www.abpsoil.com
ابنیه پایدار سبز

جمهوری اسلامی ایران

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شمارهٔ استاندارد ایران

۷۷۲۵-۱

کلي فرمها کیفیت آب- جستجو و شناسایي اشریشیا کلي و
قسمت اول : روش صافي غشایي

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، صاحبنظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی

واقتصادی آگاه ومرتبط با موضوع صورت میگیرد. سعی بر این است که استانداردهای ملی، در جهت مطلوبیت ها و مصالح ملی وبا 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 واعضای 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 ومنتشرمی 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 ونیازمندیهای 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 کنندکان

سیستم های مدیریت کیفیت ومدیریت 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 استانداردکیفیت آب- جستجو و شمارش انتروکوک هاي روده اي
قسمت اول : روش صافي غشايي

رئیس	سمت یا نمایندگی
محبعلي، قاسمعلي (فوق ليسانس ميكروب شناسي)	پژوهشگاه صنعت نفت
اعضا	
اصلاني، محمد مهدي (دكتراي ميكروب شناسي)	انستيتو پاستور ايران
رحيمي فرد (دكتراي ميكروب شناسي)	وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشكي ادارة كل آزمايشگاه هاي كنترل غذا و دارو
زندوكيلي، فاطمه (فوق ليسانس علوم بهداشتي در تغذيه)	مؤسسه استاندارد و تحقيقات صنعتي ايران
سلطاني، شهرو (ليسانس ميكروب شناسي)	مؤسسه استاندارد و تحقيقات صنعتي ايران
ضرغامپور، زهره (فوق ليسانس ميكروب شناسي)	شركت آب و فاضلاب استان تهران
غلامي، ميترا (دكتراي بهداشت محيط)	دانشگاه علوم پزشكي ايران
دبیر	
زرسازي، گيتا (ليسانس صنايع- استاندارد كنترل كيفيت)	مؤسسه استاندارد و تحقيقات صنعتي ايران

پیشگفتار ب
مقدمه ت
هدف
۱
دامنه کاربرد ۱
مراجع الزامي ۲
اصطلاحات و تعاریف ۲
اساس روش ۳
نمونه برداري ۳
مواد لازم ۵
وسایل لازم ۱۰
روش اجراي آزمون ۱۰
بیان نتایج ۱۳
گزارش آزمون ۱۴

پیش گفتار

استاندارد "کیفیت آب- جستجو و شمارش انتروکوك هاي روده اي- قسمت اول : روش صافي غشايي" كه توسط كميسيون هاي مربوط تهيه و تدوين شده ودر شصت وچهارمين جلسة كميتة ملي استاندارد ميكروبيولوژي و بيولوژي مورخ۸۳/۸/۱۱ تصويب شد. اينك اين استاندارد به استناد بند يك مادة ۳ قانون اصلاح قوانين و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقيقات صنعتي ايران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ به عنوان استاندارد ملي ايران منتشر مي‌شود.

براي حفظ همگامي و هماهنگي با تحولات و پيشرفتهاي ملي و جهاني در زمينه صنايع، علوم و خدمات، استانداردهاي ملي ايران در مواقع لزوم تجديدنظر خواهد شد و هر گونه پيشنهادي كه براي اصلاح و تكميل اين استاندارد ارائه شود، در تجديدنظر بعدي مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراين براي مراجعه به استانداردهاي ملي ايران بايد همواره از آخرين تجديدنظر آنها استفاده كرد.

در تهيه و تجديدنظر اين استاندارد سعي شده است كه ضمن توجه به شرايط موجود و نيازهاي جامعه، در حد امكان بين اين استاندارد و استانداردهاي بين‌المللي و استاندارد ملي كشورهاي صنعتي و پيشرفته هماهنگي ايجاد شود.

اين استاندارد جايگزين استاندارد ملي ايران ۳۷۶۰ گرديده و استاندارد ۳۶۷۰ باطل اعلام مي گردد.

منابع و مأخذي كه براي تهيه اين استاندارد به كار رفته به شرح زير است:

۱ - استاندارد ملی ایران ۳۶۲۰ : سال ۱۳۷۴ جستجو وشمارش استرپتوکوک 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

انتروکوك هاي روده اي[1] باكتري هاي گرم مثبت، كاتالاز منفي، كوكوئيدي تا تخم مرغي شكل و معمولاً زنجيره اي و دارای آنتی ژن o هستند كه از انواع آنها مي‌توان انتروكوكوس هاي فكاليس[2]، فاسيوم[3]، دورانس[4]، هيرا[5] و همچنين برخي از گونه هاي متعلق به جنس استرپتوكوكوس (مشخصاً استرپتوكوكوس هاي بوويس[6] و اكوينوس[7]) را نام برد. اگرچه اين گونه هاي استرپتوكوكوس به مدت كوتاه در آب زنده مانده و احتمال دارد كه شمارش نشوند .

