جمهوری اسلامی ایران

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

# شمارهٔ استاندارد ایران

1779

# روش نمونه برداري و آزمايش فاضلابها

چاپ اول

موسسه استاندارد و تحقيقات صنعتي ايران

موسسه استاندارد و تحقيقات صنعتي ايران تنها سازماني است در ايران كه بر طبق قانون ميتواند استاندارد رسمي فرآورده ها را تعيين و تدوين و اجراي آنها را با كسب موافقت شورايعالي استاندارد اجباري اعلام نمايد. وظايف و هدفهاي موسسه عبارتست از:

(تعيين، تدوين و نشر استانداردهاي ملي - انجام تحقيقات بمنظور تدوين استاندارد بالا بردن كيفيت كالاهاي داخلي، كمك به بهبود روشهاي توليد و افزايش كارائي صنايع در جهت خودكفائي كشور - ترويج استانداردهاي ملي - نظارت بر اجراي استانداردهاي اجباري - كنترل كيفي كالاهاي صادراتي مشمول استاندارد اجباري و جلوگيري از صدور كالاهاي نامرغوب بمنظور فراهم نمودن امكانات رقابت با كالاهاي مشابه خارجي و حفظ بازارهاي بين المللي كنترل كيفي كالاهاي وارداتي مشمول استاندارد اجباري بمنظور حمايت از مصرف كنندگان و توليدكنندگان داخلي و جلوگيري از ورود كالاهاي نامرغوب خارجي راهنمائي علمي و فني توليدكنندگان، توزيع كنندگان و مصرف كنندگان - مطالعه و تحقيق درباره روشهاي توليد، نگهداري، بسته بندي و ترابري كالاهاي مختلف - ترويج سيستم متريك و كاليبراسيون وسايل سنجش - آزمايش و تطبيق نمونه كالاها با استانداردهاي مربوط، اعلام مشخصات و اظهارنظر مقايسه اي و صدور گواهينامه هاي لازم).

موسسه استاندارد از اعضاء سازمان بين المللي استاندارد ميباشد و لذا در اجراي وظايف خود هم از آخرين پيشرفتهاي علمي و فني و صنعتي جهان استفاده مينمايد و هم شرايط كلي و نيازمنديهاي خاص كشور را مورد توجه قرار ميدهد.

اجراي استانداردهاي ملي ايران بنفع تمام مردم و اقتصاد كشور است و باعث افزايش صادرات و فروش داخلي و تأمين ايمني و بهداشت مصرف كنندگان و صرفه جوئي در وقت و هزينه ها و در نتيجه موجب افزايش درآمد ملي و رفاه عمومي و كاهش قيمتها ميشود.

**تهیه کننده**
**کمیسیون استاندارد فاضلابها**

**رئیس**

| | |
|---|---|
| اعظم دکتر داروساز شکوهي - شکوه | رئیس آزمایشگاههاي و بیولوژیست سازمان آب تهران |

**اعضاء**

| | |
|---|---|
| الهي - حسینعلي | مهندس شیمي و مشاور مؤسسه مهندس بهداشت استاندارد و تحقیقات صنعتي ایران |
| جمشیدي نیا - غلامحسین | مهندس بهداشت کارشناس دانشکده بهداشت |
| علائي - منوچهر | کارشناس بهداشت محیط وزارت بهداري |
| فرید پاك - فرهاد | مهندس شیمي معاون شیلات شمال |
| گودرزي - هوشنگ | مدیر کل بهداشت محیط وزارت بهداري |

**دبیر**

| | |
|---|---|
| پریدخت - رئوفیان | شیمیست کارشناس مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتي ایران |

# فهرست مطالب

روش نمونه برداري و آزمايش فاضلابها
هدف و دامنه كاربرد
نمونه برداري
يادآوري و راهنمائيهاي عمومي براي آزمايشها
اندازه‌گيري كل مواد معلق
اندازه‌گيري اكسيژن مورد نياز بيوشيميائي
باكتريهاي بيماريزا

بسمه تعالي

پيشگفتار

استاندارد نمونه برداري و روشهاي آزمون فاضلابها كه بوسيله كميسيون فني استاندارد فرآورده هاي شيميائي و فتوشيمي زير نظر كميته ملي استاندارد صنايع شيميائي و تحت نظارت شورايعالي استاندارد در موسسه استاندارد و تحقيقات صنعتي ايران تهيه و تدوين گرديده است به استناد ماده يك (( قانون مواد الحاقي به قانون تاسيس موسسه استاندارد و تحقيقات صنعتي ايران مصوب 24 آذر 1349)) بعنوان استاندارد رسمي ايران منتشر ميگردد .

براي حفظ همگامي و هماهنگي با پيشرفتهاي ملي و جهاني صنايع و علوم استانداردهاي ايران در مواقع لزوم و يا در فواصل معين مورد تجديد نظر قرار خواهند گرفت و هر گونه پيشنهادي كه براي اصلاح يا تكميل اين استانداردها برسد در هنگام تجديد نظر در در كميسيون فني مربوط مورد توجه واقع خواهد شد .

بنابراين براي مراجعه به استانداردهاي ايران بايد همواره از آخرين چاپ و تجديد نظر آنها استفاده نمود .

در تهيه اين استاندارد سعي برآن بوده است كه با توجه به نيازمنديهاي خاص ايران حتي المقدور ميان روشهاي معمول در اين كشور و استاندارد و روشهاي متدوال در كشورهاي ديگر هماهنگي و همگامي ايجاد شود .

بنابراين با بررسي امكانات و مهارتهاي موجود و اجراي آزمايشهاي لازم استاندارد حاضر با استفاده از استاندارد زير تهيه گرديد :

1- استاندارد هندوستان شماره 4733 سال 1972

# روش نمونه برداري و آزمايش فاضلابها

## 1 - هدف و دامنه كاربرد

اين استاندارد روشهاي نمونه برداري و آزمايش فاضلابها را در برميگيرد .

## 2 - نمونه برداري

2-1- محل نمونه برداري :

در مواردیکه آزمايش فاضلاب در نقطه مشخصي مورد نظر باشد انتخاب محل نمونه برداري موردي نخواهد داشت . در مواردیکه اطلاع از ترکيب فاضلاب در محل خروج فاضلاب از تأسيسات تصفيه مورد نظر باشد نمونه در محل تخليه از انتهاي لوله خروجي تأسيسات بايد برداشت شود .

2-2- هنگاميكه پي بردن به تغييرات تركيب فاضلاب در دوره يا فاصله زماني مشخص مانند اوج ( حداكثر مقدار ) تخليه لازم باشد نمونه‌ها بايد در فواصل كوتاه و معيني از زمان يعني هر 5 يا 10 يا 30 دقيقه برداشت و آزمايش شود . براي مطالعه و آگاهي از كيفيت فاضلاب در يك دوره عملكرد يا يك دوره زماني ( معمولا 24 ساعت ) يا يك دوره كار روزانه تأسيسات تصفيه از روش نمونه‌گيري تركيبي بايد استفاده شود . نمونه تركيبي از مخلوط كردن برداشت نمونه‌هاي معرف در فواصل معين و اختياري از زمان از كانال اصلي تخليه بدست ميآيد . حجم هر يك از نمونه‌هاي برداشت شده بايد نسبت ثابتي از حجم فاضلاب را داشته باشد . فواصل زمانهاي اختيار شده بايد با تغييرات ماهيت و مقدار جريان فاضلاب مرتبط باشد . در برداشت نمونه‌ها بايد توجه داشت كه نسبت واقعي مواد معلق محفوظ بماند . نمونه‌گيري نبايد از ناحيه كف آلود در سطح و يا از كف كانال

صورت گيرد . معمولا نمونه‌ها بايد در $\frac{1}{3}$ فاصله از كف بستر جريان برداشت گردد . نمونه بايد به آرامي و بنحوي برداشت شود كه هوا در آن وارد نشود . در بيشتر موارد برداشت نمونه يكبار در ساعت رضايتبخش ميباشد .

2-3- وسائل نمونه برداري

ظروف چيني با لعاب يا ظروف لعابي كه لعاب آنها شكننده نباشد و يا ظروف شيشه‌اي را براي نمونه برداري ميتوان بكار برد . ظروفي كه جهت نمونه برداري بكار ميرود بايد دهان گشاد و كوچك باشد كه انتقال محتوي به ظرف اصلي نمونه بآساني صورت گيرد و رسوب و باقيمانده در كف آنها بجا نماند . چنانچه وسيله نمونه برداري خود كار در اختيار باشد ميتوان از آن استفاده كرد .

2-3-1- در مورد تهيه نمونه‌هاي تركيبي ظروفي براي جمع آوري نمونه‌ها بايد بكار برد كه گنجايش كافي براي كليه نمونه‌هاي برداشت شده را داشته باشد .

براي تهيه نمونه تركيبي ميتوان از ظروف شيشه‌اي يا لعابي با گنجايش كافي تميز و خشك استفاده كرد . چنانچه ظروف لعابدار براي اين منظور بكار رود بايد دقت شود كه لعاب بريدگي يا ترك خوردگي نداشته باشد .

2-4- ظروف نمونه برداري

2-4-1- قبل از برداشت مقدار نمونه لازم براي آزمايش , مواد جامد را با تكان دادن ظرف نمونه تركيبي كاملا بحال تعليق در آوريد .

2-4-2- نمونه‌ايكه بمنظور آزمايش برداشت ميشود بايد در بطريهاي در سمباده كه قبلا با مقداري از نمونه شسته شده است ريخته شود . بطريهاي نو قبل از استفاده بايد بوسيله اسيد شسته شده و سپس با دقت با آب مقطر آبكشي شود . در حدود 2

تا 3 ليتر از نمونه براي كليه آزمايشها كافي است .

بطريهائيكه بمنظور تهيه نمونه نهائي بكار ميرود بايد از نمونه بنحوي پر شود كه مقدار بسيار كمي هوا در آنها باقي بماند و در بطري بايد كاملا محكم بسته شود . چنانچه نمونه بايد به فاصله دوري حمل شود آنرا در محفظه محكمي كه براي اين منظور تهيه شده است بايد بطور قائم قرار داد .

2-4-3- در روي بطري نمونه برداري مشخصات كامل نمونه مانند محل نمونه برداري و تاريخ و ساعت نمونه برداري و نام و سمت نمونه برداري و نوع نمونه بايد قيد شود .

2-5- نگاهداري و حفظ نمونه

2-5-1- نمونه بايد در موقع جمع آوري و پس از آن در 4 درجه سانتيگراد نگاهداري شود .

2-5-2- روش كلي حفظ نمونه كه قابل بكاربري در كليه آزمايشها باشد وجود ندارد . بطور كلي ترجيح داده ميشود كه آزمايش روي نمونه بلافاصله پس از نمونه‌گيري انجام شود . بهترين راه براي حفظ اغلب نمونه‌ها , نگاهداري آنها در 3 تا 4 درجه سانتيگراد در جعبه يخ كه بخوبي عايق شده است و يا در يخچال بمدت 24 ساعت است . در مواردیكه از مواد شيميائي براي حفظ نمونه براي آزمايشهاي معين استفاده ميشود , اين مواد را بايد بطور جداگانه در قسمتي از نمونه كه براي آزمايش معيني بكار ميرود ريخته شود .

## 3- يادآوري و راهنمائيهاي عمومي براي آزمايشها

3-1- محلولهاي لازم - در صورتيكه نوع خاصي از مواد ذكر نشده باشد ميتوان از مواد شيميائي

خالص و آب مقطر ( استاندارد شماره 1728) استفاده کرد .

يادآوري 1- منظور از مواد شيميائي خالص موادي است که ناخالصي آنها در نتيجه آزمايش مؤثر نباشد .

3-2- بايد توجه داشت که تهيه نمونه ايکه معرف فاضلاب باشد اهميت بسيار دارد . روش نمونه برداري براي تهيه اين نمونه در بند 2 آمده است ولي چنانچه نوع آزمايش نمونه برداري خاصي را ايجاب کند . نمونه برداري بايد طبق روش خاصي که توضيح داده شده است انجام گيرد .

## 4 - اندازه‌گيري کل مواد معلق

4-1- خلاصه روش

مواد معلق بوسيله صاف کردن از روي يک لايه پنبه کوهي در داخل بوته گوچ بدست ميآيد .

