



جمهوری اسلامی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شماره استاندارد ایران

۷۷۲۴-۲



کیفیت آب- جستجو و شمارش انتروکوک های روده ای - قسمت دوم : روش صافی
غشایی

چاپ اول

آشنایی با مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب قانون، تنها مرجع رسمی کشور است که عهده دار وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) میباشد.

تدوین استاندارد در رشته های مختلف توسط کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه، صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی



واقصدادی آگاه ومرتبط با موضوع صورت میگیرد. سعی بر این است که استانداردهای ملی، در جهت مطلوبیت ها و مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فنی و فن آوری حاصل از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع شامل: تولیدکنندگان، مصرف کنندگان، بازرگانان، مراکز علمی و تخصصی و نهادها و سازمانهای دولتی باشد.پیش نویس استانداردهای ملی جهت نظرخواهی برای مراجع ذینفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال میشود و پس از دریافت نظرات وپیشنهادها در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح ودر صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که توسط مؤسسات و سازمانهای علاقمند و ذیصلاح و با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می شود نیز پس از طرح و بررسی در کمیته ملی مربوط و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی چاپ ومنتشر می گردد. بدین ترتیب استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مفاد مندرج در استاندارد ملی شماره ((۵)) تدوین و در کمیته ملی مربوط که توسط مؤسسه تشکیل میگردد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد میباشد که در تدوین استانداردهای ملی ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندیهای خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین المللی استفاده می نماید.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون به منظور حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی وعمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردها را با تصویب شورای عالی استاندارد اجباری نماید. مؤسسه می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه بندی آنرا اجباری نماید.

همچنین بمنظور اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمانها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و گواهی کنندگان



سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست محیطی، آزمایشگاهها و کالیبره کنندگان وسایل سنجش، مؤسسه استاندارد اینگونه سازمانها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران مورد ارزیابی قرار داده و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آنها اعطا نموده و بر عملکرد آنها نظارت می نماید. ترویج سیستم بین المللی یکاها ، کالیبراسیون وسایل سنجش تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی از دیگر وظایف این مؤسسه می باشد.

کمیسیون استاندارد کیفیت آب- جستجو و شمارش انتروکوک
های روده ای
قسمت دوم : روش صافی غشایی

رئیس	سمت یا نمایندگی
محبعلی، قاسمعلی (فوق لیسانس میکروب شناسی)	پژوهشگاه صنعت نفت
اعضا	
اصلائی، محمد مهدی (دکترای میکروب شناسی)	انستیتو پاستور ایران
رحیمی فرد (دکترای میکروب شناسی)	وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی_ اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو
زندوکیلی، فاطمه (فوق لیسانس علوم بهداشتی در تغذیه)	مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
سلطانی، شهره (لیسانس میکروب شناسی)	مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
ضرغامپور، زهره (فوق لیسانس میکروب شناسی)	شرکت آب و فاضلاب استان تهران
غلامی، میترا (دکترای بهداشت محیط)	دانشگاه علوم پزشکی ایران
دبیر	
زرسازی، گیتا (لیسانس صنایع - استاندارد کنترل کیفیت)	مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران



ب	پیشگفتار
ت	مقدمه
	هدف
	۱
۱	دامنه کاربرد
۲	مراجع الزامی
۲	اصطلاحات و تعاریف
۳	اساس روش
۳	نمونه برداری
۶	مواد لازم
۱۷	وسایل لازم
۱۸	روش اجرای آزمون
۲۲	بیان نتایج
۲۳	گزارش آزمون

پیش گفتار

استاندارد^(۱) کیفیت آب- جستجو و شمارش انتروکوک های روده ای به روش صافی غشایی- روش آزمون میکروبیولوژی^(۲) که توسط کمیسیون های مربوط تهیه و تدوین شده و در شصت و چهارمین جلسه کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی و بیولوژی مورخ ۸۳/۸/۱۱ مورد تصویب قرار گرفته است، اینک به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ بعنوان استاندارد ملی ایران منتشر می شود. اینک این استاندارد به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفتهای ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدیدنظر خواهد شد و هر گونه پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استاندارد ارائه شود، در تجدیدنظر بعدی مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین برای مراجعه به استانداردهای ملی ایران باید همواره از آخرین تجدیدنظر آنها استفاده کرد. در تهیه و تجدیدنظر این استاندارد سعی شده است که ضمن توجه به شرایط موجود و نیازهای جامعه، در حد امکان بین این استاندارد و استانداردهای بین المللی و استاندارد ملی کشورهای صنعتی و پیشرفته هماهنگی ایجاد شود. این استاندارد جایگزین استاندارد ملی ایران ۳۶۲۰ گردیده است و استاندارد ۳۶۲۰ باطل اعلام می گردد. منابع و مأخذی که برای تهیه این استاندارد به کار رفته به شرح زیر است:

