جمهوری اسلامی ایران

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شمارهٔ استاندارد ایران

3759

جستجو و شمارش کلیفرم ها در آب به روش چند لوله ای

چاپ اول

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران تنها سازمانی است در ایران که بر طبق قانون میتواند استاندارد رسمی فرآورده‌ها را تعیین و تدوین و اجرای آنها را با کسب موافقت شورایعالی استاندارد اجباری اعلام نماید. وظایف و هدفهای موسسه عبارتست از:

تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی – انجام تحقیقات بمنظور تدوین استاندارد بالا بردن کیفیت کالاهای داخلی، کمک به بهبود روشهای تولید و افزایش کارائی صنایع در جهت خودکفائی کشور – ترویج استانداردهای ملی – نظارت بر اجرای استانداردهای اجباری – کنترل کیفی کالاهای صادراتی مشمول استانداردهای اجباری و جلوگیری از صدور کالاهای نامرغوب بمنظور فراهم نمودن امکانات رقابت با کالاهای مشابه خارجی و حفظ بازارهای بین المللی کنترل کیفی کالاهای وارداتی مشمول استاندارد اجباری بمنظور حمایت از مصرف کنندگان و تولیدکنندگان داخلی و جلوگیری از ورود کالاهای نامرغوب خارجی راهنمائی علمی و فنی تولیدکنندگان، توزیع کنندگان و مصرف کنندگان – مطالعه و تحقیق درباره روشهای تولید، نگهداری، بسته بندی و ترابری کالاهای مختلف – ترویج سیستم متریک و کالیبراسیون وسایل سنجش – آزمایش و تطبیق نمونه کالاها با استانداردهای مربوط، اعلام مشخصات و اظهارنظر مقایسه ای و صدور گواهینامه های لازم).

موسسه استاندارد از اعضاء سازمان بین المللی استاندارد میباشد و لذا در اجرای وظایف خود هم از آخرین پیشرفتهای علمی و فنی و صنعتی جهان استفاده مینماید و هم شرایط کلی و نیازمندیهای خاص کشور را مورد توجه قرار میدهد.

اجرای استانداردهای ملی ایران بنفع تمام مردم و اقتصاد کشور است و باعث افزایش صادرات و فروش داخلی و تأمین ایمنی و بهداشت مصرف کنندگان و صرفه جوئی در وقت و هزینه‌ها و در نتیجه موجب افزایش درآمد ملی و رفاه عمومی و کاهش قیمتها میشود.

کمیسیون استاندارد

جستجو و شمارش کلیفرم ها، کلیفرم های گرماپای واشریشیاکلی فرضی در آب به روش چند لوله ای

رئیس

ایماندل – کرامت ا ...	متخصص بهداشت محیط	دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

اعضاء

پورمنصور – مهدخت	پزشک	انستیتو پاستور
حسن پور – محمدحسین	فوق لیسانس تغذیه و بهداشت	مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
روشن طبری – مژده	فوق لیسانس قارچشناسی	مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
صدیقی – هما	لیسانس بیولوژی	شرکت آب و فاضلات استان تهران
محبعلی – قاسمعلی	فوق لیسانس میکروبیولوژی	پژوهشگاه صنعت نفت

دبیر

زندوکیلی – فاطمه	لیسانس تغذیه	مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

فهرست مطالب

هدف

دامنه کاربرد

تعاریف

اساس روش

مواد رقیق کننده , محیطهای کشت و معرف‌ها

دستگاه‌ها و وسایل

روش کار

پیوست الف

پیوست ب

بسمه تعالی

پیشگفتار

استاندارد جستجو و شمارش کلیفرم‌ها در آب به روش چند لوله‌ای که به وسیله کمیسیون فنی مربوطه تهیه و تدوین شده و در یکمین کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی مورخ 74/9/28 مورد تائید قرار گرفته , اینک به استناد بند 1 ماده 3 قانون اصلاحی قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه 1371 به عنوان استاندارد رسمی ایران منتشر می‌گردد .

برای حفظ همگامی و هماهنگی با پیشرفتهای ملی و جهانی در زمینه صنایع و علوم استانداردهای ایران در مواقع لزوم و یا فواصل معین مورد تجدید نظر قرار خواهد گرفت و هرگونه پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها برسد در هنگام
تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه واقع خواهد شد .

بنابراین برای مراجعه به استانداردهای ایران باید همواره از آخرین چاپ و تجدید نظر آنها استفاده نمود .

در تهیه و تدوین این استاندارد سعی شده است که ضمن توجه به شرایط موجود و نیازهای جامعه حتی المقدور بین این استاندارد و استاندارد کشورهای صنعتی و پیشرفته هماهنگی ایجاد شود .

