www.abpsoil.com

ابنیه پایدار سبز

INSO
5869
1st. Revision
2014

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران
Iranian National Standardization Organization

استاندارد ملی ایران
۵۸۶۹
تجدید نظر اول
۱۳۹۲

آب معدنی طبیعی – روش‌های آزمون میکروبی

Natural mineral water – Microbiological test methods

ICS: 67.160.20 ; 07.100

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک مادهٔ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

نام موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب یکصد و پنجاه و دومین جلسه شورای عالی اداری مورخ ۹۰/۶/۲۹ به سازمان ملی استاندارد ایران تغییر و طی نامه شماره ۲۰۶/۳۵۸۳۸ مورخ ۹۰/۷/۲۴ جهت اجرا ابلاغ شده است .

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان سازمان ، صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود وکوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود .پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذی صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند درکمیتهٔ ملی طرح و بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود .بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شوند که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌دهد به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)[1] ،کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور ، از آخرین پیشرفت های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود .

سازمان ملی استاندارد ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. سازمان می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمان ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد ایران این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آن ها نظارت می کند. ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization
2 - International Electrotechnical Commission
3- International Organization of Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legale)
4 - Contact point
5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«آب معدنی طبیعی- روش‌های آزمون میکروبی»

(تجدید نظر اول)

رئیس:	**سمت و/ یا نمایندگی**
زینی، فریده (دکترای قارچ شناسی)	دانشگاه تهران
دبیر:	
قبادی دانا، مریم (دکترای ژنتیک مولکولی)	سازمان ملی استاندارد ایران-پژوهشگاه استاندارد
اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
افضلی، سمانه سادات (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	اداره کل استاندارد استان مازندران
حکاک زاده، ستاره (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	اداره کل استاندارد استان کرمان
دوچشمه ، مهدی (فوق لیسانس بهداشت محیط)	سازمان ملی استاندارد ایران-پژوهشگاه استاندارد
رشنوادی، طاهره (فوق لیسانس صنایع غذایی)	کارشناس
سلیمانی فر، فاطمه (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	کارشناس
مصلحی، نازنین (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	اداره کل استاندارد استان البرز

مختاری، فهیمدخت (فوق لیسانس ایمونولوژی)	سازمان ملی استاندارد ایران-پژوهشگاه استاندارد
نظرلطفی، هدی (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	کارشناس

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
کمیسیون فنی تدوین استاندارد	ج
پیش گفتار	و
هدف	۱
دامنه کاربرد	۱
مراجع الزامی	۱
اصطلاحات و تعاریف	۱
اساس روش	۲
نمونه برداری	۲
مواد لازم	۳
وسایل لازم	۱۴
روش اجرای آزمون	۱۵
گزارش آزمون	۲۱

پیش گفتار

استاندارد" آب معدنی طبیعی –روش‌های آزمون میکروبی" نخستین بار در سال ۱۳۸۲ تدوین شد. این استاندارد بر اساس پیشنهادهای رسیده و بررسی توسط سازمان ملی استاندارد ایران و تایید کمیسیون‌های مربوط برای اولین بار مورد تجدید نظر قرار گرفت و در سیصدو پنجاه و دومین اجلاس کمیتهٔ ملی استاندارد بیولوژی و میکروبیولوژی مورخ ۹۲/۱۲/۶ تصویب شد، اینک به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ ، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود .

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینهٔ صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت . بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی استفاده کرد.

این استاندارد جایگزین استاندارد ملی ایران شماره ۵۸۶۹ : سال ۱۳۸۲ می شود.

منابع و ماخذی که برای تهیهٔ این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

۱- استاندارد ملی ایران ۵۳۵۳: سال ۱۳۷۸، جستجو و شمارش اسپور کلستریدیوم‌های احیا کننده سولفیت با استفاده از روش صافی غشایی در آب

۲- استاندارد ملی ایران ۸۸۶۹: سال ۱۳۸۵، کیفیت آب -شناسایی و شمارش *سودوموناس آئروژینوزا*[1] به روش صافی کردن غشایی

۳- استاندارد ملی ایران ۲-۷۷۲۴ : سال ۱۳۸۳، کیفیت آب -شناسایی و شمارش انتروکوکوس‌های روده ای به روش صافی کردن غشایی

۴- استاندارد ملی ایران۱- ۷۷۲۵: سال ۱۳۸۳، کیفیت آب -شناسایی و شمارش *اشریشیا کلی*[2] به روش صافی کردن غشایی

5- Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods 2001- Edited by Frances Pouch Downes, Keith Ito, American Public Health Association

[1] - *Pseudomonas aeruginosa*
[2] - *Escherichia coli*

آب معدنی طبیعی-روش‌های آزمون میکروبی

۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد تعیین روش مرجع جهت انجام آزمون‌های میکروبی آب معدنی طبیعی بطری شده می باشد.

۲ دامنه کاربرد

این استاندارد برای بررسی کیفیت میکروبی آب‌های معدنی طبیعی بطری شده می باشد.

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 شوند. در مورد مراجع دارای تاریخ چاپ/ یا تجدید نظر، اصلاحیه‌ها و تجدید نظرهای بعدی این مدارک مورد نظر نیست. مع هذا بهتر است کاربران ذینفع این استاندارد امکان کاربرد آخرین اصلاحیه‌ها و تجدید نظرهای مدارک الزامی زیر را مورد بررسی قرار دهند. در مورد مراجع بدون تاریخ چاپ./ یا تجدید نظر آن مدارک الزامی ارجاع شده مورد نظر است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربران استاندارد الزامی است:

۳-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹: سال ۱۳۸۵، روش‌های عمومی میکروبیولوژی و آئین کار در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی

۳-۲ استاندارد ملی ایران ۴۲۰۷: سال ۱۳۷۶، آئین کار آزمون‌های باکتریولوژیک آب

۳-۳ استاندارد ملی ایران ۴۲۰۸: سال ۱۳۷۶، نمونه برداری

۴ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات و / یا تعاریف زیر به کار می‌رود:

۴-۱ *سودوموناس آئروژینوزا*

میکروارگانیسمی است که روی محیط کشت انتخابی حاوی ستریماید[1] رشد کرده و غالباً با تولید پیوسیانین، ایجاد فلورسنس زیر پرتوی فرابنفش می‌کند. این میکروارگانیسم همچنین اکسیداز مثبت بوده و قادر به تولید گاز آمونیاک از استامید است.