در بررسي و آزمون آب، انتروكوك ها را به عنوان نشانگر آلودگي مدفوعي در نظر مي گيرند ، اگرچه ممكن است گاهی دارای منشا ديگری باشند ، ولي شناسائي سويه هاي جدا شدة آن در آب مي تواند عامل مهمي در ارزيابي كيفيت آب و در نتيجه سلامت جامعه باشد .

كيفيت آب- شناسايي و شمارش اشريشياكلي و كلي فرم ها

قسمت اول : روش صافي غشايي

۱ هدف

هدف از تدوين اين استاندارد، تعيين روش آزمون شناسايي و شمارش اشريشياكلي و كلي فرم ها در آب بوسيلة صافي غشايي به دو روش((سريع)) و ((استاندارد)) مي‌باشد .

۲ دامنه كاربرد

اين استاندارد در مورد تمامي انواع آب به غير از موارد زير كاربرد دارد :

۲-۱ آب هايي كه حاوي مقادير قابل توجه ذرات و مواد معلق باشند، به گونه اي كه در عمل صاف‌سازي ايجاد اختلال كند .

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

۱-۲ آب هايي كه داراي تعداد زيادي از ميكروارگانيسم هاي ديگر باشند، به گونه اي كه رشد آنها مانع از شمارش دقيق كليفرم ها شده و يا وجود آنها با فرايند صاف سازي تداخل ايجاد كنند .

يادآوري – درمورد آب هاي خيلي كدر مي توانيد از روشهايي مانند بيشترين تعداداحتمالي (طبق استاندارد ملي ۳۷۵۹: ۱۳۷۵) استفاده كنيد

۳ مراجع الزامي

مدارك الزامي زير حاوي مقرراتي است كه در متن اين استاندارد به آنها ارجاع داده شده است. بدين‌ترتيب آن مقررات جزئي از اين استاندارد محسوب مي‌شود. در مورد مراجع داراي تاريخ
چاپ و/ يا تجديدنظر، اصلاحيه ها و تجديدنظرهاي بعدي اين مدارك مورد نظر نيست. معهذا بهتر است كاربران ذينفع اين استاندارد، امكان كاربرد آخرين اصلاحيه ها و تجديدنظرهاي مدارك
الزامي زير را مورد بررسي قرار دهند. در مورد مراجع بدون تاريخ چاپ و/ يا تجديدنظر، آخرين چاپ و/ يا تجديدنظر آن مدارك الزامي ارجاع داده شده مورد نظر است .
استفاده از مراجع زير براي كاربرد اين استاندارد الزامي است :

۱-۳ استاندارد ملي ايران ٤۲۰۷ : سال ۱۳۷٦ آيين كار آزمونهاي باكتريولوژيكي آب

۲-۳ استاندارد ملي ايران ۲۷٤۷ : سال ۱۳۸۰ آيين كار در آزمايشگاه ميكروبيولوژي

۳-۳ استاندارد ملي ايران ۳۷۵۹: سال ۱۳۷۵ جستجو وشمارش كليفرم ها در آب به روش چند لوله اي

٤ اصطلاحات و تعاريف

در اين استاندارد اصطلاحات و / يا واژه ها با تعاريف زير به كار مي‌رود :

۱-٤ باكتري‌هاي لاكتوز مثبت

(روش استاندارد)

منظور، باكتري هايي هستند كه در شرايط هوازي در دماي ۳ ± ۳٦ درجه سلسيوس بر روي محيط كشت انتخابي و افتراقي داراي لاكتوز رشد نموده، در مدت ۳ ± ۲۱ ساعت توليد اسيد كنند

٤-۲ كليفرم ها

(روش استاندارد)

منظور، باكتري هاي لاكتوز مثبت تعريف شده در بند ٤-۱ است كه اكسيداز منفي مي‌باشند .

٤-۳ اشريشيا كلي

(روش استاندارد)

منظور، باكتري هاي كلي فرم تعريف شده در بند ٤-۲ است كه در دماي ۰/٥ ± ٤٤ درجه سلسيوس به مدت ۳ ± ۲۱ ساعت از تريپتوفان توليد ايندول كنند .

٤-٤ اشريشياكلي

(روش سريع)

منظور، باكتري هاي مقاوم به نمك هاي صفراوي هستند كه در دماي ۰/٥ ± ٤٤ درجه سلسيوس در مدت ۳ ± ۲۱ ساعت از تريپتوفان توليد ايندول كنند .

٥ اساس روش

اين روش براساس صافسازي نمونه بوسيلة صافي غشايي است و به منظور دقيق‌تر بودن نتايج آزمون، بطور موازي و همزمان با دو روش "استاندارد" و "سريع" (طبق بندهاي ٥-۱ و ٥-۲) انجام مي‌پذيرد .

