ISIRI

8869

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

۸۸۶۹

چاپ اول

کیفیت آب ــ شناسایی و شمارش سودوموناس آئروژینوزا به روش صاف کردن غشایی

Water quality – Detection and enumeration of *pseudomonas aeruginosa* by membrane filtration method

« بسمه تعالی»

آشنایی با مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب قانون، تنها مرجع رسمی کشور است که عهده دار وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) میباشد.

تدوین استاندارد در رشته های مختلف توسط کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه، صاحبنظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی واقتصادی آگاه ومرتبط با موضوع صورت میگیرد. سعی بر این است که استانداردهای ملی، در جهت مطلوبیت ها و مصالح ملی وبا توجه به شرایط تولیدی، فنی و فن آوری حاصل از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع شامل: تولیدکنندگان ،مصرف کنندگان، بازرگانان، مراکز علمی و تخصصی و نهادها و سازمانهای دولتی باشد.پیش نویس استانداردهای ملی جهت نظرخواهی برای مراجع ذینفع واعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال میشود و پس از دریافت نظرات وپیشنهادها در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح ودر صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که توسط مؤسسات و سازمانهای علاقمند و ذیصلاح و با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می شود نیز پس از طرح و بـررسی در کمیته ملی مربوط و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی چاپ ومنتشرمی گردد. بدین ترتیب استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مفاد مندرج در استاندارد ملی شماره ((۵)) تدوین و در کمیته ملی مربوط که توسط مؤسسه تشکیل میگردد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد میباشد که در تدوین استانداردهای ملی ضمن تـوجه به شرایط کلی ونیازمندیهای خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهـای بین المـللی استفـاده می نماید.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون به منظور حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی وعمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردها را با تصویب شورای عالی استاندارد اجباری نماید. مؤسسه می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه بندی آنرا اجباری نماید.

همچنین بمنظور اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمانها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و گواهی کنندکان سیستم های مدیریت کیفیت ومدیریت زیست محیطی، آزمایشگاهها و کالیبره کنندگان وسایل سنجش، مؤسسه استاندارد اینگونه سازمانها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران مورد ارزیابی قرار داده و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آنها اعطا نموده و بر عملکرد آنها نظارت می نماید. ترویج سیستم بین المللی یکاها ، کالیبراسیون وسایل سنجش تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی از دیگر وظایف این مؤسسه می باشد.

نشانی مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران : کرج ـ شهر صنعتی، صندوق پستی ۱۶۳-۳۱۵۸۵

دفتر مرکزی : تهران ـ ضلع جنوبی میدان ونک – صندوق پستی : ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵

تلفن مؤسسه در کرج: ۸-۲۸۰۶۰۳۱-۰۲۶۱

تلفن مؤسسه در تهران: ۵-۸۸۷۹۴۶۱-۰۲۱

دورنگار: کرج ۲۸۰۸۱۱۴-۰۲۶۱ ـ تهران ۸۸۸۷۱۰۳-۸۸۸۷۰۸۰ -۰۲۱

بخش فروش ـ تلفن: ۲۸۰۷۰۴۵-۰۲۶۱ دورنگار: ۲۸۰۷۰۴۵-۰۲۶۱

پیام نگار: Standard @ isiri.or.ir

بهاء ۲۰۰۰ ریال

Headquarters: Institute Of Standards And Industrial Research Of Iran

P.O.Box : 31585-163 Karaj – IRAN

Tel (Karaj): 0098 (261) 2806031-8

Fax (Karaj): 0098 (261) 2808114

Central Office: Southern corner of Vanak square, Tehran

P.O.Box : 14155-6139 Tehran-IRAN

Tel (Tehran): 0098 21 8879461-5

Fax (Tehran): 0098 21 8887080, 8887103

Email: Standard @ isiri.or.ir

Price: 2000 RLS

کمیسیون استاندارد کیفیت آب – جستجو و شمارش سودوموناس آئروژینوزا به روش صاف کردن غشائی

