ISIRI
7725-3
1st. edition

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
Institute of Standards and Industrial Research of Iran

استاندارد ملی ایران
۷۷۲۵-۳
چاپ اول

کیفیت آب – جستجو ، شناسایی و شمارش *اشریشیا کلی* و باکتری های *کلی فرم* – قسمت سوم : شمارش *اشریشیا کلی* با استفاده از مدل کوچک سازی(بیشترین تعداد احتمالی) در آب های سطحی و فاضلاب

Water quality-Detection and enumeration of *Escherichia coli* and *Coliform bacteria* Part 3 : Miniaturized method (Most Probable Number) for the detection and enumeration of *E. coli* in surface and waste water

ICS:07.100.20

به‌نام خدا

آشنایی با مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی 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.

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه* 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 ذیصلاح 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 شود که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که مؤسسه استاندارد تشکیل می‌دهد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی 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 پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بینالمللی بهره‌گیری می‌شود.

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی 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 کشو ر و / یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. مؤسسه 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 سا زمانها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست-محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش ، مؤسسهٔ استاندارد 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 آنها 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 مؤسسه است.

---

* موسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

1- International organization for Standardization
2 - International Electro technical Commission
3- International Organization for Legal Metrology (Organization International de Metrology Legal)
4 - Contact point
5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

"کیفیت آب – جستجو ، شناسایی و شمارش *ا شریشیا کلی* و باکتری های کلی فرم – قسمت سوم : شمارش *ا شریشیا کلی* با استفاده از مدل کوچک سازی(بیشترین تعداد احتمالی) در آب های سطحی و فاضلاب"

رئیس:	**سمت و/ یا نمایندگی**
رحیمی فرد، ناهید (دکتری تخصصی میکروب شناسی)	وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی- اداره کل آزمایشگاههای کنترل و مرکز تحقیقات غذا و دارو
دبیر:	
زرسازی ،گیتا (لیسانس صنایع)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفباء) اسکندری ، صغری (فوق لیسانس زیست شناسی)	سازمان حفاظت محیط زیست
زند وکیلی ، فاطمه (فوق لیسانس علوم بهداشتی در تغذیه)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
سرگزی ، مریم (لیسانس میکروب شناسی)	شرکت آب های شهرها و شهرک های غرب تهران
صمیعی، بیتا (لیسانس میکروبیولوژی)	اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان تهران
ضرغا مپور ، زهره (فوق لیسانس میکروب شناسی)	شرکت آب و فاضلاب شهر تهران

سعادتی ، شهلا (لیسانس تغذیه)	وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی- اداره کل آزمایشگاههای کنترل و مرکز تحقیقات غذا و دارو
نوری ، زهرا (لیسانس میکروب شناسی)	وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی- اداره کل آزمایشگاههای کنترل و مرکز تحقیقات غذا و دارو

:

پیش‌گفتار

استاندارد "کیفیت آب – جستجو ، شناسایی و شمارش ا شریشیا کلی و باکتری هـای کلـی فـرم -قسـمت سوم : شمارش ا شریشیا کلی با استفاده از مدل کوچک سازی(بیشترین تعداد احتمالی) در آب های سطحی و فاضلاب" که پیش‌نویس آن درکمیسیون‌های مربوط توسط مؤسسهٔ اسـتاندارد و تحقیقـات صـنعتی ایـران تهیه و تدوین شده و در دویست و بیست و ششمین اجـلاس کمیتـهٔ ملـی میکروبیولـوژی و بیولـوژی مـورخ ۸۷/۱۱/۲۶ مورد تصویب قرار گرفته است ، اینک به استناد بند یک مادهٔ ۳ قـانون اصـلاح قـوانین و مقـررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملـی ایـران منتشـر 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.

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

1- ISO 9308 -3 : 1998 : " Water quality-Detection and enumeration of Escherichia coli and Coliform bacteria in surface and waste water – Part 3 : Miniaturized method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium

2- ISO 9308 -3 : 1998 / Cor 1 : 2000: " Water quality-Detection and enumeration of Escherichia coli and Coliform bacteria in surface and waste water"
Part 3 :
Miniaturized method (Most Probable Number)) for the detection and enumeration of E. coli in surface and waste water .