٥-۱ روش استاندارد

روش استاندارد براساس قرار دادن صافي غشايي بر روي محيط كشت انتخابي جامد لاكتوز دار و گرمخانه گذاري آن در دماي ۳ ± ۳٦ درجه سلسيوس بمدت ۳ ± ۲۱ ساعت مي‌باشد .

كلني هاي مشخص تشكيل شده در سطح صافي غشايي، بعنوان باكتري هاي لاكتوز مثبت شمارش مي شود. پس از انتخاب كلني هاي مشخص و تجديد كشت آن ها، آزمونهاي تأييدي شامل توليد ايندول و همچنين آزمون اكسيداز انجام مي گردد و سپس تعداد احتمالي باكتريهاي كلی فرم و اشريشياكلي در ۱۰۰ ميلي‌ليتر نمونه محاسبه مي‌شود .

٥-۲ روش سريع

روش سريع براساس قرار دادن صافي غشايي بر روي محيط كشت حاوي كازئين و گرمخانه‌گذاري در دماي ۲ ± ۳٦ درجه سلسيوس به مدت ٤ تا ٥ ساعت مي‌باشد. پس از تجديد كشت كلني هاي مشخص بر روي محيط كشت جامد حاوي كازئين و نمك هاي صفراوي

و گرمخانه گذاري در دماي ۰/۵ ± ٤٤ درجه سلسيوس بمدت ۱۹ تا ۲۰ ساعت شمارش انجام مي‌شود .
در اين روش كلني‌هاي تشكيل شده در سطح صافي غشايي، كه قادر به توليد ايندول از تريپتوفان مي‌باشند، بعنوان اشريشياكلي شمارش شده و تعداد احتمالي آن در ۱۰۰ ميلي ليتر نمونه محاسبه مي‌گردد.

٦ نمونه برداري

٦-۱ مقدار يك تا پنج ليتر آب را با رعايت شرايط زير نمونه‌برداري كنيد :
٦-۱-۱ براي نمونه برداري، از ظروف شيشه اي و يا پلاستيكي سترون شده استفاده كنيد. اين ظروف بايد به گونه اي باشد كه دماي ۱٦۰ درجه سلسيوس را به خوبي تحمل نمايد. همچنين در اين دما نبايد موادي از ظروف آزاد شوند كه براي رشد باكتري ها بازدارنده بوده و يا سبب افزايش رشد آنها شوند .
٦-۱-۲ ظروف قبل از سترون شدن، بايد با آب و مادة شوينده مناسب شسته و با آب مقطر آبكشي شوند. سپس با اسيد نيتريك شسته و با آب مقطر آبكشي شوند .
٦-۱-۳ چنانچه نمونه برداري از شير آب انجام پذيرد، بايد مقداري از داخل و خارج شير آب را كاملاً تميز و گندزدايي و پس از باز گذاشتن آب براي مدت دو دقيقه، شير را بسته و براي گند زدايي با چراغ الكلي قسمت سر شير را حرارت دهيد. سپس آن را باز نموده تا آب خارج و خنك شود .

يادآوری- براي گندزدايي قسمت سر شير از محلول هيپوكلريت سديم ۱۰۰ ميلي گرم در ليتر و يا الكل اتيليك ۷۰ درصد مي توانيد استفاده كنيد .

٦-۱-٤ ظروف نمونه برداري نبايد كاملاً از آب پر شوند .
٦-۱-۵ براي نمونه برداري بايد دقت كافي نمود تا از آلودگي ثانوي پيشگيري بعمل آيد .
٦-۱-٦ براي نمونه برداري از آب هاي آشاميدني، بايد پيش از سترون نمودن ظروف، به ازاي هر ۱۲۵ ميلي ليتر گنجايش ظرف، مقدار ۰/۱ ميلي ليتر از محلول ۳ درصد تيوسولفات سديم[1] اضافه نمود تا ميزان باقيماندة كلر را خنثي كند .
٦-۱-۷ براي نمونه برداري از آب هايي كه ميزان باقيماندة كلر در آن بيشتر از ۵ قسمت در

1-Thiosulfate Sodium ($Na_2 S_2 O_3$)

ميليون[1] باشد ، بايد پيش از سترون نمودن ظروف، به ازاء هر ۱۲۵ ميلي ليتر گنجايش ظرف، مقدار ۰/۱ ميلي ليتر محلول تيوسولفات سديم ۱۰ درصد به آن اضافه كنيد .

۶-۱-۸ در مورد آب هايي كه غلظت فلزات سنگين در آنها بيش از ۰/۰۱ ميلي گرم در ليتر است، بايد پيش از سترون نمودن ظروف، به ازاء هر ۵۰۰ ميلي ليتر گنجايش ظرف، مقدار ۰/۳ ميلي ليتر محلول ۱۵ درصد اتيلن دي امين ترا استيك اسيد[2] به آن اضافه كنيد .