لذا با بررسی امکانات و مهارت‌های موجود و اجرای آزمایش‌های لازم استاندارد حاضر با استفاده از منابع زیر تهیه گردیده است :

1- 1- International standard – ISO 9308 – 2 1990 water quality – detection and enumeration of coliform thermotolerant coliform and presumptive escherichia coil
2- 2- International standard – ISO 8199, 1988 water quality – general guide to the enumeration of micro – organisms by culture

جستجو و شمارش کلیفرم‌ها ، کلیفرم‌ها گرماپای[1] و اشریشیاکلی فرضی [2] در آب به روش چند لوله‌ای [3]

1 ـ هدف

هدف از تدوین این استاندارد , ارائه یک روش مرجع برای شناسائی و شمارش کلیفرم‌ها , کلیفرم‌های گرماپای و اشریشیاکلی فرضی در آب به وسیله کشت در محیط مایع به روش چند لوله‌ای و محاسبه بیشترین تعداد احتمالی [4] آنها در نمونه می‌باشد .

2 ـ دامنه کاربرد

این استاندارد در مورد کلیه آبها , حتی آبهایی که دارای ذرات و مواد معلق هستند , کاربرد دارد .

3 ـ تعاریف

در این استاندارد واژه‌ها با تعاریف زیر بکار برده می‌شود :

3 ـ 1 ـ کلیفرم‌ها :

منظور میکروارگانیسم‌هایی هستند که می‌توانند در شرایط هوازی در دمای35±0/5 و 37±0/5 درجه سلسیوس در محیط

مایع لاکتوز رشد کرده و در مدت 48 ساعت تولید اسید و گاز کنند .

3 ـ 2 ـ کلیفرم‌های گرماپای :

منظور کلیفرم‌های تعریف شده در بند 3 ـ 1 هستند که قادرند در مدت 24 ساعت در دمای44±0/5 و44/5±0/25 درجه سلسیوس نیز تولید اسید و گاز کنند .

3 ـ 3 ـ اشریشیاکلی فرضی :

منظور کلیفرم‌های مقاوم به حرارت تعریف شده در بند 3 ـ 2 هستند که قادرند در مدت 24 ساعت در دمای 44±0/5و 44/5±0/25درجه سلسیوس از تریپتوفان تولید اندول و از لاکتوز و مانیتول تولید گاز کند .

4 ـ اساس روش

4 ـ 1 ـ تلقیح نمونه یا رقتی از آن به یک سری لوله‌های حاوی محیط مایع انتخابی لاکتوز .

4 ـ 2 ـ گرمخانه گذاری لوله‌ها در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 24 تا 48 ساعت .

4 ـ 3 ـ تجدید کشت هریک از لوله‌های دارای کدورت و گاز مثبت به محیط انتخابی تأییدی .

4 ـ 4 ـ در مواردی که جستجوی اشریشیاکلی فرضی مورد نظر است , برای بررسی تولید اندول از لوله‌های فوق در یک محیط ترپتوفان دار کشت داده می‌شود .

در مورد بررسی کلیفرم‌ها , محیطهای تأییدی در دمای 25 تا 37 درجه سلسیوس به مدت 48 ساعت قرار می‌گیرد و در مورد بررسی کلیفرم‌های گرماپای و اشریشیاکلی فرضی در دمای 24 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت گرمخانه گذاری می‌شود . سپس با استفاده از جداول آماری بیشترین تعداد

احتمالی کلیفرم‌ها , کلیفرم‌های گرماپای و اشریشیاکلی فرضی در 100 میلی‌لیتر از نمونه محاسبه می‌شود . (از تعداد لوله‌هایی که نتایج تأییدی مثبتی داشته‌اند).

5 ـ مواد رقیق کننده ، محیطهای کشت و معرف‌ها

5 ـ 1 ـ مواد اولیه ,

به منظور به دست آوردن نتایج هماهنگ از مواد شیمیایی با کیفیت یکسان و با درجه خلوص معین و محیطهای کشت مناسب استفاده نمایید .

5 ـ 2 ـ مواد رقیق کننده :

از یکی از محلول‌های رقیق کننده پیوست شماره یک , برطبق دستورالعمل داده شده استفاده نمایید .

5 ـ 3 ـ محیطهای کشت و معرف‌ها :

از محیطهای کشت و معرف‌های پیوست شماره دو برطبق دستورالعمل داده شده , استفاده نمایید .

6 ـ دستگاه‌ها و وسایل

از دستگاه‌ها و وسایل معمولی در آزمایشگاه میکروبیولوژی استفاده نمایید .

7 ـ روش کار

7 ـ 1 ـ آماده سازی :

آماده سازی و تهیه رقت‌های مورد نیاز را برطبق استاندارد ملی ایران به شماره 356 انجام دهید . در مواردی که نمونه برداشت شده بیش از نیم میلی‌لیتر است , از لوله‌های حاوی محیط کشت با غلظت دو برابر استفاده نمایید .

