



جمهوری اسلامی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مشماره 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 شورایی عالی 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 مییاشد 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 گرمایای و اشریشیاکلی فرضی

در آب به روش چند لوله ای

رئیس

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

اعضاء

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

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 استانداردهای 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 گرماپای¹ و اشريشیاکلی فرضی² در آب به روش چند لوله‌ای³

1- هدف

هدف از تدوین این استاندارد ، ارائه یک روش مرجع برای شناسائی و شمارش کلیفرم‌ها ، کلیفرم‌های گرماپای و اشريشیاکلی فرضی در آب به وسیله کشت در محیط مایع به روش چند لوله‌ای و محاسبه بیشترین تعداد احتمالی⁴ آنها در نمونه می‌باشد .

2- دامنه کاربرد

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

3- تعاریف

در این استاندارد واژه‌ها با تعاریف زیر بکار برده می‌شود :

3- 1- کلیفرم‌ها :

منظور میکروارگانیزم‌هایی هستند که می‌توانند در شرایط هوازی در دمای $35 \pm 0/5$ و $37 \pm 0/5$ درجه سلسیوس در محیط

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

3 - 2 - کلیفرم‌های گرم‌پای :

منظور کلیفرم‌های تعریف شده در بند 3 - 1 هستند که قادرند در مدت 24 ساعت در دمای $44 \pm 0/5$ و $44/5 \pm 0/25$ درجه سلسیوس نیز تولید اسید و گاز کنند .

3 - 3 - اش‌ریشیاکلی فرضی :

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

4 - اساس روش

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

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

4 - 3 - تجدید کشت هر یک از لوله‌های دارای کدورت و گاز مثبت به محیط انتخابی تأییدی .

4 - 4 - در مواردی که جستجوی اش‌ریشیاکلی فرضی مورد نظر است ، برای بررسی تولید اندول از لوله‌های فوق در یک محیط تریپتوفان 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 گرم‌پای 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 گرمای و اشریشیاکلی فرضی در 100 میلی‌لیتر از نمونه محاسبه می‌شود . (از تعداد لوله‌هایی که نتایج تأییدی مثبتی داشته‌اند).

5- مواد رقیق کننده ، محیطهای کشت و

معرف‌ها

5- 1- 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- 2- مواد رقیق کننده :

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

5- 3- محیطهای کشت و معرف‌ها :

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

6- دستگاه‌ها و وسایل

از دستگاه‌ها و وسایل معمولی در آزمایشگاه میکروبیولوژی استفاده نمایید .

7- روش کار

7- 1- 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- 2- گرمخانه گذاری :

لوله‌های تلقیح شده را برای مدت 48 ساعت در دمای 35 ± 0.5 یا 37 ± 0.5 درجه سلسیوس قرار دهید .

7 - 3 - 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 ، مجدداً تا 48 ساعت در گرمخانه قرار دهید .

7 - 4 - آزمون‌های تأییدی :

از آنجا که واکنش مثبت در لوله‌های حاوی جدا ساز⁵ (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 اشروشیاکلی برات نیز استفاده شود .

7 - 4 - 1 - کلیفرم‌ها :

برای تایید وجود کلیفرم‌ها ، توسط حلقه کشت از لوله‌های واکنش مثبت بند 7 - 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 - 4 - 2 - کلیفرم‌های گرم‌پای :

توسط حلقه کشت از لوله‌های واکنش مثبت بند 7 - 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 - 4 - 3 - اش‌ریشیاکلی فرضی :

توسط حلقه کشت از لوله‌های واکنش مثبت بند 7 - 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 - 5 انجام داد .

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

7 - 5 - 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 نمی باشد .

گونه های آئروموناتس نیز که به طور طبیعی در آب وجود دارند ، فقط در دمای 37 درجه سلسیوس یا کمتر از لاکتوز تولید اسید و گاز می کنند و موجب تداخل در روند آزمون می شوند . این میکروارگانیسم های اکسیداز مثبت بوده و قابل تشخیص از کلیفرم ها می باشند .

7 - 5 - 1 - 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 شیشه ای ، 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 در نظر بگیرید .

یادآوری : در مواردی که آزمون اکسیداز انجام می شود ، آزمون های کنترل را باید با میکروارگانیسم های شناخته شده دارای واکنش مثبت (پزودوموناتس ائروژینوزا)⁶ و واکنش منفی (اشیریشیاکلی) انجام دهید .