4-2- مواد لازم :

4-2-1- شير پنبه کوهي - شير پنبه کوهي را ميتوان از پنبه کوهي شسته شده ( در اسيد ) در آب تهيه کرد . براي اين منظور کافي است 15 گرم پنبه کوهي را در آب بجال تعليق درآورد . چنانچه پنبه کوهي حاوي ذرات بسيار ريز باشد با عمل ته نشين کردن ميتوان ذرات ريز را از شير آسبست جدا کرد .

4-3- روش

4-3-1- با دقت کامل يک لايه 3 ميليمتري از شير آسبست در ته بوته گوچ بسازيد . براي اين منظور ابتدا بوته را بمقدار لازم از شير آسبست که قبلا خوب مخلوط شده است پر کنيد . سپس آنرا براي دو دقيقه بگذاريد تا ذرات سنگين‌تر ته نشين شود و سپس با همان مقدار خلائي که نمونه را صاف ميکنيد بوته را با وصل کردن به دستگاه مکنده تحت تأثير مکش قرار دهيد و لايه پنبه کوهي را با

عبور دادن مقداري آب از ميان آن شستشو دهيد . بوته آماده شده را براي مدت يكساعت در اتو 105-103 درجه سانتيگراد خشك كرده پس از خنك كردن بوته در دسيكاتور آنرا وزن كنيد .

4-3-2- مقادير 10 ميلي ليتري از نمونه را كه بخوبي تكان داده شده است در بوته وزن شده تحت مكش صاف كنيد .

يادآوري 2- قبل از شروع بصاف كردن نمونه لايه پنبه كوهي را با چند قطره آب مرطوب كنيد . همواره لازم است ده ميلي ليتر بعدي نمونه قبل از اينكه بوته بكلي از محلول خالي شود در بوته ريخته شود . براي برداشت نمونه بوسيله پيپتهاي دهان گشاد باندازه‌اي كه مانع گرفتگي بوسيله مواد معلق نشود پيشنهاد ميشود . صاف كردن نمونه را به مقادير 10 ميلي ليتر آنقدر تكرار كنيد كه در حدود 10 تا 20 ميلي گرم از مواد معلق در بوته جمع شود يا اينكه عمل صاف كردن خيلي كند و بسختي صورت گيرد . بعد از اتمام عمل صاف كردن , باقيمانده را 2-3 مرتبه با 10 ميلي ليتر از آب مقطر شستشو دهيد تا املاح محلول از لايه خارج شود . عمل صاف كردن با مكش را آنقدر ادامه دهيد تا آخرين قطره آب خارج شده و مواد معلق باقيمانده روي لايه كاملا خشك بنظر آيد . سپس بوته را براي مدت يكساعت در يك اتو در 105-103 درجه سانتيگراد خشك كنيد .

پس از خنك كردن بوته در دسيكاتور آنرا در درجه حرارت آزمايشگاه وزن كنيد .

4-4- محاسبه :

$$\text{كل مواد معلق بر حسب ميلي گرم در ليتر} = \frac{\text{وزن مواد معلق بدست آمده برحسب ميلي گرم} \times ۱۰۰۰}{\text{حجم نمونه صاف شده}}$$

5-1- خلاصه روش - کلیه روشهائیکه براي اندازه‌گیري اکسیژن بکار میرود براساس دستور کار اولیه وینکلر [1] است .

اساس روش عبارت است از رسوب کردن هیدرواکسید منگنز حاصل از افزودن محلول سولفات منگنز و محلول قلیائي یدور پتاسیم در بطري که از نمونه پر شده است . اکسیژن موجود در نمونه بسرعت بر هیدرواکسید منگنز اثر کرده و تشکیل هیدروکسیدهاي منگنز با ظرفیت بالاتر را میدهد . سپس با اسیدي کردن محلول , ید بمقدار معادل اکسیژن موجود در نمونه آزاد میشود . مقدار ید آزاد شده با تیتراسیون بوسیله محلول استاندارد تیوسولفات و بکار بردن محلول نشاسته بعنوان معرف اندازه‌گیري میشود .

5-2- در روش وینکلر یونها و ترکیبات مختلف موجود در نمونه ایجاد مزاحمت میکند . براي رفع مزاحمت این مواد در روش وینکلر تغییرات مناسبي داده شده است . انتخاب دستور کار مناسب بستگي به ماهیت نمونه و مواد مزاحم دارد .

قابلیت بکاربري روشها در زیر داده شده است :

الف - روش وینکلر : در مواردیکه هیچگونه مواد مزاحم در نمونه وجود ندارد .

ب - روش آلستربرگ [2] ( روش آزید سدیم :) در مواردیکه در نمونه بیش از 0/1 میلي گرم در لیتر نیتریت بر حسب ازت و یك میلي گرم آهن دو ظرفیتي در لیتر و همچنین در نمونه مواد احیأ و اکسید کننده وجود نداشته باشد . در مواقعیکه 5 میلي گرم در لیتر یا بیشتر یون آهن سه ظرفیتي وجود داشته باشد فلور پتاسیم افزوده میشود . با افزودن فلورو روشي براي غلظت 100 تا 200 میلي گرم در لیتر آهن سه ظرفیتي قابلیت بکاربري دارد .

پ - روش ريدل استوارت [3] ( روش پرمنگنات :) در مواردیکه منحصرا آهن دو ظرفيتي وجود دارد . در صورتیکه آهن دو ظرفيتي يا سه ظرفيتي بيش از دو ميلي گرم در ليتر وجود داشته باشد فلورور پتاسيم قبل از اسيدي كردن نمونه افزوده ميشود .

ت - روش هيپوكلريت قليائي : در مواردیکه سولفيت , تيوسولفات و پلي تيوناتها و كلر آزاد و هيپوكلريت وجود دارد . هرچند به نتايجايكه از اين روش بدست ميآيد نميتوان اعتماد كرد زيرا نتايج تا حدودي كم است .

ث - روش شورت [4] تريو : در مواردیکه مواد آلي وجود دارد كه بسهولت در PH محلول قليائي يدور اكسيده ميشود .

ج - روش انعقاد بوسيله زاج : در مواردیکه مقدار قابل ملاحظه مواد معلق وجود دارد .

5-3- روش وينكلر :

5-3-1- مواد و محلولهاي لازم :

الف - محلول سولفات منگنز - 480 گرم سولفات منگنز با چهار مولكول آب تبلور را در مقداري آب حل كرده و در صورتيكه محلول تار است آنرا صاف و تا يك ليتر رقيق كنيد . هنگاميكه اين محلول به محلول اسيدي شده يدور پتاسيم افزوده ميشود نبايد بيش از مقدار جزئي يد آزاد كند .

ب - محلول قليائي يدور - 500 گرم هيدرواكسيد سديم ( يا 700 گرم هيدرواكسيد پتاسيم ) را در 500 ميلي ليتر آب حل كنيد و بگذاريد محلول سرد شود . محلول هيدرواكسيد بايد فاقد كربنات باشد . 150 گرم يدور پتاسيم را جداگانه در مقداري آب تازه جوشيده و سرد شده حل كنيد . اين محلول را به محلول هيدرواكسيد سديم بيفزائيد . مخلوط را تا يك ليتر با آب رقيق كنيد .

پ - اسيد سولفوريك غليظ

ت - محلول استاندارد 0/025 نرمال تيوسولفات - محلول تيوسولفات را هر بار در موقع مصرف بوسيله دي كرومات پتاسيم استاندارد تيتر كنيد . يك ميلي ليتر محلول تيوسولفات 0/025 نرمال معادل دو دهم ميلي گرم اكسيژن است .

5-3-2- دستور كار - در بطري در سمباده اي 250-300 ميلي ليتري محتوي نمونه را برداريد و بدان 1/5 ميلي ليتر محلول سولفات منگنز و 1/5 ميلي ليتر مخلوط قليائي يدور پتاسيم با پي پتهاي جداگانه بيفزائيد بطوريكه نوك پيپت كاملا در زير سطح مايع قرار گيرد . در سمباده بطري را بدقت در جاي خود قرار دهيد بطوريكه حباب هوا وارد بطري نشود . با برگرداندن و چرخاندن بطري محتوي آنرا كاملا مخلوط كنيد و بگذاريد رسوب ايجاد شده ته نشين شود . هنگاميكه رسوب ته نشين شد و محلول روي رسوب هيدرواكسيد منگنز صاف شد مخلوط كردن را براي بار دوم تكرار كنيد . پس از ته نشين شدن رسوب در سمباده بطري را بدقت برداشته و حداقل 100 ميلي ليتر محلول صاف شده روي رسوب را بوسيله پي پت برداريد . بلافاصله دو ميلي ليتر اسيد سولفوريك غليظ بوسيله پي پت از كنار دهانه وارد بطري كنيد دوباره در بطري را بگذاريد و با برگرداندن و چرخاندن بطري محتوي آنرا كاملا مخلوط كنيد تا يد آزاد شده بطور يكنواخت در محلول توزيع شود . اين محلول را بلافاصله با محلول استاندارد تيوسولفات سديم و افزودن يك ميلي ليتر محلول نشاسته بعنوان معرف در هنگاميكه رنگ زرد محلول كمرنگ شده است تا زايل شدن رنگ آبي تيتر كنيد . خطاي مربوط به افزودن محلول مواد شيميائي و مقدار نمونه خارج شده از بطري قابل ملاحظه نميباشد .

5-3-3- محاسبه - مقدار اکسیژن محلول برحسب میلي گرم در لیتر برابر است با حجم مصرف شده محلول استاندارد تیوسولفات در تیتراسیون .

5-4- روش آلستربرگ ( آزید سدیم .)

5-4-1- مواد لازم - کلیه مواد داده شده در بخش 5-3-1 باستثنأ محلول قلیائي یدور بکار برده میشود , محلول قلیائي یدور آزید سدیم و محلول فلورور پتاسیم جایگزین محلول قلیائي یدور میشود .

الف - محلول یدور سدیم و آزید سدیم - ده گرم آزید سدیم را در 40 میلي لیتر آب حل کنید . این محلول را به محلول یدور قلیائي که طبق بند ب 5-3-1 تهیه شده و حجم آن تا حدود 950 میلي لیتر رقیق شده است ضمن بهم زدن مداوم بیفزائید .

ب - محلول فلورور پتاسیم - 40 گرم فلورور پتاسیم با دو ملکول آب تبلور را در صد میلي لیتر آب حل کنید .

5-4-2- دستور کار - از دستور کار داده شده در بخش 5-3-2 باید پیروي شود با این تفاوت که بجاي محلول قلیائي یدور از محلول قلیائي یدور آزید سدیم باید استفاده شود , هنگامیکه مقدار 5 میلي گرم در لیتر یا بیشتر یون آهن سه ظرفیتي موجود باشد . یك میلي لیتر محلول فلوئور پتاسیم قبل از اسیدي کردن به نمونه بیفزائید و پس از افزودن اسید بلافاصله نمونه را تیتر کنید .

5-4-3- محاسبه - مانند بخش 5-3-3- محاسبه کنید .

5-5- روش ریدل استوارت ( روش پرمنگنات .)

5-5-1- مواد لازم - از کلیه محلولهائیکه در بخش (5-3-1) شرح تهیه آن داده شده و فلوئور پتاسیم که شرح تهیه آن ( طبق بند ب -5-4-1)- داده شده بانضمام محلولهائیکه در زیر داده میشود باید استفاده شود .

الف - محلول پرمنگنات پتاسيم - 6/3 گرم پرمنگنات پتاسيم را در مقداري آب حل كرده و حجم آنرا با آب بيك ليتر برسانيد .

ب - محلول اگسالات پتاسيم - 2 گرم اگسالات پتاسيم با يك مولكول آب تبلور را در صد ميلي ليتر آب حل كنيد .