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
آشنایی با مؤسسه استاندارد	ج
کمیسیون فنی تدوین استاندارد	د
پیش گفتار	و
۱ هدف و دامنه کاربرد	۱
۲ مراجع الزامی	۱
۳ اصطلاح و تعریف	۲
۴ اساس روش	۲
۵ نمونه برداری	۲
۶ مواد / و یا واکنشگر ها	۳
۷ وسایل	۵
۸ روش اجرای آزمون	۶
۹ بیان نتایج	۱۰
۱۰ گزارش نتایج	۱۰

"کیفیت آب – جستجو ، شناسایی و شمارش *اشریشیا کلی* و باکتری های کلی فرم - قسمت سوم : شمارش *اشریشیا کلی* با استفاده از مدل کوچک سازی(بیشترین تعداد احتمالی) در آب های سطحی و فاضلاب"

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روش جستجو ، شناسایی و شمارش *اشریشیا کلی* در آب های سطحی و فاضلاب به روش مدل کوچک سازی[1] (بیشترین تعداد احتمالی) بوسیله تلقیح در محیط کشت مـایع، مـی باشد.

این استاندارد، برای آب های سطحی و فاضلاب ، بویژه آب هایی که غنی از مواد معلق هستند،کاربرد دارد.

یادآوری ۱ - این روش برای جستجو ، شناسایی و شمارش باکتری های کلی فرم کاربرد ندارد .

یادآوری۲ – این روش برای آب های آشامیدنی و آب هایی که تعداد باکتری ها در آن کمتر از ۱۵ در هر ۱۰۰ml است، کاربرد ندارد .

۲ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد ملی ایران به آن ها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن مقررات ، جزئی از این استاندارد ملی ایران محسوب می شود.

در صورتی که به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد ، اصلاحیه ها و تجدیدنظرهای بعدی آن مورد نظر این استاندارد ملی ایران نیست. در موردمدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشاربه آن ها ارجاع داده شده است ، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه های بعدی آن ها مورد نظر است .

استفاده از مراجع زیر برای این استاندارد الزامی است:

۲-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ ، میکروبیولوژی موادغذایی وخوراک دام - راهنمای الزامات کلی برای آزمون

۲-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۸۹۲۳ ، میکروبیولوژی موادغذایی وخوراک دام – آماده سازی آزمایه - سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون های میکروبیولوژی – قسمت اول : مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری

۲-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۲-۸۹۲۳ ، موادغذایی وخوراک دام – آماده سازی آزمایه - سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون میکروبیولوژی های میکروبیولوژی – قسمت دوم : مقررات ویژه برای آماده سازی گوشت و فراورده های آن

۱- *Miniaturized by inoculation in liquid medium*

۲-۴ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۸۶۶۳ ، قسمت اول – راهنمای عمومی تضمین کیفیت برای آماده سازی محیط های کشت در آزمایشگاه

۲-۵ استاندارد ملی ایران شماره ۲-۸۶۶۳ ، میکروبیولوژی خوراک انسان و دام- راهنمای آماده سازی و تولید محیط های کشت – قسمت دوم – راهنمای عملی برای آزمون محیط های کشت

۲-۶ استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۸ ، آئین کار نمونه برداری از آب جهت آزمون های باکتریولوژیکی

۲-۷ استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۷ ، آیین کار آزمون های باکتریولوژیکی آب

۳ اصطلاح و تعریف

در این استاندارد اصطلاح و تعریف زیر به کار می رود :

۳-۱

اشریشیا کلی

باکتری هایی هستند که در محیط کشت مایع اختصاصی حاوی ۴- متیل امبلی فریل- بتا-دی - گلوکورونید (MUG)[1] در دمای $44\ ^{oC}$ قادر به رشد می باشند .

۴ اساس روش

این روش بر اساس تلقیح نمونه های رقیق شده در یک ردیف میکروتیترپلیت حاوی محیط کشت اختصاصی دهیدراته و سپس گرمخانه گذاری در دمای $(44 \pm 0/5)\ ^{oC}$ به مدت h (۳۶ تا ۷۲) می باشد. وجود *اشریشیا کلی* با ایجاد فلورسنس آبی رنگ در طول موج ۳۶۶ nm که در نتیجه هیدرولیز MUG در محیط است ، مشخص می شود .