۶-۲ نگهداري نمونه

نمونه را بايد تا رسيدن به آزمايشگاه و انجام آزمون در يخچال و يا در ظروف حاوي يخ نگه داري كنيد .

نمونه را ترجيحاً بلافاصله پس از نمونه برداري، مورد آزمون قرار دهيد. و چنانچه اين امر امكان پذير نباشد، مي توانيد نمونه را تا ۶ ساعت پس از نمونه برداري در دماي متعادل محيط (۲۵ درجه سلسيوس) نگهداري كنيد .

يادآوري- تحت شرايط خاص كه انجام آزمون امكان پذير نباشد مي توان نمونه را تا ۲۴ ساعت پس از نمونه برداري در دماي ۳ ± ۵ درجه سلسيوس، در تاريكي نگه داري نمود .

۷ مواد لازم

بمنظور بدست آوردن نتايج هماهنگ ، از مواد شيميايي با كيفيت يكسان و درجه خلوص آزمايشگاهي استفاده كنيد .

1- Part per million (P. .P. .M)
2- Ethylene diamine tetra acetic acide (E. D. T. A)

چنانچه محيط هاي كشت بصورت تجارتي در دسترس باشند، تهيه محيط كشت را طبق دستورالعمل سازنده انجام دهيد.

۷-۱ محيط‌هاي كشت، رقيق كننده ها و معرف‌ها

۷-۱-۱ محيط كشت لاكتوز تي تي سي آگار حاوي سديم هپتادسيل سولفات[1]

۷-۱-۱-۱ محيط كشت پايه

تركيبات	مقدار
لاكتوز	۲۰ گرم
پپتون	۱۰ گرم
عصاره مخمر	۶ گرم
عصاره گوشت	۵ گرم
بروموتيمول آبي	۰/۰۵ گرم

1- Lactose TTC Agar with sodium heptadecylsulfate

آگار ۱۵ تا ۲۵ گرم (به قدرت ژلي آگاربستگي دارد)
آب مقطر ۱۰۰۰ ميلي ليتر

طرز تهيه : مواد فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل نموده، در ظروفي با گنجايش حداكثر ۲۵۰ ميلي ليتر تقسيم كنيد. سپس در اتوكلاو با دماي ۱ ± ۱۲۱ درجه سلسيوس بمدت ۱۵ دقيقه سترون نماييد. pH محيط را به گونه اي تنظيم كنيد كه پس از سترون شدن، برابر ۰/۱ ± ۷/۲ شود.

۷-۱-۱-۲ محلول تري فنيل تترازوليوم كلرايد[1]

تركيب	**مقدار**
۲ و ۳ و ۵ تري فنيل تترازوليوم كلرايد (تي تي سي)	۰/۰۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰ ميلي ليتر

طرز تهيه : تي تي سي را در مقدار كمي آب مقطر حل نموده، سپس حجم آن را به ۱۰۰ ميلي ليتر برسانيد. محلول فوق را با عبور دادن از صافي غشايي با اندازه روزنه ۰/۲ ميكرومتر سترون كنيد .

۷-۱-۱-۳ محلول سديم هپتا دسيل سولفات[2] (ترجيتول ۷)

تركيبات	**مقدار**
سديم هپتا دسيل سولفات (ترجيتول ۷)	۰/۲ گرم
آب مقطر	۱۰۰ ميلي ليتر

طرز تهيه : ترجيتول ۷ را در مقدار كمي آب مقطر حل نموده، حجم آن را به ۱۰۰ ميلي ليتر برسانيد. سپس در اتوكلاو با دماي ۱ ± ۱۲۱ درجه سلسيوس بمدت ۱۵ دقيقه سترون كنيد .

۷-۱-۱-٤ محيط كشت كامل

تركيبات	**مقدار**
محيط كشت پايه (طبق بند ۷-۱-۱-۱)	۱۰۰ ميلي ليتر
محلول تي تي سي (طبق بند ۷-۱-۱-۲)	۵ ميلي ليتر
محلول سديم هپتا دسيل سولفات (طبق بند ۷-۱-۱-۳)	۵ ميلي ليتر

1- Triphenyl tetrazolium chloride (TTC)
2- Sodium heptadecyl sulfate solution (Tergitol 7)

طرز تهیه : محیط کشت پایه را ذوب نمایید و پس از رسیدن درجة حرارت محیط کشت به ٤٥ تا ٥٠ درجه با رعایت شرایط ستروني، محلول هاي تي تي سي و سدیم هپتا دسیل سولفات را به آن اضافه نموده، به گونه اي مخلوط کنید که پس از افزودن هر یك از مواد، حباب تشکیل نشود.
سپس محیط کشت فوق را به ضخامت دست کم ٥ میلي متر در پلیت هاي سترون تقسیم کنید. چنانچه محیط کشت آماده شده در همان روز کاري مورد استفاده قرار نمي گیرد، آن را در تاریکي و دماي ٣ ± ٥ درجه سلسیوس بیشینه تا ١٠ روز مي توانید نگهداري کنید .