رئیس	**نمایندگی**
رحیمی فرد ، ناهید (دکترای میکروب شناسی)	وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی – ادارهٔ کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو
آزاد ، علیرضا (لیسانس مهندسی شیمی)	شرکت آب معدنی دماوند
اطهری نیا ، معصومه (فوق لیسانس بیولوژی)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
خضری پور ، معصومه (لیسانس تغذیه)	وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی – ادارهٔ کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو
زندوکیلی ، فاطمه (فوق لیسانس علوم بهداشتی در تغذیه)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
زوار ، مریم (لیسانس تغذیه)	وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی – ادارهٔ کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو
سرگزی ، مریم (لیسانس میکروب شناسی)	شرکت آب و فاضلاب شهرها و شهرک های غرب استان تهران
شجاعی آرانی ، ابوالفتح	دانشگاه علوم پزشکی ایران

(دکترای میکروب شناسی)

ضرغامپور ، زهره
(فوق لیسانس میکروب شناسی)
شرکت آب و فاضلاب استان تهران

فتوحی ، جواد
(لیسانس میکروب شناسی صنعتی)
شرکت زمزم تهران

فیاضی ، اکرم سادات
(لیسانس تغذیه)
موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

کهن نیا ، ناصر
(فوق لیسانس میکروب شناسی)
گروه تولیدی مهرام

مرتضویان ، امیرمحمد
(دکترای علوم و صنایع غذایی)
دانشگاه تهران – دانشکده پردیس کشاورزی – گروه صنایع غذایی

دبیران

داورزنی ، ساره
(لیسانس تغذیه)
موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

زرسازی ، برتا
(لیسانس بهداشت عمومی)
موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

فهرست مندرجات

صفحه

پیش گفتار	ب
مقدمه	پ
۱ هدف	۱
۲ دامنه کاربرد	۱
۳ مراجع الزامی	۱
٤ اصطلاحات و تعاریف	۲
۵ اساس روش	۲
٦ نمونه برداری	۲
۷ مواد لازم	۳
۸ وسایل لازم	۱۱
۹ روش اجرای آزمون	۱۲
۱۰ شمارش	۱۵
۱۱ بیان نتایج	۱۵
۱۲ گزارش آزمون	۱٦

پیش گفتار

استاندارد کیفیت آب – شناسایی و شمارش سودوموناس آئروژینوزا به روش صاف کردن غشایی که بوسیله کمیسیون فنی مربوطه تهیه و تدوین شده و در کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی و بیولوژی مورخ ۸۵/۱۰/۲۳ مورد تصویب قرار گرفته است، اینک باستناد بند ۱ ماده ۳ قانون اصلاحی قوانین و مقررات موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ به عنوان استاندارد رسمی ایران منتشر می گردد.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با پیشرفتهای ملی و جهانی در زمینه صنایع و علوم ، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم مورد تجدیدنظر قرار خواهند گرفت و هرگونه پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها برسد در هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه واقع خواهد شد. بنابراین برای مراجعه به استانداردهای ملی ایران باید همواره از آخرین چاپ و تجدیدنظر آنها استفاده نمود .

در تهیه و تدوین این استاندارد سعی شده است که ضمن توجه به شرایط موجود و نیازهای جامعه حتی‌المقدور بین این استاندارد و استاندارد کشورهای صنعتی و پیشرفته هماهنگی ایجاد شود.

منابع و ماخذی که برای تهیه این استاندارد به کار رفته به شرح زیر است:

1 – ISO 16266: 2006 Water quality – Detection and enumeration of *pseudomonas aeruginosa* by membrane filtration method

2 – Warburton D., Enumeration of pseudomonas aeruginosa in foods and food ingredients by hydrophobic grid membrane filter technique, Health protection branch of Canada, 2001

3 – APHA /AWWA/ WEF, Standard methods for the examination of water and wastewater, 18 th edition, 2005

مقدمه

سـودوموناس آئروژیـنوزا[1] گونه ای از جنس سودوموناس است که گستردگی زیادی در محیط های طبیعـی دارد و آن را می‌توان از آب، خاک و سبزی های خام جدا کرد. سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری بیماری زا و فرصت طلب[2] است که در افراد بیمار، به ویژه افرادی که سیستم ایمنی تضعیف شـده دارند، ایجاد عفونت می کند و سبب تأخیر در بهبود زخم ها می‌شود. این باکتری ممکن است از طـریق آب استخرهای شنا که به طور کامل گندزدایی نشده اند، به شناگران سرایت کرده و سبب ایجاد بیماری های پوستی و عفونت گوش خارجی در آن‌ها شود.