5-5-2- دستور كار - در سمباده اي بطري محتوي نمونه را برداريد و بوسيله يك پيپت مدرج يك ميلي ليتري مقدار 0/7 ميلي ليتر اسيد سولفوريك غليظ را با دقت در زير سطح مايع اضافه كنيد . سپس مقدار كافي محلول پرمنگنات پتاسيم ( در حدود يك ميلي ليتر ) بيافزائيد تا اينكه رنگ بنفش كمرنگ حاصل براي مدت 5 دقيقه پايدار بماند . از افزايش محلول پرمنگنات زيادتر از مقدار لازم خودداري كنيد . در بطري را گذاشته و با برگرداندن آن محتوي بطري را مخلوط كنيد . پس از 5 دقيقه با افزايش مقادير 0/5 ميلي ليتري محلول اگسالات پتاسيم و مخلوط كردن آن رنگ پرمنگنات را زايل كنيد . فواصل افزودن هر بار محلول اگسالات بايد در حدود 5 دقيقه باشد . با افزايش 3 ميلي ليتر محلول قليائي يدور , دنباله كار را طبق بخش 5-3-2- ادامه دهيد چنانچه يون دو ظرفيتي يا آهن سه ظرفيتي بيش از 10 ميلي گرم در ليتر در محلول وجود داشته باشد مقدار يك ميلي ليتر محلول فلوئور پتاسيم بلافاصله بعد از افزايش پرمنگنات اضافه كنيد .

پس از اسيدي كردن محلول تيتراسيون بايد بدون تأخير انجام شود .

5-5-3- محاسبه مانند بخش 5-3-3- محاسبه كنيد .

5-6- روش هيپوكلريت قليائي

5-6-1- مواد و محلولهاي لازم - از كليه محلولهائيكه در بخش 5-3-1- شرح تهيه آن داده شده

است بايد استفاده شود ولي بجاي محلول قليائي يدور از محلول قليائي يدور - آزيد سديم استفاده كنيد ( بند الف 5-4-1 مراجعه شود ) بعلاوه محلولهاي زير را نيز تهيه كنيد .

الف - محلول هيپوكلريت قليائي دو نرمال - براي تهيه اين محلول گاز كلر را از داخل محلول 2/1 نرمال هيدروكسيد سديم ضمن خنك كردن محلول عبور دهيد . تيتر اين محلول را هفته‌اي يكبار با محلول تيوسولفات سديم تعيين كنيد . هنگاميكه محلول اسيدي بوده و در آن مقدار كافي يدور پتاسيم وجود داشته باشد يك ميلي ليتر آن در حدود 20 ميلي ليتر محلول 0/1 نرمال تيوسولفات سديم براي نيتراسيون لازم دارد .

ب - محلول يدور پتاسيم نرمال - 17 گرم يدور پتاسيم را در مقداري آب حل كرده و حجم آنرا با آب به 100 ميلي ليتر برسانيد با افزايش يك ميلي ليتر محلول هيدروكسيد سديم نرمال باين محلول از آزاد شدن يد جلوگيري كنيد .

پ - اسيد سولفوريك (1+9) يك قسمت اسيد سولفوريك غليظ را به 9 قسمت آب با احتياط بيفزائيد .

ت - محلول سولفيت سديم يكدهم نرمال - 6/3 گرم سولفيت سديم بي آب و يا 12/6 گرم سولفيت سديم با هفت مولكول آب تبلور را در مقداري آب حل كرده و حجم آنرا بيك ليتر برسانيد . هنگاميكه غلظت محلول كمتر از 80 درصد غلظت اوليه باشد محلول را مورد استفاده قرار ندهيد .

ث - محلول بين يدات پتاسيم [5] يكدهم نرمال : 3/249 گرم بين يدات پتاسيم $KH(IO_3)_2$ را در مقداري آب حل كرده و حجم آنرا در يك بالن ژوژه يك ليتري تا نشانه با آب رقيق كنيد .

5-6-2- دستور كار

در سمباده اي بطري محتوي نمونه را برداشته و مقدار 0/2 ميلي ليتر و يا مقدار كافي محلول هيپوكلريت قليائي براي اكسيده كردن سولفيتها و تيوسولفاتها پلي تيوناتها به نمونه اضافه كنيد . در سمباده اي بطري را گذاشته و با معكوس كردن و چرخاندن آن براي مدت 20-30 ثانيه محتوي آنرا مخلوط كنيد . يك ميلي ليتر محلول يدور پتاسيم ( بند 5-3-1) بيافزائيد و سپس با افزودن يك ميلي يا بيشتر محلول اسيد سولفوريك (1+9) محيط را اسيدي كنيد و محتوي شيشه را كاملا مخلوط كنيد .

0/2 ميلي ليتر محلول نشاسته بيفزائيد و يد آزاد شده را بوسيله محلول سولفيت سديم در مقابل معرف نشاسته بصورت يد تركيبي درآوريد و بدفعات مقادير 0/1 ميلي ليتر محلول يكدهم نرمال بين يدات پتاسيم بيفزائيد تا رنگ آبي كمرنگ در محيط ظاهر شده و پايدار بماند . دنباله كار را با افزودن 3 ميلي ليتر محلول قليائي يدور - ازيد سديم طبق بخش ( الف - 5-4-1) ادامه دهيد .

5-6-3- محاسبه - مانند بخش 5-3-3- محاسبه كنيد .

5-7- روش شورت تريو

5-7-1- مواد و محلولهاي لازم - از كليه محلولهائيكه در بخش 5-3-1- شرح تهيه آن داده شده است استفاده كنيد ولي بجاي محلول قليائي يدور از محلول قليائي يدور - ازيد سديم استفاده كنيد ( به بند الف 5-4-1 مراجعه شود .)

5-7-2- دستور كار - در سمباده اي بطري محتوي نمونه را برداريد و مقدار 2 ميلي ليتر محلول سولفات منگنز و سپس 2 ميلي ليتر محلول قليائي يدور - ازيد سديم بيافزائيد . در بطري را گذاشته و با برگردانيدن و چرخاندن بطري براي مدت 20 ثانيه محتوي آنرا مخلوط كنيد . بلافاصله دو ميلي ليتر اسيد سولفوريك غليظ قبل از ته

نشين شدن رسوبات افزوده و محتوي بطري را كاملا مخلوط كنيد و تيتراسيون محلول را بطوريكه در بخش 5-3-2- شرح داده شده است انجام دهيد .

5-7-3- محاسبه - مانند بخش 5-3-3- محاسبه كنيد .

5-8- روش دلمه سازي بوسيله زاج .

5-8-1- محلولها و مواد لازم از كليه محلولهائيكه در بخش 5-3-1- شرح آن داده شده است و همچنين از محلولهائيكه شرح تهيه آنها در زير داده ميشود استفاده كنيد .

الف - محلول زاج - 10 گرم سولفات مضاعف آلومينيوم و پتاسيم را در مقداري آب حل كرده و حجم آنرا با آب به 100 ميلي ليتر برسانيد .

ب - هيدرواكسيد آمونيم - محلول غليظ هيدرواكسيد آمونيم (d = 0/9 .)

5-8-2- دستور كار - نمونه را در بطري در سمباده اي 500 تا 1000 ميلي ليتري بريزيد و همان احتياطهائيكه در روشهاي قبلي لازم است در اين روش نيز بكار بنديد . ده ميلي ليتر محلول زاج و سپس يك تا دو ميلي ليتر هيدرواكسيد آمونيوم بيافزائيد در بطري را گذاشته و با برگردانيدن و چرخاندن آن بآرامي بمدت يك دقيقه محتوي بطري را مخلوط كنيد . بطري را براي مدت 10 دقيقه بگذاريد بماند تا رسوب ته نشين شود .

سپس محلول صاف شده روي رسوب را بوسيله يك سيفون در يك بطري 250 تا 300 ميلي ليتري آزمايش اكسيژن منتقل كنيد تا محلول از بطري سرريز شود . از ورود هوا به نمونه جلوگيري كنيد . نوك لوله خروجي سيفون را در نزديكي كف بطري اندازه‌گيري اكسيژن قرار دهيد . سپس برحسب مورد دنباله كار را طبق بخشهاي 5-3 و 5-4 و 5-6 ادامه دهيد و نتيجه را محاسبه كنيد .

## 6- اندازه‌گيري اكسيژن مورد نياز بيوشيميائي

6-1- خلاصه روش - اكسيژن مورد نياز بيوشيميائي عبارت است از مقدار اكسيژن لازم براي حجم معيني از فاضلاب براي اكسيده شدن مواد آلي در آن بوسيله ميكروارگانيسمها در شرايط مشخص . براي اندازه‌گيري اكسيژن مورد نياز اكسيژن محتوي در نمونه رقيق شده يا نشده قبل از كشت و پس از كشت بمدت پنج روز در 20 درجه سانتيگراد اندازه‌گيري ميشود .

6-2- وسائل مورد نياز - بطريهاي در سمباده‌اي به حجم 250 تا 300 ميلي ليتر با گردن باريك براي اين آزمايش مناسب است بمنظور احتياط بيشتر بطريها را قبل از آزمايش بايد كاملا با مواد شوينده و آب شستشو داده و براي جلوگيري از ورود و جذب هوا در نمونه در مدت كشت بطريها را بايد وارونه در حمام آبي قرار داد يا از بطريهائي با دهانه مخصوص براي ريختن آب استفاده كرد .

6-3- مواد و محلولهاي لازم

6-3-1- محلول هيدرواكسيد سديم - تقريباً يك نرمال :

6-3-2- محلول سولفيت سديم - 1/5 گرم سولفيت سديم بي آب را در يك ليتر آب حل كنيد . اين محلول را هر بار براي مصرف روزانه تهيه كنيد .

6-3-3- آب براي رقيق كردن - آب مقطر با كيفيت خوب و عاري از فلزات خصوصاً مس كه هوا در آن دميده شده باشد براي اين منظور مناسب است .

6-3-4- محلول بافر فسفات - 8/5 گرم پتاسيك دي هيدروژن فسفات و 21/75 گرم دي پتاسيم هيدروژن فسفات $K_2HPO_4$ و 33/4 گرم دي سديم هيدروژن فسفات $Na_2HPO_4,7H_2O$ و 1/7 گرم كلرور آمونيوم را در

500 ميلي ليتر آب حل كنيد و حجم محلول را با آب به يك ليتر برسانيد . PH اين محلول بايد 7/2 باشد .

6-3-5- محلول سولفات منيزيم - 22/5 گرم سولفات منيزيم با هفت مولكول آبرا در مقداري آب حل كرده و حجم محلول را با آب به يك ليتر برسانيد .

6-3-6- محلول كلرور كلسيم - 27/5 گرم كلرور كلسيم بي آب را در مقداري آب حل كرده و حجم محلول را با آب بيك ليتر برسانيد .

6-3-7- محلول كلرور فريك - 0/25 گرم كلرور فريك با شش مولكول آب تبلور را در مقداري آب حل كرده محلول را با آب بيك ليتر برسانيد .

6-3-8- مواد براي بارور كردن - مايع صاف شده فاضلاب خانگي كه مدت 24 الي 36 ساعت در 20 درجه سانتيگراد از نگاهداري آن گذشته باشد ميتوان بكار برد .

6-4- دستور كار :

6-4-1- نمونه‌هاي اسيدي و يا قليائي را به ترتيب بوسيله محلول هيدرواكسيد سديم و يا اسيد كلريدريك كه مقدار مصرف آن قبلا تعيين شده است تا PH هفت خنثي كنيد .

6-4-2- در نمونه هائيكه كلر آزاد و يا كلر آمين وجود دارد چنانچه پس از دو ساعت راكد گذاردن نمونه , كلرور كلر آمين‌ها از بين نرفت نمونه بايد بوسيله محلول سولفيت عاري از اين مواد شود . مقدار محلول سولفيت را با گرفتن حجم معيني از نمونه و افزودن مقداري يدور و تيتراسيون محلول نسبت به معرف محلول نشاسته تعيين كنيد . سپس مقدار محلول سولفيت تعيين شده را به مقدار معيني از نمونه كه مورد نياز است بيفزائيد . از افزودن مقدار اضافي محلول سولفيت خودداري كنيد

. نبودن کلر را در محلول پس از بیست دقیقه بررسي کنید .

6-4-3- در نمونه هائیکه مقدار مواد سمي زیاد است . آماده کردن نمونه نیاز به اعمال اختصاصي دارد . معهذا با رقیق کردن مناسب نمونه میتوان اثر سمي آنها را از بین برد تا حداکثر اکسیژن مورد نیاز بیوشیمیائي بدست آید . چنانچه بارقت بیشتر مقدار اکسیژن مورد نیاز بیوشیمیائي بیشتر شد عملا رقیق کردن را باید آنقدر ادامه دارد تا مقدار حداکثر اکسیژن مورد نیاز بیوشیمیائي بدست آمده در اثر رقیق کردن تجاور نکند .