۱ - استاندارد ملی ایران ۳۶۲۰ : سال ۱۳۷۴ جستجو و شمارش استریپتوکوک های مدفوعی در آب به روش صافی غشایی



2 - ISO 7899-2 2000: Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci-
Part 2: Membrane filtration method .

مقدمه

انتروکوک های روده ای^۱ باکتری های گرم مثبت، کاتالاز منفی، کوکوئیدی تا تخم مرغی شکل و معمولاً زنجیره ای و دارای آنتی ژن O هستند که از انواع آنها می توان انتروکوکوس های فکالیس^۲، فاسیوم^۳، دورانس^۴، هیرا^۵ و همچنین برخی از گونه های متعلق به جنس استرپتوکوکوس (مشخصاً استرپتوکوکوس های بوویس^۶ و اکوینوس^۷) را نام برد. اگرچه این گونه های استرپتوکوکوس به مدت کوتاه در آب زنده مانده و احتمال دارد که شمارش نشوند .

در بررسی و آزمون آب، انتروکوک ها را به عنوان نشانگر آلودگی مدفوعی در نظر می گیرند ، اگرچه ممکن است گاهی دارای منشا دیگری باشند ، ولی شناسایی سویه های جدا شده آن در آب می تواند عامل مهمی در ارزیابی کیفیت آب و در نتیجه سلامت جامعه باشد .

کیفیت آب- جستجو و شمارش انتروکوک های روده ای- قسمت دوم : روش صافی غشایی (تجدید نظر)

۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روش جستجو و شمارش انتروکوک های روده ای در آب، بوسیله صافی غشایی^۱ می باشد .

۲ دامنه کاربرد

-
- 1- Intestinal enterococci
 - 2- Enterococcus faecalis
 - 3- Enterococcus faecium
 - 4- Enterococcus durans
 - 5- Enterococcus hirae
 - 6- Streptococcus bovis
 - 7- Streptococcus equines

پ

- 1- Membrane filter
- 2- Most probable Number (MPN)



۱-۲ این استاندارد در مورد آب های گندزدایی شده مانند آب آشامیدنی و آب استخر و همچنین آب بسته بندی شده و آب معدنی کاربرد دارد .

۲-۲ این استاندارد در مورد آب های زیر کاربرد ندارد :

۱-۲-۲ آب های دارای مقادیر قابل توجه ذرات و مواد معلق که در عمل صافسازی ایجاد اختلال نموده و باعث مسدود شدن روزنه صافی غشایی می شوند .

۱-۲ آب های دارای مقادیر قابل توجه از میکروارگانیسم های دیگر، به گونه ای که رشد آنها مانع از شمارش و تشخیص دقیق انتروکوک های روده ای شود .

یادآوری- در مورد آب های خیلی کدر از روش بیشترین تعداد احتمالی^۲ استفاده کنید .

۳ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد به آنها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد محسوب می شود. در مورد مراجع دارای تاریخ چاپ و/ یا تجدیدنظر، اصلاحیه ها و تجدیدنظرهای بعدی این مدارک مورد نظر نیست. معهذا بهتر است کاربران ذینفع این استاندارد، امکان کاربرد آخرین اصلاحیه ها و تجدیدنظرهای مدا ۱ لزامی زیر را مورد بررسی قرار دهند. در مورد مراجع بدون تاریخ چاپ و/ یا تجدیدنظر، آخرین چاپ و/ یا تجدیدنظر آن مدارک الزامی ارجاع داده شده مورد نظر است .

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است :

۱-۳ استاندارد ملی ایران ۴۲۰۷ : سال ۱۳۷۹ آیین کار آزمونهای باکتریولوژیکی آب

۲-۳ استاندارد ملی ایران ۲۷۴۷ : سال ۱۳۸۰ آیین کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

۳-۳ استاندارد ملی ایران ۳۷۵۹ : سال ۱۳۷۵ جستجو و شمارش کلیفرم ها در آب به روش چند لوله ای

۴ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات و / یا واژه ها با تعاریف زیر به کار می رود :

۱-۴ انتروکوک های روده ای



منظور، باکتری‌هایی هستند که قادر به احیاء ترکیب ۲ و ۳ و ۵- تری فنیل تترازولیوم کلراید^۱ و تبدیل آن به فرمازان^۲ بوده و همچنین قادر به هیدرولیز اسکولین^۳ در دمای ۴۴ درجه سلسیوس در محیط‌های کشت بند ۷-۱-۱ و ۷-۱-۲ این استاندارد می‌باشند.

