



جمهوری اسلامی ایران

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شماره 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 شورای 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 کارایی 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 راهنمایی 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 اظهار نظر 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 هزینه ها و در نتیجه موجب افزایش درآمد ملی و رفاه عمومی و کاهش قیمتتها میشود.

### کمیسیون استاندارد

جستجو و شمارش کلیفرم ها، کلیفرم های گرمایی 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 -      پزشك      انستیتو پاستور

مهدخت



مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران	فوق لیسانس تغذیه و بهداشت	حسن پور - محمدحسین
مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران	فوق لیسانس قارچ شناسی	روشن طبري - مژده
شرکت آب و فاضلات استان تهران پژوهشگاه صنعت نفت	لیسانس بیولوژی فوق لیسانس میکروبیولوژی	صدیقی - هما محبعلی - قاسمعلی
مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران	لیسانس تغذیه	دبیر زندوکیلی - فاطمه

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

## جستجو و شمارش کلیفرم‌ها , کلیفرم‌ها گرم‌پای<sup>1</sup> و اشریشیاکلی فرضی<sup>2</sup> در آب به روش چند لوله‌ای<sup>3</sup>

### 1 - هدف

هدف از تدوین این استاندارد , ارائه یک روش مرجع برای شناسایی و شمارش کلیفرم‌ها , کلیفرم‌های گرم‌پای و اشریشیاکلی فرضی در آب به وسیله کشت در محیط مایع به روش چند لوله‌ای و محاسبه بیشترین تعداد احتمالی<sup>4</sup> 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 هوایی 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 کنند .

#### 4 - اساس روش

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

4 - 2 - گرمخانه‌گذاری 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 گرمخانه‌گذاری می‌شود . سپس با استفاده از جداول آماری بیشترین تعداد احتمالی کلیفرم‌ها ، کلیفرم‌های گرم‌پای و اشریشیاکلی فرضی در 100 میلی‌لیتر از نمونه محاسبه می‌شود . ( از تعداد لوله‌هایی که نتایج تأییدی مثبتی داشته‌اند).

#### 5 - مواد رقیق‌کننده ، 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 میلی لیتر 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  $35 \pm 0.5$  یا  $37 \pm 0.5$  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 منفي بوده و يك يا 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 ساز<sup>5</sup> (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 - سبزرخشان و اش‌ریشیاکلی برات نیز استفاده شود.

7 - 4 - 1 - کلیفرم‌ها :

برای تأیید وجود کلیفرم‌ها، توسط حلقه کشت از لوله‌های واکنش مثبت بند 7 - 3 برداشت نموده و به لوله حاوی محیط آبگوشت لاکتوز - صفرا - سبزرخشان 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 نمی‌باشد .  
 گونه‌های آئروموناتس 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 - 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 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 در نظر بگیرید .

یادآوری : در مواردی که آزمون اکسیداز انجام می‌شود , آزمون‌های کنترل را باید با میکروارگانیسم‌های شناخته شده دارای واکنش مثبت ( پزودوموناتس آئروژینوزا )<sup>6</sup> و واکنش منفی ( اشیشیاکلی ) 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 اشیشیاکلی فرضی را در 100 میلی‌لیتر نمونه با استفاده از جداول آماری پیوست , محاسبه نمایید .

### پیوست الف

محلول‌های رقیق کننده :

1 - آب پیتونه ( 0/1 درصد )

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





روش تهیه : پپتون را در 950 میلی لیتر آب حل نموده و PH را با محلول هیدروکسید سدیم و یا اسید کلریدریک ( يك 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  $121 \pm 1$  درجه سلسیوس به مدت 15 دقیقه اتوکلاو نمایید .  
2 - آب پپتونه نمکی

ترکیبات	مقدار
پپتون	۱ گرم
کلرید سدیم	۸/۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

روش تهیه : ترکیبات فوق را در 950 میلی لیتر آب حل نموده و PH را با محلول هیدروکسید سدیم و یا اسید کلریدریک ( يك 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  $121 \pm 1$  درجه سلسیوس به مدت 15 دقیقه اتوکلاو نمایید .