6-4-4- براي بررسي کیفیت آب براي رقیق کردن و مؤثر بودن بارور کننده , مقدار اکسیژن مورد نیاز بیوشیمیائي محلولهاي استاندارد گلوکز و یا اسید گلوتامیك بغلظت 300 میلي گرم در لیتر که با آب براي رقیق کردن تهیه شده است تعیین کنید . مقدار اکسیژن بیوشیمیائي این محلولها بترتیب باید در حدود 224±10 میلي گرم در لیتر و 217±10 میلي گرم در لیتر بدست آید .

6-4-5- آب براي رقیق کردن را در حدود 20 درجه سانتیگراد نگاهداري کنید . مقدار لازم آب براي رقیق کردن نمونه مورد آزمایش را بردارید و براي هر لیتر آن مقدار یك میلي لیتر از محلولهاي زیر بیفزائید : با فرفسفات , سولفات منیزیم , کلرور کلسیم و کلرور فریك سپس آنرا با مایع فاضلاب خانگي بارور کنید . مقدار بارور کننده که در آزمایش کنترلي در آب براي رقیق کردن بکار برده میشود باید بمقداري (1-0/1 درصد فاضلاب ته نشین شده ) باشد که افت اکسیژن پس از کشت در 20 درجه سانتیگراد بمدت 5 روز مابین 0/2 تا 0/8 میلي گرم در لیتر شود .

6-4-6- تعدادي نمونه رقيق شده ( معمولا 5 تا 25 درصد ) به ترتيبي تهيه كنيد كه افت اكسيژن محلول پس از پنج روز كشت حداقل 2 ميليگرم در ليتر باشد در صورتيكه نسبت رقيق كردن بيش از يك به صد است ابتدا يك محلول ده درصد از نمونه اوليه در يك بالن ژوژه بسازيد و از اين نمونه محلولهاي رقيق شده نهائي را كه براي آزمايش بكار ميرود تهيه كنيد .

6-4-7- آب براي رقيق كردن را كه بارور شده است بوسيله سيفون بيك استوانه مدرج يك ليتري تا 500 ميلي ليتر منتقل كنيد . مقدار معين از نمونه كه كاملا مخلوط شده است در زير سطح مايع در استوانه مدرج بريزيد . حجم محلول را با آب براي رقيق كردن تا نشانه 1000 ميلي ليتري برسانيد با ميله شيشه اي محلول را بدون اينكه هوا وارد محلول شود به آرامي مخلوط كنيد و محلول رقيق شده را بوسيله يك سيفون به دو بطري در سمباده اي يا بيشتر منتقل كنيد بطريها را كاملا پركرده و بدقت در سمباده بطريها را بگذاريد محلولهاي با غلظت كمتر را بهمين نحو تهيه كنيد .

غلظت اوليه اكسيژن محلول را در يكي از بطريها پس از 5 دقيقه طبق يكي از روشهاي مناسب مذكور در بخش 5 اندازه‌گيري كنيد . بطريهاي ديگر را در بيست درجه سانتيگراد بمدت 5 روز كشت دهيد و بطريق مناسب از ورود هوا به بطري جلوگيري كنيد همزمان با سيفون كردن نمونه‌ها آب رقيق كردن را در دو بطري در سمباده سيفون كنيد . مقدار اكسيژن محلول در يكي از بطريها را پس از 15 دقيقه اندازه بگيريد و بطري ديگر را بمدت 5 روز در بيست درجه سانتيگراد كشت دهيد . پس از 5 روز مقدار اكسيژن محلول در نمونه رقيق شده و در نمونه براي تصحيح آزمايش را اندازه‌گيري كنيد .

6-5- محاسبه :

$$\frac{(D_1 - D_2) - (C_1 - C_2)F}{P}$$ = میلی گرم در لیتر اکسیژن مورد نیاز بیو شیمیائی ( در پنج روز در بیست درجه سانتیگراد ) .

$D_1$ = مقدار اکسیژن محلول در نمونه اولیه .

$D_2$ = مقدار اکسیژن محلول نمونه رقیق شده پس از کشت .

$C_1$ = مقدار اکسیژن محلول در آب براي رقیق کردن بارور شده .

$C_2$ = مقدار اکسیژن محلول در آب براي رقیق کردن بارور شده پس از کشت

F = نسبت مواد بارور کننده در نمونه به نمونه کنترلي یعني مقدار درصد مواد باروري در $D_1$ تقسیم بر مقدار درصد مواد باروري در $C_1$ و P کسري از نمونه که مورد آزمایش قرار گرفته است .

6-5-1- کلیه نتایج را تا تقریب 0/2 میلیگرم در لیتر گزارش کنید .

## 7 - باکتریهاي بیماریزا

کلیات

7-1- باکتریهاي بیماریزائیکه عموماً در فاضلابها وجود دارد و باعث شیوع بیماریها میشود عبارتست از دسته سالمونلاتیفي [6] که بیماري حصبه را سبب میشود و سالمونلاپارتیفيها که بیماریهاي شبه حصبه یا پاراتیفوئیدها را موجب میشود و شیگلاها [7] که مولد اسهال یا دیسانتري میباشد و ویبریوکلرا [8] که مولد بیماري وبا میباشد , سالمونلا و شیگللاها را میتوان با کشت در محیطهاي آنریشیسمان [9] و انتقال روي محیطهاي سلکتیو [10] بصورت کشت خالص بدست آورد و آنها را

با روشهاي بيوشيميائي و مرفولوژيكي و سرولوژيكي تشخيص داد .

7-2- نظر باينكه تعداد باكتريهاي بيماريزا با مقايسه با باكتريهاي غير بيماريزا ( ساپروفيتيك [11]) بسيار ناچيز است لذا تهيه نمونه تغليظ شده معرف اهميت بسيار دارد .

روش جذب با پارچه در مسير فاضلاب وسيله مطلوبي براي تغليظ نمونه است , موجودات جذب شده در پارچه را داخل يك آبگوشت غذائي كرده و براي جدا كردن عوامل بيماريزا يا مستقيمأ از همين آبگوشت غذائي استفاده ميشود و يا اين آبگوشت را از داخل صافي تهيه شده از گرد سيليس نرم رد كرده و محتوي صافي را براي جدا كردن باكتريهاي بيماريزا مورد استفاده قرار ميدهند . نمونه برداري و آزمايش باكتريولوژي بايد چند بار در ماه انجام شود .

7-3- برداشت و آماده كردن نمونه

7-3-1- مواد مورد نياز

الف - پارچه جاذب كه عبارت از گاز جراحي به ابعاد 30*15 سانتيمتر كه در لايه‌هاي متعددي بطور فشرده تا شده باشد . بيك سر پارچه جاذب چند تكه سنگ براي سنگين كردن و بسر ديگر آن نخي با طول كافي وصل كنيد . مجموعه را در كاغذ بسته بندي پيچيده و براي مدت 30 دقيقه در اتو كلاو و با فشار يك كيلوگرم بر سانتيمتر مربع آنرا سترون كنيد .

ب - آبگوشت غذائي - ده گرم عصاره گوشت و 5 گرم كلرور سديم و ده گرم پيتن را در 900 ميلي ليتر آب بوسيله جوشاندن حل كنيد . محلول را سرد كرده و حجم آنرا با آب تا يك ليتر برسانيد و PH محلول را تا 7/5 تنظيم كنيد . محلول را از صافي ( واتمن شماره 1 يا معادل آن ) صاف كنيد .

سپس آنرا بمقادير 100 ميلي ليتري در ارلن مايرهاي 150 ميلي ليتري و بمقادير ده ميلي ليتري در لوله هائي آزمايش توزيع كنيد و براي مدت 15 دقيقه آنها را در اتو كلاو و در فشار يك كيلوگرم بر سانتيمتر مربع سترون كنيد .

پ - كاغذ صافي - كاغذ صافي ( واتمن شماره 1) يا معادل آنرا بصورت چين دار تا كنيد و در قيفهائي بقطر 10 سانتيمتر قرار دهيد . قيف با كاغذ صافي را روي دهانه بطري شيشه اي قرار دهيد . اين مجموعه را با كاغذ بسته بندي محكم بپيچيد سپس آنها را براي مدت 15 دقيقه در اتوكلاو و با فشار يك كيلوگرم بر سانتيمتر مربع سترون كنيد .

ت - سوسپانسيون گرد سيليس - پنج گرم گرد سيليس در هزار ميلي ليتر آب وارد كنيد و در بطريهاي شيشه اي به مقادير 500 ميلي ليتري بريزيد و در اتوكلاو با فشار يك كيلوگرم بر سانتيمتر مربع براي مدت 15 دقيقه سترون كنيد .

ث - محيط مايع براي ويبروكلرا - حجم معيني از محلولهائي بشرح زير برداشته و آنها را در يك بطري سترون شده با 0/8 ميلي ليتر الكل مطلق و 20 ميلي ليتر آب مخلوط كنيد :

- مقدار 17/6 ميلي ليتر از محلول پيتن دو درصد كه PH آن تا 8/4 تنظيم و براي مدت 15 دقيقه در اتو كلاو با فشار يك كيلوگرم بر سانتيمتر مربع سترون شده است .

- مقدار 2/4 ميلي ليتر از محلولي كه از حل كردن 18 گرم كلرور سديم 0/66 گرم سولفات منيزيم با 7 مولكول آب تبلور , در 100 ميلي ليتر آب بدست آمده بنحو قبل بمدت 30 دقيقه با بخار سترون شده است .

- مقدار 4/5 ميلي ليتر از يك محلول 10 درصد سوكروز كه براي مدت 30 دقيقه با بخار سترون شده است .

- مقدار 0/16 ميلي ليتر از محلول بيسموت آمونيوم سيترات كه شرح تهيه آن در زير داده شده است .

يك شيشه در سمباده اي را در حجم 500 ميلي ليتر نشانه گذاري كنيد . مقدار 60 گرم سيترات بيسموت را از داخل قيفي وارد شيشه كنيد . سپس مقدار 50 ميلي ليتر آب در شيشه بريزيد و با يك ميله شيشه اي مخلوط را بهم بزنيد تا سيترات بصورت خمير يكنواختي درآيد سپس 20 ميلي ليتر محلول هيدرواكسيد آمونيوم (12/5 درصد حجمي ) بيفزائيد و با ميله شيشه مخلوط را هم بزنيد . در بطري را بگذاريد و بطري را تكان دهيد . هنگاميكه سيترات بيسموت كاملا حل شد تا نشانه 500 ميلي ليتري آب بيفزائيد . اين محلول را بمقدار كم باندازه مورد نياز تهيه كنيد .

- مقدار 2/5 ميلي ليتر سولفيت سديم 20 درصد

- مقدار 1/6 ليتر محلول يكصدم درصد كلرور مركوريك به بطري محتوي بيفزائيد PH محلول را بوسيله هيدرواكسيد سديم نرمال به 9/2 برسانيد .

يادآوي 3- مقدار محيطيكه تهيه ميشود براي يك نمونه است . بايد توجه داشت كه در كليه مراحل تهيه , رعايت حفظ ستروني محيط لازم است .

7-3-2- روش كار :

الف - پارچه هاي جاذب را در محل مناسب در مسير جريان فاضلاب قرار دهيد ( چنانچه از روش صاف كردن استفاده شود سه عدد پارچه جاذب لازم است ) و بگذاريد بمدت 48 ساعت در مسير بماند . سپس آنها را بيرون آورده و هر يك را در يك جار سترون شده دهان گشاد شيشه اي قرار دهيد . در هر يك

از جارها مقدار كافي از محيط آبگوشت غذائي بريزيد بطوريكه محيط كشت همه پارچه جاذب را در برگيرد . سپس پارچه جاذب را بوسيله يك ميله شيشه اي ته گرد سترون شده فشار دهيد و همه محلول را خوب بهم بزنيد تا آنچه جذب پارچه شده است بطور يكنواخت در محيط كشت منتشر شود .

ب - چنانچه روش صاف كردن بكار رفته است سوسپانسيون گرد سيليس را داخل يك صافي سترون شده بريزيد بطوريكه همه سطح صافي بطور كامل از گرد سيليس پوشيده شود . سه عدد صافي بطريق فوق تهيه كنيد .