۵ اساس روش

این روش براساس صاف نمودن حجم معینی از نمونه به وسیله صافی غشایی با اندازه روزنه ۰/۴۵ میکرون و قرار دادن صافی غشایی بر روی محیط کشت جامد انتخابی و گرمخانه گذاری در دما و زمان مشخص طبق بند ۹-۱-۲ این استاندارد و آزمون تأییدی طبق بند ۹-۱-۴ می‌باشد.

۶ نمونه برداری

۶-۱ مقدار یک تا پنج لیتر آب را با رعایت شرایط زیر نمونه برداری کنید:

۶-۱-۱ برای نمونه برداری، از ظروف شیشه‌ای و یا پلاستیکی سترون شده استفاده کنید. این ظروف باید به گونه‌ای باشد که دمای ۱۶۰ درجه سلسیوس را به خوبی تحمل نماید. همچنین در این دما نباید موادی از ظروف آزاد شوند که برای رشد باکتری‌ها بازدارنده بوده و یا سبب افزایش رشد آنها شوند.

۶-۱-۲ ظروف قبل از سترون شدن، باید با آب و ماده شوینده مناسب شسته و با آب مقطر آبکشی شوند. سپس دوباره با اسید نیتریک شسته و با آب مقطر آبکشی شوند.

۶-۱-۳ چنانچه نمونه برداری از شیر آب انجام پذیرد، باید مقداری از داخل و خارج شیر آب را کاملاً تمیز و گندزدایی و پس از باز گذاشتن آب برای مدت دو دقیقه، شیر را بسته و برای گند زدایی با چراغ الکی قسمت سر شیر را حرارت دهید. سپس آن را باز نموده تا آب خارج و خنک شود.

یادآوری- برای گندزدایی قسمت سر شیر از محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و یا الکل اتیلیک ۷۰ درصد می‌توانید استفاده کنید.

۶-۱-۴ ظروف نمونه برداری نباید کاملاً از آب پر شوند.

۶-۱-۵ برای نمونه برداری باید دقت کافی نمود تا از آلودگی ثانوی پیشگیری بعمل آید.

1- Triphenyl tetra zolium chloride (T. T. C)

2- Formazan

3- Aesculin



۶-۱-۶ برای نمونه برداری از آب های آشامیدنی، باید پیش از سترون نمودن ظروف، به ازای هر ۱۲۵ میلی لیتر گنجایش ظرف، مقدار ۰/۱ میلی لیتر از محلول ۳ درصد تیوسولفات سدیم^۱ اضافه نمود تا میزان باقیمانده کلر را خنثی کند .

۷-۱-۶ برای نمونه برداری از آب هایی که میزان باقیمانده کلر در آن بیشتر از ۵ قسمت در میلیون^۲ باشد، باید پیش از سترون نمودن ظروف، به ازای هر ۱۲۵ میلی لیتر گنجایش ظرف، مقدار ۰/۱ میلی لیتر محلول تیوسولفات سدیم ۱۰ درصد به آن اضافه کنید .

۸-۱-۶ در مورد آب هایی که غلظت فلزات سنگین در آنها بیش از ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر است، باید پیش از سترون نمودن ظروف، به ازای هر ۵۰۰ میلی لیتر گنجایش ظرف، مقدار ۰/۳ میلی لیتر محلول ۱۵ درصد اتیلن دی آمین تترا استیک اسید^۱ به آن اضافه کنید .

۶-۲ نگهداری نمونه

نمونه را باید تا رسیدن به آزمایشگاه و انجام آزمون در یخچال و یا در ظروف حاوی یخ نگه داری کنید .
نمونه را ترجیحاً بلافاصله پس از نمونه برداری، مورد آزمون قرار دهید. و چنانچه امکان پذیر نباشد، می توانید تا ۶ ساعت پس از نمونه برداری در دمای متعادل محیط (۲۵ درجه سلسیوس) نگهداری کنید .