1- 4-Methylumbelli Feryl- B- D- glucuronide (MUG)

۵ نمونه برداری

نمونه برداری باید مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۸ انجام گیرد .
نمونه را بلافاصله و یا چنانچه امکان پذیر نباشد ، حداکثر h ۶ پس از نمونه برداری آزمون کنید.

۶ مواد و/ یا واکنشگرها

برای بدست آوردن نتایج هماهنگ از مواد شیمیایی با کیفیت یکسان و درجه خلوص آزمایشگاهی استفاده کنید.چنانچه محیط های کشت به صورت تجاری در دسترس باشند، تهیه محیط های کشت را مطابق با دستور العمل سازنده انجام دهید .
همچنین در تهیه محیط های کشت از آب مقطر و یا آب یون زدایی شده[1] و بدون مواد بازدارنده از رشد میکروارگانیسم ها استفاده کنید.

۶-۱ محلول های رقیق کننده و محیط های کشت

۶-۱-۱ رقیق کننده اختصاصی (SD)[2]

مواد تشکیل دهنده	**مقدار**
نمک دریایی مصنوعی [3]	۲۲٫۵ g
محلول پروموفنول آبی رنگ	۱۰ ml
آب مقطر یا آب یون زدایی شده	۱۰۰۰ ml

روش تهیه :
مواد فوق را پس از مخلوط نمودن، در اتوکلاو با دمای ^{oC} (۳ ± ۱۲۱) به مدت زمان ۱۵ دقیقه تا ۲۰ دقیقه سترون کنید .

یادآوری - محلول بروموفنول آبی رنگ ، با افزودن مقدار g ۰٫۰۴ از اتانول ٪۵۰ تهیه می شود. این محلول فقط به منظور تغییر رنگ رقیق کننده اختصاصی به رنگ آبی و تمایز آن از آب مقطر یا آب یون زدای شده می باشد .

1- de- ionized

2-Special Diluent
3-Synthetic sea salt

۶-۱-۲ آب یون زدایی شده / آب مقطر

آب یون زدایی شده / آب مقطر را پس از تهیه ، در ظروف با گنجایش مناسب ریخته ، سپس آن را دراتوکلاو با دمای ^{oC} (۳ ± ۱۲۱) به مدت زمان ۱۵ دقیقه تا ۲۰ دقیقه سترون کنید.

۶-۱-۳ محیط کشت MUG /EC

مواد تشکیل دهنده	مقدار
تریپتون	۴۰ g
سالیسین	۱ g
تریتون × ۱۰۰	۱ g
۴- متیل امبلی فریل- بتا-دی - گلوکورونید (MUG)	۱۰۰ m g
آب مقطر یا آب یون زدایی شده	۱۰۰۰ ml

روش تهیه :

به ترتیب ، تریپتون، سالیسین ، تریتون × ۱۰۰ را به ۱۰۰۰ ml آب مقطر افزوده و آن را همراه با همزن مغناطیسی به آرامی. تا رسیدن به نقطه جوش حل کنید.

پس از سرد کردن محیط ، MUG را که در ۲ ml N ، N دی متیل فرمامید[1] حل شده ، به آن اضافه کنید. pH محیط را در(۰/۲ ± ۶/۹) تنظیم کنید . محلول را با استفاده از صافی غشایی با منافذی به قطر ۰/۲ µ سترون کنید..سپس به حجم های ۱۰۰ µl در هر چاهک میکروتیتر پلیت (طبق بند ۷-۱۱) بریزید و بلافاصله در یک تونل خشک کننده و یا هود لامینر[2] با جریان دو لایه دهیدراته (طبق بند ۷-۳) کنید .

1 -N,N-dimethylformamide
2 -Laminar flow

یادآوری – N ، N دی متیل فرمامید سمی و سرطانزا می باشد و هنگام استفاده از آن باید از هود[1] شیمیایی استفاده شود

۷ وسایل

از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروب شناسی طبق استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ و همچنین وسایل زیر استفاده کنید:

۷-۱ تجهیزات برای سترون سازی خشک (اون) و یا بخار (اتوکلاو) .