سـودوموناس آئروژیـنوزا گرم منفی، متحرک، میله ای، بدون اسپور و ناتوان در تخمیر قندها است. دمـای بهیـنه برای رشد آن ۳۷ درجهٔ سلسیوس است.با این وجود در دمای ٤٢ درجهٔ سلسیوس هم می‌تواند رشد کند ولی در دمای کمتر از ٤ درجهٔ سلسیوس قادر به رشد نیست. این باکتری اکسیداز مثبت بوده و با تجزیه استامید تولید گاز آمونیاک می کند.

بیش از ۹۰ درصد سویه های[3] آن، رنگدانه پیوسیانین[4] به رنگ سبز-آبی تولید می کنند.

1- Pseudomonas aeruginosa
2- Opportunistic
3- Strains
4- Pyocyanin9

کیفیت آب – شناسایی و شمارش سودوموناس آئروژینوزا به روش صاف کردن غشایی

۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد تعیین روش، جستجو و شمارش سودوموناس آئروژینوزا به روش ۹ صاف کردن غشایی است.

۲ دامنهٔ کاربرد

این استاندارد برای انواع مختلف آب شامل آب معدنی و آب استخرهای شنا کاربرد دارد.

یادآوری – این استاندارد برای آب هایی که حاوی مقدار قابل توجهی ذرات و مواد معلق هستند به دلیل ایجاد اختلال در فرآیند صاف کردن، کاربرد ندارد.

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 می‌شود. در مورد مراجع دارای تاریخ چاپ و/یا تجدید نظر، اصلاحیه و تجدید نظرهای بعدی این مدرک مورد نظر نیست. معهذا 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 و/یا تجدیدنظر، آخرین چاپ و/ تجدیدنظر آن مدارک الزامی ارجاع داده شده موردنظر است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربران این استاندارد الزامی است :

۳-۱ استاندارد ملی ایران ۲۷٤۷ : سال ۱۳۸۰ میکروبیولوژی- آیین کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

۳-۲ استاندارد ملی ایران ٤۲۰۸ : سال ۱۳۷٦ آیین کار نمونه برداری از آب جهت آزمون‌های باکتریولوژی

۳-۳ استاندارد ملی ایران ٤۲۰۷ : سال ۱۳۷٦ آیین کار آزمون‌های باکتریولوژیکی آب

۱ ۴ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاح و/یا واژه با تعریف زیر به کار می‌رود:

۱-۴ سودوموناس آئروژینوزا

میکروارگانیسمی است که روی محیط کشت انتخابی حاوی ستریماید[1] رشد کرده و غالباً با تولید پیوسیانین، ایجاد فلورسنس[2] زیر پرتوی فرابنفش می کند. این میکروارگانیسم همچنین اکسیداز مثبت بوده و قادر به تولید گاز آمونیاک از استامید است.

۲ ۵ اساس روش

روش فوق بر اساس صاف کردن حجم معینی از نمونه، کشت‌دادن، گرمخانه‌گذاری، شمارش و انجام آزمون‌های تأییدی مطابق با بند ۹ این استاندارد است.

۳ ۶ نمونه برداری

نمونه برداری از آب باید مطابق با استاندارد ملی ایران ٤٢٠٨ : سال ١٣٧٦ انجام شود.

۴ ۷ مواد لازم

برای به‌دست‌آوردن نتایج هماهنگ، از موادشیمیایی با کیفیت یکسان و درجهٔ خلوص آزمایشگاهی استفاده کنید. آب مورد استفاده برای تهیه محیط‌های کشت باید با استاندارد ملی ایران ٢٧٤٧ : سال ١٣٨٠ مطابقت داشته باشد.

چنانچه محیط‌های کشت در بازار قابل دسترس[2] هستند، تهیهٔ محیط‌های کشت را مطابق با دستورالعمل سازنده انجام دهید.

۱-۷ محیط های کشت

1- Cetrimide
2- Fluorescence

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 (K_2SO_4)	۱۰/۰ گرم
کلرید منیزیم بدون آب ($MgCl_2$)	۱/٤ 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 درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید.