۴-۲ باکتری‌های لاکتوز مثبت

1-Cetrimide

طبق استاندارد ملی۱-۷۷۲۵ باکتری‌هایی هستند که در شرایط هوازی در دمای (۳ ± ۳۶) درجه سلسیوس بر روی محیط کشت انتخابی و افتراقی دارای لاکتوز رشد نموده و در مدت (۳ ± ۲۱) ساعت تولید اسید کنند.

۴-۳ کلی‌فرم‌ها

طبق استاندارد ملی۱-۷۷۲۵ باکتری‌های لاکتوز مثبت تعریف شده در بند (۴-۱) است که اکسیداز منفی می‌باشند.

۴-۴ *اشریشیا کلی*

طبق استاندارد ملی۱-۷۷۲۵ اشریشیا کلی(به روش استاندارد)، باکتری‌های کلی فرم تعریف شده در بند (۴-۲) است که در دمای(۰/۵ ± ۴۴) درجه سلسیوس به مدت(۳ ± ۲۱) ساعت از تریپتوفان تولید ایندول کنند.

۴-۵ *اشریشیاکلی*

طبق استاندارد ملی۱-۷۷۲۵ اشریشیا کلی(به روش سریع) باکتری‌های مقاوم به نمک‌های صفراوی هستند که در دمای (۰/۵ ± ۴۴) درجه سلسیوس در مدت(۳ ± ۲۱) ساعت می‌توانند از تریپتوفان، ایندول تولید کنند.

۴-۶ انتروکوکوس‌های روده ای

کوکوس‌هایی هستند که قادر به احیاء ترکیب ۲ و ۳ و ۵- تری فنیل تترازولیوم کلراید[1] و تبدیل آن به فرمازان[2] بوده و همچنین قادر به هیدرولیز اسکولین[3] در دمای ۴۴ درجه سلسیوس درمحیط‌های کشت بند (۷-۳-۱-۴) این استاندارد می باشند.

۴-۷ کلستریدیوم‌های احیأ کننده سولفیت

باکتری‌های بی‌هوازی هستند، که اسپور تولید می‌کنند و به خانواده کلستریدیاسه[4] و جنس کلستریدیوم تعلق دارند.

۵ اساس روش

1- Triphenyl tetra zolium chloride (T. T. C)
2- Formazan
3- Aesculin
4- Clostridiaceae

این روش بر اساس صاف کردن حجم معینی از نمونه، کشت دادن در محیط‌های اختصاصی و گرمخانه‌گذاری، بررسی و انجام آزمون‌های تاییدی می‌باشد.

۶ نمونه برداری

نمونه برداری از آب باید مطابق با استاندارد ملی ایران ۴۲۰۸ : سال ۱۳۷۶، انجام شود.

۷ مواد لازم

برای بدست آوردن نتایج هماهنگ، از مواد شیمیایی با کیفیت یکسان و درجه خلوص آزمایشگاهی استفاده کنید. آب مورد مصرف برای محیط‌های کشت باید با استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹: سال ۱۳۸۵، مطابقت داشته باشد. چنانچه محیط‌های کشت در بازار قابل دسترس هستند، تهیه محیط‌های کشت را مطابق با دستورالعمل سازنده انجام دهید.

۷-۱ محیط کشت سودوموناس

۷-۱-۱ محیط کشت سودوموناس سی-ان آگار[1]

۷-۱-۱-۱ محیط کشت پایه

مواد تشکیل دهنده	مقدار
هضم شدهٔ پانکراتیک ژلاتین	۱۶/۰ گرم
هضم شدهٔ پانکراتیک کازئین[2]	۱۰/۰ گرم
گلیسرول	۱۰ میلی لیتر
سولفات پتاسیم بدون آب[3]	۱۰/۰ گرم
کلرید منیزیم بدون آب[4]	۱/۴ گرم
آگار	۱۵/۰ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

روش تهیه:

مواد فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل و سپس در اتوکلاو با دمای (۳ ± ۱۲۱) درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید.

۷-۱-۱-۲ مکمل محیط کشت سی _ ان(CN)[5]

1- Pseudomonas – CN agar
2- Pancreatice digest of casein
3- K_2SO_4
4- $Mgcl_2$
5- CN supplement
6- Hexa decyle trimethyle ammonium bromide

مواد تشکیل دهنده	مقدار
هگز ا دسیل تری متیل آمونیوم بروماید [1] (ستریماید)	۰٫۲۰ گرم
نالیدیکسات سدیم [2]	۰٫۰۱۵ گرم
آب مقطر سترون	۲٫۰ میلی لیتر

روش تهیه: مواد فوق را با رعایت شرایط اسپتیک در آب مقطر سترون حل کنید.

یادآوری - مکمل محیط کشت سی-ان نیاز به اتوکلاو کردن ندارد.

۷-۱-۱-۳ محیط کشت کامل

روش تهیه: محیط کشت پایه طبق بند (۷-۱-۱-۱) را تا دمای ۴۵ تا ۵۰ درجه سلسیوس سرد کنید. سپس با رعایت شرایط اسپتیک به ازای هر ۵۰۰ میلی لیتر محیط کشت پایه، کل مکمل محیط کشت سی _ ان طبق بند (۷-۱-۱-۲) را به آن اضافه و پس از مخلوط کردن در پلیت‌های سترون تقسیم کنید. عمق محیط کشت در هر پلیت حداقل ۵ میلی متر باشد. pH نهایی محیط کشت در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس برابر با (۷٫۳ ± ۰٫۲) است.

یادآوری ۱- پلیت‌های آماده شده محیط کشت سودوموناس سی – ان آگار را در تاریکی و در دمای (۳ ± ۵) درجهٔ سلسیوس، حداکثر به مدت زمان یک ماه می توانید نگهداری کنید.

یادآوری ۲- محیط کشت ذوب شده را نباید بیش از ۴ ساعت نگهداری کرد.

یادآوری ۳- از ذوب کردن دوبارهٔ محیط کشت، باید خودداری شود.

۷-۱-۲ محیط کشت ستریماید آگار

مواد تشکیل دهنده	مقدار
هضم شده پانکراتیک ژلاتین	۲۰٫۰ گرم
سولفات پتاسیم	۱۰٫۰ گرم
کلرید منیزیم	۱٫۴ گرم
هگزا دسیل تری متیل آمونیوم بروماید(ستریماید)	۰٫۳ گرم
گلیسرول	۱۰ میلی لیتر
آگار	۱۳٫۶ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

روش تهیه: مواد فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل و سپس در اتوکلاو با دمای (۳ ± ۱۲۱) درجه سلسیوس به مدت زمان ۱۵ دقیقه سترون کنید. pH نهایی محیط کشت در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس برابر با (۷٫۲ ± ۰٫۲) است.