سپس محيط آبگوشتهاي غذائي فوق را كه در آنها محتويات پارچه جاذب وجود دارد بوسيله اين صافيها صاف كنيد . پس از صاف كردن محيط كشت , هر يك از كاغذ صافيها را بعنوان نمونه براي جدا كردن عوامل بيماريزاي مختلف بكار بريد .

پ - براي جدا كردن سالمونلاوشيگلاها يكي از كاغذ صافيها فوق را در 50 ميلي ليتر آبگوشت تتراتيونات ( الف -7-4-1)- وارد كنيد و كاغذ صافي ديگر را در 50 ميلي ليتر آبگوشت سلنيت ( ب -7-4-1) وارد كنيد .

ت - براي جدا كردن ويروكلرا كاغذ صافي سوم را در محيط مايع ويروكلرا ( ث -7-3-1) وارد كنيد براي مدت 24 ساعت در 37 درجه حرارت سانتيگراد در انكوباتور نگاهداريد . سپس يك حلقه پلاتين از اين كشت بر روي بشقاب آگار نمك صفرا ( پ -7-5-1)- ببريد و آنرا بصورت منتشر كشت دهيد و اين روش كار را براساس بند (7-5-2)- ادامه دهيد .

7-4- سالمونلاها و شيگلاها

7-4-1- محيطهاي كشت لازم

الف - آبگوشت تتراتيونات كوفمن و مولر [12] - به 90 ميلي ليتر از آبگوشت غذائي سترون شده با رعايت شرايط آسپتيك [13] و ضمن همزدن مداوم 5 گرم كربنات كلسيم را كه قبلا بصورت گرد درآورده شده است و در اتوكلاو سترون شده است اضافه كنيد . ده ميلي ليتر محلول 50 درصد تيوسولفات سديم كه قبلا با بخار سترون شده است بآن بيفزائيد . دو ميلي ليتر از محلول يد يدوره 5 گرم يدور پتاسيم را در 20 ميلي ليتر آب با سائيدن در هاون حل كنيد . مقدار 4 گرم يد بتدريج ضمن سائيدن به محلول يدور بيافزائيد اين محلول را در شيشه قهوه اي در سمباده اي نگهداري كنيد .)

يك ميلي ليتر از محلول آبي يكدهم درصد سبز درخشان و 5 ميلي ليتر محلول صفراي گاو استريل شده يا يك گرم از ملح صفرا بآن اضافه كنيد . اين محيط را به مقادير 10 ميلي ليتري در لوله هاي آزمايش توزيع كنيد . اين محلول را نبايد پس از تهيه از اتوكلاو سترون كرد زيرا تتراتيونات ممكن است در اثر حرارت تجزيه شود .

ب - آبگوشت سلينيت اف - 4 گرم سلينيت اسيد سديم و 5 گرم پيتن و 4 گرم لاكتوز و 9/5 گرم فسفات دي سديم و 0/5 گرم فسفات منوسديك را در 1000 ميلي ليتر آب سترون شده حل كنيد . در موقع حل كردن بايد تا حد ممكن شرايط ستروني را رعايت كرد . اين محلول كاهي رنگ را به مقادير 10 ميلي ليتري در لوله هاي آزمايش با در پيچي توزيع كنيد 1 سپس براي مدت 30 دقيقه در معرض بخار 100 درجه قرار دهيد . اين محيط را نبايد در اتوكلاو قرار داد زيرا ممكن است مقدار جزئي رسوب قرمز رنگ در محيط ايجاد شود ولي اين رسوب در عمل محيط كشت دخالتي نخواهد داشت PH محيط تهيه شده بمقدار 7/1 باشد براي اين منظور ممكن است

ايجاد كند كه مقدار املاح فسفات افزوده شده بمقدار جزئي تغيير داده شود .

پ - محيط آگار مكونكي - 5 گرم سديم تروكولات و 20 گرم پيتن و 5 گرم كلرور سديم و 20 گرم گرد آگار و يا آگار رشته شده را در 1000 ميلي ليتر آب مقطر بريزيد . اين مخلوط را در معرض بخار قرار دهيد تا مواد جامد آن حل شود .

سپس آنرا تا 50 درجه سانتيگراد سرد كنيد . PH محيط را در اين درجه حرارت ما بين 7/6 تا 7/8 تنظيم كنيد . در صورت لزوم يك سفيده تخم مرغ براي سه ليتر محيط استفاده كنيد . محيط را براي مدت 15 دقيقه در فشار 0/7 كيلوگرم بر سانتيمتر مربع در اتوكلاو قرار دهيد . محيط را در حاليكه گرم است از كاغذ صافي نوع خوب يا يك قطعه پنبه در گاز پيچيده شده كه در قيف قرار دارد صاف كنيد . PH محيط صاف شده در 50 درجه سانتيگراد به 7/3 و با در درجه حرارت آزمايشگاه به 7/5 برسانيد . سپس صد ميلي ليتر از محلول 10 درصد لاكتوز و 3/5 ميلتي ليتر محلول معرف دو درصد قرمز خنثي در الكل اتيليك 50 درصد بيافزائيد .

كليه محلولها را بخوبي مخلوط كنيد و در تعدادي ارلن ماير بريزيد و براي مدت 15 دقيقه در فشار 0/6 كيلوگرم بر سانتيمتر مربع در اتوكلاو سترون كنيد . در هنگام مصرف محيط آنرا براي ذوب كردن در حمام بخار قرار دهيد و بمقادير 12-15 ميلي ليتر در بشقابهاي پتري بريزيد و بگذاريد ببندد . سطح محيط را قبل از استفاده در انكوباتور خشك كنيد .

ت - محيط آگار دزاكسي كلات سيترات

آگار پايه : 200 گرم از عصاره گوشت را در 200 ميلي ليتر آب روي شعله حل كنيد و محلول را نسبت به معرف فنل فتالئين با هيدرواكسيد سديم 50

درصد قليائي كنيد . سپس محلول را جوشانده و بوسيله كاغذ صافي صاف كنيد . PH محلول را در 7/3 تنظيم كنيد . حجم محلول را به 200 ميلي ليتر برسانيد و 20 گرم پيتن بآن بيافزائيد . در ظرف ديگري 90 گرم از آگار رشته شسته شده يا گرد آگار را در 3700 ميلي ليتر آب بمدت يكساعت بوسيله بخار حرارت دهيد . سپس محلول آگار را صاف كنيد و آنرا به محلول عصاره گوشت و پيتن اضافه كرده و مخلوط كنيد . پنج ميلي ليتر از محلول دو درصد معرف قرمز خنثي در اتانل 50 درصد و 40 گرم لاكتوز نيز بآن اضافه كرده و حجم محلول را با آب به 4 ليتر برسانيد .

اين محلول را بدقت به اندازه‌هاي 100 ميلي ليتري در بطريها توزيع كنيد و بمدت 10 دقيقه در فشار 0/3 كيلوگرم بر سانتيمتر مربع در اتو كلاو سترون كنيد .

- محلول شماره يك : 17 گرم سيترات سديم و 17 گرم تيوسولفات سديم و دو گرم سيترات فري آمونيم ( پولكي سبز رنگ ) را در 100 ميلي ليتر آب سترون شده با حرارت دادن حل كنيد .

- محلول شماره دو : 100 گرم دزاكسي كلات سديم را در 100 ميلي ليتر آب سترون حل كنيد .

- محلول شماره يك و دو را بمدت يكساعت در 60 درجه حرارت سانتيگراد در يك حمام آبي سترون كنيد . براي تهيه آگار دزاكسي كلات سيترات 100 ميلي ليتر از آگار را در يك حمام آبي ذوب كرده و مقدار 5 ميلي ليتر از محلولهاي شماره يك و دو را با پيپت جداگانه بآن بيفزائيد . پس از اضافه كردن هر يك از محلولها محيط را تكان بدهيد تا اختلاط بطور كامل انجام گيرد . سپس محيط آماده شده را در بشقابهاي پتري بمقدار 12 تا 15 ميلي ليتر در هر بشقاب توزيع كنيد و بگذاريد ببندد

. سطح محيط را قبل از استفاده در انكوباتور خشك كنيد .

ث - محيط آگار بيسموت سولفيت ( ويلسون وبلر )

محلول [14] اوليه : 6 گرم سيترات بيسموت آمونيوم پولكي شكل را در 50 ميلي ليتر آب در حال جوش حل كنيد . در ظرف ديگري 20 گرم سولفيت سديم بي آب را در 600 ميلي ليتر آب حل كنيد . اين دو محلول را مخلوط كرده و آنرا حرارت دهيد تا بجوش آيد در اين هنگام 10 گرم فسفات منو اسيد سديم به محلول اضافه كنيد . سپس محلول را سرد كرده و بآن مقدار 10 گرم گلوكز كه در 50 ميلي ليتر آب حل شده است بيفزائيد .

آگار پايه : 30 گرم آگار را در 1000 ميلي ليتر ابگوشت غذائي با حرارت دادن روي اجاق يا در اتوكلاو و با دقت حل كنيد ( ب -7-3-1) سپس محلول را تا 50 درجه سانتيگراد سرد كنيد و PH محلول را بين 7/6 تا 7/4 تنظيم كنيد .

سپس آنرا در اندازه هاي 30 ميلي ليتري در تعداد ارلن ماير توزيع كنيد و براي مدت 30 دقيقه در فشار يك كيلوگرم بر سانتيمتر مربع در اتو كلاو سترون كنيد . محيط سترون شده را در يخچال نگاهداري كنيد .

براي تهيه محيط كشت 20 ميلي ليتر از محلول اوليه را به 100 ميلي ليتر از آگار پايه فوق در حال ذوب اضافه كنيد باين مخلوط يك ميلي ليتر محلول سولفات فروهشت درصد و نيم ميلي ليتر محلول سبز درخشان اضافه كنيد .

پس از مخلوط كردن در بشقابهاي پتري بريزيد و بگذاريد ببندد . حتي الامكان از محيط تازه تهيه شده استفاده كنيد 1 سطح محيط كشت بايد خشك باشد . محيطهاي كه رنگ آنها مايل به سبز نيست دور بريزيد .

ج - محیطهاي قندي - به هر 90 میلي لیتر از آب پیتنه که از حل کردن 10 گرم پیتن و 5 گرم کلرور سدیم در یك لیتر آب بدست آمده و PH آن در 7/5 تنظیم شده است 10 میلي لیتر محلول 10 درصد قند قابل تخمیرکه جهت آزمایش مورد نظر لازم است بیافزائید ( این قندها که عبارتست از گلوکز ساکاروز - لاکتوز - دولسیت - مانیت و سالیسین همچنین مانیوتول نیوزیتو را براي ویبروکلرا میتوان بکار برد ) و یك میلي لیتر معرف آندراد [15] ( که از اضافه کردن محلول هیدرواکسید سدیم یك نرمال بمقدار کافي به محلول فوشین اسید نیم درصد بمحض ظهور رنگ زرد بدست میآید ) اضافه کنید سپس این محیط را بمقدار سه میلي لیتري در لوله هاي آزمایش 12*100 میلیمتري که داراي لوله هاي تخمیري دورهام میباشد و قبلا بوسیله اتوکلاو و در فشار 0/7 کیلوگرم بر سانتیمتر براي مدت 20 دقیقه یا در معرض بخار (100 درجه سانتیگراد ) براي مدت 20 دقیقه در سه روز متوالي سترون شده است بریزید .

چ - محیط اوره آز ( محیط کریستین سن [16]) - 1/5 گرم پپتن و 5 گرم کلرور سدیم و دو گرم آگار و دو گرم فسفات منو اسید پتاسیم را در 1000 میلي لیتر آب حل کرده و شش میلي لیتر از محلول آبي فنول قرمز دو در هزار بیافزائید PH محیط را بین 6/8 تا 6/9 تنظیم کنید و آنرا براي مدت 15 دقیقه در 120 درجه سانتیگراد در اتوکلاو سترون کنید . هنگامیکه محلول تا حدود 50 درجه سانتیگراد سرد شد بآن محلول گلوکز سترون شده تا حصول غلظت نهائي یکدهم درصد بیافزائید . سپس 100 میلي لیتر محلول 20 درصد اوره که قبلا بوسیله صاف کردن با صافي زایتس [17] سترون شده است بآن بیفزائید . این محیط را در لوله هاي آزمایش

سترون شده توزيع كرده بگذاريد بحالت مايل ببندد .

