروف مناسب، آن را در اتوکلاو با دمای ۱۲۱°C به مدت زمان ۱۵min سترون کنید.

پس از سترون‌سازی و سرد کردن محیط کشت، pH نهایی را برابر ۰/۱±۵/۷ دردمای آزمایشگاه تنظیم کنید.

به جای کلرامفنیکل می توان از ۰/۱۰ g بنزیل پنیسیلین پتاسیم و ۰/۱۰g تتراسایکلین در هر لیتر محیط کشت استفاده کرد.آنتی بیوتیک‌های فوق باید درست پیش از استفاده، به صورت سترون به محیط کشت اضافه شود.

پ-۳ محیط کشت عصاره مالت[2]

پ-۳-۱ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار
عصاره مالت	۳۰/۰g
پپتون سویا، هضم شده پاپائیک سویا	۳/۰g
آگار	۱۵/۰g
کلرامفنیکل	۰/۰۵g
آب	۱۰۰۰ml

1- Glucose-peptone (GP) agar medium with antibitics

2- Malt extract agar medium

پ-۳-۲ آماده‌سازی

مواد فوق (شامل کلرامفنیکل) یا محیط کشت کامل بدون آب را با حرارت دادن در آب حل کنید. پس از تقسیم محیط کشت در ظروف مناسب آن را در اتوکلاو با دمای ۱۱۵ $^{\circ}C$ به مدت زمان ۱۰min سترون کنید.
پس از سترون‌سازی، pH نهایی را برابر ۰٫۲±۵٫۶ در دمای آزمایشگاه تنظیم کنید.

پیوست ت
(آگاهی دهنده)
خنثی‌کننده‌های فعالیت ضدقارچی مواد نگهدارنده و مایعات آبکشی

در جدول ت-۱ ترکیبات شیمیائی مواد خنثی‌کننده فعالیت ضد قارچی مواد نگهدارنده و مایعات آبکشی ارائه شده است.

جدول ت-۱ ترکیبات شیمیایی خنثی‌کننده فعالیت ضدمیکروبی مواد نگهدارنده و مایعات آبکشی

مواد نگهدارنده	ترکیبات شیمیائی خنثی‌کنندهٔ فعالیت ضد قارچی مواد نگهدارنده	مثال‌هائی از مواد خنثی‌کننده و مایعات آبکشی مناسب (برای روش صافی غشایی)
ترکیبات فنلی: -پارابن ها فنوکسی اتانول -فنیل اتانول و غیره آنیلایدها	لسیتین پلی سوربات ۸۰ اتیلن اکساید متراکم شده حاصل از الکل های چرب سورفاکتانت های غیر یونی	پلی سوربات ۸۰، ۳۰ g/l+ لسیتین، ۳ g/l اتیلن اکساید متراکم شده حاصل از الکل های چرب، ۷ g/l+ لسیتین، ۲۰ g/l+ پلی سوربات ۸۰، ۴ g/l آبگوشت خنثی کننده D/E[a] مایعات آبکشی: آب مقطر، تریپتون، ۱ g/l + NaCl، ۹ g/l، پلی سوربات ۸۰، ۵ g/l
ترکیبات چهارتایی آمونیم سورفاکتانت‌های کاتیونی	لسیتین، ساپونین، پلی‌سوربات ۸۰ سدیم دودسیل سولفات اتیلن اکساید متراکم شده حاصل از الکل های چرب	پلی سوربات ۸۰، ۳۰ g /l+ سدیم دودسیل سولفات، ۴ g/l+ لسیتین، ۳ g/l پلی سوربات ۸۰، ۳۰ g /l+ ساپونین، ۳۰ g/l+ ال لسیتین، ۳ g/l آبگوشت خنثی‌کنندهD/E مایعات آبکشی: آب مقطر، تریپتون، ۱ g/l + NaCl، ۹ g/l، پلی سوربات ۸۰، ۵ g/l
آلدئیدها عوامل آزاد کننده فرمالدئید	گلیسین، هیستیدین	لسیتین، ۳ g/l+ پلی سوربات ۸۰، g/l ۳۰+ ال هیستیدین، ۱ g/l پلی سوربات ۸۰، g/l ۳۰+ ساپونین، g/l ۳۰+ ال هیستیدین، ۱ g/l + ال سیستین، ۱ g/l آبگوشت خنثی‌کننده D/E[a] مایعات آبکشی: پلی سوربات ۸۰، g/l ۳۰+ ال هیستیدین ۰/۵ g/l
ترکیبات اکسید کننده	سدیم تیو سولفات	سدیم تیوسولفات۵ g/l مایعات آبکشی: سدیم تیوسولفات۳ g/l
ایزوتیازولینون ها، ایمیدازول ها	لسیتین، ساپونین آمین‌ها، سولفات ها، مرکاپتان ها، سدیم بی سولفیت، سدیم تیوگلیکولات	پلی سوربات ۸۰، ۳۰ g/l+ ساپونین، ۳۰ g/l + لسیتین ۳ g/l مایعات آبکشی: تریپتون، ۱/ g/l + NaCl، ۹ g /l،پلی سوربات ۸۰، ۵ g/l