۷-۲ گرمخانه قابل تنظیم در دمای ^{oC} (۴۴±۰/۵) .

۷-۳ تونل خشک کننده یا هود لامینر[1] (ترجیحا کلاس ۲) .

۷-۴ محفظه مشاهده نور فرا بنفش با لامپ شبکه ای ۳۶۶ nm.

۷-۵ دستگاه رفراکتومتر[2] (در صورت نیاز) .

۷-۶ pH متر با دقت ۰/۱ ± .

۷-۷ لوله های آزمایش در اندازه های ۱۶۰mm × ۱۶ mm یا ارلن با ظرفیت مشابه .

۷-۸ لوله های آزمایش در اندازه های ۲۰۰ mm × ۲۰ mm یا ارلن با ظرفیت مشابه .

۷-۹ مولتی پی پت های ۸ کاناله (سمپلر) قابل تنظیم برای اندازه گیری و توزیع ۲۰۰ µl در هر چاهک .

۷-۱۰ سرسمپلر سترون مناسب برای مولتی پی پت ها .

۷-۱۱ میکروتیتر پلیت سترون با چاهک ۹۶ خانه ای و ظرفیت ۳۵۰ µl ته صاف و بدون فلورسنس.

۷-۱۲ پوشش چسبناک سترون یکبار مصرف برای پوشاندن[3] کامل میکروتیتر پلیت ها .

۷-۱۳ پلیت های سترون به قطر ۹۰ mm.

۷-۱۴ تجهیزات مورد نیاز برای صاف کردن[4] طبق استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۷ .

۷-۱۵ صافی غشایی با منافذی به قطر µ ۰/۲ برای سترون سازی محیط های کشت مایع .

1- Chemical Fume hood
2- Refractometer
3- sealing
4- membrane filters

۸ روش کار

۸-۱ انتخاب رقت ها

تعداد رقت ها بر اساس میزان آلودگی آب مورد آزمون متغیر است . در جدول (۱) مثال هایی از انواع مختلف آب ارائه شده است.

جدول ۱ – انواع مختلف آب و رقت های مربوط به آن ها

نوع نمونه	تعداد رقت	تعداد چاهک انتخابی در هر رقت	حدود شمارش باکتری ها در ۱۰۰ml نمونه
آب شنا گاه	۲	۶۴ چاهک برای رقت یک دوم ۳۲ چاهک برای رقت یک بیستم	$۱۰^{۴}$ × (۳/۵ تا ۱۵)
آب های سطحی دیگر	۴	۲۴ چاهک برای رقت یک دوم ۲۴ چاهک برای رقت یک بیستم ۲۴ چاهک برای رقت یک دویستم ۲۴ چاهک برای رقت یک دو هزارم	$۱۰^{۶}$ × (۳/۲ تا ۴۰)
فاضلاب یا پساب (تصفیه خانه)	۶	۱۶ چاهک برای رقت یک دوم تا ۱۶ چاهک برای رقت یک دویست هزارم	$۱۰^{۸}$ × (۶/۷ تا ۶۰)

۸-۲ آماده سازی رقت ها

توجه: به دلیل انتشار ذرات ، مراحل آماده سازی رقت باید در زیر هود میکروبی (طبق بند۷-۳) انجام شود .

۸-۲-۱ آماده سازی رقت آب شیرین و آب لب شور فاضلاب

میزان شوری آب را با دستگاه رفراکتومتر (طبق بند ۷-۵) اندازه گیری کنید .

۸-۲-۱-۱ نمونه ی آماده شده (طبق بند ۵) را به شدت تکان دهید تا توزیع یکنواختی از میکروارگانیسم ها ایجاد شود . سپس بلافاصله با استفاده از پی پت سترون مقدار ml ۹ از نمونه را به ml ۹ از محلول رقیق کننده SD بند ۶-۱-۱ منتقل کنید (رقت یک دوم) .