### 3 - محلول رینگر $\frac{1}{4}$

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

روش تهیه : ترکیبات فوق را در آب حل نموده و در ظروف مناسب تقسیم نمایید . سپس در دمای  $121 \pm 1$  به مدت 15 دقیقه اتوکلاو کنید . PH نهایی محیط باید  $7 \pm 1$  باشد .  
4 - محلول بافر فسفات:



ترکیبات	مقدار
دی هیدروژن پتاسیم فسفات	۴۲/۵ میلی گرم
کلرید منیزیم	۱۹۰ میلی گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

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  $121 \pm 1$  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 برات ( غلظت مضاعف ) Lactose Broth

ترکیبات	مقدار
پپتون	۱۰ گرم
لاکتوز	۱۰ گرم
عصاره گوشت	۶ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

روش تهیه : ترکیبات فوق را در آب جوش حل نموده و در لوله های 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 مك كانگي Mac Conkey Broth

ترکیبات	مقدار
نمک های صفرای	۱۰ گرم
پپتون	۴۰ گرم
لاکتوز	۲۰ گرم
کلرید سدیم	۱۰ گرم
بروموکروزول یا کروزیل ارغواسی (محلول اتانولی ۱٪ حجم به حجم)	۲ میلی لیتر
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

روش تهیه پپتون : نمک های صفرای 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 اتوکلاو نمایید .

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



## Improved formate lactose glutamate medium

ترکیبات	مقدار	
لاکتوز	۲۰ گرم	Lactose
نمک سدیم گلوتامیک اسید	" ۱۲/۷	L(+)-Glutamic acid sodium salt
مونوهیدروکلرید آرژینین	" ۰/۰۴۸	L(+)-Arginine monohydrochloride
اسید اسپارتیک	" ۰/۰۴	L(-)-Aspartic acid
سیستین	" ۰/۰۴	L(-)-Cystine
فرمات سدیم	" ۰/۵	Sodium formate
دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات	" ۱/۸	Dipotassium hydrogen phosphate
کلرید آمونیم	" ۵	Ammonium chloride
سولفات منیزیم	" ۰/۰۲ (MgSO <sub>۴</sub> · ۷H <sub>۲</sub> O)	Magnesium sulfate(MgSO <sub>۴</sub> · 7H <sub>2</sub> O)
کلرید کلسیم	" ۰/۰۲ (CaCl <sub>۲</sub> · ۲H <sub>۲</sub> O)	Calcium chloride(CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O)
سیترات آهن (سه ظرفیتی)	" ۰/۰۲	Iron(III)Citrate scales
تیامین	" ۰/۰۰۲	Thiamine (aneurin hydrochloride)
اسید نیکوتیک	" ۰/۰۰۲	Nicotinic acid
اسید پانتوتیک	" ۰/۰۰۲	Pantothenic acid
بروموکروزول ارغوانی (۱٪ جرم به جرم محلول الکلی)	۲ میلی لیتر	Bromocresol purple ( 1% m/m-ethanolic solution )
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر	Distilled water

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 -



	مقدار	ترکیبات
L(+) <i>Arginine monohydrochloride</i>	۰/۴ گرم	مونوهیدروکلرید آرژینین
L(-) <i>Aspartic acid</i>	" 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 -

	مقدار	ترکیبات
L(-) <i>Cystine</i>	۰/۴ گرم	سیستین
<i>Sodium hydroxide</i> ( 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 -

	مقدار	ترکیبات
<i>Nicotinic acid</i>	۰/۰۲ گرم	اسید نیکوتینیک
<i>Pantothenic acid</i>	" 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 -

	مقدار	ترکیبات
<i>Iron (III) Citrate scales</i>	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 -

	مقدار	ترکیبات
<i>Calcium chloride</i> ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	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 يك دهم درصد تیامین را در آب مقطر سترون به صورت زیر تهیه نمایند :

محتویات يك 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 PH 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% الکی 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 حجم های 10 و 50 میلی لیتری تقسیم کنید . هر لوله یا ظرفی که مورد استفاده قرار می گیرد , باید دارای لوله دور هام باشد . پس از سترون نمودن باید مطمئن شوید که لوله دور هام 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 سریع تری می دهد .

