ISIRI
2946
2nd.revision

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

استانداردملی ایران
۲۹۴۶
تجدیدنظر دوم

میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام– روش جستجو و شمارش اشریشیاکلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی

Microbiology of food and animal feeding stuffs -Detection and enumeration of presumptive Escherichia coli -Most probable number technique

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: ۲۵۰۰ 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: 2500”RLS

« 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.

کمیسیون استانداردمیکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش جستجو و شمارش اشریشیاکلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی

(تجدید نظر)

رئیس	سمت یا نمایندگی
رحیمی فرد ، ناهید (دکتـرای میکروب شناسی)	وزارت بهداشت ودرمان وآموزش پزشکی ـ اداره کل آزمایشگاه کنترل غذا و دارو
اعضاء	
ابراهیمی امام ، غلامحسن (لیســـانس صنایع غذایی)	مؤسســه استانداردوتحقیقات صنعتی ایران
پیروز ، بهناز (فوق لیسانس میکروب شناسی)	وزارت بهداشت ودرمان وآموزش پزشکی ـ اداره کل آزمایشگاه کنترل غذا و دارو
زند وکیلی ،فاطمه (فوق لیسانس علوم بهداشتی در تغذیه)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
ضرغامپور ،زهره (فوق لیسانس میکروب شناسی)	وزارت نیرو- شرکت آب و فاضلاب تهران
دبیـــــر	
ادریس ، شادی (لیسانس زیست شناسی)	مؤسســه استـاندارد وتحقیقـات صنعتی ایران

فهرست اعضاء شرکت کننده در هفتاد و نهمین اجلاسیه کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی و بیولوژی مورخ ۱۳۸۴/۷/۶

رئیس کمیته ملی	سمت یا نمایندگی
ابوعلی ، رحیم (فوق لیسانس صنایع غذایی)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

اعضاء

ابراهیمی امام ، غلامحسن (لیسانس صنایع غذایی)	مؤسسه استانداردوتحقیقات صنعتی ایران
ادریس ، شادی (لیسانس زیست شناسی)	مؤسسه استاندارد وتحقیقات صنعتی ایران
پیروز ، بهناز (فوق لیسانس میکروب شناسی)	اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو
رحیمی فرد ، ناهید (دکترای میکروب شناسی)	اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو
زند وکیلی ،فاطمه (فوق لیسانس علوم بهداشتی در تغذیه)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
شریعتی ، منیژه (لیسانس صنایع غذایی)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
ضرغامپور ،زهره (فوق لیسانس میکروب شناسی)	شرکت آب و فاضلاب تهران وزارت نیرو
فرزاد ، رضا (فوق لیسانس میکروب شناسی)	انستیتو پاستور ایران

کهن نیا ، ناصر (فوق لیسانس میکروب شناسی)	شرکت مهرام
لولا ور ، پرویز (دکترای دامپزشکی)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
محمدیان جذی ، سهراب (لیسانس)	سازمان حمایت از مصرف کنندگان و تولید کنندگان
مولوی ، فاطمه (فوق لیسانس)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

دبیـــــر

پیراوی ونک ، زهرا (فوق لیسانس صنایع غذایی)	موسســه استـاندارد وتحقیقـات صنعتی ایران

پیشگفتار

استاندارد میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام ـ روش جستجو و شمارش اشریشیاکلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی نخستین بار در سال ۱۳۶۷ تهیه شد. این استاندارد بر اساس پیشنهادهای رسیده و بررسی و تایید کمیسیون های مربوط برای دومین بار مورد تجدید نظر قرار گرفت و درهفتادونهمین جلسه کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی مورخ ۸۴/۷/۶ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین ومقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت های ملی و جهانی در زمینه صنایع ، علوم و خدمات ، استاندارد های ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر گونه پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استاندارد ها ارائه شود ، در تجدید نظر بعدی مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین برای مراجعه به استاندارد های ایران باید همواره از آخرین تجدید نظر آنها استفاده کرد.

در تهیه و تجدید نظر این استاندارد سعی شده است که ضمن توجه به شرایط موجود و نیازهای جامعه ، در حد امکان بین این استاندارد و استاندارد ملی کشورهای صنعتی و پیشرفته هماهنگی ایجاد شود.

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

۱ـ استاندارد ملی ایران ۲۹۴۶ : سال ۱۳۷۴ ـ چاپ سوم ـ تجدید نظر اول ـ روش جستجو وشمارش بیشترین تعداد احتمالی اشریشیا کلی در مواد غذایی

2- ISO 7251:2005,Microbiology of food and animal feeding stuffs -Detection and enumeration of presumptive Escherichia coli -Most probable number technique

فهرست مندرجات صفحه

پیش گفتار	ب
هدف و دامنه کاربرد	۱
مراجع الزامی	۱
اصطلاحات و تعاریف	۲
اساس آزمایش	۲
نمونه برداری	۳
مواد لازم	۳
وسایل لازم	۶
آماده سازی آزمایه	۷
روش اجرای آزمون	۸
بیان نتایج	۱۱
گزارش آزمون	۱۳
پیوست الف	۱۴
پیوست ب	۲۰

میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام ـروش جستجووشمارش اشریشیا کلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی (تجدید نظر)

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف ازتدوین این استاندارد تعیین روش جستجو و شمارش بیشترین تعداداحتمالی[1] اشریشیا کلی[2] با استفاده از محیط کشت مایع در دماهای ۳۷ و ۴۴ درجه سلسیوس است . این استاندارد درباره نمونه های مواد غذایی مورد مصرف انسان و خوراک دام وهمچنین نمونه های در تماس با مواد غذایی کاربرد دارد.