یادآوری- تحت شرایط خاص که انجام آزمون امکان پذیر نباشد می توان نمونه را تا ۲۴ ساعت پس از نمونه برداری در دمای 3 ± 5 درجه سلسیوس، در تاریکی نگه داری نمود .

۷ مواد لازم

به منظور بدست آوردن نتایج هماهنگ، از مواد شیمیایی با کیفیت یکسان و درجه خلوص بالا و همچنین محیط های کشت مناسب و معتبر استفاده کنید .
چنانچه محیط های کشت بصورت تجارتي در دسترس باشند تهیه محیط کشت را طبق دستورالعمل سازنده انجام دهید .

۷-۱ محیط های کشت

۷-۱-۱-۱ محیط کشت اسلنتز و بارتلی^۱

۷-۱-۱-۱-۱ محیط کشت پایه

مقدار

ترکیبات

1-Thiosulfate sodium (Na₂ S₂ O₃)

2- Part per million (P. .P. .M)

¹ - Ethylene diamin tetra acetic acid (E.D.T.A.)

1- Slanetz and Bartley medium (S & B)



تریپتوز	۲۰ گرم
عصاره مخمر	۵ گرم
گلوکز	۲ گرم
هیدروژن فسفات دی پتاسیم	۴ گرم
سدیم آزاید	۰/۴ گرم
آگار ۸ تا ۱۸ گرم (به قدرت ژلی آگار بستگی دارد.)	
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه : مواد فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل نموده، و برای مدت ۵ دقیقه اضافی دیگر تا حل شدن کامل، آن را در حمام آب جوش قرار دهید. سپس محیط را تا دمای ۵۰ تا ۶۰ درجه سلسیوس سرد کنید .

یادآوری ۱- از آنجا که محیط های کشت حاوی سدیم آزاید بسیار سمی می باشند، در تهیه محیط های کشت باید از تماس مستقیم با پوست و همچنین استنشاق آن خودداری کنید .

یادآوری ۲- چنانچه محلول های حاوی سدیم آزاید، با ظروف فلزی برای مثال سینک های ظرفشویی در تماس باشند، ترکیبات قابل انفجار ایجاد نموده، لذا پیشنهاد می شود با افزودن مقادیر زیاد از محلول اشباع شده نیتريت، ترکیبات آزاید را تجزیه کنید .

یادآوری ۳- نیمه عمر محیط های کشت حاوی سدیم آزاید کوتاه بوده و با گذشت زمان تجزیه می شوند، لذا ضروری است تاریخ انقضای محیط های کشت فوق مورد توجه قرار گیرد .

۷-۱-۱-۲ محلول تی تی سی

ترکیبات

۲ و ۳ و ۵ تری فنیل تترازولیوم کلراید ۱ گرم
آب مقطر ۱۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه : معرف فوق را در آب مقطر ریخته، با تکان دادن حل کنید. سپس آن را توسط صافی غشایی با اندازه روزه ۰/۲۲ میکرون سترون نمایید .

یادآوری - محلول فوق را دور از نور قرار دهید و چنانچه ته رنگ صورتی مشاهده گردید، آن را دور بریزید.
۷-۱-۱-۳ محیط کشت کامل^۱



ترکیبات

مقدار

محیط کشت پایه (طبق بند ۷-۱-۱-۱) ۱۰۰۰ میلی لیتر
محلول تی تی سی بند (طبق بند ۷-۱-۱-۲) ۱۰ میلی لیتر

طرز تهیه : محلول تی تی سی را به محیط کشت پایه که تا دمای ۵۰ تا ۶۰ درجه سلسیوس سرد شده است، اضافه کنید. سپس به ضخامت ۳ تا ۵ میلی متر در پلیت های سترون شده ریخته، در سطحی صاف قرار دهید تا بصورت جامد درآید. پلیت های تهیه شده را می توانید حداکثر دو هفته در دمای 3 ± 5 درجه سلسیوس و تاریکی نگه داری کنید. pH نهایی محیط باید در دمای ۲۵ درجه سلسیوس برابر $0/1 \pm 7/2$ باشد.

یادآوری ۱- برای تنظیم pH محیط کشت بند ۷-۱-۱-۳ از محلول های کربنات سدیم (۱۰۰ گرم در لیتر) یا هیدروکسید سدیم (۴۰ گرم در لیتر) یا اسید هیدروکلریک (۳۶/۵ گرم در لیتر) استفاده کنید .