جدول ت-۱ ترکیبات شیمیایی خنثی‌کننده فعالیت ضدمیکروبی مواد نگهدارنده و مایعات آبکشی (ادامه)

مواد نگهدارنده	ترکیبات شیمیائی خنثی کنندهٔ فعالیت ضد میکروبی مواد نگهدارنده	مثال هائی از مواد خنثی کننده و مایعات آبکشی مناسب (برای روش صافی غشایی)
گوانیدهای دوتایی	لسیتین، ساپونین، پلی سوربات۸۰	پلی سوربات۸۰ ۳۰g/l+، ساپونین۳۰g/l+ لسیتین۳ g/l مایعات آبکشی: تریپتون، ۱g/l +NaCl، ۹g/l، پلی سوربات۸۰، ۵ g/l
نمک های متالیک(Cu,Zn,Hg) ترکیبات آلی جیوه	سدیم بی سولفات، ال-سیستئین ترکیبات سولفیدریل، تیوگلیکولیک اسید	سدیم تیو گلیکولات ۰٫۵g/l یا ۵g/l ال سیستین ۰٫۸g/l یا ۱٫۵g/l آبگوشت خنثی‌کننده [a]D/E مایعات آبکشی: سدیم تیوگلیکولات ۰٫۵g/l
یادآوری- براساس pH فرآورده بهداشتی، آرایشی می‌توان pH ماده خنثی‌کننده را در مقادیر مناسب تنظیم کرد.		

کتابنامه

[۱] استاندارد ملی ایران شماره ۹۶۰۷، سال ۱۳۸۶: میکروبیولوژی - میکروبیولوژی فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی - جستجو و شناسایی کاندیدا آلبیکنس

[۲] استاندارد ملی ایران شماره ۹۶۰۸، سال ۱۳۸۶: میکروبیولوژی - میکروبیولوژی فرآورده‌های بهداشتی، آرایشی- جستجو و شناسائی میکروارگانیسم‌های مشخص و نامشخص

[۳] استاندارد ملی ایران شماره ۱۹۸۵۱، سال ۱۳۹۳: ضدعفونی‌کننده‌ها و گندزداهای شیمیایی - آزمون سوسپانسیون کمی برای ارزیابی فعالیت قارچ‌کشی یا مخمرکشی ضدعفونی‌کننده‌ها یا گندزداهای شیمیایی مورد استفاده در اماکن پزشکی -روش آزمون و الزامات

[4] COLIPA. Guidelines on Microbial Quality Management, European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association.COLIPA, 1997

[5] CTFA. Microbiology Guidelines.Toiletry and Fragrance Association, 2001

[6] EP. Microbiological Examination of Non-Sterile Products.European Pharmacopoeia, Fourth Edition, 2002

[7] FDA. Bacteriological Analytical Manual, 8th edition, U.S. Food and Drug Administration, 1995, http:// www .fda .gov/ Food/ FoodScienceResearch/ LaboratoryMethods/ ucm2006949 .htm

[8] JP 14, General Tests — Microbial Limit Test, Japanese Pharmacopoeia, 2001

[9] USP 28, Microbial Limit Test <61>, U.S. Pharmacopoeia, 2005

[10] AtlasR.M. Handbook of Microbiological Media. CRC Press, 1993

[11] SingerS. The Use of Preservative Neutralizers in Diluents and Plating Media, Cosmetics and Toiletries, 102, p. 55, December 1987

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