7 ـ 2 ـ گرمخانه گذاری :

لوله‌های تلقیح شده را برای مدت 48 ساعت در دمای 35±0/5 یا37±0/5 درجه سلسیوس قرار دهید .

7 ـ 3 ـ بررسی :

پس از مدت 18 تا 24 ساعت لوله‌ها را بررسی نمایید . لوله‌هایی که دارای کدورت همراه با تولید گاز و اسید (در مورد محیطهایی که دارای معرف PH هستند) هستند , به عنوان نتیجه مثبت در نظر بگیرید و لوله‌هایی را که منفی بوده و یک یا تمامی تغییرات فوق را نشان نداده است , مجددا تا 48 ساعت در گرمخانه قرار دهید .

7 ـ 4 ـ آزمون‌های تاییدی :

از آنجا که واکنش مثبت در لوله‌های حاوی جدا ساز [5] (بند یک پیوست دو) تنها مربوط به کلیفرم‌های فرضی است , بنابراین انجام آزمون تأییدی بر روی محیط کشت انتخابی اهمیت داشته و ترجیحاً پرگنه‌های شاخص به مرحله آزمون تأییدی انتقال یابد . از هر یک از لوله‌های واکنش مثبت در یک یا چند لوله حاوی محیطهای تأییدی (بند 2 پیوست دو) کشت دهید تا تولید اندول و گاز مورد بررسی قرار گیرد .

یادآوری 1: در صورتی که جهت جداسازی از محیط ساده آبگوشت لاکتوز استفاده می‌شود , توصیه می‌گردد از دو محیط انتخابی‌تر تأییدی آبگوشت لاکتوز – صفرا – سبزدرخشان و اشریشیاکلی براث نیز استفاده شود .

7 ـ 4 ـ 1 ـ کلیفرم‌ها :

برای تایید وجود کلیفرم‌ها , توسط حلقه کشت از لوله‌های واکنش مثبت بند 7 ـ 3 برداشت نموده و به لوله حاوی محیط آبگوشت لاکتوز – صفرا – سبزدرخشان تلقیح نمایید . لوله را

در دمای 35 تا 37 درجه سلسیوس گرمخانه گذاری نموده و پس از 48 ساعت از نظر تولید گاز بررسی کنید .

7 ـ 4 ـ 2 ـ کلیفرم‌های گرماپای :

توسط حلقه کشت از لوله‌های واکنش مثبت بند 7 ـ 3 برداشت نموده و به لوله حاوی محیط آبگوشت اشریشیاکلی تلقیح نمایید . لوله را در دمای 44 درجه سلسیوس گرمخانه گذاری نموده و پس از 24 ساعت از نظر تولید گاز بررسی نمائید .

7 ـ 4 ـ 3 ـ اشریشیاکلی فرضی :

توسط حلقه کشت از لوله‌های واکنش مثبت بند 7 ـ 3 برداشت نموده و به لوله حاوی محیط آب تریپتونه تلقیح نمایید . سپس لوله‌ها را به مدت 24 ساعت در دمای 44 درجه سلسیوس قرار دهید . پس از پایان این مدت مقدار 0/2 تا 0/3 از معرف کواکس به لوله‌ها اضافه نمایید . پس از تکان دادن لوله‌ها , ایجاد رنگ قرمز دلیل بر حضور اندول است .

یادآوری 2: با استفاده از محیط آبگوشت لوریل تریپتوز مانیتول حاوی تریپتوفان می‌توان هم تولید گاز و هم تولید اندول توسط اشریشیاکلی فرضی را مشاهده نمود .

یادآوری 3: حضور اشریشیاکلی دلیل بر وجود آلودگی مدفوعی است . در صورت لزوم می‌توان آزمون‌های تأییدی را برطبق بند 7 ـ 5 انجام داد .

یادآوری 4: برای انجام آزمون تأییدی (بند 7 ـ 5) لازم است از لوله‌های واکنش مثبت روی پلیت حاوی آگار مغذی کشت خالص تهیه شود .

7 ـ 5 ـ آزمون اکسیداز : برخی از میکروارگانیسم‌هایی که در آب یافت می‌شوند , ممکن است در بسیاری از جهات مشابه با کلیفرم‌ها باشند . این میکروارگانیسم‌ها فقط در دمای کمتر از

37 درجه سلسیوس قادر به تخمیر لاکتوز و تولید گاز هستند ولی از نظر آزمونهای تأییدی منفی هستند و حضور آنها در آب حائز اهمیت نمی‌باشد .