7-Sodium nalidixate

۷-۱-۳ محیط کشت ام _پی _ ای _ سی آگار (mPAC)

۷-۱-۳-۱ محیط کشت پایه

مواد تشکیل دهنده	مقدار
ال – لیزین هیدروکلرید[1]	۵/۰ گرم
کلرید سدیم	۵/۰ گرم
تیوسولفات سدیم	۵/۰ گرم
عصارهٔ مخمر	۲/۰ گرم
سولفات منیزیم با ۷ ملکول آب[2]	۱/۵ گرم
لاکتوز	۱/۲۵ گرم
ساکارز	۱/۲۵ گرم
گزیلوز	۱/۲۵ گرم
سیترات آمونیوم آهن ۳ ظرفیتی[3]	۰/۸ گرم
فنل -رد	۰/۰۸ گرم
آگار	۱۲/۰ گرم
آب مقطر	۹۹۰ میلی لیتر

روش تهیه:

مواد فوق را در آب مقطر حل کنید. سپس در اتوکلاو با دمای (۳± ۱۲۱) درجهٔ سلسیوس به مدت زمان ۱۵ دقیقه سترون کنید.

۷-۱-۳-۲ مکمل محیط کشت ام _پی _ ای _ سی آگار (mPAC)

مواد تشکیل دهنده	مقدار
کانامایسین[4]	۸/۰ میلی گرم
نالیدیکسیک اسید[5]	۰/۰۳۷ گرم
آب مقطر	۱۰ میلی لیتر

روش تهیه: مواد فوق را با رعایت شرایط اسپتیک در آب مقطر سترون حل کنید.

یادآوری - مکمل محیط کشت ام _پی _ ای _ سی آگار نیاز به اتوکلاو کردن ندارد.

1- L(+) – Lysine hydrochloride
1- $MgSO_4.7H_2O$
2-Ferric ammonium citrate III
3- Kanamycin
4- Nalidixic acid

۷-۱-۳-۳ محیط کشت کامل

روش تهیه: محیط کشت پایه طبق بند (۷-۱-۳-۱) را تا دمای ۴۵ تا ۵۰ درجه سلسیوس سرد کنید. سپس با رعایت شرایط اسپتیک مکمل محیط کشت ام- پی- ای- سی آگار طبق بند (۷-۱-۱-۲) را به آن اضافه و پس از مخلوط کردن در پلیت‌های سترون تقسیم کنید. pH نهایی محیط کشت در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس برابر با (۰/۲ ± ۷/۲) است.

۷-۱-۴ آگار مغذی[1]

مواد تشکیل دهنده	مقدار
عصارهٔ مخمر	۲/۰ گرم
پپتون	۵/۰ گرم
عصارهٔ گوشت	۱/۰ گرم
کلرید سدیم[2]	۵/۰ گرم
آگار	۱۵/۰ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

روش تهیه: مواد فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل و پس از اتوکلاو با دمای (۳ ± ۱۲۱) درجه سلسیوس به مدت زمان ۱۵ دقیقه سترون و در پلیت های مناسب تقسیم کنید. pH نهایی محیط کشت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس برابر با (۰/۲ ± ۷/۴) است. پیش از کاربرد محیط کشت فوق، مطابق با استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹: سال ۱۳۸۵، رطوبت سطح محیط کشت را با قرار دادن پلیت در گرمخانه ۲۵ تا ۵۰ درجهٔ سلسیوس به مدت زمان ۳۰ دقیقه، حذف کنید.

یادآوری - پلیت‌های آگار مغذی را، در تاریکی و در دمای (۳ ± ۵) درجه سلسیوس حداکثر به مدت یک ماه می توانید نگهداری کنید.

۷-۲ محیط کشت کلیفرم‌ها

۷-۲-۱ لاکتوز TTC آگار با سدیم هپتا دسیل سولفات[3]

۷-۲-۱-۱ محیط پایه

ترکیبات	مقدار
لاکتوز	۲۰ گرم

1- Nutrient agar
2- NaCl
3- Lactose TTC agar With sodium heptadecylsulfate

پپتون	۱۰ گرم
عصاره مخمر	۶ گرم
عصاره گوشت	۵ گرم
برومو تیمول آبی	۰/۰۵ گرم
آگار	۱۵ تا ۲۵ گرم (به قدرت ژلی آگاربستگی دارد)
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه : ترکیبات فوقِ را در آب جوش حل کرده. محیط در ظروفی به حجم حداکثر ۲۵۰ میلی لیتر تقسیم کرده و دردمای (۱ ± ۱۲۱) درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید. و pH محیط را پس از سترون کردن روی (۰/۲±۷/۲) تنظیم کنید.

۷-۲-۱-۲ محلول تری فنیل تترازولیوم کلراید[1]

ترکیبات	مقدار
۲ و ۳ و ۵- تری فنیل تترازولیوم کلراید (تی تی سی)	۰/۰۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه : TTC را در مقدار کمی آب حل کرده و سپس حجم آن به ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید. محلول فوق را با عبور دادن از صافی غشایی با منافذ ۰/۲۲ میکرومتر سترون کنید.

۷-۲-۱-۳ محلول سدیم هپتا دسیل سولفات[2] (ترجیتول ۷)

ترکیبات	مقدار
سدیم هپتا دسیل سولفات (ترجیتول ۷)	۰/۲ گرم
آب مقطر	۱۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه : ترجیتول ۷ را در مقدار کمی آب مقطر حل نموده، حجم آن را به ۱۰۰ میلی لیتر برسانید. سپس در اتوکلاو با دمای (۱ ± ۱۲۱) درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید.

۷-۲-۱-۴ محیط کشت کامل

ترکیبات	مقدار
محیط کشت پایه	۱۰۰ میلی لیتر

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

طبق بند (۷-۲-۱-۱)	
محلول تی تی سی	۵ میلی لیتر
طبق بند (۷-۲-۱-۲)	
محلول سدیم هپتا دسیل سولفات	۵ میلی لیتر
طبق بند (۷-۲-۱-۳)	

طرز تهیه : محیط پایه بند (۷-۲-۱-۱) را ذوب کرده و تا دمای (۵ ± ۵۰) درجه سلسیوس سرد نموده سپس با رعایت شرایط سترون، محلول‌های تی تی سی بند (۷-۲-۱-۲) و محلول سدیم هپتا دسیل سولفات را اضافه کرده و کاملاً مخلوط نمایید به گونه‌ای که پس از افزودن هر یک از مواد از تشکیل حباب جلوگیری شود. محیط را با ضخامت حدود ۵ میلی‌متر در پلیت تقسیم کنید.