تفسیر نتایج

از تعداد لوله های حاوی محیط جداساز و تأییدی که دارای واکنش مثبت هستند ، بیشترین تعداد احتمالی کلیفرم ها

کلیفرم های مقاوم به حرارت و اشیریشیاکلی فرضی را در 100

میلی لیتر نمونه با استفاده از جداول آماری پیوست ، محاسبه
نمایید .

پیوست الف

محلول های رقیق کننده :

1 - آب پیتونه (0/1 درصد)

	<u>مقدار</u>	<u>ترکیبات</u>
Peptone	۱ گرم	پیتون
Distilled water	۱۰۰۰ میلی لیتر	آب مقطر

روش تهیه : پیتون را در 950 میلی لیتر آب حل نموده و PH را
با محلول هیدروکسید سدیم و یا اسید کلریدریک (یک مول در
لیتر) به گونه ای تنظیم کنید که پس از سترون شدن $7 \pm 0/1$
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 - آب پیتونه نمکی

	<u>مقدار</u>	<u>ترکیبات</u>
Peptone	۱ گرم	پیتون
Sodium Chloride	۸/۵ گرم	کلرید سدیم
Distilled Water	۱۰۰۰ میلی لیتر	آب مقطر

روش تهیه : ترکیبات فوق را در 950 میلی لیتر آب حل نموده و
PH را با محلول هیدروکسید سدیم و یا اسید کلریدریک (یک
مول در لیتر) به گونه ای تنظیم کنید که پس از سترون شدن
 $7 \pm 0/1$ باشد . سپس حجم را با آب مقطر به 1000 برسانید ،

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

3 - محلول رینگر $\frac{1}{4}$

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

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

4 - محلول بافر فسفات :

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

روش تهیه :

الف) محلول فسفات : 34 گرم فسفات را در 500 میلی لیتر آب مقطر حل نمایید . PH را با محلول هیدروکسید سدیم (یک مول در لیتر) تا $7/2 \pm 0/5$ تنظیم نموده و با آب مقطر به حجم 1000 میلی لیتر برسانید .

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

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

پیوست ب

1 - محیط های جداساز :

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

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

روش تهیه : ترکیبات فوق را در آب جوش حل نموده و در لوله هایی 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 $6/9 \pm 0/2$ باشد . برای تهیه محیط با غلظت معمولی ترکیبات فوق را با 1000 میلی لیتر دیگر آب مقطر رقیق نمایید .

1 - 2 - آبگوشت مک کانگی 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 یا کروزول ارغوازی (محلول اتانولی ۱٪ حجم به حجم)	۲ میلی لیتر	Bromocresol or (Cresol) Purple (% V/V ethanoic solution)
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر	Distilled water

روش تهیه پپتون : نمک های 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 $7/4 \pm 0/2$ تنظیم نمایید و بعد بروموکروزول را اضافه کنید . برای تهیه محیط با غلظت معمولی ترکیبات فوق را با 1000 میلی لیتر دیگر آب مقطر رقیق نمایید . محیط با غلظت معمولی را در حجم های 5 میلی لیتر و محیط با غلظت مضاعف را در حجم های 10 و 50 میلی لیتر درون لوله های حاوی دور هام تقسیم نموده و در دمای 115 درجه سلسیوس برای مدت 10 دقیقه اتو کلاو نمایید .

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

Improved formate lactose glutamate medium

	مقدار	ترکیبات
Lactose	۲۰ گرم	لاکتوز
L(+)-Glutamic acid sodium salt	" ۱۲/۷	نمک سدیم گلوتامیک اسید
L(+)-Arginine monohydrochloride	" ۰/۰۴۸	مونوهیدروکلرید آرژینین
L(-)-Aspartic acid	" ۰/۰۴	اسید اسپارتیک
L(-)-Cystine	" ۰/۰۴	سیستین
Sodium formate	" ۰/۵	فرمات سدیم
Dipotassium hydrogen phosphate	" ۱/۸	دیپتاسیم هیدروژن فسفات
Ammonium chloride	" ۵	کلرید آمونیم
Magnesium sulfate($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	" ۰/۰۲ ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	سولفات منیزیم
Calcium chloride($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	" ۰/۰۲ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	کلرید کلسیم
Iron(III)Citrate scales	" ۰/۰۲	سیترات آهن (سه ظرفیتی)
Thiamine (aneurin hydrochloride)	" ۰/۰۰۲	تیامین
Nicotinic acid	" ۰/۰۰۲	اسید نیکوتینیک
Pantothenic acid	" ۰/۰۰۲	اسید پانتوتینیک
Bromocresol purple (1 m/m-ethanolic solution)	۲ میلی لیتر	بروموکروزول ارغوانی (۱٪ جرم به جرم محلول الکلی)
Distilled water	۱۰۰۰ میلی لیتر	آب مقطر