گونه‌های آئروموناس نیز که به طور طبیعی در آب وجود دارند , فقط در دمای 37 درجه سلسیوس یا کمتر از لاکتوز تولید اسید و گاز می‌کنند و موجب تداخل در روند آزمون می‌شوند . این میکروارگانیسم‌های اکسیداز مثبت بوده و قابل تشخیص از کلیفرم‌ها می‌باشند .

7 ـ 5 ـ 1 ـ آزمون اکسیداز را با کشت خالص از باکتری تخمیرکننده لاکتوز که روی محیط آگار مغذی رشد کرده است , به صورت زیر انجام دهید .

– 2 یا 3 قطره از معرف اکسیداز را روی یک کاغذ صافی در یک پیلیت قرار دهید .

– با استفاده از یک میله شیشه‌ای , سواب یا سوزن کشت پلاتینی (نیکل و کروم نباشد) مقداری از پرگنه را روی کاغذ صافی قرار دهید .

– ظهور رنگ ارغوانی مایل به آبی تیره در مدت 10 ثانیه را به عنوان واکنش مثبت درنظر بگیرید .

یادآوری : در مواردی که آزمون اکسیداز انجام می‌شود , آزمون‌های کنترل را باید با میکروارگانیسم‌های شناخته شده دارای واکنش مثبت (پزودوموناس ائروژینوزا) [6] و واکنش منفی (اشریشیاکلی) انجام دهید .

تفسیر نتایج

از تعداد لوله‌های حاوی محیط جداساز و تأییدی که دارای واکنش مثبت هستند , بیشترین تعداد احتمالی کلیفرم‌ها کلیفرم‌های مقاوم به حرارت و اشریشیاکلی فرضی را در 100

میلی‌لیتر نمونه با استفاده از جداول آماری پیوست , محاسبه نمایید .

پیوست الف

محلول‌های رقیق کننده :

1 ـ آب پپتونه (0/1 درصد)

ترکیبات	مقدار	
پپتون	۱ گرم	Peptone
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر	Distilled water

روش تهیه : پپتون را در 950 میلی‌لیتر آب حل نموده و PH را با محلول هیدروکسیدسدیم و یا اسید کلریدریک (یک مول در لیتر) به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون شدن 7±0/1 باشد . سپس حجم را با آب مقطر به 1000 برسانید و در ظروف مناسب تقسیم نموده و در دمای 121±1 درجه سلسیوس به مدت 15 دقیقه اتوکلاو نمایید .

2 ـ آب پپتونه نمکی

ترکیبات	مقدار	
پپتون	۱ گرم	Peptone
کلرید سدیم	۸/۵ گرم	Sodium Chloride
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر	Distilled Water

روش تهیه : ترکیبات فوق را در 950 میلی‌لیتر آب حل نموده و PH را با محلول هیدروکسیدسدیم و یا اسیدکلریدریک (یک مول در لیتر) به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون شدن 7±0/1 باشد . سپس حجم را با آب مقطر به 1000 برسانید ,

در ظروف مناسب تقسیم کرده و در دمای 1±121 درجه سلسیوس به مدت 15 دقیقه اتوکلاو نمایید .

3 ـ محلول رینگر $\frac{1}{4}$

ترکیبات	مقدار	
کلرید سدیم	۲/۲۵ گرم	Sodium Chloride
کلرید پتاسیم	۰/۱۰۵ گرم	Potassium Chloride
کلریدکلسیم (بدون آب)	۰/۱۲ گرم	Calcium Chloride,anhydrous
کربنات هیدروژن‌سدیم	۰/۰۵ گرم	Sodium hydrogen carbonate
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر	Distilled water

روش تهیه : ترکیبات فوق را در آب حل نموده و در ظروف مناسب تقسیم نمایید . سپس در دمای 1±121 به مدت 15 دقیقه اتوکلاو کنید . PH نهایی محیط باید 1±7 باشد .

4 ـ محلول بافر فسفاته :

ترکیبات	مقدار	
دی‌هیدروژن‌پتاسیم فسفات	۴۲/۵ میلی گرم	Potassium dihydrogen phosphate
کلرید منیزیم	۱۹۰ میلی گرم	Magnesium chloride
آب مقطر	۱۰۰۰میلی لیتر	Distilled water

روش تهیه :

الف) محلول فسفات : 34 گرم فسفات را در 500 میلی‌لیتر آب مقطر حل نمایید . PH را با محلول هیدروکسیدسدیم (یک مول در لیتر) تا7/2±0/5 تنظیم نموده و با آب مقطر به حجم 1000 میلی‌لیتر برسانید .

ب) محلول کلرید منیزیم : 38 گرم کلرید منیزیم را در 1000 میلی‌لیتر آب مقطر حل نمایید .