یادآوري- محیط کشت کامل را نباید در اتوکلاو سترون نمود .

٧-١-٢ تریپتون سوي آگار[1]

ترکیبات	**مقدار**
تریپتون از کازئین	١٥ گرم
سوي پپتون	٥ گرم
کلرید سدیم	٥ گرم
آگار	١٥ تا ٢٥ گرم
آب مقطر	تا ١٠٠٠ میلي لیتر

طرز تهیه : مواد فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل کنید. . pH نهایي محیط باید در دمای ٢٥ درجه سلسیوس برابر ٠/١ ± ٧/٢ باشد . سپس در حجم هاي بیشینه ٢٥٠ میلي لیتري در اتوکلاو با دماي ١ ± ١٢١ درجه سلسیوس بمدت ١٥ دقیقه سترون کنید. پس از سرد نمودن دماي محیط کشت تا ٥ ± ٥٠ درجه سلسیوس، به ضخامت حداقل ٥ میلي متر، در پلیت هاي سترون تقسیم نمایید .

٧-١-٣ تریپتون صفرا آگار[2]

ترکیبات	**مقدار**
تریپتون از کازئین	٢٠ گرم
نمك صفراوي	١/٥ گرم
آگار	١٥ تا ٢٥ گرم
آب مقطر	تا ١٠٠٠ میلي لیتر

طرز تهیه : مواد فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل کنید .
pH نهایي محیط باید در دمای ٢٥ درجه سلسیوس برابر ٠/٥ ±

1- Tryptone soy agar (TSA)
2-Tryptone Bile Agar (TBA)

۷/۲ باشد . محیط کشت فوق را پس از تقسیم در حجم های بیشینه ۲۵۰ میلی لیتری در اتوکلاو با دمای ۱ ± ۱۲۱ درجه سلسیوس بمدت ۱۵ دقیقه سترون کنید. پس از سرد نمودن دمای محیط کشت تا ۵ ± ۵۰ درجه سلسیوس، به ضخامت دست کم ۵ میلی‌متر در پلیت‌های سترون تقسیم نمایید .

یادآوری- برای تهیه محیط کشت بصورت دولایه ، حدود یک میلی لیتر از محیط کشت تریپتون سوی آگار بند ۷-۱-۲ با دمای ۵ ± ۵۰ درجه سلسیوس را ۳۰ الی ۶۰ دقیقه قبل از قرار دادن صافی غشایی ، روی محیط کشت تریپتون صفرا آگار جامد شده بند ۷-۱-۳ بریزید .

۷-۱-٤ آبگوشت تریپتوفان[1]

ترکیبات	مقدار
کازئین هضم شده	۱۰ گرم
L- تریپتوفان	۱ گرم
کلرید سدیم	۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه : مواد فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل کنید. پس از تقسیم در لوله های آزمایش به حجم های ۳ میلی لیتر و مسدود نمودن لوله های آزمایش با گلوله های پنبه ای و یا درپوش های فلزی یا پلاستیکی، در اتوکلاو با دمای ۱ ± ۱۲۱ درجه سلسیوس بمدت ۱۵ دقیقه سترون نمایید. pH نهایی محیط باید در دمای ۲۵ درجه سلسیوس برابر ۰/۱ ± ۷/۵ باشد .

۷-۱-۵ محلول های رقیق کننده

۷-۱-۵-۱ محلول رینگر یک به چهار

ترکیبات	**مقدار**
کلرید سدیم	۲/۲۵ گرم
کلرید پتاسیم	۰/۱۰۵ گرم
کلرید کلسیم بدون آب	۰/۱۲ گرم
کربنات هیدروژن سدیم	۰/۰۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه : مواد فوق را پس از حل کردن در آب مقطر، به حجم های ۹ و ۹۰ میلی لیتر در ظروف مناسب تقسیم کنید. سپس در اتوکلاو با دمای ۱ ± ۱۲۱ درجه سلسیوس بمدت ۱۵ دقیقه سترون نمایید. . pH نهایی محیط باید در دمای ۲۵ درجه سلسیوس برابر ۰/۱ ± ۷ باشد .