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

۷-۳ محیط کشت *انتروکوکوس فکالیس*[1]

۷-۳-۱ محیط کشت اسلنتز و بارتلی[2]

۷-۳-۱-۱ محیط پایه

ترکیبات	مقدار
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 : ترکیبات فوق را با حرارت دادن در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس حل کرده و پس از حل شدن برای مدت ۵ دقیقه اضافی دیگر در حمام آب گرم حرارت داده و سپس تا دمای ۵۰ الی ۶۰ درجه سلسیوس سرد نمایید.

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

۷-۳-۱-۲ محلول تی تی سی

1- ***Enterococcus faecalis***
2- Slanetz and Bartley medium (S & B)

ترکیبات	مقدار
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 و با تکان دادن حل نمایید. سپس آن را با استفاده از صافی غشایی با منافذ به قطر ۰٫۲۲ میکرون سترون کنید.

۷-۳-۱-۳ محیط کشت کامل[1]

ترکیبات	مقدار
محیط کشت پایه طبق بند (۷-۳-۱-۱)	۱۰۰۰ میلی لیتر
محلول تی تی سی طبق بند (۷-۳-۱-۲)	۱۰ میلی لیتر

طرز تهیه : محلول TTC را به محیط پایه با دمای ۵۰ الی ۶۰ درجه سلسیوس اضافه کرده محیط را با ضخامت ۵ میلیمتر در پلیت‌ها تقسیم کرده و در یک سطح صاف و خنک قرار دهید. pH نهایی محیط باید در دمای ۲۵ درجه سیلسیوس برابر (۰٫۱ ± ۷٫۲) باشد .

۷-۳-۱-۴محیط کشت صفرا- اسکولین آزاید آگار[2]

ترکیبات	مقدار
تریپتون	۱۷ گرم
پپتون	۳ گرم
عصاره مخمر	۵ گرم
صفرای گاوی (به صورت پودری)	۱۰ گرم
سدیم کلراید	۵ گرم
اسکولین	۱ گرم
سیترات آمونیم آهن سه ظرفیتی	۰/۵ گرم
سدیم آزاید	۰/۱۵ گرم
آگار	۸ تا ۱۸ گرم (به قدرت ژلی آگار بستگی دارد)
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

1- Complete medium
2- Bile – aesculin azide agar

طرز تهیه : ترکیبات فوِق را با جوشانیدن در آب مقطر حل کرده در دمای ۲۵ درجه سلسیوس pH محیط تهیه شده بایستی (۰/۱ ± ۷/۱) باشد. سپس محیط را به حجم‌های ۲۵۰ میلی لیتر در ظروف درپیچ دار با ظرفیت ۵۰۰ میلی لیتر تقسیم کرده و در حرارت (۳ ± ۱۲۱) درجه سلسیوس به مدت ۱۵دقیقه سترون کنید. آنگاه آن را تا دمای ۵۰ الی ۶۰ درجه سلسیوس خنک کرده و محیط را با ضخامت حداقل ۳ تا ۵ میلی متر در پلیت‌ها تقسیم کرده و در یک سطح صاف و خنک قرار دهید.

۷-۴ محیط کشت کلستریدیوم‌های احیأ کننده سولفیت

۷-۴-۱ محیط کشت سولفیت آیرون آگار[1]

۷-۴-۱-۱ محیط پایه آگار مغذی

ترکیبات	مقدار
عصاره گوشت	۳ گرم
پپتون	۱۰ گرم
کلرید سدیم	۵ گرم
آگار	۱۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

روش تهیه: مواد فوق را به آب مقطر اضافه نموده و آن را بجوشانید، سپس pH محیط را در ۲۵ درجه سلسیوس با محلول سود یک مولار در (۰/۱ ± ۷/۶) تنظیم نموده و در حجم‌های ۱۸ میلی لیتری در لوله‌های آزمایش تقسیم نموده و به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو ، در دمای (۱± ۱۲۱) درجه سلسیوس، سترون نمائید. پس از جامد شدن، محیط را در یخچال نگهداری کنید.

۷-۴-۱-۲ محلول سولفیت سدیم[2]

ترکیبات	مقدار
سولفیت سدیم	۱۰ گرم
آب مقطر	۱۰۰ میلی لیتر

روش تهیه: سولفیت سدیم را در آب مقطر حل نموده و توسط صافی سترون کنید. سپس محلول را در ۲ الی ۵ درجه سلسیوس نگهداری نموده و هر دو هفته یکبار از محلول تازه استفاده نمائید.

۷-۴-۱-۳ محلول سولفات آهن[3]

1-Sulfite Iron Agar
2- Na_2SO_3
3- $FeSO_4$

ترکیبات	مقدار
سولفات آهن دو ظرفیتی	۸ گرم
آب مقطر	۱۰۰ میلی لیتر

روش تهیه: سولفات آهن دو ظرفیتی را در آب مقطر حل نموده و توسط صافی سترون کنید. سپس محلول فوق را در ۲ الی ۵ درجه سلسیوس نگهداری نموده و هر دو هفته یک بار از محلول تازه استفاده نمائید.

۷-۴-۱-۴ محیط کشت کامل

روش تهیه: قبل از آزمایش محیط پایه بند (۷-۴-۱-۱) را ذوب نموده و به هر ۱۸ میلی لیتر محیط کشت، ۱ میلی لیتر از محلول سولفیت سدیم و ۵ قطره از محلول سولفات آهن دو ظرفیتی اضافه نمائید.

۷-۴-۲ تریپتوز سولفیت آگار[1]

ترکیبات	مقدار
تریپتوز	۱۵ گرم
سوی تن	۵ گرم
عصاره مخمر	۵ گرم
سدیم متا بی سولفیت	۱ گرم
آمونیوم سیترات آهن سه ظرفیتی	۱ گرم
آگار	۱۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰میلی لیتر

روش تهیه: مواد فوق را به آب مقطر اضافه نموده و آن را بجوشانید. سپس pH محیط را در دمای ۲۵ درجه در (۰/۱ ± ۷/۶) تنظیم نمائید. محیط را در حجم‌های ۱۸ میلی لیتری در لوله‌های آزمایش تقسیم نموده و به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو، در دمای (۱± ۱۲۱) درجه سلسیوس، سترون نمائید. پس از جامد شدن، محیط را در یخچال نگهداری کنید.

۷-۵ محیط‌های تأییدی

۷-۵-۱ تریپتوفان براث

ترکیبات	مقدار
تریپتون از کازئین	۱۰ گرم
ال – تریپتوفان	۱ گرم
سدیم کلراید	۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

1-Tryptise Sulfite Agar

طرز تهیه : ترکیبات بالا با حرارت دادن در آب حل نموده و در هر لوله ۳ میلی لیتر ریخته شد. درب لوله‌ها را با درپوش پنبه ای بسته و به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس سترون کنید.