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 -

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

ترکیبات فوق را در آب حل کرده و حرارت دهید تا حل شود .
محلول شماره 2 -

	<u>مقدار</u>	<u>ترکیبات</u>
L(-) Cystine	۰/۴ گرم	سیستین
Sodium hydroxide (5 mol/l)	۱۰ میلی لیتر	هیدروکسید سدیم (۵ مول در لیتر)
Distilled water	۹۰ میلی لیتر	آب مقطر

ترکیبات فوق را در آب حل کرده و حرارت دهید تا حل شود .
محلول شماره 3 -

	<u>مقدار</u>	<u>ترکیبات</u>
Nicotinic acid	۰/۰۲ گرم	اسید نیکوتینیک
Pantothenic acid	" ۰/۰۲	اسید پانتوتینیک
Distilled water	۵ میلی لیتر	آب مقطر

ترکیبات فوق را در آب حل کرده و حرارت دهید تا حل شود .
محلول شماره 4 -

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

سیترات آهن را در آب با حرارت داده حل کنید .
محلول شماره 5 -

	<u>مقدار</u>	<u>ترکیبات</u>
Calcium chloride (CaCl ₂ .2H ₂ O)	۵ میلی لیتر	کلرید کلسیم
Distilled water	۱۰۰ میلی لیتر	آب مقطر
	۰/۱ میلی لیتر	اسید کلریدریک غلیظ

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 -

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

محتویات یک آمپول 100 میلی گرمی را با رعایت شرایط سترونی به 99 میلی لیتر آب مقطر سترون اضافه کنید . محلول فوق را می توان 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 :

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

پس از تنظیم PH, 20 میلی لیتر از محلول 1% الکلی بروموکروزول ارغوانی را به آن اضافه کنید و با 810 میلی لیتر آب مقطر سترون حجم را به 10 لیتر برسانید . سپس در حجم های 500 میلی لیتری 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 کاملاً با محیط کشت پر شده 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 - 4 - محیط آبگوشت لوریل تریپتوز (غلظت مضاعف)

Lauryl tryptose (lactose) broth

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

روش تهیه : تریپتوز ، کلرید سدیم 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 $6/8 \pm 0/2$ 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 - محیط‌های تأییدی :

2 - 1 - آبگوشت لاکتوز - صفرا سبزدرخشان (bile) borth

Brilliant-green lactose

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

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 115°C برای مدت 10 دقیقه اتوکلاو کنید .

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

ترکیبات	مقدار	
تریپتوز یا تریپتیکاز	۲۰ گرم	Tryptose or Trypticase
لاکتوز	" ۵	Lactose
مخلوط نمکهای صفراوی و بانمک	" ۱/۵	Bile salts mixture or bile salts
صفراوی شماره ۳		No. 3
دی پتاسیم هیدروژن فسفات	" ۴	dipotassium hydrogen Phosphate
پتاسیم دی هیدروژن 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 اتوکلاو کنید . PH نهایی محیط باید 6/9 باشد .

2 - 3 - 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 میلی لیتری 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 می دهد .

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

Lauryl Tryptose Manitol Broth with Tryptophan

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

روش تهیه: تریپتوز، کلرید سدیم، 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 $6/8 \pm 0/2$ به حجم‌های 5 میلی لیتری در لوله‌های حاوی دورهام تقسیم نموده و در 115 درجه سلسیوس به مدت 10 دقیقه اتوکلاو کنید.

3 - معرف‌ها:

3-1 - معرف کواکس

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

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

3-2 - معرف اکسیداز

	<u>مقدار</u>	<u>ترکیبات</u>
Tetramethyl - p - phenylen - diamine hydrochloride	۰ / ۱ گرم	تترامتیل پارافنیلن دی‌امین - هیدروکلراید
Distilled water	۱۰ میلی لیتر	آب مقطر

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

Thermotolerant coliform –1
resumptiveP1 Escherichia col –2
Multiple Tube Method –3
Most robable Number –4
Isolation medium –5
Paeudomonas aeruginosa –6



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