۷-۱-۲ محیط کشت صفرا - اسکولین آزاید آگار^۲

ترکیبات

مقدار

۱۷ گرم

۳ گرم

۵ گرم

۱۰ گرم

۵ گرم

۱ گرم

۰/۵ گرم

۰/۱۵ گرم

۸ تا ۱۸ گرم (به قدرت ژلی آگار

۱۰۰۰ میلی لیتر

تریپتون

پپتون

عصاره مخمر

صفراي گاو (بصورت خشك)

سدیم کلراید

اسکولین

سیترات آمونیم آهن سه ظرفیتی

سدیم آزاید

آگار

بستگی دارد)

آب مقطر

طرز تهیه : مواد فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل کنید. سپس به حجم های ۲۵۰ میلی لیتر، در ظروف درپيچ دار با گنجایش ۵۰۰ میلی لیتر تقسیم نموده و در اتوکلاو با دمای 1 ± 121 درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید. پس از اینکه دمای محیط کشت به درجه حرارت ۵۰ تا ۶۰ درجه سلسیوس رسید، به ضخامت دست کم ۳ میلی متر در پلیت های سترون تقسیم

کرده و در سطحی صاف قرار دهید تا بصورت جامد درآید. pH نهایی محیط باید در دمای ۲۵ درجه سلسیوس برابر $0/1 \pm 7/1$ باشد .

² Bile – aesculin azide agar



پلیت های فوق را می توان حداکثر دو هفته در دمای 3 ± 5 درجه سلسیوس نگهداری نمود .

۸ وسایل لازم

از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروب شناسی طبق استاندارد ملی ۲۷۴۷ و همچنین وسایل زیر استفاده کنید :

۱-۸ وسایل صافی غشایی شامل دستگاه پمپ خلاء ، قیف ، صفحه نگهدارنده صافی غشایی ، گیره نگهدارنده ، ارلن مایر تخلیه ، لوله های وصل شونده به پمپ خلاء و صافی غشایی با اندازه های روزنه $0/45$ و $0/22$ میکرون و قطر 47 تا 50 میلی متر .

۲-۸ گیره سر صاف

۳-۸ حمام آب گرم و یا گرمخانه قابل تنظیم در دمای $2 \pm$ درجه سلسیوس و $0/5 \pm 44$ درجه سلسیوس

۹ روش اجرای آزمون

۱-۹ صاف سازی نمونه

دست کم 250 میلی لیتر نمونه آب را (طبق استاندارد ملی ایران 4207 آئین کار آزمونهای باکتریولوژیکی آب) از صافی غشایی سترون با اندازه روزنه $0/45$ میکرون عبور دهید .

یادآوری ۱- حجم نمونه متناسب با نوع آن متفاوت است. برای مثال در مورد آب معدنی بسته بندی شده، حجم نمونه 250 میلی لیتر مناسب می باشد.

یادآوری ۲- تمام عملیات صاف سازی باید در مجاورت شعله و با استفاده از وسایل سترون انجام شود .

۱-۱-۹ کشت

صافی بند ۱-۹ را در شرایط سترون بر روی محیط کشت اسلنتز و بارتلی بند ۱-۱-۷ به گونه ای قرار دهید که سطح چهارخانه آن به طرف بالا بوده و همچنین حباب هوا در زیر آن تشکیل نشود.

۲-۱-۹ گرمخانه گذاری

پلیت های بند ۱-۱-۹ را در دمای 2 ± 36 درجه سلسیوس به مدت 4 ± 44 ساعت گرمخانه گذاری کنید .

۳-۱-۹ بررسی پلیت ها

پلیت های بند ۲-۱-۹ را بررسی نموده و چنانچه کلنی های برجسته بر روی صافی غشایی به رنگ قرمز، صورتی و آلبالویی (در مرکز و یا تمام آن ها) مشاهده گردید، به عنوان انتروکوک های روده ای مشخص شمارش کنید .



یادآوری- کلنی های مشخص انتروکوک های روده ای با احیاء ۲ و ۳ و ۵- تری فنیل تترازولیوم کلراید و تبدیل آن به فرمازان ، به رنگ قرمز، آلبالویی یا صورتی دیده می شوند .

۹-۱-۴ آزمون تأییدی

با استفاده از گیره سر صاف سترون بند ۸-۲، صافی غشایی بند ۹-۱-۳ را به گونه ای که سطح چهارخانه آن به طرف بالا باشد، بر روی محیط کشت صفر اسکولین- آزاید آگار بند ۷-۱-۲ که به دمای حدود ۴۴ درجه سلسیوس رسیده است ، انتقال داده و در دمای ۰/۵ ± ۴۴ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت گرمخانه گذاری نمایید.