ح - محيط كشت براي آزمون تحرك - اين محيط شامل 3 گرم عصاره گوشت و 10 گرم پپتن و پنج گرم كلرور سديم و 4 تا 5 گرم آگار ذوب شده در هزار ميلي ليتر آب ميباشد . PH محيط را بايد بين 7/5 تا 7/6 تنظيم كنيد . محيط مايع را در لوله‌هاي كشت تا حديكه قسمتي از لولها را پر كند توزيع كنيد و در هر يك از اين لوله‌ها لوله شيشه‌اي كه دو انتهاي آن باز است بطوري وارد كنيد كه يك انتهاي آن بيش از 1/5 سانتيمتر از آگار بيرون نباشند . لوله‌ها و محيط را براي مدت 15 دقيقه و در 120 درجه حرارت در اتوكلاو سترون كنيد . اين محيط هنگام سرد شدن بايد حالت نرم داشته و مايع نباشد . اين حالت با تغيير مقدار آگار بكار برده شده بدست ميآيد .

خ - محيط كشت براي آزمون اندل - اين محيط شامل آب پپتنه است كه از حل كردن 20 گرم پپتن و پنج گرم كلرور سديم در 1000 ميلي ليتر آب بدست ميآيد و محلول داراي PH 7/4 است . محيط را در لوله‌هاي آزمايش به مقادير پنج ميلي ليتر توزيع كرده و براي مدت 15 دقيقه در 120 درجه حرارت سانتيگراد در اتوكلاو سترون كنيد . پپتن مصرفي بايد بوسيله نوعي باكتري شناخته شده كه اندول توليد ميكند آزمايش شود .

د - معرف كواك [18] - مقدار 10 گرم پارادي متيل آمينو بنزآلدئيد را در 150 ميلي ليتر آميل الكل يا ايزوآميل الكل حل كرده و بتدريج بآن 50 ميلي ليتر اسيد هيدروكلريك اضافه كنيد . معرف را بمقدار كم تهيه كرده و در يخچال نگاهداري كنيد .

ذ - محلول رنگ‌آميزي گرم - رنگ‌آميزي احتياج به دو محلول دارد كه بنام محلولهاي شماره يك و دو ناميده ميشود .

محلول شماره يك عبارت است از محلول 0/5 درصد كريستال و يوله يا متيل ويوله در آب . محلول شماره دو عبارت است از محلولي بغلظت يك درصد يد و دو درصد يدور پتاسيم در آب . محلول سوم براي ظهور رنگ كه عبارت است از محلولي بغلظت 0/1 گرم قرمز خنثي و 0/2 ميلي ليتر اسيد استيك يك درصد در 1000 ميلي ليتر آب .

ر - آگار غذائي - به آبگوشت غذائي ( ب -7-3-1) مقدار كافي آگار مخصوص باكتري‌شناسي بيفزائيد كه هنگام ريختن در بشقاب پتري سطح سفتي ايجاد كند . مقدار افزودن آگار با نوع آن تغيير ميكند و مقدار آن هر بار با تغيير نوع آگار بايد بررسي تعيين شود . اين مقدار معمولا مابين 1/5 تا 3 درصد تغيير ميكند . آگار را در آبگوشت غذائي حل كرده و آنرا بمدت 15 دقيقه در 120 درجه حرارت سانتيگراد در اتوكلاو سترون كنيد . از اين آگار غذائي هم پتري ديش و هم محيط مايل تهيه كنيد .

ز - محيط براي آزمون هوف وليفسون - 2 گرم پپتن و پنج گرم كلرور سديم و 3 گرم فسفات اسيد پتاسيم و 3 گرم آگار را در 1000 ميلي ليتر آب حل كنيد . PH محلول را تا 7/1 تنظيم كرده و محلول را صاف كنيد . 15 ميلي ليتر از محلول 0/2 درصد الكلي برموتيمول بلو بآن بيافزائيد و آنرا براي مدت 20 دقيقه در 115 درجه سانتيگراد سترون كنيد . باين مخلوط از محلول سترون شده گلوكز آنقدر بيافزائيد كه غلظت نهائي محلول به يك درصد برسد . سپس آنرا مخلوط كرده و بمقدار

4-3 ميلي ليتر در لوله هاي 100*12 ميليمتري توزيع كنيد .

س - محيط آگار با سه قند ملح آهن - بمقدار 3 گرم عصاره گوشت و 3 گرم عصاره مخمر و 2 گرم پپتن و يك گرم گلوكز و ده گرم لاكتوز و ده گرم سوكروز و دو دهم گرم سولفات فرو [19] متبلور و پنج گرم كلرور سديم و سه دهم گرم تيوسولفات سديم [20] متبلور و سي گرم آگار را در 1000 ميلي ليتر آب با حرارت دادن حل كنيد . باين مخلوط 12 ميلي ليتر محلول دو دهم درصد فنول قرمز اضافه كرده و پس از مخلوط كردن در لوله هاي آزمايش توزيع كنيد . سپس براي مدت 20 دقيقه در 115 درجه سانتيگراد سترون كنيد وبگذاريد در حال عمقي و مايل ببندد .

ش - محيط سيمون سيترات آگار - 5 گرم كلرور سديم و 0/2 گرم سولفات منيزيم [21] متبلور و يك گرم فسفات پتاسيم و يك گرم آمونيم دي هيدروژن فسفات [22] و 2 گرم سيترات سديم و 20 تا 30 گرم آگار را در 1000 ميلي ليتر آب حل كنيد . باين مخلوط 40 ميلي ليتر از محلول دو در هزار معرف بروموتيمول بلو بيافزائيد براي مدت 15 دقيقه در 120 درجه سانتيگراد سترون كنيد .

سپس در لوله هاي آزمايش توزيع كرده و بطوري بگذاريد به ترتيبي ببندد كه هم بحالت مايل و هم عمقي شكل بگيرد .

7-4-2- دستور كار :

پنج ميلي ليتر از نمونه ايكه از پارچه جاذب بدست آمده ( الف 7-3-2) و خوب مخلوط شده است بوسيله يك پيپت سترون شده بيك لوله محتوي آبگوشت تراتيونات منتقل كنيد . همچنين همين مقدار نمونه را بيك لوله محتوي آبگوشت سلنيت اف منتقل كنيد بوسيله يك حلقه پلاتين بزرگ از نمونه

برداشت کرده و در سطح آگار دزاکسي کلات سيترات و يك حلقه ديگر را روي بشقاب آگار ويلسون بلر کشت دهيد . کليه محيطها را براي مدت 18-24 ساعت در 37 درجه حرارت در انکوباتور قرار دهيد . پس از کشت در بشقابهاي تراتيونات و آبگوشت سلنيت از آن برداشت کرده روي بشقابهاي درزاکسي کلات ويلسون و آگار بلر کشت داده و در 37 درجه سانتيگراد در انکوباتور قرار دهيد . ايجاد کلنيهاي مجزا در سطح بشقاب بايد در مد نظر باشد هنگاميکه از روش صاف کردن پيروي ميشود آبگوشت تراتيونات و آبگوشت سلنيت که کاغذ صافي در آن منتقل شده است و در آزمونه‌ها ( ب -3-2)- را بمدت 24 ساعت در 37 درجه سانتيگراد در انکوباتور قرار دهيد . سپس بوسيله حلقه‌هاي پلاتيني از آنها نمونه برداشت کرده و بر روي بشقابها آگار دزاکسي کلات سيترات و آگار ويلسون و بلر کشت دهيد .

کلنيهاي مشکوك به سالمونلاها و شيگلاها پس از کشت روي محيط آگار دزاکسي کلات سيترات لاکتوز را تخمير نکرده و ظاهري گرد , کوچك , کمرنگ شفاف غير برجسته مانند قطر شبنم دارد و کلنيهاي سالمونلاهاتيفي و پارا تيفي روي محيط ويلسون و بلر داراي رنگ سياه مي‌باشند .

براي بدست آوردن نتيجه بهتر مي‌توان کشت را از روي محيط مايع بر روي محيط مکونکي آگار نيز منتقل کرد . سالمونلاها و شيگلاها بعلت اينکه قادر نيستند لاکتوز را تخمير کنند در روي محيط مکونکي کلنيهاي بيرنگ يا رنگ پريده و گرد تشکيل ميدهد .

چنانچه روي محيطهاي جامد فوق پس از يك شب آنکوباسيون کلنيهاي قابل رؤيت بدست نيامد بشقابها را براي مدت 24 ساعت ديگر در انکوباتور قرار دهيد .

لاكن در مورد كشت بر روي محيطهاي مايع انكوباسيون براي مدت 18-24 ساعت كاملا كافي است چنانچه در اين مدت نتيجه مطلوبي بدست نيامد بايد از انكوباسيون براي مدت بيشتر اجتناب كرد زيرا كه نتيجه مطلوبي بدست نمي‌دهد .

ب - براي بررسي از كلنيهاي مشكوك بتعداد ممكن انتخاب ( حداقل شش كلني از هر بشقاب ) كنيد و بوسيله يك ميله پلاتيني سترون شده برداشت كرده و بر روي آبگوشت غذائي در لوله ب -7-3-1- منتقل كنيد و براي مدت 18 تا 24 ساعت در 37 درجه سانتيگراد در انكوباتور قرار دهيد در پايان اين مدت از اين كشت براي آزمايش تحرك و رنگ‌آميزي استفاده كنيد . همچنين براي تائيد خلوص كلنيهائيكه لاكتوز را تخمير نميكنند يك حلقه پلاتين از اين محيط مايع را بر روي محيط بشقاب مكوني آگار منتقل كنيد و براي مدت 24 ساعت در 37 درجه سانتيگراد در انكوباتور قرار دهيد و نتيجه كشت را مشاهده كنيد . سپس كلنيهائي از اين محيط بر روي آگار مورب كشت دهيد و بمدت 24 ساعت در 37 درجه سانتيگراد در انكوباتور قرار دهيد . سپس كشتهاي بدست آمده را براي تائيد بوسيله آزمايشهاي سرولوژي و تعيين نوع در يخچال نگاهداري كنيد .

سالمونلا و شيگلاها باكتريهائي هستند ميله‌اي شكل و گرم منفي , هنگاميكه صفات مشخصه باكتريها با جدول شماره يك تطبيق كند باكتريها مشكوك به سالمونلاها و شيگلاها ميباشند .

پ - لازم است لوله‌هاي كشت آگار غذائي مورب را جهت تائيد به آزمايشگاه رفرانس ارسال داشت . چنانچه آزمايشهاي سرولوژي براي تشخيص سالمونلا تيفي و پارا تيفي مقدور باشد اين آزمايش‌ها را ممكن است انجام داد . براي شناسائي انواع ديگر

سالمونلاها و شیگلاها باید متکي به اظهار نظر آزمایشگاه ذیصلاح بود .

ت - آزمایش اوره آز - براي انجام این آزمایش از کشت 24 ساعته آبگوشت غذائي ( ب -7-4-2) برداشته و بر روي تمام سطح مورب محیط ( چ -7-4-2) کشت دهید و براي مدت 18 تا 24 ساعت و در 37 درجه حرارت سانتیگراد در انکوباتور قرار دهید . نتیجه مثبت آزمایش اوره آز با تغییر رنگ محیط به صورتي با قرمز پس از انکوباسیون مشهود میشود . چنانچه نتیجه منفي بود آنکوباسیون را حداقل چهار روز ادامه دهید . انواع پروتوس[23] که معمولا در فاضلابها یافت میشود نتیجه مثبت میدهد .