۷-۱-۵-۲ محلول فسفات بافری

1-Tryptophane Broth

ترکیبات	مقدار
دي هيدروژن پتاسيم فسفات	٤٢/٥ ميلي گرم
كلريد منيزيم	١٩٠ ميلي گرم
آب مقطر	١٠٠٠ ميلي ليتر

طرز تهيه :

الف- محلول فسفات

٣٤ گرم دي هيدروژن پتاسيم فسفات را در ٥٠٠ ميلي ليتر آب مقطر حل نماييد. pH را با محلول هيدروكسيد سديم يك مول در ليتر برابر ٠/٥ ± ٧/٢ تنظيم نموده، سپس با آب مقطر به حجم ١٠٠٠ ميلي ليتر برسانيد .

ب- محلول كلريد منيزيم

٣٨ گرم كلريد منيزيم را در ١٠٠٠ ميلي ليتر آب مقطر حل كنيد .

پ- محلول نهايي

١/٢٥ ميلي ليتر از محلول فسفات (الف) را با ٥ ميلي ليتر از محلول كلريد منيزيم (ب) مخلوط نموده، به ١٠٠٠ ميلي ليتر آب مقطر اضافه كنيد. سپس در حجم هاي مناسب تقسيم نموده و در اتوكلاو با دماي ١ ± ١٢١ درجه سلسيوس بمدت ١٥ دقيقه سترون نماييد. pH نهايي محيط بايد در دماى ٢٥ درجه سلسيوس برابر ٠/١ ± ٧ باشد .

٧-١-٦ معرف كواكس[1] (براي روش استاندارد)

ترکیبات	مقدار
پارا دي متيل امينو بنزآلدئيد[2]	٥ گرم
آميل الكل يا بوتيل الكل (عاري از بازهاي آلي)	٧٥ ميلي ليتر
اسيد هيدروكلريك	٢٥ ميلي ليتر

طرز تهيه : پارادي متيل امينو بنز آلدئيد را در آميل الكل حل نموده، سپس اسيد را با دقت و به آرامي به آن اضافه كنيد. محلول فوق بايد در ظروف تيره، دور از نور و در دماي ٣ ± ٥ درجه سلسيوس، نگهداري شود .

يادآوري- معرف كواكس بايد به رنگ زرد تا قهوه اي روشن باشد و چنانچه آميل الكل از كيفيت مناسبي برخوردار نباشد، در تركيب با آلدئيد به رنگ تيره در مي‌آيد كه نبايد مورد استفاده قرار گيرد .

٧-١-٧ معرف ايندول[1] (براي روش سريع)

1- Kovac's Reagent
2- Para dimethyl amino benz aldehyde

1- Indole Reagent

ترکیبات	مقدار
پارا دي متيل امينو بنزآلدئيد	۰/۵ گرم
اسيد هيدروكلريك	۱۰۰ ميلي ليتر

طرز تهيه : پارادي متيل امينو بنز آلدئيد را در اسيد هيدروكلريك با دقت و به آرامي حل كنيد. سپس در ظروف تيره و در دماي ۳ ± ۵ درجه سلسيوس نگهداري نماييد .

يادآوري ۱- رنگ معرف ايندول بايد زرد روشن بوده و چنانچه تبديل به رنگ زرد متمايل به قهوه اي شود، نبايد مورد استفاده قرار گيرد

يادآوري ۲- از آنجائيكه پارا دي متيل امينو بنزآلدئيد نبايد با پوست دست تماس داشته باشد، همچنين اميل الكل موجب تحريك غشاهاي موكوسي و ايجاد سرگيجه مي‌شود ، توصيه مي‌شود براي تهيه اين محلول ها از كابينت داراي لوله خروجي به بيرون از آزمايشگاه و همچنين دستكش و ماسك استفاده كنيد.

۷-۱-۸ معرف اكسيداز[1]

ترکیبات	مقدار
تترامتيل پارافنيلن دي آمين هيدروكلرايد [2]	۰/۱ گرم
آب مقطر	۱۰ ميلي ليتر

طرز تهيه :
ترا متيل پارافنيلن دي آمين هيدروكلرايد را در آب مقطر حل كنيد. محلول فوق پايدار نبوده و براي هر بار استفاده بايد تهيه گردد .

يادآوري- تركيب ترا متيل پارافنيلن دي آمين سرطانزا مي باشد. توصيه مي شود از تماس پوستي با اين تركيب خودداري كنيد و همچنين در هنگام كار با آن، از كابينت داراي لوله خروجي به بيرون از آزمايشگاه و دستكش و ماسك استفاده نماييد .