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

Lauryl tryptose (lactose) broth



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

روش تهیه : تریپتونوز , 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 حجم های 5 میلی لیتری در لوله های حاوی دور هام تقسیم کنید . محیط با غلظت مضاعف را نیز در حجم های 10 و 50 میلی لیتری در لوله های حاوی دور هام تقسیم نموده در دمای 115 درجه سلسیوس به مدت 10 دقیقه اتوکلاو کنید .  
2 - محیط های تأییدی :

1 - 2 - آبگوشت لاکتوز - صفرا سبز درخشان green (bile) borth Brilliant-lactose

ترکیبات	مقدار	
پپتون	۱۰ گرم	Peptone
لاکتوز	" ۱۰	Lactose
پوئر صفرای گاوی	" ۲۰	Oxbile (dehydrated)
سبز درخشان (محلول ۰/۱ درصد در آب)	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 میلی لیتر آب مقطر حل کنید . سپس 20 گرم صفرای گاوی را که در 200 میلی لیتر 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
دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات	" ۴	dipotassium hydrogen Phosphate
پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات	" ۱/۵	Potassium dihydrogen Phosphate
کلرید سدیم	" ۵	Sodium Chloride
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی‌لیتر	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 میلی‌لیتر	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 کنید .  
یادآوری : افزودن 0/1% (m/m) تریپتوفان نتایج بهتری به دست  
می‌دهد .

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





## Lauryl Tryptose Manitol Broth with Tryptophan

ترکیبات	مقدار
تریپتوز	۲۰ گرم
مانیتول	" ۵
کلرید سدیم	" ۵
دی پتاسیم هیدروژن فسفات	" ۲/۷۵
پتاسیم دی هیدروژن فسفات	" ۲/۷۵
لوریل سولفات سدیم	" ۰/۱
تریپتوفان	" ۰/۲
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

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 ۵ میلی لیتری در لوله‌های حاوی دورهام تقسیم نموده و در ۱۱۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو کنید.

3 - معرف‌ها:

3 - 1 - معرف کواکس

ترکیبات	مقدار
پارادی‌متیل‌امینوبنزالدهید	۵ گرم
اتیل الکل	۷۵ میلی لیتر
اسید هیدروکلریک	" ۲۵

روش تهیه: پس از حل کردن آلدئید در الکل اسید را به دقت اضافه نمایید. محلول فوق را در دمای ۴ درجه سلسیوس و به دور از نور نگهداری کنید.

3 - 2 - معرف اکسیداز

ترکیبات	مقدار
تترا‌متیل‌پ‌فنیلن - دی‌آمین - هیدروکلراید	۰/۱ گرم
آب مقطر	۱۰ میلی لیتر