جدول شماره یك صفات مشخصه سالمونلا ها و شیگلاها

| ردیف | آزمایشها | تیفی | انواع دیگر | زیرگونه | زیرگونه | زیرگونه |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | آزمایش رنگ آمیزی گرم | گرم منفی میله‌ای | گرم منفی میله‌ای | گرم منفی میله‌ای | گرم منفی میله‌ای | گرم منفی میله‌ای |
| ۲ | تحرك (ازلحاظ کشت) | مثبت | مثبت | منفی | مثبت | مثبت |
| ۳ | آزمایش کاتالاز | مثبت | مثبت | مثبت (باستثنای شیگلاها) | مثبت | مثبت |
| ٤ | آزمایش هوف ولیفسون | تخمیرکننده | تخمیرکننده | تخمیرکننده | تخمیرکننده | تخمیرکننده |
| ٥ | آزمایش اکسیداز | منفی | منفی | منفی | منفی | منفی |
| ٦ | آزمایش | مثبت | مثبت | منفی | منفی | منفی |
| ۷ | آزمایش اوره آز | منفی | منفی | منفی | منفی | منفی |
| ۸ | آزمایش اسید فنیل پیرووبکه | منفی | منفی | منفی | منفی | منفی |
| ۹ | آزمایش ایندول | منفی | منفی | مثبت یا منفی | مثبت یا منفی | منفی |
| ۱۰ | آزمایش سیترات | منفی | مثبت | منفی | منفی | منفی |
| ۱۱ | آزمایش گلوکز | منحصراً تولید اسید | تولید گاز و اسید | منحصراً تولید اسید | منحصراً تولید اسید | منحصراً اسید |
| ۱۲ | آزمایش لاکتوز | بدون اسید و گاز | بدون اسید و گاز | بدون اسید و گاز | بدون اسید و گاز | مثبت دیررس |
| ۱۳ | آزمایش سوکروز | " " " | " " " | " " " | " " " | " " " |
| ۱٤ | آزمایش سالیسین | " " " | " " " | " " " | " " " | بدون تولید اسید و گاز |
| ۱٥ | آزمایش دوسیتول | بدون تولید اسید و گاز | تولید اسید و گاز | فعل و انفعال متغیر ولی اکثر گونه‌ها بدون تولید اسید و گاز | فعل و انفعال متغیر است ولی زیرگونه بدون تولید اسید و گاز | |
| ۱٦ | آزمایش مانیت | منحصراً اسید | " " " | بدون تولید اسید و گاز | منحصراً تولید اسید | منحصراً تولید اسید |

یادآوری: صفاتیکه برای انواع دیگر سالمونلاها ذکر شده از خیلی جهات مشابه گونه های آریزونا سیترو باکتر است . بعضی انواع شیگلا فلکسنری ٦ بمقدار کم گاز تولید میکند .

ث - آزمایش تحرك - گونه مورد آزمایش را بوسیله فرو کردن یك میله مستقیم پلاتین بعمق 5 میلي لیتر در محیط ( ح -7-4-1) کشت دهید . دقت کنید که کشت در خارج از لوله شیشه اي در سطح محیط انجام نشود .

سپس اين محيط را براي مدت 18 تا 24 ساعت در 37 درجه سانتيگراد در انكوباتور قرار دهيد . گونه‌هاي متحرك در جوانب قسمت مركزي محيط شروع رشد خواهد كرد يعني رشد از قسمت مركزي محيط در لوله به اطراف نفوذ ميكند . چنانچه نتيجه در روز اول منفي بود محيط كشت را براي مدت 4-6 روز در حرارت اطاق براي مشاهده تحرك احتمالي نگاهداريد .

ج - آزمايش ايجاد اندل - يك حلقه پلاتين از كشت 24 ساعته آبگوشت غذائي ( ب -7-4-2) را داخل محيط ( ح -7-4-1) كشت دهيد و براي مدت 48 ساعت در 37 درجه سانتيگراد در انكوباتور قرار دهيد سپس 0/5 ميلي ليتر معرف كواك [24] بآن اضافه كرده و بآرامي تكان دهيد . رنگ قرمز نشانه ايجاد اندل در محيط است .

يادآوري 4- كليه اين اعمال بترتيبي بايد انجام شود كه شخص آزمايش كننده و محيط آزمايشگاه آلوده نشود .

چ - رنگ‌آميزي گرم - در روي يك لام تميز بدون چربي يك لايه نازك از محيط كشت مايع بطور مستقيم و يا داخل يك قطره آب از كشت جامد يك لايه نازك محدود تهيه كنيد . سپس با حركت دادن لام روي شعله و سرد كردن لام لايه را ثابت كنيد لايه را براي مدت 30 ثانيه با محلول متيل ويوله و يا كريستال ويوله ( ذ -7-4-1) رنگ كنيد . لايه را با محلول يد ( ذ -7-4-1)- شستشو داده سپس با همان محلول آنرا بپوشانيد و بگذاريد مدت 30 ثانيه بماند . بعد از گذشت اين مدت آنرا با محلول اتانول شستشو دهيد تا اينكه زمينه محو بدست آيد و سپس لام را با آب جاري بشوئيد و از محلول قرمز خنثي ( ذ -7-4-1) براي مدت يك دقيقه بر روي لكه بريزيد پس از بكار بردن رنگ قرمز

خنثي لام را با آب شستشو داده و براي بررسي با ميكرسكپ خشك كنيد .

ح - آزمايش كاتالاز - گونه را براي مدت 24 ساعت روي آگار بيسموت مورب ( ر -7-4-1)- كشت دهيد و سپس يك ميلي ليتر از محلول پراكسيد هيدروژن در لوله كشت در حاليكه بصورت مورب است بريزيد . آزاد شدن اكسيژن بصورت حبابهائي از محلول پراكسيد هيدروژن نشانه وجود كاتالاز ميباشد .

خ - آزمايش هوف وليفسون - از كشت تازه آگار ( ر -7-4-1) در دو لوله محتوي محيط ( ز -7-4-1)- منتقل كنيد يكي از لوله‌ها بايد با لايه نازكي از پارافين مايع سترون شده پوشانده شود . هر لوله را بمدت چهار روز در انكوباتور در 37 درجه سانتيگراد قرار دهيد و روزانه آنها مشاهده كنيد . تشكيل اسيد بوسيله ايجاد رنگ زرد در لوله بدون پارافين كه نشانه مصرف گلوكز بصورت اكسيداتيو [25] است مشخص ميشود .

تشكيل اسيد در دو لوله نشانه واكنش تخميري است فقدان اسيد در هر يك از لوله‌ها نشانه آنستكه گونه قادر به مصرف گلوكز بصورت اكسيد اتويا تخميري نميباشد .

د - آزمايش اكسيداز - چند قطره محلول تازه تهيه شده معرف كه مخلوطي از حجمهاي مساوي محلول 1 درصد آلفانفتول در الكل اتيليك 95 درصد و محلول 1 درصد كلروپاراآمينودي [26] متيل اتيلين در آب ميباشد به كشت تازه تهيه آگار مورب ( ر -7-4-1)- اضافه كنيد . ظاهر شدن رنگ آبي در مدت دو دقيقه نشانه واكنش مثبت است .

ذ - آزمايش روي محيط آگار با سه قند و ملح آهن - گونه مشكوك را بوسيله يك ميله پلاتيني بر روي سطح مورب محيط آگار با سه قند و ملح آهن (

س 7-4-1) در عمق محيط و سطح مورب كشت دهيد . سپس آنرا بمدت هفت روز در انكوباتور 37 درجه قرار داده نتيجه كشت را روزانه مشاهده كنيد تغيير رنگ نشانه ايجاد اسيد است . پارگي محيط در امتداد خط كشت بعلت توليد گاز و سياه شدن محيط بعلت توليد هيدورژن سولفوره ميباشد .

ر - آزمايش اسيد فنيل پيروريك [27] - از كشت 24 ساعت متراكم از باكتري روي آگار غذائي ( ر -7-4-1) سوسپانسيوني در نيم ميلي ليتر محلول نرمال نمك تهيه كنيد و آنرا بيك لوله آزمايش دهان گشاد منتقل كنيد ( قطر لوله آزمايش حداقل 1/5 سانتيمتر باشد ) به سوسپانسيون فوق 0/5 ميلي ليتر از محلول دو دهم درصد د.ال - فنيل آلانين [28] بيفزائيد سپس آنرا بخوبي مخلوط كرده و آنرا حداقل سه ساعت در درجه حرارت محيط آزمايشگاه بطور افقي نگاهداريد . سپس چند قطره از محلول نيمه اشباع كلرور فريك بآن بيفزائيد ايجاد رنگ سبز تيره نشانه واكنش مثبت ميباشد كه در اثر ماندن از بين ميرود . گونه هاي پروتوس واكنش مثبت ميدهد و بعنوان كنترل بكار ميرود .

ز - آزمايش سيترات - از كشت تازه آگار غذائي ( ر -7-4-1) بوسيله يك ميله پلاتيني مستقيم گونه مشكوك را بر روي يك محيط سيترات ( ش -7-4-1) مورب كشت دهيد و سپس آنرا مدت چهار روز در انكوباتور 37 درجه براي رشد باكتريها نگاهداري كنيد .

س - آزمايش بر روي قند - يك حلقه پلاتين از كلنيهاي مشكوك كشت شده روي آبگوشت غذائي بدست آمده در بند ( ب -7-4-2) به هر يك از محيطهاي قندي ( ج 7-4-1) داده شده در جدول يك بيفزائيد سپس آنها را براي مدت 24 ساعت در 37 درجه

سانتيگراد در انكوباتور قرار داده و نتيجه را ملاحظه كنيد .

7-5- ويبروكلر

7-5-1- محيط كشت

الف - محيط كشت آب پپتن قليائي - ده گرم پپتن و پنج گرم كلرور سديم را در مقداري آب حل كرده و حجم را به هزار ميلي ليتر برسانيد . سپس PH محلول را در 8/2 تنظيم كنيد و بمقادير 50 ميلي ليتري در بطريها يا ارلن مايرهاي مناسب توزيع كرده و بمدت 30 دقيقه در فشار يك كيلوگرم بر سانتيمتر مربع در اتوكلاو سترون كنيد .

ب - محيط كشت ارونسون [29]

محيط آگار غذائي پايه - 25 گرم از گرد يا رشته شسته شده آگار را در 100 ميلي ليتر آبگوشت غذائي ( ب -7-3-1) بوسيله حرارت حل كنيد . سپس محلول را تا 50 درجه سانتيگراد سرد كرده و PH آنرا تا 7/2 تنظيم كرده براي مدت 10 دقيقه با جريان بخار سترون كنيد .

بيست ميلي ليتر محلول ده درصد تهيه شده از كربنات سديم بي آب كه قبلا بمدت 30 دقيقه در 100 درجه سانتيگراد حرارت داده شده است به 300 ميلي ليتر آگار پايه ذوب شده بيفزائيد و مدت 30 دقيقه آنرا در جريان بخار قرار دهيد . در حاليكه محيط هنوز گرم است به ترتيب 15 ميلي ليتر محلول 20 درصد سوكروز و 15 ميلي ليتر محلول 20 درصد گلوكز و 1/2 ميلي ليتر محلول الكل فوشين بازي اشباع شده و 6 ميلي ليتر محلول 10 درصد تهيه شده از سولفيت سديم ( در آب ) كه قبلا بمدت 30 دقيقه در 100 درجه سانتيگراد حرارت داده شده است بيفزائيد . مخلوط را بمدت 20 دقيقه سترون كنيد . سپس مقدار مناسب از محلول شفاف در

بشقابهاي پتري استريل سترون شده منتقل كرده و بگذاريد ببندد . اين بشقابها را در تاريكي نگاهداري كنيد و پس از سه روز مورد استفاده قرار دهيد .

پ - محيط آگار نمك صفرا - 10 گرم پپتن و 5 گرم عصاره گوشت و دو گرم كلرور سديم و 5 گرم توروكلات سديم را در 100 ميلي ليتر آب بوسيله بخار حل كنيد . به محلول فوق 30 گرم آگار اضافه كرده و پس از مخلوط كردن با حرارت دادن حل كنيد . سپس PH مخلوط را با محلول هيدرواكسيد سديم تا 8/5 تنظيم كنيد . مخلوط را خنك كرده و بوسيله كاغذ صافي يا پنبه جاذب كه قبلا به وسيله آب مرطوب شده است , صاف كنيد . محيط ساخته شده را به مقادير مناسب در ارلن مايرهاي سترون شده توزيع كرده و بمدت 30 دقيقه بوسيله اتوكلاو و در فشار يك كيلوگرم بر سانتيمتر مربع سترون كنيد . در موقع لزوم از ذوب كردن محيط ذخيره و توزيع آن در بشقابهاي پتري سترون شده محيط آماده بسازيد .