یادآوری ــ این استاندارد برای جستجو و شمارش برخی از سویه های بیماریزای اشریشیا کلی که قادر به رشد در دمای ۴۴ درجه سلسیوس نیستند ، کاربرد ندارد.

۲ مراجع الزامی

مدارک زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد به آنها ارجاع داده شده است . به این ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد محسوب می شود . در مورد مراجع دارای تاریخ چاپ و/یا تجدیدنظر ، اصلاحیه ها و تجدیدنظرهای بعدی این مدارک موردنظر نیست . معهذا بهتر است کاربران ذینفع این استاندارد امکان کاربرد آخرین اصلاحیه ها و تجدیدنظرهای مدارک الزامی زیر را مورد بررسی قرار دهند . در مورد مراجع بدون تاریخ چاپ و/یا تجدید نظر ، آخرین چاپ و/یا تجدیدنظر آن مدارک الزامی ارجاع داده شده مورد نظر است .

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است :

۲ـ۱ ـ استاندارد ملی ایران ۳۵۶ : سال ۱۳۸۰ ـ میکروبیولوژی مواد غذایی وخوراک دام ـ تهیه سوسپانسیون اولیه و رقتهای اعشاری برای آزمایشهای میکروبیولوژی

۲ـ۲ ـ استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵ : سال ۱۳۸۰ ـ میکربیولوژی ـ آئین کاربرد روشهای عمومی آزمایشهای میکروبیولوژی

۲ـ۳ ـ استاندارد ملی ایران ۲۷۴۷ : سال ۱۳۸۰ ـ میکربیولوژی ـ آئین کار در آزمایشگاه میکربیولوژی

2-4 ISO6887-2:,Microbiology of food and animal feeding stuffs-Preparation of test sample,initial suspention and decimal dilutions for microbiological examination_part2:Specific rules for the preparation of meat and meat products.

1-Most probable number(MPN)
2-Escherichia coli

2-5 ISO6887-3, Microbiology of food and animal feeding stuffs-Preparation of test sample,initial suspention and decimal dilutions for microbiological examination-part3:Specific rules for the preparation of fish and fishery product.

2-6 ISO 6887-4, Microbiology of food and animal feeding stuffs-Preparation of test sample,initial suspention and decimal dilutions for microbiological examination-part4:Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products,meat and meat products,and fish and fishery products.

2-7 ISO8261,Milk and milk products-General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination .

2-8 ISO/TS11133-1,Microbiology of food and animal feeding stuffs-Guidelines on preparation and production of culture media-part1:General guidelines of quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory

2-9 ISO/TS 11133-2,Microbiology of food and animal feeding stuffs-Guidelines on preparation and production of culture media-part2:practical guidelines on performance testing of culture media

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد ،اصطلاحات و/ یا واژه ها با تعاریف زیر بکار می رود:

۳ ـ ۱ اشریشیاکلی

باکتریی هایی هستند که در دمای ۴۴ درجه سلسیوس با تخمیر لاکتوز گاز تولید می کنند و از تریپتوفان اندول تولید می نمایند .

۳ ـ ۲ شمارش اشریشیاکلی

منظور بیشترین تعداد احتمالی اشریشیاکلی در هر میلی لیتر یا هر گرم از آزمونه است .

۴ اساس آزمایش

۴ ـ ۱ روش جستجو

۴ ـ ۱ ـ ۱ مقدار معینی از آزمونه و یا سوسپانسیون اولیه در محیط کشت مایع غنی کننده انتخابی تلقیح می شود.

۴ ـ ۱ ـ ۲ محیط تلقیح شده در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس تامدت زمان ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شده واز نظر تولید گاز پس از ۲۴ و۴۸ ساعت بررسی می گردد.

۴ ـ ۱ـ۳ در صورت مشاهده کدورت یا گاز در لوله ،از آن به لوله حاوی محیط کشت مایع انتخابیEC [1] تلقیح می شود.

1-Ec broth

۴ ـ ۱ـ۴ سپس لوله EC تلقیح شده طبق بند ۴ـ۱ـ۳ در دمای ۴۴ درجه سلسیوس تا ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شده و پس از آن از نظر تولید گاز بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی می شود.

۴ ـ۱ـ۵ در صورت مشاهده گاز در لوله بند ۴ـ۱ـ۴ ، از آن به لوله حاوی آب پپتونه بدون اندول تلقیح می شود.

۴ ـ۱ـ۶ سپس لوله تلقیح شده بند ۴ـ۱ـ۵ در دمای ۴۴ درجه سلسیوس تا مدت زمان ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شده و از نظر تولید اندول بررسی می شود.

۴ ـ ۱ ـ۷ لوله هایی که در محیط کشت انتخابی بند ۴ـ۱ـ۱ کدورت یا گاز ایجاد می کنند و در محیط کشت تاییدی EC گاز تولید و در آب پپتونه در ۴۴ درجه سلسیوس ، اندول تولید می کنند ، از نظروجود اشریشیا کلی درمقدار معینی از وزن یا حجم نمونه ، مثبت درنظر گرفته می شوند.