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 يك

تعداد لوله های واکنش مثبت			تعداد احتمالی در ۱۰۰ میلی لیتر				تعداد احتمالی در ۱۰۰ میلی لیتر
۳ لوله هر يك ۱۰ میلی لیتر	۲ لوله هر يك ۱ میلی لیتر	۱ لوله هر يك ۰/۱		۳ لوله هر يك ۱۰ میلی لیتر	۲ لوله هر يك ۱ میلی لیتر	۱ لوله هر يك ۰/۱	
۰	۰	۰	۴۳	۲	۱	۰	۹
۰	۰	۱	۳	۲	۰	۱	۱۴
۰	۰	۲	۲	۲	۰	۲	۲۰
۰	۰	۳	۱	۲	۰	۳	۲۶
۰	۱	۰	۳	۲	۱	۰	۱۵
۰	۱	۱	۶	۲	۱	۱	۴۰
۰	۱	۲	۴	۲	۲	۰	۲۷
۰	۱	۳	۲	۲	۱	۲	۲۴
۰	۲	۰	۱۲	۲	۱	۳	۲۴
۰	۲	۱	۷	۲	۲	۰	۲۱
۰	۲	۲	۱۱	۲	۲	۱	۲۸
۰	۲	۳	۱۲	۲	۲	۲	۳۵
۰	۳	۰	۱۶	۲	۲	۳	۴۲
۰	۳	۱	۹	۲	۲	۰	۱۹
۰	۳	۲	۱۳	۲	۳	۱	۳۶
۰	۳	۳	۱۲	۲	۳	۲	۴۱
۰	۴	۰	۱۹	۲	۳	۳	۵۲
۱	۰	۰	۴	۳	۰	۰	۲۲
۱	۰	۱	۷	۳	۰	۱	۲۹
۱	۰	۲	۱۱	۳	۰	۲	۳۴
۱	۰	۳	۱۵	۳	۰	۳	۴۵
۱	۱	۰	۷	۳	۱	۰	۲۳
۱	۱	۱	۱۱	۳	۱	۱	۲۵
۱	۱	۲	۱۵	۳	۱	۲	۳۲
۱	۱	۳	۱۹	۳	۱	۳	۴۳
۱	۲	۰	۱۱	۳	۲	۰	۲۳
۱	۲	۱	۱۵	۳	۲	۱	۳۰
۱	۲	۲	۲۰	۳	۲	۲	۳۷
۱	۲	۳	۲۴	۳	۲	۳	۴۸
۱	۳	۰	۱۱	۳	۳	۰	۲۴
۱	۳	۱	۱۵	۳	۳	۱	۳۱
۱	۳	۲	۲۰	۳	۳	۲	۳۸
۱	۳	۳	۲۴	۳	۳	۳	۴۹
۱	۳	۳	۲۹	۳	۳	۳	۵۶
۱	۳	۳	۳۴	۳	۳	۳	۶۳
۱	۳	۳	۳۹	۳	۳	۳	۷۰
۱	۳	۳	۴۴	۳	۳	۳	۷۷
۱	۳	۳	۴۹	۳	۳	۳	۸۴
۱	۳	۳	۵۴	۳	۳	۳	۹۱
۱	۳	۳	۵۹	۳	۳	۳	۹۸
۱	۳	۳	۶۴	۳	۳	۳	۱۰۵
۱	۳	۳	۶۹	۳	۳	۳	۱۱۲
۱	۳	۳	۷۴	۳	۳	۳	۱۱۹
۱	۳	۳	۷۹	۳	۳	۳	۱۲۶
۱	۳	۳	۸۴	۳	۳	۳	۱۳۳
۱	۳	۳	۸۹	۳	۳	۳	۱۴۰
۱	۳	۳	۹۴	۳	۳	۳	۱۴۷
۱	۳	۳	۹۹	۳	۳	۳	۱۵۴
۱	۳	۳	۱۰۴	۳	۳	۳	۱۶۱
۱	۳	۳	۱۰۹	۳	۳	۳	۱۶۸
۱	۳	۳	۱۱۴	۳	۳	۳	۱۷۵
۱	۳	۳	۱۱۹	۳	۳	۳	۱۸۲
۱	۳	۳	۱۲۴	۳	۳	۳	۱۸۹
۱	۳	۳	۱۲۹	۳	۳	۳	۱۹۶
۱	۳	۳	۱۳۴	۳	۳	۳	۲۰۳
۱	۳	۳	۱۳۹	۳	۳	۳	۲۱۰
۱	۳	۳	۱۴۴	۳	۳	۳	۲۱۷