محلول نهایی : برای استفاده , 1/25 میلی‌لیتر از محلول فسفات بند الف را با 5 میلی‌لیتر از محلول کلرید منیزیم بند ب را به 1000 میلی‌لیتر آب مقطر اضافه نمایید . در حجم‌های مناسب تقسیم نموده و سپس در دمای 121±1 درجه سلسیوس به مدت 15 دقیقه اتوکلاو نمایید . PH نهایی باید 7±0/1 باشد .

پیوست ب

1 ـ محیطهای جداساز :

1 ـ 1 ـ لاکتوز براث (غلظت مضاعف) Lactose Broth

ترکیبات	مقدار	
پپتون	۱۰ گرم	Peptone
لاکتوز	۱۰ گرم	Lactose
عصاره گوشت	۶ گرم	Beef extract
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر	Distilled water

روش تهیه : ترکیبات فوق را در آب جوش حل نموده و در لوله‌هایی با ابعاد مناسب و دارای لوله دور هام تقسیم نمایید . سپس در دمای 121 درجه سلسیوس به مدت 15 دقیقه اتوکلاو کنید . PH نهایی محیط باید 6/9±0/2 باشد . برای تهیه محیط با غلظت معمولی ترکیبات فوق را با 1000 میلی‌لیتر دیگر آب مقطر رقیق نمایید .

1 ـ 2 ـ آبگوشت مک کانکی Mac Conkey Broth

ترکیبات	مقدار	
نمک های صفراوی	۱۰ گرم	Bile salts
پپتون	۴۰ گرم	Peptone
لاکتوز	۲۰ گرم	Lactose
کلرید سدیم	۱۰ گرم	Sodium chloride
بروموکروزول یاکروزول ارغوانی (محلول اتانولی ۱٪ حجم به حجم)	۲ میلی لیتر	Bromocresol or(Cresol)Purple (%1 V/V ethanolic solution)
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر	Distilled water

روش تهیه پپتون : نمک‌های صفراوی و کلرید سدیم را در آب به وسیله گرم کردن حل نمایید . محلول فوق را در طول شب در دمای 4 درجه سلسیوس 4 درجه سلسیوس نگهداری کنید . سپس در حالیکه سرد است , لاکتوز را به آن اضافه نموده و در آن حل کنید . PH را در 7/4±0/2 تنظیم نمایید و بعد بروموکروزول را اضافه کنید . برای تهیه محیط با غلظت معمولی ترکیبات فوق را با 1000 میلی‌لیتر دیگر آب مقطر رقیق نمایید . محیط با غلظت معمولی را در حجم‌های 5 میلی‌لیتر و محیط با غلظت مضاعف را در حجم‌های 10 و 50 میلی‌لیتر درون لوله‌های حاوی دور هام تقسیم نموده و در دمای 115 درجه سلسیوس برای مدت 10 دقیقه اتو کلاو نمایید .

1 ـ 3 ـ محیط کلوتامات – لاکتوز – فرمات اصلاح شده (غلظت مضاعف)

Improved formate lactose glutamate medium

ترکیبات		مقدار
لاکتوز		۲۰ گرم
نمک سدیم گلوتامیک اسید		" ۱۲/۷
مونوهیدروکلرید آرژی‌نین		"۰/۰۴۸
اسید اسپارتیک		" ۰/۰۴
سیستین		" ۰/۰۴
فرمات سدیم		" ۰/۵
دی‌پتاسیم هیدروژن‌فسفات		" ۱/۸
کلرید آمونیم		" ۵
سولفات منیزیم	$(MgSO_4 \cdot 7H_2O)$	" ۰/۰۲ ($MgSO_4$. $7H_2O$)
کلرید کلسیم	$(CaCl_2 \cdot 2H_2O)$	" ۰/۰۲ ($CaCl_2$. $2H_2O$)
سیترات آهن (سه ظرفیتی)		" ۰/۰۲
تیامین		" ۰/۰۰۲
اسید نیکوتنیک		" ۰/۰۰۲
اسید پانتوتنیک		" ۰/۰۰۲
بروموکروزول ارغوانی (۱٪ جرم به جرم محلول الکلی)		۲ میلی لیتر
آب مقطر		۱۰۰۰ میلی لیتر

محیط فوق اغلب در حجم‌های 10 لیتری یا بیشتر ساخته می‌شود و در صورتی که بلافاصله در لوله تقسیم نمی‌شود , لاکتوز و تیامین حذف شود و بلافاصله قبل از تقسیم در لوله‌ها به محیط اضافه شود . برخی از ترکیبات فوق نیز به صورت جداگانه تهیه می‌شود و به محیط اضافه می‌شود .

محلول شماره 1 ـ

ترکیبات	مقدار	
مونوهیدروکلریدآرژی‌نین	۰/۴ گرم	L(+)Arginine monohydrochloride
اسید اسپارتیک	"۰/۴۸	L(-)Aspartic acid
آب مقطر	۵۰میلی لیتر	Distilled water

ترکیبات فوق را در آب حل کرده و حرارت دهید تا حل شود .