ت - محيط براي رنگآميزي گرم مانند بند ( ذ -7-4-1)

ث - محيط براي آزمايش تحرك مانند بند ( ح -7-4-1)

ج - محيط براي آزمايش هوف و ليفسون مانند بند ( ز 7-4-1)

چ - محيطهاي قندي مانند بند ( ج -7-4-1)

ح - محيط دي هيدرولازآرژنين ( به بند ذ -7-5-1- نيز مراجعه شود ) - 5/9 گرم پپتن باكتريولوژي و 5 گرم عصاره گوشت و 5 ميلي گرم پيريدوكسال [30] 0/5 گرم گلوكز را بوسيله حرارت در 1000 ميلي ليتر آب حل كرده و PH محلول را تا 6 تنظيم كنيد . سپس 5 ميلي ليتر از محلول برموكروزل ارغواني

0/2 درصد و 2/5 ميلي ليتر محلول 0/2 درصد كرزول قرمز بآن بيفزائيد . اين محلول را براي مدت 20 دقيقه در 115 درجه سانتيگراد سترون كنيد . ال - هيدروكلرور ارژنين [31] بمقداري به محلول بيفزائيد كه غلظت نهائي آن در محلول معادل يك درصد شود . چنانچه د . ال آمينو اسيد [32] بكار رود غلظت نهائي محلول بايد دو درصد باشد . اين محلول را بمقادير يك تا 1/5 ميلي ليتري در لوله هاي آزمايش كوچك 67*10 ميليمتري توزيع كنيد . بوسيله پارافين مايع استريل سطح محيط را بوسيله يك لايه از پارافين مايع سترون شده به ضخامت 5 ميليمتر بپوشانيد . سپس آنها را بمدت 10 دقيقه در 115 درجه حرارت سترون كنيد .

خ - محيط ليزين دكربوكسي لاز [33] - اين محيط را مانند هيدروكلرور ليزين بكار بريد .

د - محيط ارني تين دكربوكسي لاز [34] ( به بند ذ - 7-5-1) نيز مراجعه كنيد . ابتدا محيط را مانند محيط بند ( ج -7-5-1) تهيه كنيد و بجاي آرژنين از هيدروكلرور ارني تين بكار بريد .

ذ - محيطي ديگر براي فعاليت كربوكسي لاز و دي هيدرولاز مقدار 5 گرم باكتروپپتن [35] يا معادل آن و 3 گرم عصاره مخمر آبجو و يك گرم گلوكز را در 1000 ميلي ليتر آب حل كنيد . PH محلول را در 6/7 تنظيم كنيد .

سپس 10 ميلي ليتر از محلول 0/2 درصد برموكرزول ارغواني بآن اضافه كنيد . مخلوط را بمدت 20 دقيقه در 115 درجه سانتيگراد سترون كنيد . باين محلول آنقدر از اسيدهاي آمينه هيدروكلرور آرژنين يا هيدروكلروليزين يا هيدروكلرورارني تين كه قبلا آزمايش شده است بيفزائيد كه غلظت نهائي محلول 0/5 درصد براي نمك چپ گرا و برابر اين مقدار يعني يك درصد نمك راست گرا شود . در

صورت لزوم PH محلول را دوباره در 6/7 تنظيم كنيد . اين محلول را به مقادير دو ميلي ليتري در لوله هاي آزمايش 10*67 ميليمتري توزيع كنيد . سطح اين محيط را بوسيله يك لايه از پارافين مايع سترون شده بضخامت تقريبي 5 ميليمتر بپوشانيد . اين لوله ها را بمدت 10 دقيقه در 115 درجه سانتيگراد سترون كنيد .

7-5-2- روش آزمون - مقدار 5 ميلي ليتر از نمونه كاملا مخلوط شده بند ( الف 7-3-2) را بوسيله يك پيپت سترون شده در يك بطري محتوي آب پپتن قليائي منتقل كنيد و آنرا بمدت 18-24 ساعت در 37 درجه كشت دهيد . همچنين يك حلقه پلاتين بزرگ از نمونه كاملا مخلوط شده را در بشقاب پتري محتوي نمك صفرا كشت دهيد و آنرا براي مدت 18-24 ساعت در 37 درجه سانتيگراد در انكوباتور قرار دهيد . از سطح محيط آب پپتن قليائي پس از كشت يك حلقه پلاتين بزرگ برداشت كرده و در بشقاب پتري محتوي آگار نمك صفرا و محيط ارونسون كشت دهيد و بمدت 18 تا 24 ساعت در حرارت 37 درجه با درانكوباتور قرار دهيد . در محيط ارونسون كلنيهاي مشكوك به ويبريو همرنگ دانه هاي انار با يك مركز قرمز رنگ و هاله روشن در اطراف ظاهر ميشود . در روي محيط آگار نمك صفرا كلنيهاي ظاهري مشخص دارد , بوسيله رشد دادن گونه شناخته شده ويبريوكلرا بر روي محيط آگار نمك صفرا و مقايسه كردن صفات مشخصه كلني با رشد كلني اشريشيا بر روي همين محيط ممكن است ملاحظه كرد .

رشدهاي مشكوك بايد بوسيله آگلاتيناسيون روي لام آزمايش شود بند (7-5-3)- كلنيهاي باقيمانده را بيك لوله آزمايش محتوي آبگوشت غذائي منتقل كنيد و بمدت 4-6 ساعت درانكوباتور قرار دهيد .

همچنين آزمايشهاي داده شده در بند (7-5-2) تا (خ -7-5-2) انجام شود . خصوصيات ويبريوها بصورت فهرست زير داده شده است قبل از اينكه گونه‌ها براي تائيد نهائي بيك آزمايشگاه مرجع فرستاده شود . اين خصوصيات گونه‌ها بايد با فهرست داده شده تطبيق شود .

1- رنگ‌آميزي گرم گردها , منفي
2- تحرك مثبت
3- فعاليت كاتالاز مثبت
4- فعاليت اكسيداز مثبت
5- آزمايش هوف - ليفسون واكنش تخميركنندگي
6- محيط كشت گلوكز تخمير بدون توليد گاز
7- فعاليت آرژنين و هيدرولاز منفي
8- فعاليت ليزين دكربوكسيلاز مثبت
9- فعاليت ارني تين دكربوكسيلاز مثبت
10- محيط كشت اينوزيتول بدون تخمير
11- محيط كشت مانيتول واكنش تخمير كنندگي

گونه‌هاي آئروموناس و همچنين پلويوموناس نيز خصوصيات داده شده رديف (1) تا (6) را نشان ميدهد .

باين ترتيب براي تشخيص اين گونه‌ها ويبريوها بايد به مشخصات زير توجه نمود . گروه آئروموناس ليزين دكربوكسيلاز منفي و آرژنين و هيدروكسيلاز مثبت ميباشد مانيتول را تخمير ميكند و اينوزيتول را تخمير نمي‌كند . گروه يليزيوموناس

را تخمیري نمي‌كند و معمول اينوزيتول را تخمير مي‌كند ليزين دكربوكسيلاز مثبت ميباشد .

يادآوري 5- لازمست همه ويريوكلينها مشكوك خواه مثبت و خواه منفي كه بوسيله آزمايش آگلوتيناسيون انجام شده است براي تائيد بيك آزمايشگاه صلاحيت دار فرستاده شود .

الف - رنگآميزي طبق بند ( چ -7-4- 2) انجام شود . گرم

ب - آزمايش تحرك طبق بند ( ث -7-4- 2) انجام شود .

پ - آزمايش كاتالاز طبق بند ( ح -7-4- 2) انجام شود .

ث - آزمايش طبق بند ( د -7-4- 2) انجام شود . اكسيداز

ج - آزمايش هوف طبق بند ( خ -7-4- 2) انجام شود . ليفسون

چ - آزمايشهاي متعدد روي قند : بوسيله يك حلقه پلاتين از كلنيهاي مشكوك بهر يك از محيطهاي قندي ( ج -7-4-1) در بند 7-5-2 داده شده است منتقل كنيد و براي مدت 24 ساعت در 26 درجه سانتيگراد در انكوباتور قرار دهيد و سپس واكنشها را ملاحظه كنيد .

چ - آزمايش فعاليت دي هيدرولاز آرژنين [36] - با استفاده از يك ميله پلاتين مستقيم از محيط تازه كشت شده آگار غذائي ( ر -7-4-1) برداشت كرده و در محيط ( ح -7-5-1) زير پارافين داخل كنيد . محيط را در انكوباتور قرار داده و تا مدت چهار روز نتيجه كشت را روزانه بررسي كنيد . محيط بعلت ايجاد اسيد از گلوكز ابتدا زرد رنگ ميشود و سپس چنانچه آرژنين دي هيدرولاسيون [37] رنگ محيط بنفش ميشود . همچنين دو لوله آزمايش با همان محيط برداشته و در يكي از آنها گونه شناخته شده

ويبروكلرا و در ديگري گونه شناخته شده ارومونازيا سالمونلاتيفي را كشت دهيد و همانند نمونه عمل كنيد . ظهور رنگ زرد در لوله اول ( ويبروكلرا ) نشانه واكنش منفي است و ظهور رنگ بنفش در لوله دوم ( ارمونازيا سالمونلا ) نشانه واكنش مثبت است .

ح - آزمايش واكنش دكربوكسيلازليزين [38] - آزمايش را مانند چ -8-5-2- با بكار بردن محيط مربوطه ( خ -7-5-1) انجام دهيد .

خ - آزمايش واكنش دكربوكسيلازاورني تين - آزمايش را مانند ( چ 7-5-2) با بكار بردن محيط مربوطه ( چ -7-5-1) انجام دهيد .

7-5-3- آزمايش تسريع آگلوتي ناسيون روي لام - براي ويبركلرا روي يك لام شيشه اي تميز بوسيله يك قطره محلول نمك ايزوتونيك ( سرم فيزيولوژي 0/87 درصد كلرور سديم در آب ) و همچنين يك قطره محلول آنتي سرم ( مخلوطي از سرمهاي اوگاواوايماباباتيربالد ) بوسيله حلقه پلاتين در كنار هم قرار دهيد از رشد برداشت شده از آگار غذائي يا هر محيط ديگر سوسپانسيون غليظي را برداشته و در يك قطره محلول نمك ايزوتونيك مخلوط كنيد و بالاخره اين سوسپانسيون را با قطره آنتي سرم بوسيله ميله پلاتين مخلوط كنيد . واكنش مثبت با ظهور دلمه در مدت نيم تا يك دقيقه مشخص ميشود .

7-5-4- براي اطمينان بيشتر گونه ها را در آگار غذائي مورب به آزمايشگاه ذيصلاح ارسال داريد . بايد توجه داشت كه گونه هاي ذخيره كه اخيرا از گونه هاي ويبريوكلرايس از رشد بر روي آگار غذائي مورب جدا شده است نبايد در يخچال نگاهداري كرد زيرا گونه ها در 4 درجه حرارت سانتيگراد نميتواند زنده بماند . ويبركلرا روي

آگار غذائي مورب در درجه حرارت اطاق بخوبي زنده ميماند .

---

1-winkler
2 -Alsterberg
3 -Stewart-Rideal
4 -theriault-Short
5 -Potassium biniodata solution
6 -Solmonella typhi
7-shigella Species
8 -Vibrio cholerae
9 -Enrichment
10-Selective
11-Saprophitio
12 -s tetrathinate broth'Moller-Kauffman
13 -aceptic
14 -Stock solution
15-Andrades indientor
16 -s medium'Christensen
17 -Seitz filtration
18 -s Reagent'Kovac
19) -7H2O,FeSO4 (
20) -5H2O,NaS2O3(
21) -6H2O,MgSo4 (
22) -NH4H2PO4 (
23 -Proteus
24 -s Reagent'Kovac
25 -axidative

26 −Para - aminodimethylaniline
27 −Phenyl pytuic acid
28 −Phenylalanine−dl
29 −s medlum'Aronson
30 −Pyridoxal
31 −l-arginie hydrochloride
32 −aminoacid−dl
33 −x ylase medium−lysine decarbo
34 −Ornithine decarboxylas
35 −Pepton bactrolgical
36 −Arginine dehydrolase aclivity test
37 −dehyrolation
38. −Lysine decarbolase activity test

ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI NUMBER

1779