۷-۱-۱-۲ مکمل محیط کشت سی _ ان (CN)[3]

[3]

مواد تشکیل دهنده	مقدار
هگزا دسیل‌تری‌متیل‌آمونیوم بروماید[4] (ستریماید)	۰/۲۰ گرم
نالیدیکسات سدیم[1]	۰/۰۱۵ گرم

1- Pseudomonas – CN agar
2- Pancreatice digest of casein

1- CN supplement
2- Hexa decyle trimethyle ammonium bromide

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 اتوکلاوکردن ندارد.

۷-۱-۱-۳ محیط کشت کامل

روش تهیه :محیط کشت پایه (طبق بند ۷-۱-۱-۱) را تا دمای ٤٥ تا ٥٠ درجهٔ سلسیوس سرد کنید. سپس با رعایت شرایط اسپتیک به ازای هر ٥٠٠ میلی‌لیتر 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 ٥ میلی‌متر باشد.

pH نهایی محیط کشت در دمای ۲٥ درج ۶ لسیوس برابر با ۰/۲ ± ۷/۳ است.

یادآوری ۱ – پلیت های آماده شده محیط کشت سودوموناس سی – ان آگار را در تاریکی و در دمای ۳ ± ٥ درجهٔ سلسیوس، حداکثر به مدت زمان یک ماه می توانید نگهداری کنید.

یادآوری ۲ – محیط کشت ذوب شده را نباید بیش از ٤ 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 (K_2SO_4)	۱۰/۰ گرم
کلرید منیزیم ($MgCl_2$)	۱/٤ گرم

3- Sodium nalidixate

هگزادسیل‌تری‌متیل‌آمونیوم بروماید (ستریماید)	۰/۳ گرم
گلیسرول	۱۰ میلی لیتر
آگار	۱۳/٦ 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 درجهٔ سلسیوس به مدت زمان ۱۵ دقیقه سترون کنید.

pH نهایی محیط کشت در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس برابر با ۰/۲ ± ۷/۲ است.

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 ($MgSO_4.7H_2O$)	۱/۵ گرم
لاکتوز	**۱/۲۵ گرم**
ساکارز	۱/۲۵ گرم
گزیلوز	۱/۲۵ گرم
سیترات آمونیوم آهن ۳ ظرفیتی[2]	۰/۸ گرم
فنل رد	۰/۰۸ گرم
آگار	۱۲/۰ گرم
آب مقطر	۹۹۰ میلی لیتر

1- L(+) – Lysine hydrochloride
2-Ferric ammonium citrate III

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[1]	۸/۰ میلی گرم
نالیدیکسیک اسید[2]	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 اتوکلاوکردن ندارد.

۷-۱-۳-۳ محیط کشت کامل

روش تهیه :

محیط کشت پایه (طبق بند ۷-۱-۳-۱) را تا دمای ٤٥ تا ٥٠ درجهٔ 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 درجهٔ سلسیوس برابر با ۰/۲ ± ۷/۲ است.

۷-۱-۴ آگار مغذی[3]

1- Kanamycin
2- Nalidixic acid
1- Nutrient agar

مواد تشکیل دهنده	مقدار
عصارهٔ مخمر	**۲/۰ گرم**
پپتون[1]	۵/۰ گرم
عصارهٔ گوشت	۱/۰ گرم
کلرید سدیم (NaCl)	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 درجهٔ 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 ± ۷/٤ است.

پیش از کاربرد محیط کشت فوق، مطابق با استاندارد ملی ایران ۲۷٤۷ : سال ۱۳۸۰ رطوبت سطح محیط کشت را با قرار دادن پلیت در گرمخانه ۲۵ تا ۵۰ درجهٔ سلسیوس به مدت زمان ۳۰ دقیقه، حذف کنید.

یادآوری – پلیت های آگار مغذی را، در تاریکی و در دمای ۳ ± ۵ درجهٔ سلسیوس حداکثر به مدت یک ماه می توانید نگهداری کنید.