محلول شماره 2 ـ

ترکیبات	مقدار	
سیستین	۰/۴ گرم	L(-) Cystine
هیدروکسیدسدیم (۵مول درلیتر)	۱۰میلی لیتر	Sodium hydroxide (5 mol/l)
آب مقطر	۹۰میلی لیتر	Distilled water

ترکیبات فوق را در آب حل کرده و حرارت دهید تا حل شود .

محلول شماره 3 ـ

ترکیبات	مقدار	
اسیدنیکوتینیک	۰/۰۲ گرم	Nicotinic acid
اسید پانتوتنیک	" ۰/۰۲	Pantothenic acid
آب مقطر	۵ میلی لیتر	Distilled water

ترکیبات فوق را در آب حل کرده و حرارت دهید تا حل شود .

محلول شماره 4 ـ

ترکیبات	مقدار	
سیترات آهن (سه ظرفیتی)	۰/۲ گرم	Iron (III) Citrate scales
آب مقطر	۱۰میلی لیتر	Distilled water

سیترات آهن را در آب با حرارت داده حل کنید .

محلول شماره 5 ـ

ترکیبات	مقدار	
کلرید کلسیم	۵ میلی لیتر	Calcium chloride ($CaCl_2.2H_2O$)
آب مقطر	۱۰۰میلی لیتر	Distilled water
اسید کلریدریک غلیظ	۰/۱ میلی لیتر	

ترکیبات فوق را بدون حرارت دادن حل نموده و در دمای 121 درجه سلسیوس برای مدت 20 دقیقه اتوکلاو کنید و به عنوان محلول ذخیره نگهداری کنید .

محلول شماره 6 ـ

محلول یک دهم درصد تیامین را در آب مقطر سترون به صورت زیر تهیه نمائید :

محتویات یک آمپول 100 میلی گرمی را با رعایت شرایط سترونی به 99 میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه کنید . محلول فوق را می‌توان حداکثر به مدت 6 هفته در دمای 4 درجه سلسیوس نگهداری نمود .

برای آماده کردن 10 لیتر از محیط با غلظت مضاعف به صورت زیر عمل نمایید :

کلریدآمونیوم و سولفات منیزیم را در 9 لیتر آب مقطر داغ سترون حل نمایید . سپس تمامی محلول‌های شماره 1 ,2, 3, 4 و 4 میلی‌لیتر از محلول شماره 5 را به آن افزوده و PH را تا 6/8 یا بیشتر (در صورت لزوم) تنظیم کنید , به طوری که PH نهایی محیط پس از سترون نمودن 6/7 باشد . در صورتی که تجهیزات و روش‌های یکسانی استفاده می‌شود تغییرات PH در طول سترونی یکسان خواهد بود . در هر حال اندازه‌گیری اولیه PH قبل از سترون نمودن لازم است .

پس از تنظیم PH, 20 میلی‌لیتر از محلول 1% الکلی بروموکروزول ارغوانی را به آن اضافه کنید و با 810 میلی‌لیتر آب مقطر سترون حجم را به 10 لیتر برسانید . سپس در حجم‌های 500 میلی‌لیتری تقسیم و در دمای 115 درجه سلسیوس برای مدت 15 دقیقه سترون کنید . قبل از استفاده مقادیر لازم لاکتوز و محلول تیامین (محلول شماره 6) را

اضافه کنید و پس از حل کردن به حجم‌های 10 و 50 میلی‌لیتری تقسیم کنید . هر لوله یا ظرفی که مورد استفاده قرار می‌گیرد , باید دارای لوله دورهام باشد . پس از سترون نمودن باید مطمئن شوید که لوله دورهام کاملا با محیط کشت پرشده است . در غیر این صورت واکنش مثبت کاذب خواهید داشت .

محیط را در 115 درجه سلسیوس به مدت 10 دقیقه سترون کنید و یا در معرض بخار 100 درجه سلسیوس به مدت نیم ساعت در طی سه روز متوالی قرار دهید .

یادآوری : افزودن 0/1% (m/m) کازئین هیدرولیز شده با اسید و فاقد ویتامین , نتایج سریع‌تری می‌دهد .