1-Oxidas Reagent
2- Tetramethyl Paraphenylenediamine hydrochloride

وسايل لازم

از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروب شناسي طبق استاندارد ملي ایران ۲۷۴۷ (آئین کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی) و همچنین وسایل زیر استفاده کنید :

۸-۱ وسایل مربوط به صافي غشایي

۸-۲ صافي غشایي از جنس استرسلولز[1] با قطر ۴۷ یا ۵۰ میلي متر و اندازه هاي روزنه ۰/۴۵ و ۰/۲ میکرومتر

۸-۳ بالشتك جاذب [2] با قطر دست کم ۴۷ میلي متر

۸-۴ pH متر با دقت ±۰/۱

۸-۵ لامپ جیوة کم فشار فراء بنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر

۸-۶ حمام آب گرم و یا گرمخانه قابل تنظیم در دماي ۳۶±۲ و ۴۴±۰/۵ درجه سلسیوس

۸-۷ گیره سر صاف

۹ روش اجراي آزمون

۹-۱ صاف سازي نمونه

۱۰۰ میلي لیتر نمونه آب ، رقیق نشده و یا رقیق شده با یکی از محلول های رقیق کننده بندهای ۷-۱-۵-۱ یا ۷-۱-۵-۲ را (طبق استاندارد ملی ایران ۴۲۰۷ آئین کار آزمونهاي هایباکتریولوژیکی آب) از صافي غشایي با اندازه روزنه ۰/۴۵ میکرمتر عبور دهید.

یادآوري- حجم نمونه متناسب با نوع آب متفاوت است. بطور مثال براي آب هاي معدني بسته بندي شده، حجم نمونة ۲۵۰ میلي لیتر مناسب مي باشد .

۹-۲ روش کشت

۹-۲-۱ کشت (در روش استاندارد)

با استفاده از گیره سر صاف سترون، صافي تهیه شده در بند ۹-۱ را به گونه اي بر روي محیط کشت لاکتوز تي تي سي آگار حاوي سدیم هپتا دسیل سولفات بند ۷-۱-۱ قرار دهید تا حباب هوا در زیر آن تشکیل نشود .

۹-۲-۱-۱ گرمخانه گذاري پلیت ها (در روش استاندارد)

پلیت هاي بند ۹-۲-۱ را در دماي ۲ ± ۳۶ درجه سلسیوس بمدت ۳ ± ۲۱ ساعت گرمخانه گذاري کنید .

یادآوري - در پلیت هایي که پس از ۳ ± ۲۱ ساعت، کلني هاي مشخص تشکیل نمي شود، به منظور افزایش حساسیت و دقت بیشتر آزمایش ، زمان گرمخانه گذاري را مي توان تا ۴ ± ۴۴ ساعت افزایش داد . استفاده از

---

[1] -Cellulose esters
[2] - Filter pad

صافی غشایی دیگر و گرمخانه گذاری آن در دمای ۴۴ درجه سلسیوس می تواند مشکل رشد باکتریهای مزاحم را برطرف کند .

۹-۲-۱-۲ شمارش پلیت ها (در روش استاندارد)
تمام کلني هاي مشخص را که بر روي صافي غشايي بند ۹-۲-۱-۱ رشد نموده اند را، به عنوان باکتريهاي لاکتوز مثبت شمارش کنيد .

يادآوري- کلني هاي مشخص بدون توجه به اندازه آنها ، با ايجاد رنگ زرد در محيط اطراف آنها تشخيص داده مي‌شوند .

۹-۲-۱-۳ آزمون اکسيداز (در روش استاندارد)
با استفاده از سوزن کشت سترون، ترجيحاً تمام و يا دست کم ۱۰ کلني مشخص بند ۹-۲-۱-۲
را بر روي محيط کشت آگاردار غير انتخابي مانند تريپتون سوي آگار بند ۷-۱-۲ بصورت خطي کشت داده، در دماي ۲ ± ۳۶ درجه سلسيوس بمدت ۳ ± ۲۱ ساعت گرمخانه گذاري نماييد.
سپس آزمون اکسيداز را به روش زير انجام دهيد :
- ۲ تا ۳ قطره از معرف اکسيداز بند ۷-۱-۸ را بر روي بالشتك جاذب بريزيد .
- با استفاده از حلقة کشت پلاتين، سواب[1] يا ميله شيشه اي مقداري از کلني مشخص بند
۹-۲-۱-۳ را بر روي بالشتك جاذب آغشته به معرف اکسيداز قرار دهيد .
- ايجاد رنگ ارغواني مايل به آبي تيره، در مدت ۳۰ ثانيه را بعنوان واکنش مثبت در نظر بگيريد .

يادآوري ۱- کلي فرم ها و اشريشياکلي اکسيداز منفي مي‌باشند .

يادآوري ۲- آزمون اکسيداز را بايد با باکتريهاي شناخته شده داراي واکنش مثبت مانند (سودوموناس آئروژينوزا)[1] و واکنش منفی مانند (اشريشيا کلی) تکرار کنيد .

يادآوري ۳- از به کار بردن حلقه کشت از جنس نيکل و يا کروم بدليل ايجاد پاسخ مثبت کاذب خودداري کنيد .