۷-۵-۲ معرف کواکس

ترکیبات	مقدار
پارا دی متیل آمینو بنز آلدئید	۵ گرم
آمیل الکل یا بوتیل الکل	۷۵ میلی لیتر
هیدروکلریک اسید	۲۵ میلی لیتر

روش تهیه: پس از حل کردن آلدئید در الکل، اسید را اضافه نموده و در دمای (۳± ۵) درجه سلسیوس و دور از نور نگهداری کنید.

۷-۵-۳ معرف اکسیداز

ترکیبات	مقدار
تترا متیل پارافنیلن دی آمین هیدروکلراید	۰/۱ گرم
آب مقطر	۱۰ میلی لیتر

روش تهیه: ترکیب فوق را در آب مقطر حل کرده و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری کنید.

۷-۵ -۴ محیط استامید مایع[1]

۷-۵-۴-۱ محیط کشت پایه

ترکیبات	مقدار
استامید	۱۰/۰ گرم
کلرید سدیم	۵/۰ گرم
دی پتاسیم هیدروژن فسفات بدون آب[2]	۱/۳۹ گرم
پتاسیم دی هیدروژن فسفات بدون آب[3]	۰/۷۳ گرم
سولفات منیزیم با ۷ ملکول آب[4]	۰/۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

روش تهیه: مواد فوق را در آب مقطر حل و کاملاً مخلوط کنید.

1- Acetamide broth
2- K_2HPO_4
3- K_2HPO_4
4- $MgSO_4.7H_2O$
5- Irritant
6- NaOH

یادآوری - استامید ماده‌ای سرطان زا و تحریک کننده[5] است. بنابراین هنگام وزن کردن، آماده سازی و دفع محیط کشت باید دقت لازم به عمل آید.

۷-۵-۴-۲ محلول فنل – رد

ترکیبات	مقدار
فنل ـ رد	۱/۲ گرم
محلول هیدروکسید سدیم[6] ۰/۰۱ نرمال	۱۰۰ میلی لیتر

روش تهیه: فنل - رد را در محلول هیدروکسید سدیم حل و کاملاً مخلوط کنید.

۷-۵-۴-۳ محیط کشت کامل

روش تهیه: یک میلی لیتر محلول فنل - رد بند (۷-۵-۴-۲) را به یک لیتر محیط کشت پایه بند (۷-۵-۴-۱) اضافه و کاملاً مخلوط کنید . سپس محلول را در حجم‌های ۵ تا ۸ میلی لیتری در لوله‌های آزمایش تقسیم و در اتوکلاو با دمای (۳ ± ۱۲۱) درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید. pH نهایی محیط کشت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس برابر با (۰/۲ ± ۷) است.

یادآوری - محیط کشت کامل آبگوشت استامید را در تاریکی و در دمای (۳ ± ۵) درجه سلسیوس، حداکثر به مدت ۳ ماه می‌توانید نگهداری کنید.

۷-۵-۵ آگار مغذی

ترکیبات	مقدار
عصاره مخمر	۲ گرم
پپتون	۵ گرم
عصاره گوشت	۱ گرم
کلرید سدیم	۵ گرم
آگار	۱۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

روش تهیه: مواد فوق را به آب مقطر اضافه نموده و آن را بجوشانید، سپس pH محیط را در ۲۵ درجه سلسیوس با محلول سود یک مولار در (۰/۲ ± ۷/۴) تنظیم نموده به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو ، در دمای (۱± ۱۲۱) درجه سلسیوس، سترون نمائید. پس از جامد شدن، محیط را در یخچال نگهداری کنید.

۷-۵-۶ تریپتون سوی آگار[7]

ترکیبات	مقدار
تریپتون از کازئین	۱۵ گرم
سوی پپتون	۵ گرم
کلرید سدیم	۵ گرم
آگار	۱۵ تا ۲۵ گرم
آب مقطر	تا ۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه : مواد فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل کنید. pH نهایی محیط باید در دمای ۲۵ درجه سلسیوس برابر (۰/۱ ± ۷/۲) باشد . سپس در حجم‌های بیشینه ۲۵۰ میلی لیتری در اتوکلاو با دمای (۱± ۱۲۱) درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید. پس از سرد نمودن دمای محیط کشت تا (۵ ± ۵۰)درجه سلسیوس، به ضخامت حداقل ۵ میلی‌متر، در پلیت‌های سترون تقسیم نمایید .

۷-۵- ۷ تریپتون صفرا آگار

ترکیبات	مقدار
تریپتون از کازئین	۲۰ گرم
نمک صفراوی	۱/۵ گرم
آگار	۱۵ تا ۲۵ گرم
آب مقطر	تا ۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه : مواد فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل کنید . pH نهایی محیط باید در دمای ۲۵ درجه سلسیوس برابر (۰/۵ ± ۷/۲) باشد . محیط کشت فوق را در اتوکلاو با دمای (۱ ± ۱۲۱) درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید.

یادآوری- برای تهیه محیط کشت بصورت دو لایه ، حدود یک میلی لیتر از محیط کشت تریپتون سوی آگار بند (۷-۵-۶ با دمای (۵ ± ۵۰) درجه سلسیوس را ۳۰ الی ۶۰ دقیقه قبل از قرار دادن صافی غشایی، روی محیط کشت تریپتون بایل آگار جامد شده بند (۷-۵-۷ بریزید.

۸ وسایل لازم

۸-۱ ظرف‌های پتری

از ظرف‌های پتری به قطر ۶۰ میلی متر و به عمق ۱۵ میلی متر که ته آنها کاملاً صاف باشد ،استفاده کنید. ظرف‌های پتری از جنس شیشه مقاوم در برابر حرارت و یا انواع یکبار مصرف هستند. نوع شیشه‌ای را می‌توان پس از مصرف جهت استفاده مجدد سترون‌کنید.

۸-۲ وسایل صافی

این دستگاه از قسمت‌های زیر تشکیل شده است:

۸-۲-۱ قیف

قیف فلزی یا غیر فلزی استفاده شود، نوع فلزی آن باید از جنس مقاوم در برابر محلول‌های خورنده و دارای سطح صیقلی و صاف باشد تا میکروب‌ها به جداره آن نچسبند، انتهای قیف بصورت حلقه‌ای در آمده تا به راحتی بر روی صافی غشایی قرار گیرد.