۷-۱-۵ آبگوشت استامید[2]

۷-۱-۵-۱ محیط کشت پایه

مواد تشکیل دهنده	مقدار

2- Peptone
1- Acetamide broth

۵ استامید	۱۰/۰ گرم
کلرید سدیم	۵/۰ گرم
دی‌پتاسیم‌هیدروژن‌فسفات بدون آب (K_2HPO_4)	۱/۳۹ گرم
پتاسیم‌دی‌هیدروژن‌فسفات بدون آب (KH_2PO_4)	۰/۷۳ گرم
سولفات منیزیم با ۷ ملکول آب($MgSO_4.7H_2O$)	۰/۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

روش تهیه :

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

هشدار – استامید ماده ای سرطان زا و تحریک کننده[1] است. بنابراین هنگام وزن کردن، آماده سازی و دفع محیط کشت باید دقت لازم به عمل آید.

۷-۱-۵-۲ محلول فنل رد

مواد تشکیل دهنده	مقدار
فنل رد	۱/۲ گرم
محلول هیدروکسید سدیم (NaOH) ۰/۰۱ نرمال	۱۰۰ میلی لیتر

روش تهیه :

فنل رد را در محلول هیدروکسید سدیم حل و کاملاً مخلوط کنید.

۷-۱-۵-۳ محیط کشت کامل

روش تهیه :یک میلی‌لیتر محلول فنل رد بند[9] ۷-۱-۵-۲ را به یک لیتر محیط کشت پایه بند ۷-۱-۵-۱ اضافه و کاملاً مخلوط کنید. سپس محلول را در حجم‌های ۵ تا ۸ میلی‌لیتری در لوله‌های آزمایش تقسیم و در اتوکلاو با دمای ۳ ± ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس به مدت زمان ۱۵ دقیقه سترون کنید.

pH نهائی محیط کشت در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس برابر با ۰/۲ ± ۷ است.

2- Irritant

یادآوری – محیط کشت کامل آبگوشت استامید را در تاریکی و در دمای ۳ ± ۵ درجهٔ سلسیوس، حداکثر به مدت ۳ ماه می توانید نگهداری کنید.

۷-۲ محلول رقیق کننده

۷-۲-۱ آب پپتونه[1]

مواد تشکیل دهنده	مقدار
پپتون	۱/۰ 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 درجهٔ سلسیوس به مدت زمان ۱۵ دقیقه سترون کنید.

pH نهایی محیط کشت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس برابر با ۰/۲± ۷ است.

۷-۳ معرف

۷-۳-۱ معرف اکسیداز[2]

۱۰

مواد تشکیل دهنده	مقدار
تترامتیل-پارا-فنیلن دی‌آمین دی‌هیدروکلراید[3]	۰/۱ گرم
آب مقطر	۱۰ میلی لیتر

روش تهیه :

ماده فوق را در آب مقطر حل کاملاً مخلوط کنید.

یاد آوری – این محلول ناپایدار بوده و برای هر بار استفاده باید به صورت تازه و در مقادیر کم تهیه شود.

1- Peptone water
1- Oxidase reagent
2- Tetramethyle - ρ - phenylene diamin dihydrochloride

۸ وسایل لازم

از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروب‌شناسی مطابق با استاندارد ملی ایران ۲۷۴۷ : سال ۱۳۸۰ و همچنین از وسایل زیر استفاده کنید:

۸-۱ دستگاه پمپ خلاء با قدرت خلاء حدود ۶۳۰ تا ۶۳۵ میلی‌متر جیوه (۸۰ تا ۸۵ کیلو پاسکال)

۸-۲ دستگاه صاف کن[1] شامل قیف شیشه‌ای یا استیل[2] مخصوص صاف کردن، گیرهٔ نگهدارنده، ارلن مایر تخلیه و لوله‌های وصل شونده به پمپ خلاء

۸-۳ صافی‌های غشایی از جنس استات سلولز با اندازهٔ روزنه ۰/۴۵ میکرومتر و قطر ۴۷ تا ۵۰ میلی متر

۸-۴ گیرهٔ سر صاف

۸-۵ گرمخانهٔ قابل تنظیم در دماهای ۳۰ تا ۳۵ درجهٔ سلسیوس و ۴۲ درجهٔ سلسیوس با حد رواداری[3] ۱± درجهٔ سلسیوس