1 ـ 4 ـ محیط آبگوشت لوریل تریپتوز (غلظت مضاعف)

Lauryl tryptose (lactose) broth

ترکیبات	مقدار	
تریپتوز	۴۰ گرم	Tryptose
لاکتوز	۱۰ گرم	Lactose
کلرید سدیم	" ۱۰	Sodium Chloride
دی‌پتاسیم هیدروژن‌فسفات	" ۵/۵	Dipotassium Hydrogen Phosphate
پتاسیم دی‌هیدروژن "	" ۵/۵	Potassium Dihydrogen Phosphate
سدیم لوریل‌سولفات(درجه خلوص بالا)	" ۰/۲	Sodium Lauryl Sulfate,high purity
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر	Distilled water

روش تهیه : تریپتوز , کلریدسدیم و لاکتوز و فسفات را به آب مقطر اضافه کرده و حرارت دهید تا حل شود . سدیم لوریل سولفات را اضافه کرده و به آرامی تکان دهید تا کف نکند . PH را تا 6/8±0/2 تنظیم کنید .

برای تهیه محیط با غلظت معمولی مقدار آب محیط را به دو برابر افزایش دهید و در حجم‌های 5 میلی‌لیتری در لوله‌های

حاوی دورهام تقسیم کنید . محیط با غلظت مضاعف را نیز در حجم‌های 10 و 50 میلی‌لیتری در لوله‌های حاوی دورهام تقسیم نموده در دمای 115 درجه سلسیوس به مدت 10 دقیقه اتوکلاو کنید .

2 ـ محیطهای تأییدی :

2 ـ 1 ـ آبگوشت لاکتوز – صفرا سبزدرخشان (bile) borth Brilliant–green lactose

ترکیبات	مقدار	
پپتون	۱۰ گرم	Peptone
لاکتوز	" ۱۰	Lactose
پودر صفرای گاوی	" ۲۰	Oxbile (dehydrated)
سبزدرخشان(محلول ۱/۰درصددرآب) ۱۳ میلی لیتر		Brilliant-green(0/1% by mass-aqueous solution)
آب مقطر	تا ۱۰۰۰ میلی لیتر	Distilled water

روش تهیه : پپتون را در 500 میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید . سپس 20 گرم صفرای گاوی را که در 200 میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده‌اید , به آن اضافه نمائید . PH این محلول بین 7 تا 7/5 است . حجم محلول فوق را با آب مقطر به حدود 975 میلی‌لیتر برسانید و پس از افزودن لاکتوز PH را تا 7/4 تنظیم کنید . سپس محلول سبزدرخشان را به آن افزوده و با آب مقطر به حجم 1000 برسانید . در حجم‌های 5 میلی‌لیتری و در ظروف حاوی دورهام تقسیم و در دمای 115ºC برای مدت 10 دقیقه اتوکلاو کنید .

2 ـ 2 ـ محیط آبگوشت اشریشیاکلی E.C.Medium

ترکیبات	مقدار	
تریپتوز یا تریپتیکاز	۲۰ گرم	Tryptose or Trypticase
لاکتوز	" ۵	Lactose
مخلوط نمکهای صفراوی وبانمک صفراوی شماره ۳	"۱/۵	Bile salts mixture or bile salts No. 3
دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات	" ۴	dipotassium hydrogen Phosphate
پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات	"۱/۵	Potassium dihydrogen Phosphate
کلرید سدیم	" ۵	Sodium Chloride
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر	Distilled water

روش تهیه : ترکیبات فوق را در آب مقطر حل نمایید و در ظرف مناسب حاوی لوله دورهام تقسیم و در دمای 121 درجه سلسیوس برای مدت 15 دقیقه اتوکلاوکنید . PH نهایی محیط باید 6/9 باشد .

2 ـ 3 ـ آب تریپتونه Tryptone water

ترکیبات	مقدار	
تریپتون	۲۰ گرم	Tryptone
کلرید سدیم	" ۵	Sodium Chloride
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر	Distilled water

روش تهیه : ترکیبات فوق را در آب مقطر حل نموده و پس از تنظیم PH در 7/5 آن را به حجم‌های 5 میلی‌لیتری تقسیم نموده و در دمای 115 درجه سلسیوس به مدت 10 دقیقه اتوکلاو بکنید .

یادآوری : افزودن 0/1% (m/m) تریپتوفان نتایج بهتری به دست می‌دهد .

2 ـ 4 ـ آبگوشت لوریل تریپتوز مانیتول با تریپتوفان (با غلظت معمولی)

Lauryl Tryptose Manitol Broth with Tryptophan

ترکیبات	مقدار	
تریپتوز	۲۰ گرم	Tryptose
مانیتول	" ۵	Mannitol
کلرید سدیم	" ۵	Sodium Chloride
دی‌پتاسیم هیدروژن‌فسفات	" ۲/۷۵	Dipotassium hydrogen phosphate
پتاسیم دی‌هیدروژن‌فسفات	" ۲/۷۵	Potassium dihydrogen phosphate
لوریل سولفات سدیم	" ۰/۱	Sodium lauryl sulfate
تریپتوفان	" ۰/۲	Tryptophane
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر	Distilled water

روش تهیه : تریپتوز , کلریدسدیم , مانیتول , فسفاتها و تریپتوفان را در آب حل کرده و گرم کنید . سپس سدیم لوریل سولفات را اضافه کرده و به آرامی مخلوط کنید تا کف نکند . پس از تنظیم PH در 6/8±0/2 به حجم‌های 5 میلی‌لیتری در لوله‌های حاوی دورهام تقسیم نموده و در 115 درجه سلسیوس به مدت 10 دقیقه اتوکلاو کنید .