۸-۲-۲ صفحه نگهدارنده صافی غشایی

این صفحه وظیفه نگهداری صافی غشایی و نیز انتقال مایع صاف شده را به داخل ارلن مایر عهده دار است و توسط یک چوب پنبه لاستیکی به ارلن مایر ثابت می گردد. این صفحه منتهی به چوب پنبه لاستیکی به ارلن مایر متصل و ثابت می‌گردد و در انتها دارای لوله‌ای بود که آب صاف شده از آن خارج می‌گردد.
قیف و صفحه نگهدارنده را پس از پیچیده شدن در ورقه آلومینیومی (فویل) و یا کاغذ نفوذ ناپذیر به آب به مدت ۱۵ دقیقه در (۱± ۱۲۱) درجه سلسیوس سترون کنید.

۸-۲-۳ گیره نگهدارنده

گیره به منظور نگهداشتن قیف بر روی صافی غشایی است.

۸-۲-۴ پمپ خلأ

پمپ خلأ به منظور ایجاد خلأ و در نتیجه عبور مایع از صافی غشایی به کار می‌رود.

۸-۲-۵ لوله‌های وصل کننده

این لوله‌ها از جنس لوله‌های لاستیکی ضخیم هستند.

۸-۲-۶ صافی غشایی

صافی از جنس استات سلولز و دارای منافذی به قطر ۰٫۴۵ میکرون یا ۰٫۲۲ میکرون است که با توجه به نوع میکروارگانیسم مورد بررسی انتخاب می‌شود. صافی‌ها معمولاً سترون شده هستند و یکبار مصرف می‌باشند. در مورد صافی‌های غیر سترون می‌توان با توجه به دستورالعمل کارخانه سازنده بصورت خشک و یا پس از خیساندن آن بین دو لایه کاغذ صافی به حالت افقی قرار داده و در کاغذ نفوذ ناپذیر به آب یا ورقه آلومینیومی پیچیده و در اتوکلاو و در حرارت ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید.

۸-۲-۷ پنس مخصوص

این پنس برای برداشتن صافی غشایی و قرار دادن آن بر روی صفحه نگهدارنده و سپس انتقال آن بر روی محیط کشت مورد استفاده قرار می‌گیرد. دو سر پنس باید کاملاً صاف بوده تا صدمه‌ای به صافی غشایی وارد نسازد به منظور سترون نمودن پنس، هر بار انتهای آنرا در الکل اتیلیک ۹۶ درصد فرو برده و سپس به روی شعله گرفته تا سترون گردد و پس از سرد کردن کنار شعله مورد استفاده قرار دهید.

۸-۲ -۸ اطاقک دارای لامپ فرابنفش

نور ماوراء بنفش به طول موج ۲۵۴ نانومتر.

۹ روش آزمون

۹-۱ آماده سازی نمونه

به منظور توزیع یکنواخت میکروارگانیسم‌ها پیش از انجام آزمون نمونه را با تکان دادن ظرف کاملا یکنواخت کنید. در صورتی که ظرف حاوی نمونه به صورت کامل پر باشد، ابتدا مقداری از نمونه را با رعایت شرایط اسپتیک دور ریخته سپس عمل مخلوط کردن را انجام دهید. آماده سازی آزمایه را مطابق با استاندارد ملی ایران ۴۲۰۷ انجام دهید .

برای بررسی کلستریدیوم‌های احیأ کننده سولفیت باید قبل از انجام آزمایش، نمونه در بن ماری(۵ ± ۷۵) درجه سلسیوس، به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شود. برای کنترل درجه حرارت مقداری آب معمولی را به یک ظرف مشابه اضافه نموده، و یک دماسنج را در آن قرار داده، و ظرف را در مجاورت نمونه مورد آزمون در بن‌ماری بگذارید. از زمانیکه دماسنج حرارت ۷۵ درجه سلسیوس را نشان می‌دهد، زمان را یادداشت نموده، و بعد از ۱۵ دقیقه نمونه مورد آزمون را از بن ماری خارج نمائید.

۹-۲ صاف کردن

تمام مراحل عملیات صاف کردن باید در مجاورت شعله و با رعایت شرایط اسپتیک انجام شود. پایه نگه دارنده صافی را به ارلن تخلیه که به خلأ وصل شده است متصل کرده و توسط پنس سترون، صافی روی آن قرار دهید (به طوری که سطح چهارخانه صافی به طرف بالا باشد). سپس با رعایت شرایط سترونی قیف را روی پایه قرار داده و قسمت بیرونی آن را با گیره‌ای محکم کنید؛ درحالی‌که دکمه پمپ خلأ خاموش است، حجم معین (۲۵۰ میلی لیتر) نمونه را به درون قیف ریخته سپس دکمه پمپ خلأ را روشن نموده و خلأ حدود ۷۰ کیلوپاسکال برقرار شود، تا آب به آهستگی از میان صافی عبور کند. زمانی که حجم نمونه به کمتر از ۲۰ میلی لیتر رسید، دیواره‌های قیف را با حداقل ۲۰ میلی لیتر رقیق کننده شستشو دهید. به محض تمام شدن نمونه داخل قیف، پمپ خلأ را خاموش کنید.

برای صاف کردن حجم‌های مختلف یک نمونه می‌توان قیف را بدون سترون کردن مجدد مورد استفاده قرار داد. در چنین مواردی ابتدا کمترین حجم مورد آزمون صاف می‌شود. برای صاف کردن نمونه‌های دیگر، از دستگاه سترون دیگری استفاده نمائید. در طی صاف کردن نمونه‌های مختلف، پایه دستگاه صافی احتیاج به گندزدایی ندارد مگر آنکه صافی آسیب دیده و یا پایه آلوده شده باشد.

۹-۳ روش انتقال صافی

پس از برداشت صافی با کمک پنس سترون، آن را به طوری که سطح چهارخانه آن به طرف بالا باشد و بین صافی و محیط‌کشت حباب هوا ایجاد نگردد، به محیط کشت انتخابی به ترتیب زیر انتقال دهید.

۹-۳-۱ انتقال صافی‌های مربوط به *سودوموناس آئروژینوزا*

صافی‌های بند (۹-۲) را با استفاده از پنس سترون سر صاف بند (۸-۲-۷) مربوط به *سودوموناس آئروژینوزا* را در روی محیط کشت سودوموناس سی ان آگار بند (۷-۱-۱) قرار دهید.
یادآوری: می توان از محیط‌های کشت‌های سیتریماید آگار بند (۷-۱-۲) و ام پی ای سی آگار بند (۷-۱-۳) نیز به عنوان جایگزین محیط کشت سودوموناس سی ان آگار استفاده نمود.