۴ ـ ۲ روش شمارش

۴ ـ۲ ـ ۱ سه لوله از محیط کشت غنی کننده انتخابی با غلظت مضاعف با مقدار معینی از سوسپانسیون اولیه تلقیح می شود.

۴ ـ۲ـ۲ سه لوله از محیط کشت غنی کننده انتخابی با غلظت معمولی ، با مقدار معینی از سوسپانسیون اولیه تلقیح می گردد ، سپس تحت شرایط یکسان ، سه لوله دیگر از محیط کشت غنی کننده انتخابی با غلظت معمولی با مقدار معین از رقتهای اعشاری تلقیح می شود . افزودن سایر رقتهای اعشاری به محیط کشت انتخابی با غلظت معمولی تا کسب اطمینان از اینکه لوله های آخرین رقت نتایج منفی خواهند داد ، ادامه یابد.

۴ ـ۲ ـ۳ لوله ها دردمای ۳۷ درجه سلسیوس تا مدت زمان ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شده و پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت ، از نظر تولید گاز بررسی می شوند.

۴ ـ ۲ ـ۴ از هر لوله محیط کشت با غلظت مضاعف که کدورت یا گاز تولید کرده و همچنین ازهر لوله محیط کشت با غلظت معمولی که درآن گازتولید شده است به محیط کشت EC تلقیح می شود.

۵ نمونه برداری

نمونه برداشته شده باید نماینده واقعی از کل محموله باشد و در هنگام حمل و نقل و انبارش آسیب ندیده و تغییری در آن ایجاد نشده باشد . برای آگاهی از شرایط کلی نمونه برداری و نگه داری نمونه به استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵:سال ۱۳۸۰ مراجعه شود.

۶ مواد لازم

جهت آگاهی با قواعد کلی آزمایش های میکروبی به استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵ : سال ۱۳۸۰ مراجعه کنید.

یادآوری ـ در صورت استفاده از محیط های کشت تجاری ، محیط های کشت را طبق دستور سازنده انجام دهید .

۶ ـ ۱ محلول رقیق کننده

با توجه به نوع فرآورده ، برای تهیه محلول های رقیق کننده به استاندارد ملی ایران ۳۵۶ : سال ۱۳۸۰ مراجعه کنید. برای شیر وفرآورده های آن ، گوشت و فرآورده های آن ، محصولات دریایی و سایر محصولات به ترتیب به استانداردهای ملی ایران شماره های.[۱]... مراجعه کنید

۶- ۲ محیط های کشت و معرف ها

۶ـ ۲ ـ ۱ آ بگوشت لوریل سولفات[۲] (محیط غنی کننده انتخابی)

۶ ـ۲ ـ ۱ ـ ۱ مواد تشکیل دهنده :

نام مواد	مقدار مواد با غلظت معمولی	مقدار مواد با غلظت مضاعف
بافتهای حیوانی وگیاهی هضم شده آنزیمی[۳]	۲۰ گرم	۴۰ گرم
لاکتوز[۴]	۵ گرم	۱۰ گرم
دی پتاسیم مونو هیدروژن فسفات[۵]	۲/۷۵ گرم	۵/۵ گرم
پتاسیم دی هیدروژن فسفات[۶]	۲/۷۵ گرم	۵/۵ گرم
سدیم کلرید [۷]	۵ گرم	۱۰ گرم
سدیم لوریل سولفات [۸]	۰/۱ گرم	۰/۲گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر	۱۰۰۰میلی لیتر

۱ـ تا تدوین استانداردهای ملی ایران به ترتیب به استانداردهای بین المللی ،ISO8261 ،ISO 6887_2 ،ISO6887_3 وISO6887_4مراجعه کنید.

2_Lauryl sulfate broth
3-Enzymatic digest of plant and animal tissues ,
4_ Lactose ,
5_Di Potassium monohydrogen phosphate(K_2HPO_4),
6_Potassium dihydrogen phosphate(KH_2PO_4),
7_Sodium chloride
8_Sodium lauryl sulfate[$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$]

۶ ـ ۲ ـ ۱ ـ ۲ روش تهیه

مواد فوق را در آب حل نموده و در صورت لزوم آن را حرارت دهید. pHمحیط رابه گونه ای تنظیم کنید تا پس از سترون شدن در ۲۵ درجه سلسیوس ۰/۲ ±۶/۸ باشد .سپس محیط کشت با غلظت معمولی و غلظت مضاعف را در حجم های ۱۰ میلی لیتری به ترتیب در لوله هایی به ابعاد ۱۶۰×۱۶ و ۲۰۰×۲۰میلی متری دارای لوله دورهام تقسیم نموده و در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید.پس از سترون شدن ،لوله های دورهام بایستی بدون حباب هوا باشند.