۸-۶ حلقه کشت[4] از جنس پلاتین - ایریدیوم[5] با قطرتقریبی سه میلی‌متر

۸-۷ لامپ فرابنفش با طول موج ۲۰ ± ۳۶۰ نانومتر

۹ روش اجرای آزمون

۹-۱ آماده سازی نمونه

به منظور توزیع یکنواخت میکروارگانیسم‌ها پیش از انجام آزمون، نمونه را با تکان دادن ظرف کاملاً یکنواخت کنید. در صورتی که ظرف حاوی نمونه به صورت کامل پر باشد، ابتدا مقداری از نمونه را با رعایت شرایط اسپتیک بیرون ریخته و سپس عمل مخلوط کردن را انجام دهید .
آماده سازی آزمایه را مطابق با استاندارد ملی ایران ۴۲۰۷ : سال ۱۳۷۶ انجام دهید.

۹-۲ صاف کردن نمونه

تمامی عملیات صاف کردن باید در مجاورت شعله و با رعایت شرایط اسپتیک انجام شود.

1- Steel
2- Tolerance
3- Filtration device
3- Loop
4- Platinum-Iridium

برای صاف کردن نمونه، پایهٔ نگه دارنده صافی را به ارلن تخلیه که به دستگاه پمپ خلاء (طبق بند ۸-۱)وصل شده است، متصل کرده و توسط گیره سترون، صافی غشایی ۰/٤٥ میکرومتر (طبق بند ۸-۳) را روی آن قرار دهید، طوری که سطح چهارخانه صافی غشایی به طرف بالا باشد. سپس با رعایت شرایط اسپتیک قیف را روی پایه قرار داده و قسمت بیرونی آن را با گیره ای محکم کنید. در حالی که دگمه پمپ خلاء خاموش است، حجم معینی از نمونه و یا رقت های مورد نظر را به درون قیف انتقال دهید. سپس دگمه پمپ خلاء را روشن کنید و نمونه را از صافی غشایی عبور دهید. زمانی که حجم نمونه به کمتر از ۲۰ میلی لیتر رسید، دیواره های قیف را با حداقل ۲۰ میلی لیتر محلول رقیق کننده (طبق بند ۷-۲)، شستشو دهید. به محض تمام شدن نمونه داخل قیف، پمپ خلاء را خاموش کنید.

۱۲

یادآوری – حجم نمونه صاف شده برای آب معدنی، ۲۵۰ میلی لیتر و برای آب استخر، ۱۰۰ میلی لیتر است.

صافی‌های بند ۹-۲ را با استفاده از گیرهٔ سترون سر صاف (طبق بند ۸-٤) روی محیط کشت سودوموناس سی _ ان آگار (طبق بند ۷-۱-۱) قرار دهید. سپس پلیت‌ها را در دمای ۲ ± ۳٦ درجهٔ سلسیوس به مدت زمان ٤ ± ٤٤ ساعت گرمخانه‌گذاری کنید.

۹-۳ کشت دادن و گرمخانه گذاری

یادآوری – محیط های کشت ستریماید آگار (طبق بند ۷-۱-۲) و ام _ پی _ ای _ سی آگار mPAC (طبق بند ۷-۱-۳) با شرایط گرمخانه گذاری در دمای ٤۲ درجهٔ سلسیوس و ٤ درجهٔ سلسیوس به مدت زمان ۲٤ تا ٤۸ ساعت، می تواند به عنوان جایگزین محیط کشت سودوموناس سی _ ان آگار (طبق بند ۷-۱-۱) به کار رود. در محیط های فوق سودوموناس آئروژینوزا در دمای ٤۲ درجهٔ سلسیوس رشد می کند ولی قادر به رشد در دمای ٤ درجهٔ سلسیوس نیست.

۹-۴ بررسی صافی ها

پس از پایان زمان گرمخانه‌گذاری، پلیت ها را زیر پرتوی فرابنفش بررسی کنید. کلنی‌های مشخص[1] سودوموناس آئروژینوزا با قطر ۰/۸ تا ۲/۲ میلی متر، که روی هر یک از محیط های کشت مورد استفاده دارای خصوصیات زیر هستند را به عنوان سودوموناس فرضی[2] یا تأیید شده[3] در نظر بگیرید.

۹-۴-۱ روی محیط های کشت سودوموناس سی _ ان آگار و ستریماید آگار، کلنی های سبز – آبی (پیوسیانین) ایجاد می کنند که در صورت ایجاد فلورسنس زیر پرتوی فرابنفش، آن را به عنوان سودوموناس آئروژینوزای تأیید شده در نظر بگیرید.