۹-۲-۱-۴ آزمون ايندول (در روش استاندارد)
با استفاده از سوزن کشت سترون، تمام و يا دست کم ۱۰ کلني مشخص بند ۹-۲-۱-۲ را درون محيط کشت آبگوشت تريپتوفان بند ۷-۱-۴ تلقيح نموده و در دماي ۰/۵ ± ۴۴ درجه سلسيوس بمدت ۳ ± ۲۱ ساعت گرمخانه گذاري کنيد. سپس ۰/۲ ميلي ليتر معرف کواکس بند ۷-۱-۶ را داخل لوله حاوي

1- Swab

[1] Psedomonas aueroginosa

تريپتوفان ريخته، بررسي نماييد. ظهور رنگ قرمز آلبالويي در سطح محيط كشت مايع، تأييدي بر ايجاد ايندول در محيط كشت مي‌باشد .

يادآوري- باكتري هاي اشريشيا كلي ايندول مثبت مي‌باشند .

۹-۲-۲ كشت و گرمخانه گذاري (در روش سريع)

صافي غشايي تهيه شده در بند ۹-۱ را با استفاده از گيرة سر صاف بر روي محيط كشت تريپتون سوي آگار بند ۷-۱-۲ قرار دهيد و در دماي ۲ ± ۳٦ درجه سلسيوس به مدت ٤ تا ٥ ساعت گرمخانه گذاري نماييد . پس از پايان اين مدت ، صافي غشايي را روي محيط تريپتون صفرا آگار بند ۷-۱-۳ منتقل نموده و در دماي ۰/٥ ± ٤٤ درجه سلسيوس به مدت ۱۹ تا ۲۰ ساعت گرمخانه‌گذاري كنيد .

يادآوري - صافي ها بايد به گونه اي روي پليت قرار گيرد كه سطح چهارخانه آن به طرف بالا باشد .

۹-۲-۲-۱ شمارش پليت ها (در روش سريع)

صافي غشايي بند ۹-۲-۲ را بر روي يك بالشتك جاذب بند ۸-۲ كه به معرف ايندول بند ۷-۱-۷ آغشته شده است، انتقال داده و بمدت ۱۰ تا ۳۰ دقيقه آن را تحت تأثير تابش لامپ فراء بنفش بند ۸ – ٥ با طول موج ۲٥٤ نانومتر قرار دهيد .

تمام كلني هاي قرمز رنگ را بعنوان اشريشياكلي شمارش كنيد .

يادآوري ۱- طول زمان تابش فراء بنفش به كيفيت معرف مصرفي بستگي دارد .

يادآوري ۲- پرتو فراء بنفش به چشم ها و پوست آسيب مي رساند،لذا توصيه مي شود در هنگام كار كردن با اين پرتو، از دستكش و عينك ايمني استفاده كنيد .

يادآوري ۳- از آنجاييكه ممكن است توزيع نامناسب كلني ها، يا وجود كلني هاي مزاحم با نفوذ رنگ به كلني هاي اطراف در عمليات افتراقي فوق توليد اشكال كند، به منظور پيشگيري از اين تداخل مي‌توانيد از كشت دو لايه اي استفاده كنيد .

۱۰ بيان نتايج

تمام كلني هاي مشخص تأييد شده در بند ۹-۲-۱ (كشت در روش استاندارد) و بند ۹-۲-۲ (كشت در روش سريع) را شمارش نموده و در هر كدام ، طبق فرمول يك ، تعداد باكتري هاي اشريشيا كلي و كلي فرم ها را در ۱۰۰ ميلي‌ليتر نمونه بيان كنيد .

فرمول يك

$$C = \frac{A N V_s F}{B V_t}$$

C = تعداد كلني هاي تأييد شده در ۱۰۰ ميلي ليتر نمونه
N = تعداد كلني هاي مشخص بر روي صافي غشايي ها
B = تعداد كلني هايي كه براي انجام آزمون هاي تأييدي كشت داده شده است .
A = تعداد كلني هاي B كه تأييد شده است .
Vt = حجم نمونه آب صاف شده
Vs = حجم نمونه براي بيان نتايج براي مثال در ۱۰۰ ميلي ليتر
F = ضريب رقت

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
۳-۱۱ تاريخ ارسال نمونه به آزمايشگاه، تاريخ انجام آزمون
٤-۱۱ بيان نتايج طبق بند ۱۰ اين استاندارد
٥-۱۱ روش آزمايش طبق استاندارد ملي ايران.....
٦-۱۱ نام ونام خانوادگي و امضاء آزمايش كننده
۷-۱۱ ساير اطلاعات كه مربوط به روش آزمون باشد .

ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI NUMBER

7725-1

Water quality- Detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria
Part 1: Membrane filtration method

1st. Revision