۶ـ ۲ ـ ۲ محیط آبگوشت EC (محیط انتخابی)

۶ ـ ۲ـ ۲ـ ۱ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار مواد
کازئین هضم شده آنزیمی [1]	۲۰ گرم
لاکتوز[2]	۵ گرم
نمکهای صفراوی[3]	۱/۵ گرم
دی پتاسیم مونوهیدروژن فسفات	۴ گرم
پتاسیم دی هیدروژن فسفات	۱/۵ گرم
سدیم کلراید	۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

۶ ـ۲ـ۲ـ۲ روش تهیه

مواد فوق را در آب حل نموده و در صورت لزوم حرارت دهید. pH محیط را به گونه ای تنظیم کنید تا پس از سترون شدن در ۲۵ درجه سلسیوس۰/۲±۶/۸ باشد .سپس محیط را درحجم های ۱۰ میلی لیتری در لوله هایی به ابعاد۱۶۰×۱۶ میلی متری حاوی لوله دورهام تقسیم نموده و در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون نمائید . پس از سترون شدن ، لوله های دورهام بایستی بدون حباب هوا باشد.

۶ ـ ۲ ـ ۳ آزمون کارایی[4] جهت تضمین کیفیت محیط کشت

جهت آزمون کارآیی محیط کشت ،به استاندارد ملی ایران به شماره[5] ... مراجعه کنید .

1-Enzymatic digest of casein
2- Lactose
3-Bile salts
4 –performance testing

۵ـ تا تدوین استاندارد ملی ایران به استانداردهای بین المللی ISO/TS111332,ISO/TS11133-1, مراجعه کنید.

۶ ـ۲ـ ۴ محیط آب پپتونه بدون اندول [1]

۶ ـ۲ـ۴ ـ ۱ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار مواد
کازئین هضم شده آنزیمی(تریپتون)	۱۰ گرم
سدیم کلراید	۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰میلی لیتر

۶ـ۲ ـ۴ ـ ۲ روش تهیه

مواد فوق را در آب حل نموده و در صورت نیاز حرارت دهید .pH محیط را به گونه ای تنظیم کنید تا پس از سترون شدن در ۲۵ درجه سلسیوس ۰/۲±۷/۳ باشد، سپس آنرا در مقادیر ۵ تا ۱۰ میلی لیتری در لوله های آزمایش با ابعاد ۱۶۰×۱۶ میلی لیتر تقسیم و در اتو کلاو ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون نمایید.

۶ـ۲ ـ ۵ معرف اندول (معرف کواکس)[2]

۶ ـ۲ـ ۵ ـ۱ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار مواد
۴ـدی متیل آمینو بنزآلدئید [3]	۵ گرم
۲ـمتیل بوتان ـ۱ـال یاپنتان ـ۱ـال[4]	۷۵ میلی لیتر
اسید کلریدریک[5] با چگالی ۱/۱۸تا۱/۱۹	۲۵ میلی لیتر
گرم در میلی لیتر در ۲۰ درجه سلسیوس	

۶ ـ۲ـ ۵ ـ ۲ روش تهیه

۴ ـ دی متیل آمینو بنز آلدئید را به الکل اضافه نموده و در حمام آب بادمای۵۰ الی ۵۵ درجه سلسیوس قرار دهید.پس از حل شدن آن را در دمای اتاق قرار داده تا سرد شود، سپس اسیدرا به آرامی به آن بیفزایید، دراین حالت رنگ معرف زرد روشن تا قهوه ای روشن می شود.معرف باید در شیشه های تیره دور از نور و دمای حدود ۴ درجه سلسیوس نگهداری شود.

۷ وسایل لازم

ازوسایل معمول در آزمایشگاه میکربیولوژی برطبق استاندارد ملی ایران ۲۷۴۷ : سال ۱۳۸۰و به ویژه وسایل زیر استفاده کنید.

یادآوری ـ از وسایل یکبار مصرف در صورت داشتن شرایط مورد نظر می توان استفاده نمود.

1-peptone water,indol free
2-Kovacs` reagent
3- 4_Dimethylaminobenzaldehyde
4- 2-Methylbutan-1-ol or Pantan *1*ol
5-Hydrochloric acid

۷ ـ ۱ دستگاه سترونی با دمای خشک (آون)[1] و دستگاه سترونی مرطوب(اتوکلاو)[2]

به استاندارد ملی ایران ۲۷۴۷ : سال ۱۳۸۰مراجعه کنید .

۷ ـ ۲ گرمخانه

قابل تنظیم در دمای ۱±۳۷و ۱±۴۴ درجه سلسیوس

۷ ـ ۳ حمام آب

قابل تنظیم در دمای۱±۴۴ درجه سلسیوس

۷ ـ ۴ لوله های آزمایش

در اندازه های ۱۶۰×۱۶ ، ۱۸۰ × ۱۸ و ۲۰۰ × ۲۰ میلی متر

۷ ـ ۵ حلقه کشت[3]

ازجنس پلاتین ـ ایریدیوم یا نیکل ـ کروم ، با قطر حدود ۳ میلیمتر یا حلقه کشت سترون یکبار مصرف با حجم حدود ۱۰ میکرولیتر

۷ ـ ۶ لوله های دورهام

با اندازه مناسب جهت استفاده در لوله های آزمون طبق بند ۶ ـ ۴

۷ ـ ۷ پیپت های توزیع

با ظرفیت اسمی ۱ و ۱۰ میلی لیتر

۷ ـ ۸ pH متر

باتوانایی اندازه گیری۰/۰۱ واحد pH و دقت حدود ۰/۱ ±واحد pH در ۲۵ درجه سلسیوس

۸ آماده سازی آزمایه

با توجه به نوع فرآورده آزمایه را مطابق با استانداردملی ایران ۳۵۶ : سال ۱۳۸۰آماده نمائید. برای شیر وفرآورده های آن ، گوشت و فرآورده های آن،محصولات دریایی و سایر محصولات به ترتیب به استانداردهای ملی ایران شماره های[4]... مراجعه کنید.