سایر کلنی هایی را که سبز – آبی نیستند ولی زیر پرتوی فرابنفش فلورسنس ایجاد می کنند به عنوان سودوموناس آئروژینوزای فرضی در نظر بگیرید.

کلنی های قهوه ای مایل به قرمز را نیز که زیر پرتوی فرابنفش فلورسنس ایجاد کنند به عنوان سودوموناس فرضی در نظر بگیرید.

۹-۴-۲ روی محیط کشت mPAC آگار، کلنی های قهوه ای 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 میکروارگانیسم ها، از قراردادن پلیت ها به مدت طولانی زیر پرتوی فرابنفش خودداری کنید.

۹-۵ آزمون های تأییدی

۹-۵-۱ کشت در محیط آگار مغذی

کلنی های انتخاب شده جهت انجام آزمون های تأییدی بیوشیمیایی را بر محیط کشت آگار مغذی (طبق بند ۷-۱-٤) به صورت خطی کشت دهید و در دمای ۲ ± ۳٦ درجهٔ سلسیوس به مدت زمان ۲ ± ۲۲ ساعت گرمخانه گذاری کنید. سپس یکی از کلنی های منفرد رشد یافته روی محیط کشت فوق را برای انجام آزمون های تأییدی استفاده کنید.

۹-۵-۲ آزمون های تأییدی بیوشیمیایی

1- Typic
2- Presumptive
3- Confirmed

۹-۵-۲-۱ آزمون اکسیداز

کاغذ صافی معمولی را به ۲ تا ۳ قطره معرف اکسیداز بند ۷-۳- ۱ آغشته کنید، سپس با استفاده از حلقه کشت بخشی از کلنی جداشده بر محیط آگار مغذی بند ۹-۵-۱ 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.

۹-۵-۲-۲ آزمون استامید

با استفاده از حلقه کشت، بخشی از کلنی انتخاب شده بر محیط کشت آگار مغذی بند ۹-۵-۱ را برداشته و به لوله حاوی محیط آبگوشت استامید بند ۷-۱-۵ منتقل کنید. سپس لوله ها را در دمای ۲ ± ۳٦ درجهٔ سلسیوس برای مدت زمان ۲٤ تا ۳٦ ساعت گرمخانه گذاری کنید. پس از پایان این مدت لوله ها را بررسی کنید.

تولید گاز آمونیاک از استامید با ایجاد رنگ ارغوانی مشخص می شود.

یادآوری – سودوموناس آئروژینوزا از استامید تولید گاز آمونیاک می کند.

۱۰ روش شمارش

پلیت هایی را برای شمارش انتخاب ۱۵ حداکثر ۱۰۰ کلنی روی هر صافی داشته باشند. در صورت لزوم برای شمارش از عدسی با بزرگنمایی ۱۰ برابر استفاده کنید. کلنی هایی را که از نظر آزمون های انجام شده به عنوان سودوموناس آئروژینوزا تأیید شده باشند، شمارش کنید.

۱۱ بیان نتایج

نتایج را به صورت تعداد کلنی های شمارش شده روی صافی، با در نظر گرفتن ضریب رقت و حجم معین (صاف شده)، محاسبه و بیان کنید.

در مواردی که روی صافی هیچ کلنی رشد نکند و یا کلنی سودوموناس آئروژینوزا تأیید نشود، نتایج را به صورت منفی در حجم معین (صاف شده) بیان کنید.

۱۲ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی های زیر باشد :

۱-۱۲ مشخصات کامل نمونه مانند نوع و مقدار نمونه

۲-۱۲ تاریخ و محل نمونه برداری

۳-۱۲ تاریخ ارسال نمونه به آزمایشگاه

۴-۱۲ تاریخ انجام آزمون

۵-۱۲ روش آزمایش مورد استفاده مطابق با استاندارد ملی ایران....

۶-۱۲ بیان نتایج طبق بند ۱۱ استاندارد ملی ایران ....

۷-۱۲ سایر اطلاعات مربوط به روش آزمون

۸-۱۲ نام، نام خانوادگی و امضای آزمایشگر

ICS: 13.060.70

صفحه: ۱۱