۱	۳	۳	۱۴۹	۳	۳	۳	۲۲۴
۱	۳	۳	۱۵۴	۳	۳	۳	۲۳۱
۱	۳	۳	۱۵۹	۳	۳	۳	۲۳۸
۱	۳	۳	۱۶۴	۳	۳	۳	۲۴۵
۱	۳	۳	۱۶۹	۳	۳	۳	۲۵۲
۱	۳	۳	۱۷۴	۳	۳	۳	۲۵۹
۱	۳	۳	۱۷۹	۳	۳	۳	۲۶۶
۱	۳	۳	۱۸۴	۳	۳	۳	۲۷۳
۱	۳	۳	۱۸۹	۳	۳	۳	۲۸۰
۱	۳	۳	۱۹۴	۳	۳	۳	۲۸۷
۱	۳	۳	۱۹۹	۳	۳	۳	۲۹۴
۱	۳	۳	۲۰۴	۳	۳	۳	۳۰۱
۱	۳	۳	۲۰۹	۳	۳	۳	۳۰۸
۱	۳	۳	۲۱۴	۳	۳	۳	۳۱۵
۱	۳	۳	۲۱۹	۳	۳	۳	۳۲۲
۱	۳	۳	۲۲۴	۳	۳	۳	۳۲۹
۱	۳	۳	۲۲۹	۳	۳	۳	۳۳۶
۱	۳	۳	۲۳۴	۳	۳	۳	۳۴۳
۱	۳	۳	۲۳۹	۳	۳	۳	۳۵۰
۱	۳	۳	۲۴۴	۳	۳	۳	۳۵۷
۱	۳	۳	۲۴۹	۳	۳	۳	۳۶۴
۱	۳	۳	۲۵۴	۳	۳	۳	۳۷۱
۱	۳	۳	۲۵۹	۳	۳	۳	۳۷۸
۱	۳	۳	۲۶۴	۳	۳	۳	۳۸۵
۱	۳	۳	۲۶۹	۳	۳	۳	۳۹۲
۱	۳	۳	۲۷۴	۳	۳	۳	۳۹۹
۱	۳	۳	۲۷۹	۳	۳	۳	۴۰۶
۱	۳	۳	۲۸۴	۳	۳	۳	۴۱۳
۱	۳	۳	۲۸۹	۳	۳	۳	۴۲۰
۱	۳	۳	۲۹۴	۳	۳	۳	۴۲۷
۱	۳	۳	۲۹۹	۳	۳	۳	۴۳۴
۱	۳	۳	۳۰۴	۳	۳	۳	۴۴۱
۱	۳	۳	۳۰۹	۳	۳	۳	۴۴۸
۱	۳	۳	۳۱۴	۳	۳	۳	۴۵۵
۱	۳	۳	۳۱۹	۳	۳	۳	۴۶۲
۱	۳	۳	۳۲۴	۳	۳	۳	۴۶۹
۱	۳	۳	۳۲۹	۳	۳	۳	۴۷۶
۱	۳	۳	۳۳۴	۳	۳	۳	۴۸۳
۱	۳	۳	۳۳۹	۳	۳	۳	۴۹۰
۱	۳	۳	۳۴۴	۳	۳	۳	۴۹۷
۱	۳	۳	۳۴۹	۳	۳	۳	۵۰۴
۱	۳	۳	۳۵۴	۳	۳	۳	۵۱۱
۱	۳	۳	۳۵۹	۳	۳	۳	۵۱۸
۱	۳	۳	۳۶۴	۳	۳	۳	۵۲۵
۱	۳	۳	۳۶۹	۳	۳	۳	۵۳۲
۱	۳	۳	۳۷۴	۳	۳	۳	۵۳۹
۱	۳	۳	۳۷۹	۳	۳	۳	۵۴۶
۱	۳	۳	۳۸۴	۳	۳	۳	۵۵۳
۱	۳	۳	۳۸۹	۳	۳	۳	۵۶۰
۱	۳	۳	۳۹۴	۳	۳	۳	۵۶۷
۱	۳	۳	۳۹۹	۳	۳	۳	۵۷۴
۱	۳	۳	۴۰۴	۳	۳	۳	۵۸۱
۱	۳	۳	۴۰۹	۳	۳	۳	۵۸۸
۱	۳	۳	۴۱۴	۳	۳	۳	۵۹۵
۱	۳	۳	۴۱۹	۳	۳	۳	۶۰۲
۱	۳	۳	۴۲۴	۳	۳	۳	۶۰۹
۱	۳	۳	۴۲۹	۳	۳	۳	۶۱۶
۱	۳	۳	۴۳۴	۳	۳	۳	۶۲۳
۱	۳	۳	۴۳۹	۳	۳	۳	۶۳۰
۱	۳	۳	۴۴۴	۳	۳	۳	۶۳۷
۱	۳	۳	۴۴۹	۳	۳	۳	۶۴۴
۱	۳	۳	۴۵۴	۳	۳	۳	۶۵۱
۱	۳	۳	۴۵۹	۳	۳	۳	۶۵۸
۱	۳	۳	۴۶۴	۳	۳	۳	۶۶۵
۱	۳	۳	۴۶۹	۳	۳	۳	۶۷۲
۱	۳	۳	۴۷۴	۳	۳	۳	۶۷۹