۹-۳-۲ انتقال صافی‌های مربوط به *کلیفرم* و *اشریشیا کلی*

۹-۳-۲-۱ روش استاندارد

صافی‌های بند (۹-۲) مربوط به *کلیفرم* و *اشریشیا کلی* را در شرایط سترون با استفاده از پنس سترون سر صاف بند (۸-۲-۷) به گونه ای در روی محیط کشت لاکتوز تی تی سی آگار حاوی سدیم هپتا دسیل سولفات بند (۷-۲-۱) قرار دهید تا حباب هوا در زیر آن تشکیل نشود .

۹-۳-۲-۲ روش سریع

صافی‌های بند (۹-۲) مربوط به *کلیفرم* و *اشریشیا کلی* را در شرایط سترون با استفاده از پنس سترون سر صاف بند (۸ -۲-۷) به گونه ای در روی محیط کشت تریپتون سوی آگار بند (۷-۲-۲) قرار دهید تا حباب هوا در زیر آن تشکیل نشود.

۹-۳-۳ انتقال صافی‌های مربوط به *انتروکوکوس فکالیس*

صافی‌های بند (۹-۲) مربوط به انتروکوکوس فکالیس را در شرایط سترون با استفاده از پنس سترون سر صاف بند (۸-۲-۷) را به گونه ای در روی محیط کشت اسلنتز و بارتلی بند (۷-۳-۱) قرار دهید که سطح چهارخانه آن به طرف بالا بوده و همچنین حباب هوا در زیر آن تشکیل نشود.

۹-۳-۴ انتقال صافی‌های مربوط به کلستریدیوم‌های احیا کننده سولفیت

صافی‌های بند (۹-۲) مربوط به کلستریدیوم‌های احیا کننده سولفیت را در شرایط سترون با استفاده از پنس سترون سر صاف بند (۸-۲-۷) را به گونه‌ای در پلیت قرار دهید که روی آن را به طرف کف پلیت باشد و دقت نمائید تا حباب هوا در ته صافی تشکیل نگردد. سپس ضمن اینکه صافی را توسط انبرک نگه داشته‌اید، ۱۸ میلی‌لیتر از محیط کشت سولفیت آیرون آگار بند (۷-۴-۱) را بر روی صافی بریزید.

۹-۴ گرمخانه گذاری

کلیه پلیت‌ها را باید به صورت وارونه درون گرمخانه قرار داد. زمان و دمای گرمخانه گذاری بسته به نوع میکروارگانیسم مورد جستجو متفاوت بوده، ممکن است در دو مرحله انجام شود. در مواردی که احیای میکروارگانیسم آسیب دیده مورد نظر است ابتدا به مدت۲ تا ۴ ساعت در دمای پائین‌تر (حدود ۲۵درجه) قرار داده می‌شود و متعاقب آن برای زمان طولانی‌تر در دمای بهینه رشد معمول برای میکروارگانیسم مورد نظر قرار می‌گیرد.

۹-۴-۱ پلیت‌های مربوط به *سودوموناس آئروژینوزا* را به مدت ۴۸ ساعت دردمای (۱± ۳۷) درجه سلسیوس یا (۱ ± ۳۵) درجه سلسیوس گرمخانه گذاری‌کنید.

۹-۴-۲ پلیت‌های مربوط به باکتری‌های کلیفرم را دردمای(۲ ± ۳۶)درجه سلسیوس به مدت (۳ ± ۲۱) ساعت قرار دهید.

۹-۴-۳ پلیت‌های مربوط به *انتروکوکوس فکالیس* را به مدت (۴ ± ۴۴) ساعت در دمای (۲ ± ۳۶) درجه سلسیوس گرمخانه گذاری کنید.

۹ -۴-۴ پلیت‌های مربوط به کلستریدیوم‌های احیأ کننده سولفیت را به مدت (۴ ± ۴۴) ساعت در دمای (۱ ± ۳۷) درجه سلسیوس در شرایط بی‌هوازی گرمخانه گذاری کنید.

۹-۵ بررسی پلیت‌ها پس از گرمخانه‌گذاری

۹-۵-۱ بررسی پلیت‌های مربوط به *سودوموناس آئروژینوزا*

پس از پایان زمان گرمخانه‌گذاری، پلیت ها را زیر پرتوی فرابنفش بررسی کنید. پرگنه‌های مشخص[1] *سودوموناس آئروژینوزا* با قطر ۰/۸ تا ۲/۲ میلی متر، که روی محیط‌های کشت سودوموناس سی- ان آگار و ستریماید آگار ، پرگنه های سبز آبی (پیوسیانین) ایجاد می‌کنند که در صورت ایجاد فلورسنس زیر پرتوی فرابنفش، آن را به عنوان *سودوموناس آئروژینوزا* تأیید شده در نظر بگیرید.

سایر پرگنه هایی را که سبز - آبی نیستند ولی زیر پرتوی فرابنفش فلورسنس ایجاد می‌کنند به عنوان سودوموناس آئروژینوزای فرضی در نظر بگیرید.

پرگنه‌های قهوه‌ای مایل به قرمز را نیز که زیر پرتوی فرابنفش فلورسنس ایجاد کنند به عنوان سودوموناس فرضی در نظر بگیرید.

روی محیط کشت mPAC آگار، پرگنه‌های قهوه‌ای با مرکز سیاه مایل به سبز و هاله روشن در اطراف آن را به عنوان سودوموناس فرضی در نظر بگیرید.

یادآوری - برای جلوگیری از نابودی میکروارگانیسم‌ها، از قراردادن پلیت‌ها به مدت طولانی زیر پرتوی فرابنفش خودداری کنید.

۹-۵-۲ بررسی پلیت‌های مربوط به باکتری‌های کلیفرم

پرگنه‌های رشد نموده به رنگ زرد که در زیر صافی و در عمق محیط کشت، درست در محل پشت پرگنه‌ها، هاله‌های زرد بصورت دایره کامل دیده می‌شوند را به عنوان باکتری‌های لاکتوز مثبت در نظر بگیرید.

۹-۵-۳ بررسی پلیت‌های مربوط به *انتروکوکوس فکالیس*

پرگنه‌های رشد نموده، برجسته قرمز، صورتی و شاه بلوطی رنگ (حتی در مرکز پرگنه‌ها) دیده می‌شوند را به عنوان انتروکوکوس روده ای در نظر بگیرید.

---

[1] - Typical

۹-۵-۴ بررسی پلیت‌های مربوط به کلستریدیوم‌های احیأ کننده سولفیت

پرگنه‌های سیاه رشد نموده در محیط را به عنوان کلستریدیوم‌های احیأ کننده سولفیت در نظر بگیرید.