۹ روش اجرای آزمون

۹ – ۱ روش جستجو

۹ ـ ۱ ـ ۱ تهیه آزمونه و سوسپانسیون اولیه

1-Oven
2-Autoclave
3-Loop

۴ـ تا تدوین استانداردهای ملی ایران به ترتیب از راست به چپ استانداردهای بین المللی ،ISO8261 ،ISO 6887-2، ISO6887-3 و ISO6887-4مراجعه کنید.

با توجه به نوع فرآورده،آزمونه را مطابق استاندارد ملی ایران ۳۵۶ : سال ۱۳۸۰ تهیه نمائید. برای شیر و فرآورده های آن،گوشت و فرآورده های آن ، محصولات دریایی و سایر محصولات به ترتیب به استانداردهای ملی ایران شماره های[۱]... مراجعه کنید.

یک میلی لیترازسوسپانسیون اولیه را به ۹ میلی لیترمحیط لوریل سولفات با غلظت معمولی طبق بند ۶ـ۲ اضافه کنید (معادل۰/۱ گرم یا ۰/۱ میلی لیتر از نمونه) ، یا ۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه را به ۱۰ میلی لیتر لوله حاوی لوریل سولفات با غلظب مضاعف طبق بند۶ـ۲ اضافه کنید (معادل ۱ گرم یا ۱ میلی لیتر از نمونه) .

برای حجم های بیشتر ، X میلی لیتر یا X گرم از آزمونه را به ۹Xمیلی لیتر از رقیق کننده اضافه کنید. سپس سوسپانسیون اولیه را به ۹۰X میلی لیتر از غلظت معمولی لوریل سولفات طبق بند۶ـ۲ اضافه کنید.(برای مثال ۵ میلی لیتر یا ۵ گرم از نمونه را به ۴۵ میلی لیتر از رقیق کننده اضافه کنید .این مقدار از سوسپانسیون اولیه را به ۴۵۰ میلی لیتر از لوریل سولفات با غلظت معمولی بند۶ـ۲ اضافه کنید.

۹ـ۱ـ۲ گرمخانه گذاری محیط کشت انتخابی (آبگوشت لوریل سولفات)

لوله های تلقیح شده با غلظت معمولی و مضاعف لوریل سولفات رادر دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت۲ ±۲۴ساعت قرار دهید .اگر در این مرحله گاز ویا کدورت مشاهده نشد ،گرمخانه گذاری را تا ۲±۴۸ ساعت ادامه دهید .

برای صدف های خوراکی مدت زمان گرمخانه گذاری باید۲±۴۸ ساعت باشد . برای برخی از فرآورده های شیری (مانند کازئین) لوله دورهام ممکن است به انتهای لوله محیط کشت بچسبد . اگرپس از ۴۸ساعت دوره گرمخانه گذاری ، کدورت مشاهده شد ، اما گاز تولید نگردید ، از این لوله به لوله حاوی محیط کشت EC تلقیح کرده و طبق بند ۹ ـ۱ ـ۳ عمل کنید.

۹ـ۱ـ۳ تلقیح و گرمخانه گذاری محیط انتخابی (آبگوشت EC)

پس از گرمخانه گذاری لوله های کشت با غلظت مضاعف طبق بند ۹ـ۱ـ۲ ، چنانچه هرگونه کدورت یا گاز مشاهده شد ، یا پس از گرمخانه گذاری لوله های کشت با غلظت معمولی طبق بند ۹ـ۱ـ۲، اگر گاز در لوله ها مشاهده شد ، بوسیله حلقه کشت ، از آن برداشت نموده و به محیط کشت EC تلقیح کنید و در حمام آب گرم یا گرمخانه در ۴۴ درجه سلسیوس به مدت ۲±۲۴ ساعت گرمخانه گذاری کنید .چنانچه در این مرحله هیچ گازی در لوله EC مشاهده نشد ، مدت

۱ـ تا تدوین استانداردهای ملی ایران به ترتیب به استانداردهای بین المللی ،ISO8261 ،ISO 6887-2، ISO6887-3 وISO6887-4مراجعه کنید.

زمان گرمخانه گذاری را تا ۲±۴۸ ساعت ادامه دهید . برای صدف های خوراکی زنده مدت زمان گرمخانه گذاری نباید از ۲±۲۴ساعت بیشتر باشد.

۹ ـ ۱ـ۴ تلقیح و گرمخانه گذاری آب پپتونه

پس از گرمخانه گذاری لوله ها طبق بند ۹ ـ ۱ـ۳ ، چنانچه در آنها گاز مشاهده شد ، از آن ، بوسیله حلقه کشت ، به محیط آب پپتونه طبق بند ۶ـ۴ که دمای آن به ۴۴ درجه سلسیوس رسیده است ، تلقیح کنید و در دمای۴۴ درجه سلسیوس به مدت ۲±۴۸ ساعت گرمخانه گذاری کنید.