۸-۲-۱-۲ با استفاده از پی پت سترون دیگر ، مقدار ml ۱ از محلول رقیق کننده (طبق بند ۸-۲-۱-۱) را به دومین لوله حاوی ml ۹ محلول رقیق کننده SD منتقل کنید (رقت یک بیستم) .

۸-۲-۱-۳ با استفاده از پی پت سترون دیگر ، مقدارml ۱ از محلول رقیق کننده (طبق بند ۸-۲-۱-۲) را به سومین لوله حاوی ml ۹ محلول رقیق کننده SD انتقال دهید (رقت یک دویستم) .

در صورت لزوم ، مراحل رقیق سازی را ادامه دهید .

۸-۲-۲ آماده سازی رقت آب دریا (شوری بیشتر یا مساوی ۳۰ g / kg)

میزان شوری آب دریا را با دستگاه رفراکتورمتر (بند ۸-۵) اندازه گیری کنید .

۸-۲-۲-۱ نمونه آماده شده را به شدت تکان دهید تا توزیع یکنواختی از میکروارگانیسم ها ایجاد شود. سپس بلافاصله با استفاده از پی پت سترون ، مقدارml ۹ از نمونه را به ml ۹ آب مقطر (طبق بند ۷-۱-۲) منتقل کنید (رقت یک دوم) .

۸-۲-۲-۲ با استفاده از پی پت سترون دیگر ، مقدارml ۱ از محلول رقیق کننده (طبق بند ۸-۲-۲-۱) را به دومین لوله حاوی ml ۹ محلول رقیق کننده SD (طبق بند ۷-۱-۱) منتقل کنید (رقت یک بیستم) .

۸-۲-۲-۳ با استفاده از پی پت سترون دیگر ، مقدارml ۱ از محلول رقیق کننده (طبق بند ۸-۲-۲-۱) را به سومین لوله حاویml ۹ محلول رقیق کننده SD منتقل کنید (رقت یک دویستم) .
در صورت لزوم ، مراحل رقیق سازی را ادامه دهید .

یادآوری- با توجه به شوری بیشتر آب دریا ، اولین لوله رقت باید حاوی آب مقطر (طبق بند ۶-۱-۲) باشد .

۸-۳ تلقیح و گرمخانه گذاری میکروتیتر پلیت ها

۸-۳-۱ تلقیح

به منظور سهولت ، رقت انتخابی را در پلیت سترون به قطر ۹۰ mm ریخته ، سپس با استفاده از میکرو پیپت ۸ کاناله (طبق بند ۷-۹) مقدار ۲۰۰ µl از رقت را به چاهک های میکروتیتر پلیت سترون (طبق بند ۷-۱۱) که حاوی محیط کشت دهیدراته (طبق بند ۶-۱-۳) می باشد ، تلقیح کنید .

یادآوری ۱ – برای توزیع ۲۰۰ µl از هر رقت به جدول (۱) مراجعه کنید .
یادآوری ۲ – مراقب باشید محتویات یک چاهک به چاهک دیگر سرریز نشود.

۸-۳-۲ گرمخا نه گذاری

میکرو تیتر پلیت های تلقیح شده ی بند ۸-۳-۱را با پوشش چسبناک سترون بند ۷-۱۲ بپوشانید . سپس میکروتیتر پلیت هارا درگرمخانه بند (طبق بند ۷-۲) در دمای ^{oC} (۴۴±۰/۵) به مدت h (۳۶ تا ۷۲)گرمخانه گذاری کنید .

یادآوری ۱ – جابجایی میکروتیتر پلیت ها را با دقت انجام دهید .
یادآوری ۲ –کنترل کیفی میکروتیتر پلیت ها را با یک شاهد منفی (رقیق کننده سترون) و یک شاهد مثبت (سوسپانسیونی که دارای حداقل ۵۰۰ میکروارگانیسم در هرml باشد) پس از گرمخانه گذاری در دمایoC (۴۴±۰/۵) به مدت۴۸h انجام دهید .

۸-۳-۳ خواندن نتایج

میکرو تیتر پلیت های بند ۸-۳-۲ را همراه با پوشش در محفظه مشاهده فرابنفش (طبق بند ۷-۴)قرار دهید . همه چاهک هایی که نور فلورسنس آبی ایجاد می کنند، را به عنوان *اشریشیاکلی* مثبت (+) گزارش کنید .