یادآوری- انتروکوک های روده ای اسکولین را در مدت ۲ ساعت هیدرولیز نموده، تولید ترکیب ۶ و ۷- دی هیدروکسی کومارین^۱ می کند ، که با یون آهن سه ظرفیتی ترکیب شده و ایجاد رنگ قهوه ای روشن تا سیاه می کند .

۹-۱-۴-۱ شمارش

در مواردی که تعداد کلنی های شاخص کمتر از ۵۰ کلنی می باشد، تمام کلنی های شاخص بند ۹-۱-۴ را که در محیط کشت اطراف آنها رنگ قهوه ای روشن تا سیاه منتشر شده است را به عنوان انتروکوک های روده ای تأیید شده شمارش نمایید . چنانچه بیش از ۵۰ کلنی در صافی غشایی بند ۹-۱-۴-۱ مشاهده گردید، ۱۰ مربع صافی غشایی را بطور دلخواه انتخاب نموده و تعداد کلنی های آن را شمارش کنید . اگر صافی غشایی دارای ۱۰۰ مربع و یا ۱۴۰ مربع باشد، تعداد کلنی های آن را شمارش نموده و در عدد ۱۰ و یا ۱۴ ضرب کنید .

یادآوری- تعداد زیاد شمارش کلنی ها و یا توزیع نابرابر آنها، ممکن است سبب انتشار رنگ به محیط کشت اطراف شده و در شمارش ایجاد مزاحمت کنند. لذا پیشنهاد می شود، چنانچه احتمال بالا بودن شمارش انتروکوک های روده ای وجود داشته باشد، نمونه مورد آزمون را (طبق استاندارد ملی ایران ۲۲۰۷ آئین کار آزمونهای باکتریولوژیکی آب) رقیق کنید .

۱۰ بیان نتایج

برای محاسبه نتایج، با توجه به اینکه هر کلنی از یک میکروارگانیسم منشا گرفته است، نتایج را به صورت تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی^۱ در حجم معین نمونه با استفاده از فرمول یک محاسبه کنید .

1 - 6, 7- dihydroxycoumarin
1- Colony Forming Unit (C. F. U)



$$C_s = \frac{N}{(n_1 v_1 f_1) + (n_2 v_2 f_2) + \dots}$$

فرمول يك

C_s = تعداد واحدهاي تشكيل دهنده كلني در حجم اوليه V_s
 N = تمام كلني هاي شمارش شده بر روي صافي ها و يا پليت ها در رقت هاي مختلف
 n_1 و n_2 = تعداد پليت هاي شمارش شده به ترتيب براي رقت هاي f_1 و f_2
 v_1 و v_2 = حجم نمونه مورد آزمون به ترتيب براي رقت هاي f_1 و f_2
 f_1 و f_2 = رقت هاي مورد استفاده به ترتيب براي حجم هاي v_1 و v_2 و ...
و در مورد نمونه رقيق نشده $f = 1$ مي باشد .
 V_s = حجم اوليه براي بيان تعداد ميكروارگانيسم ها در نمونه

يادآوري- براي گزارش نتيجه نهايي شمارش با ۹۵ درصد اطمینان، از فرمول دو استفاده کنید :

فرمول دو

$$C = \frac{C + 2 \pm 2\sqrt{C+1}}{2}$$

جمع شمارش كلني ها

يادآوري- براي شمارش پليت هايي كه کمتر از ۲۰ كلني دارند ، از فرمول شماره دو استفاده نکنيد .

۱۱ گزارش آزمون

- گزارش آزمون بايد داراي آگاهي هاي زير باشد :
- ۱-۱۱ مشخصات كامل نمونه مانند نوع نمونه و مقدار ماده گندزدا
 - ۲-۱۱ تاريخ و محل نمونه برداري، تاريخ ارسال نمونه به آزمایشگاه
 - ۳-۱۱ تاريخ انجام آزمون
 - ۴-۱۱ بيان نتايج طبق بند ۱۰ اين استاندارد
 - ۵-۱۱ روش آزمون طبق استاندارد ملي.....
 - ۶-۱۱ نام و نام خانوادگي و امضاي آزمایشگر
 - ۷-۱۱ ساير اطلاعات كه مربوط به روش آزمون باشد .





ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI NUMBER

7724-2



**Water quality- Detection and enumeration
of intestinal enterococci
Part 2 : membrane filtration method**

1st. Revision