۹ ـ ۱ ـ ۵ بررسی تولید اندول

۰/۵ میلی لیتراز معرف اندول طبق بند ۶-۵را به لوله های آب پپتونه که طبق بند ۹ـ۱ـ۴ گرمخانه گذاری شده بود اضافه کنید و خوب مخلوط نموده و پس از یک دقیقه بررسی کنید. ایجاد رنگ قرمز در فاز الکلی وجود اندول را مشخص می کند .

۹ـ ۱ ـ۶ تفسیر نتایج

چنانچه در هریک از لوله های بند ۹ـ۱ـ۳ گاز مشاهده شد و در لوله آب پپتونه بند۹ـ۱ـ۴ اندول تولید شد ، از نظر وجوداشریشیا کلی در حجم و یا وزن مورد آزمون ، مثبت و در غیر این صورت منفی در نظر گرفته می شود.

۹ ـ۲ روش شمارش

۹ ـ۲ ـ ۱ تهیه آزمونه ، سوسپانسیون اولیه و رقتها

با توجه به نوع فرآورده ، آزمونه را طبق استانداردملی ایران ۳۵۶ : سال ۱۳۸۰ تهیه نمائید . برای شیر و فرآورده های آن ، گوشت و فرآورده های آن ، محصولات دریایی و سایر محصولات به ترتیب به استانداردهای ملی ایران شماره های[1]... مراجعه کنید.

رقت های مناسب را جهت اطمینان از اینکه تمام لوله های آخرین رقت نتایج منفی خواهند داد ، آماده کنید.

۹ ـ ۲ ـ ۲ تلقیح و گرمخانه گذاری محیط کشت انتخابی (آبگوشت لوریل سولفات)

۹ ـ۲ ـ۲ ـ۱ یک سری سه لوله ای از هر رقت آماده کنید. برای صدف ها و محصولات خاص و یا در مواردی که صحت بیشتر نتایج آزمون مورد نظر است ، سری پنج لوله ای مناسب تر می باشد.

۹ـ۲ـ۲ـ ۲ به هریک ازسه لوله محیط کشت غنی کننده انتخابی با غلظت مضاعف طبق بند ۶ـ ۲، با استفاده از یک پیپت سترون ۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه را انتقال دهید.این آزمونه برابر با یک گرم نمونه در هر لوله می باشد.

۱ـ تا تدوین استانداردهای ملی ایران به ترتیب به استانداردهای بین المللی ،ISO8261 ،ISO 6887-2، ISO6887- 3 ،ISO6887-4مراجعه کنید.

۹ ـ۲ـ۲ـ۳ سپس به سه لوله محیط کشت غنی کننده انتخابی با غلظت معمولی طبق بند ۶ـ۲با استفاده از پیپت سترون دیگری ، یک میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه را تلقیح کنید .این آزمونه برابر با ۰/۱گرم نمونه در هر لوله می باشد.

۹ـ۲ـ۲ـ۴ با استفاده از رقت ۰/۱ بدست آمده در بند۹ـ۲ـ۲ـ۳ رقت های بعدی مانند ۰/۰۱ و۰/۰۰۱ را می توان تهیه کرد . برای هر رقت از پیپت سترون جدید استفاده کنید و به دقت لوله های کشت تلقیح شده را مخلوط کنید.

۹ـ۲ـ۲ـ۵ لوله های محیط کشت با غلظت مضاعف در بند ۹ـ۲ـ۲ـ۲ را و همچنین لوله های محیط کشت با غلظت معمولی در بند ۹ـ۲ـ۲ـ۳ و ۹ـ۲ـ۲ـ۴ را در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت زمان ۲+_ ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری کنید . اگر در این مرحله گاز و یا کدورت در لوله ها مشاهده نشد گرمخانه گذاری را ۲۴ ساعت دیگر ادامه دهید.

برای فرآورده های دریایی مدت زمان گرمخانه گذاری باید ۲±۴۸ ساعت باشد.

برای برخی فرآورده های شیری مانند کازئین ، لوله درهام ممکن است در ته لوله محیط کشت بچسبد . اگر بعد از ۴۸ ساعت دوره گرمخانه گذاری ، کدورت بدون تولیدگاز ایجاد شد ، از آن به محیط EC طبق بند ۹ـ۲ـ۳ تلقیح کنید.

۹ـ۲ـ ۳ کشت و گرمخانه گذاری محیط کشت انتخابی (EC)

۹ـ۲ـ۳ـ۱ از هر لوله محیط کشت با غلظت مضاعف طبق بند ۹ـ۲ـ۲ـ۵ که در آن کدورت یا گاز مشاهده می شود و از هر لوله محیط کشت با غلظت معمولی طبق بند ۹ـ۲ـ۲ـ۵ که فقط گاز در آن مشاهده می شود، به وسیله حلقه کشت به لوله حاوی محیط کشت EC طبق بند ۶ـ۳ تلقیح کنید.

۹ـ۲ـ۳ـ۲ لوله های تلقیح شده طبق بند ۹ـ۲ـ۳ـ۱ را در حمام آب گرم و یا گرمخانه در ۴۴ درجه سلسیوس به مدت ۲±۲۴ ساعت قراردهید. چنانچه در این مرحله هیچ گازی در محیط کشتEC ایجاد نشد ، گرمخانه گذاری را تا مدت زمان ۲±۴۸ ساعت ادامه دهید.