۹-۶ آزمون‌های تاییدی

۹-۶-۱ پرگنه‌های مشکوک به *سودوموناس آئروژینوزا*

کلنی‌های انتخاب شده جهت انجام آزمون‌های تأییدی بیوشیمیایی را بر محیط کشت آگار مغذی طبق بند (۷-۵-۵) کشت داده و برای مدت (۲ ± ۲۲) ساعت در دمای (۲ ± ۳۶) درجه سلسیوس گرمخانه گذاری کنید. سپس یکی از کلنی‌های منفرد رشد یافته روی محیط کشت فوق را برای انجام آزمون‌های تأییدی استفاده کنید.

۹-۶-۱-۱ آزمون اکسیداز

کاغذ صافی معمولی را به ۲ تا ۳ قطره معرف اکسیداز بند (۷-۵-۳) آغشته کنید، سپس با استفاده از حلقه کشت بخشی از کلنی جدا شده بر محیط آگار مغذی بند (۷-۵-۵) را برداشته و روی کاغذ صافی آغشته به معرف اکسیداز بکشید. تغییر رنگ کاغذ صافی به ارغوانی پس از مدت زمان ۱۰ ثانیه، نشانگر مثبت بودن آزمون اکسیداز است.

یادآوری - *سودوموناس آئروژینوزا* اکسیداز مثبت است.

در صورت استفاده از نوارهای قابل دسترس در بازار، مطابق با دستورالعمل سازنده عمل کنید.

یادآوری - به عنوان شاهد آزمون با میکروارگانیسم‌های شناخته شده دارای واکنش مثبت (*سودوموناس آئروژینوزا*) و واکنش منفی (*اشرشیا کلی*) نیز آزمون انجام شود.

۹-۶-۱-۲ آزمون استامید

با استفاده از حلقه کشت، بخشی از کلنی انتخاب شده بر محیط کشت آگار مغذی بند (۷-۵-۵) را برداشته و به لوله حاوی محیط استامید مایع بند (۷-۵-۴) منتقل کنید. سپس لوله‌ها را در دمای (۲ ± ۳۶) درجه سلسیوس برای مدت زمان ۲۴ تا ۳۶ ساعت گرمخانه گذاری کنید. پس از پایان این مدت لوله‌ها را بررسی کنید. تولید گاز آمونیاک از استامید با ایجاد رنگ ارغوانی مشخص می‌شود.

یادآوری - *سودوموناس آئروژینوزا* از استامید تولید گاز آمونیاک می کند.

۹-۶-۲ آزمون‌های تأییدی پرگنه‌های مشکوک به باکتری‌های کلیفرم

به منظور تأیید نتایج، تعدادی از پرگنه‌ها بطور جداگانه روی محیط بند (۷-۵-۶) (TSA) کشت داده و برای مدت (۲ ± ۲۱) ساعت در دمای (۲ ± ۳۶)درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری کنید.

۹-۶-۲-۱ آزمون‌های تأییدی پرگنه‌های مشکوک به باکتری‌های کلیفرم در روش استاندارد

۹-۶-۲-۱ -۱ آزمون اکسیداز

پس از پایان‌این مدت آزمون اکسیداز را مطابق با بند (۹-۶-۱-۱) انجام دهید.

یادآوری - *اشرشیا کلی* اکسیداز منفی است.

۹-۶-۲-۱ -۲ آزمون ایندول

با استفاده از سوزن کشت سترون، تمام و یا دست کم ۱۰ کلنی مشخص بند (۹-۶-۲) را درون محیط کشت تریپتوفان مایع بند (۷- ۵-۱) تلقیح نموده و در دمای (۰/۵ ± ۴۴) درجه سلسیوس به مدت (۳ ± ۲۱) ساعت گرمخانه گذاری کنید. سپس ۰/۲ میلی لیتر معرف کواکس بند (۷-۵-۲) را داخل لوله حاوی تریپتوفان ریخته، بررسی نمایید. ظهور رنگ قرمز آلبالویی در سطح محیط کشت مایع، تأییدی بر ایجاد ایندول در محیط کشت می باشد .

یادآوری- باکتری‌های اشریشیا کلی ایندول مثبت می باشند.

۹-۶-۲-۲ آزمون‌های تاییدی پرگنه‌های مشکوک به باکتری‌های کلیفرم در روش سریع

صافی غشایی تهیه شده در بند (۹-۱) را با استفاده از گیرهٔ سر صاف بر روی محیط کشت تریپتون سوی آگار بند (۷-۵-۶) قرار دهید و در دمای (۲ ± ۳۶) درجه سلسیوس به مدت ۴ تا ۵ ساعت گرمخانه گذاری نمایید. پس از پایان این مدت، صافی غشایی را روی محیط تریپتون صفرا آگار بند (۷-۵-۷) منتقل نموده و در دمای (۰/۵ ± ۴۴) درجه سلسیوس به مدت ۱۹ تا ۲۰ ساعت گرمخانه گذاری کنید .

یادآوری - صافی‌ها باید به گونه ای روی پلیت قرار گیرد که سطح چهارخانه آن به طرف بالا باشد .

صافی غشایی بند (۹-۲-۲) را که به معرف ایندول بند (۷-۵-۲) آغشته شده است، انتقال داده و به مدت ۱۰ تا ۳۰ دقیقه آن را تحت تأثیر تابش لامپ فراء بنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر قرار دهید .

تمام کلنی‌های قرمز رنگ را به عنوان اشریشیاکلی تلقی کنید .

۹-۶-۳ پرگنه‌های مشکوک به انتروکوکوس فکالیس

با استفاده از گیره سر صاف سترون بند (**۸-۲-۷**)، صافی غشایی بند (۹-۵۱-۳) را به گونه ای که سطح چهارخانهٔ آن به طرف بالا باشد، بر روی محیط کشت صفرا اسکولین- آزاید آگار بند (۷-۳-۱-۴) 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– انتروکوکوس‌های روده ای، اسکولین را در مدت ۲ ساعت هیدرولیز نموده، تولید ترکیب ۶ و ۷- دی هیدروکسی کومارین[1] می کند ، که با یون آهن سه ظرفیتی ترکیب شده و ایجاد رنگ قهوه ای روشن تا سیاه می کند .

۱۰ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی‌های زیر باشد :

---

1 - 6, 7- dihydroxycoumarin

۱۰-۱ مشخصات کامل نمونه مانند نوع نمونه

۱۰-۲ تاریخ و محل نمونه برداری، تاریخ ارسال نمونه به آزمایشگاه

۱۰-۳ تاریخ انجام آزمون

۱۰-۴ بیان نتایج طبق بند ۱۰ این استاندارد

۱۰-۵ ارجاع به شماره این استاندارد ملی ایران (۵۸۶۹)

۱۰-۶ نام و نام خانوادگی و امضای آزمایشگر تایید کننده و تصویب کننده

۱۰-۷ سایر جزئیات که مربوط به روش آزمون باشد .