۱	۳	۳	۴۷۹	۳	۳	۳	۶۸۶
۱	۳	۳	۴۸۴	۳	۳	۳	۶۹۳
۱	۳	۳	۴۸۹	۳	۳	۳	۷۰۰
۱	۳	۳	۴۹۴	۳	۳	۳	۷۰۷
۱	۳	۳	۴۹۹	۳	۳	۳	۷۱۴
۱	۳	۳	۵۰۴	۳	۳	۳	۷۲۱
۱	۳	۳	۵۰۹	۳	۳	۳	۷۲۸
۱	۳	۳	۵۱۴	۳	۳	۳	۷۳۵
۱	۳	۳	۵۱۹	۳	۳	۳	۷۴۲
۱	۳	۳	۵۲۴	۳	۳	۳	۷۴۹
۱	۳	۳	۵۲۹	۳	۳	۳	۷۵۶
۱	۳	۳	۵۳۴	۳	۳	۳	۷۶۳
۱	۳	۳	۵۳۹	۳	۳	۳	۷۷۰
۱	۳	۳	۵۴۴	۳	۳	۳	۷۷۷
۱	۳	۳	۵۴۹	۳	۳	۳	۷۸۴
۱	۳	۳	۵۵۴	۳	۳	۳	۷۹۱
۱	۳	۳	۵۵۹	۳	۳	۳	۷۹۸
۱	۳	۳	۵۶۴	۳	۳	۳	۸۰۵
۱	۳	۳	۵۶۹	۳	۳	۳	۸۱۲
۱	۳	۳	۵۷۴	۳	۳	۳	۸۱۹
۱	۳	۳	۵۷۹	۳	۳	۳	۸۲۶
۱	۳	۳	۵۸۴	۳	۳	۳	۸۳۳
۱	۳	۳	۵۸۹	۳	۳	۳	۸۴۰
۱	۳	۳	۵۹۴	۳	۳	۳	۸۴۷
۱	۳	۳	۵۹۹	۳	۳	۳	۸۵۴
۱	۳	۳	۶۰۴	۳	۳	۳	۸۶۱
۱	۳	۳	۶۰۹	۳	۳	۳	۸۶۸
۱	۳	۳	۶۱۴	۳	۳	۳	۸۷۵
۱	۳	۳	۶۱۹	۳	۳	۳	۸۸۲
۱	۳	۳	۶۲۴	۳	۳	۳	۸۸۹
۱	۳	۳	۶۲۹	۳	۳	۳	۸۹۶
۱	۳	۳	۶۳۴	۳	۳	۳	۹۰۳
۱	۳	۳	۶۳۹	۳	۳	۳	۹۱۰
۱	۳	۳	۶۴۴	۳	۳	۳	۹۱۷
۱	۳	۳	۶۴۹	۳	۳	۳	۹۲۴
۱	۳	۳	۶۵۴	۳	۳	۳	۹۳۱
۱	۳	۳	۶۵۹	۳	۳	۳	۹۳۸
۱	۳	۳	۶۶۴	۳	۳	۳	۹۴۵
۱	۳	۳	۶۶۹	۳	۳	۳	۹۵۲
۱	۳	۳	۶۷۴	۳	۳	۳	۹۵۹
۱	۳	۳	۶۷۹	۳	۳	۳	۹۶۶
۱	۳	۳	۶۸۴	۳	۳	۳	۹۷۳
۱	۳	۳	۶۸۹	۳	۳	۳	۹۸۰
۱	۳	۳	۶۹۴	۳	۳	۳	۹۸۷
۱	۳	۳	۶۹۹	۳	۳	۳	۹۹۴
۱	۳	۳	۷۰۴	۳	۳	۳	۱۰۰۱
۱	۳	۳	۷۰۹	۳	۳	۳	۱۰۰۸
۱	۳	۳	۷۱۴	۳	۳	۳	۱۰۱۵
۱	۳	۳	۷۱۹	۳	۳	۳	۱۰۲۲
۱	۳	۳	۷۲۴	۳	۳	۳	۱۰۲۹
۱	۳	۳	۷۲۹	۳	۳	۳	۱۰۳۶
۱	۳	۳	۷۳۴	۳	۳	۳	۱۰۴۳
۱	۳	۳	۷۳۹	۳	۳	۳	۱۰۵۰
۱	۳	۳</					



---

Thermotolerant coliform -1  
resumptiveP1 Escherichia col -2  
Multiple Tube Method -3  
Most robable Number -4  
Isolation medium -5  
Pseudomonas 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

1<sup>st</sup> Edition