برای صدف های زنده ، کل دوره گرمخانه گذاری از ۲±۲۴ ساعت نباید بیشتر باشد.

۹ـ۲ـ۴ تلقیح و گرمخانه گذاری آب پپتونه

با استفاده از حلقه کشت از هر لوله گرمخانه گذاری شده طبق بند ۹ـ۲ـ۳ـ۲ که در آن گاز مشاهده شود ، به لوله حاوی آب پپتونه که دمای آن به ۴۴ درجه سلسیوس رسیده است ، تلقیح کنید و به مدت زمان ۲+_۴۸ ساعت در دمای ۴۴ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری کنید.

۹ـ۲ـ۵ بررسی تولید اندول

۰/۵ میلی لیتر از معرف اندول طبق بند ۶ـ۵ به لوله های آب پپتونه که طبق بند ۹ـ۲ـ۴ گرمخانه گذاری شده ، افزوده ، سپس خوب هم زده و پس از یک دقیقه بررسی کنید . مشاهده رنگ قرمز در فاز الکلی دلیل بر وجود اندول می باشد.

۹ـ۲ـ۶ تفسیر نتایج

چنانچه در هر یک از لوله های تلقیح و گرمخانه گذاری شده طبق بند ۹ـ۲ـ۳ گاز مشاهده شد و در لوله های آب پپتونه طبق بند ۹ـ۲ـ۴ اندول تولید شد ، از نظر وجود اشریشیاکلی مثبت در نظر گرفته می شود . برای هر رقت ، تعداد لوله های مثبت با غلظت مضاعف و غلظت معمولی را شمارش کنید.

۱۰ بیان نتایج

۱۰ ـ۱ روش جستجو

بر اساس تفسیر نتایج طبق بند ۹ـ۱ـ۶ وجود یا عدم وجود احتمالی اشریشیاکلی را در آزمونه ، بر اساس وزن در گرم ، یا حجم در میلی لیتر از نمونه مورد آزمون گزارش کنید.

۱۰ ـ ۲ روش شمارش

برای شمارش اشریشیاکلی طبق بندهای ۱۰ـ۲ـ۱و۱۰ـ۲ـ۲ عمل کنید.

۱۰ـ۲ـ۱ انتخاب رقتها

۱۰ ـ۲ ـ ۱ ـ ۱ چنانچه حداقل در یک رقت سه لوله مثبت وجود دارد بالاترین رقت (یعنی رقتی که حاوی کمترین مقدار نمونه باشد)که در آن سه لوله مثبت بوده است و دو رقت بعدی آن (۰/۱ و ۰/۰۱)را انتخاب کنید.به مثال یک از جدول یک و بند ۱۰ ـ۲ـ۱ـ۲ مراجعه کنید.

اگرتعداد سری رقت های تهیه شده بعداز بالاترین رقت کافی نیست ، به جای آن سه رقت آخر (رقت هایی که حاوی کمترین مقدار نمونه باشند)را انتخاب کنید . مثال دو از جدول یک را ببینید.

۱۰ ـ۲ ـ۱ـ۲ چنانچه در هیچیک از رقت ها سه لوله مثبت وجود ندارد : سه رقت آخر (رقت هائی که حاوی کمترین مقدار نمونه باشند) را که در آنها حداقل یک لوله مثبت بوده است ، انتخاب کنید. به مثال سه از جدول یک مراجعه کنید .

۱۰ ـ ۲ ـ ۱ـ۳ در موارد خاص چنانچه بیش از یکی از رقت های سه تایی تلقیح شده دارای هیچ لوله مثبتی نباشد ، به طریق زیر عمل کنید:

در مواردی که پائین ترین رقت هیچ لوله مثبتی ندارد (یعنی لوله ای که حاوی بیشترین مقدار نمونه می باشد) دو رقت قبل از آن (رقت هایی که معادل ۱۰ و ۱۰۰ برابر اولین رقت انتخاب شده هستند)را انتخاب کنید . به مثال های چهار و پنج از جدول یک مراجعه کنید.

در مواردی که فقط اولین رقت گذاشته شده مثبت می باشد ، سه رقت را انتخاب کنید ، حتی اگر در دو رقت بعدی هیچ یک ازلوله ها مثبت نباشند.

یاد آوری ـ سوسپانسیون اولیه و نمونه مایع نیز رقت در نظر گرفته می شود .

جدول یک ـ مثال هائی از انتخاب نتایج مثبت برای محاسبه مقادیر MPN

مثال	تعداد لوله های مثبت که پس ازگرمخانه گذاری سه لوله تلقیح شده برای مقادیر مختلف نمونه به دست آمده است						MPN	
	فرآورده مایع	۱۰ml	۱ml	$۱۰^{-۱}$ml	$۱۰^{-۲}$ ml	$۱۰^{-۳}$ml	فرآورده های مایع	سایر فرآورده ها
	سایر فرآورده ها	۱g	$۱۰^{-۱}$g	$۱۰^{-۲}$g	$۱۰^{-۳}$g	$۱۰^{-۴}$g	$ml^{-۱}$	$g^{-۱}$
۱		۳	**۳**	**۲**	**۱**	۰	۱ /۵× ۱۰	$۱/۵\times۱۰^{۲}$
۲		۳	**۳**	**۳**	**۰**	۰	۲/۴×۱۰	$۲/۴\times۱۰^{۲}$
۳		۲	۲	**۱**	**۱**	**۰**	۷/۴	۷/۴×۱۰
۴		**۳**	**۳**	**۰**	۰	۰	۲/۴	۲/۴×۱۰
۵		**۲**	**۲**	**۰**	۱	۰	$۲/۱\times۱۰^{-۱}$	۲/۱