یادآوری: بررسی نتایج را پس ازh ۳۶ گرمخانه گذاری انجام دهید. نور فلورسنس ایجاد شده در نمونه مثبت با افزایش زمان ، تغییر نخواهد کرد.

۸-۳-۳-۱ تعیین عدد شاخص

برای هر رقت ، تعداد چاهک های مثبت (+) را یادداشت کنید . سپس عدد شاخص را ثبت و گزارش کنید.

مثال (۱) : تعیین عدد شاخص در آب استخر

رقت	تعداد

۳۲ چاهک مثبت از ۶۴ چاهک	یک دوم
۵ چاهک مثبت از ۳۲ چاهک	یک بیستم

اعداد ۵ و۳۲ را به عنوان عدد شاخص گزارش کنید .

مثال (۲) : تعیین عدد شاخص در آب های سطحی

تعداد	رقت
۲۴ چاهک مثبت از ۲۴چاهک	یک دوم
۱۸چاهک مثبت از ۲۴ چاهک	یک بیستم
۵ چاهک مثبت از ۲۴ چاهک	یک دویستم
۱ چاهک مثبت از ۲۴ چاهک	یک بیست هزارم

اعداد ۱۸ و ۵ و۱ را به عنوان عدد شاخص گزارش کنید .

مثال (۳) : تعیین عدد شاخص در فاضلاب

تعداد	رقت
۱۶چاهک مثبت از ۱۶ چاهک	یک دوم
۱۶چاهک مثبت از ۱۶ چاهک	یک بیستم
۱۶چاهک مثبت از ۱۲ چاهک	یک دویستم
۱۶چاهک مثبت از ۵ چاهک	یک دو هزارم
۱۶چاهک مثبت از صفر چاهک	یک بیست هزارم
۱۶چاهک مثبت از صفر چاهک	یک دویست هزارم

اعداد ۱۲و ۵ وصفر را به عنوان عدد شاخص گزارش کنید .

یادآوری۱- چنانچه تلقیح نمونه درسه رقت یا بیشتر انجام شود ، بهتر است نتیجه آخرین رقت انتخابی صفر باشد .

یادآوری۲ – نرم افزار ، محاسبه بیشترین تعداد احتمالی در ml *اشریشیا کلی* را در آب برای هر روشی از تلقیح (کشت) و با حدود اطمینان ٪ ۹۵ مشخص می کنند.

مثال : اگر

CN عدد شاخص

LO حد پایینی

UP حد بالایی

باشد ، بنابر این اگر CN ۳۲و۵ باشد ، بیشترین تعداد احتمالی اشریشیا کلی در ml ۱ نمونه عدد ۵۶/۷ با ضریب اطمینان ٪ ۹۵ می باشد .

{LO=۵/۴۲-UP=۱۰/۵۴}

۱۰۰ ml در ۷۵۶ ml (۵۴۲ تا ۱۰۵۴)

۹ بیان نتایج

نتایج را به صورت تعداد احتمالی *اشریشیاکلی* در ml ۱ و یا در ml ۱۰۰ نمونه بیان کنید .

چنانچه هیچکدام از چاهک های میکروتیترپلیت مثبت (+) نشد ، نتایج را بصورت " تعداد کمتر از ۱۰۰ در هر ml نمونه " و یا " تعداد کمتر از یک رقت مورد استفاده در MPN " بیان کنید.

۱۰ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی های زیر باشد :

۱۰– ۱ مشخصات کامل نمونه شامل نوع و حجم نمونه.

۱۰ – ۲ تاریخ نمونه برداری و تاریخ ارسال نمونه به آزمایشگاه.

۱۰– ۳ تاریخ انجام آزمون .

۱۰– ۴ روش آزمون طبق این استاندارد ملی ایران .

۱۰– ۵ بیان نتایج طبق بند این استاندارد .

۱۰– ۶ نام و نام خانوادگی و امضاء آزمایش کننده .

۱۰– ۷ سایر اطلاعات مربوط به روش آزمون .