3 ـ معرف‌ها :

3 ـ 1 ـ معرف کواکس

ترکیبات	مقدار	
پارادی‌متیل‌امینوبنزالدئید	۵ گرم	P-Dimethyl amino benzaldehyde
اتیل الکل	۷۵ میلی لیتر	Amyl alcohol
اسید هیدروکلریدریک	" ۲۵	Hydrochloric acid

روش تهیه : پس از حل کردن آلدئید در الکل اسید رابه دقت اضافه نمایید . محلول فوق را در دمای 4 درجه سلسیوس و به دور از نور نگهداری کنید .

3 ـ 2 ـ معرف اکسیداز

ترکیبات	مقدار	
تترامتیل پارافنیلن دی امین ـ هیدروکلراید	۰/۱ گرم	Tetramethyl - p - phenylen - diamine hydrochloride
آب مقطر	۱۰ میلی لیتر	Distilled water

روش تهیه : ترکیب فوق را در آب حل کنید . محلول به دست آمده را می‌توان حداکثر به مدت یک هفته در دمای 4 درجه سلسیوس نگهداری نمود .

جدول شماره یک

تعداد احتمالی در ۱۰۰ میلی لیتر	۲ لوله هریک ۰/۱ میلی لیتر	۲ لوله هریک ۱ میلی لیتر	۲ لوله هریک ۱۰ میلی لیتر		تعداد احتمالی در ۱۰۰ میلی لیتر	تعداد لوله های واکنش مثبت		
	۰/۱	۱	۱۰			۲ لوله هریک ۰/۱ میلی لیتر	۲ لوله هریک ۱ میلی لیتر	۲ لوله هریک ۱۰ میلی لیتر
۹	۰	۱	۲		<۳۴	۰	۰	۰
۱۴	۱	۰	۲		۳	۱	۰	۰
۲۰	۲	۰	۲		۶	۲	۰	۰
۲۶	۳	۰	۲		۹	۳	۰	۰
۱۵	۰	۱	۲		۳	۰	۱	۰
۲۰	۱	۱	۲		۶	۱	۱	۰
۲۷	۲	۱	۲		۹	۲	۱	۰
۳۴	۳	۱	۲		۱۲	۳	۱	۰
۲۱	۰	۲	۲		۶	۰	۲	۰
۲۸	۱	۲	۲		۹	۱	۲	۰
۳۵	۲	۲	۲		۱۲	۲	۲	۰
۴۲	۳	۲	۲		۱۶	۳	۲	۰
۲۹	۰	۳	۲		۹	۰	۳	۰
۳۶	۱	۳	۲		۱۳	۱	۳	۰
۴۴	۲	۳	۲		۱۶	۲	۳	۰
۵۳	۳	۳	۲		۱۹	۳	۳	۰
۲۲		۰	۳		۴	۰	۰	۱
۳۹	۱	۰	۳		۷	۱	۰	۱
۶۴	۲	۰	۳		۱۱	۲	۰	۱
۹۵	۳	۰	۳		۱۵	۳	۰	۱
۴۳	۰	۱	۳		۷	۰	۱	۱
۷۵	۱	۱	۳		۱۱	۱	۱	۱
۱۲۰	۲	۱	۳		۱۵	۲	۱	۱
۱۶۰	۳	۱	۳		۱۹	۳	۱	
۹۳	۰	۲	۳		۱۱	۰	۲	۱
۱۵۰	۱	۲	۳		۱۵	۱	۲	۱
۲۱۰	۲	۲	۳		۲۰	۲	۲	۱
۲۹۰	۳	۲	۳		۲۴	۴	۲	۱
۲۴۰	۰	۳	۳		۱۶	۰	۳	۱
۹۶۰	۱	۳	۳		۲۶	۱	۳	۱
۱۱۰۰	۳	۳	۳		۲۴	۲	۳	۱
>۱۱۰۰	۳	۳	۳		۲۹	۳	۳	۱

جدول بیشترین تعداد احتمالی در ۱۰۰ میلی لیتر آب به روش سه لوله ای

1- Thermotolerant coliform

2- resumptiveP1 Escherichia col

3- Multiple Tube Method

4- Most robable Number

5- Isolation medium

6- Paeudomonas aeruginosa

ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI NUMBER

3759

Detection and enumeration of coliform organisms in water by multiple tube method

1st Edition