۱۰ـ۲ـ۲ محاسبه بیشترین تعداد احتمالی (MPN)

بر حسب ، تعداد نمونه های مورد آزمایش قرار گرفته به ازای هر بهر در جدول های پیوست الف ـ۱ والف ـ۲ قابل قبول بودن لوله های مثبت را که برطبق بند ۱۰ـ۲ـ۱ انتخاب شده اند از نظر آماری بررسی کنید . بررسی آماری را با در نظر گرفتن تعداد نمونه های مورد آزمون و همچنین با استفاده از نتایج رده های دو و سه جدول پیوست ب انجام دهید.

بنابراین ، برای مثال ، درصورتی که فقط نتایج رده یک در جدول پیوست ب قابل قبول باشد ، توالی ۲۲۱ هنگامی قابل بیان است که ۱۰ نمونه از هر بهر موردآزمون قرار گرفته باشد . به عبارت دیگر وقتی که حداقل نتایج احتمالی رده دو را قابل قبول بدانیم ، توالی ۲۲۱ در صورتی قابل بیان است که فقط دو ، سه یا پنج نمونه مورد آزمایش قرار گرفته باشد . اگر توالی ۲۲۱ نتیجه حاصل از یک آزمون باشد ، تحت هیچ شرایطی قابل قبول نیست.

برای هرردیف که بر این اساس قابل قبول محسوب می شود ، شاخص MPN را با استفاده از جدول های شرح داده شده در پیوست الف - ۱و الف-۲ تعیین کنید.

تعداد میکروارگانیسم ها را در هر میلی لیتر (در مورد فرآورده های مایع)یا هر گرم (در مورد سایر فرآورده ها)با ضرب شاخص MPN در عکس پائین ترین رقتی که انتخاب شده (یعنی رقتی که بیشترین مقدار نمونه را داراست) محاسبه نمائید.

مثال ۱- با استفاده ازسری های سه تایی لوله ،اگر عدد MPN ، درهر گرم ۰/۷۴ باشد طبق پیوست الف ـ۱ با حدود اطمینان ۹۵٪ ، حد پائین آن ۰/۱۳وحد بالای آن ۲/۰۰ در هرگرم نمونه است.

مثال ۲ ـ چنانچه عددMPN در هرگرم ۲۴باشد ، طبق پیوست الف ـ۱ باحدود اطمینان ۹۵٪ ، حد پائین آن ۴ و حد بالای آن ۹۹ در هر گرم نمونه است .

۱۱ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی های زیر باشد:

۱ـ۱۱ روش آزمون طبق استاندارد ملی ایران ۲۹۴۶ :سال ۱۳۸۴

۲ـ۱۱ مشخصات کامل نمونه

۳ـ۱۱ تاریخ نمونه برداری و روش استفاده شده در نمونه برداری در صورت آگاهی

۴ـ۱۱ تاریخ انجام آزمون

۵ـ۱۱ روش جستجو وشمارش طبق استاندارد ملی ایران ۲۹۴۶ : سال ۱۳۸۴

۶ـ۱۱ دمای گرمخانه گذاری

۷ـ۱۱ نتایج آزمون بدست آمده طبق بند ۱۰ استاندارد ملی ایران ۲۹۴۶ : سال ۱۳۸۴

۸ـ۱۱ تمام جزئیاتی که طبق این استاندارد ملی انجام نگرفته ومی تواند بر نتایج آزمون تاثیر گذار باشد.

۹ـ۱۱ نام و نام خانوادگی و امضای آزمایش کننده

پیوست الف

جدول MPN

(الزامی)

الف.۱ محاسبه بیشترین تعداد احتمالی(MPN) در روش سه لوله ای(۹ لوله ای)

محاسبه بیشترین تعداد احتمالی درروش سه لوله ای(۹ لوله ای) طبق جدول الف ـ۱ به شرح زیرانجام شود .

جدول الف ـ ۱ـ MPN برای ۳×۱ گرم(میلی لیتر)،۳×۰/۱گرم(میلی لیتر)و۳×۰/۰۱ گرم(میلی لیتر)

حدود اطمینان				رده مورد قبول هنگامی که تعداد آزمون برابر باشد با[1]					MPN	تعداد نتایج مثبت		
۹۹٪		۹۵٪										
حد بالا	حدپایین	حد بالا	حد پایین	۱۰	۵	۳	۲	۱				
۱/۴۰	۰/۰۰	۰/۹۴	۰/۰۰						<۰/۳۰	۰	۰	۰
۱/۴۰	۰/۰۰	۰/۹۵	۰/۰۱	۱	۲	۲	۲	۳	۰/۳۰	۰	۰	۰
۱/۶۰	۰/۰۰	۱/۰۰	۰/۰۱	۱	۱	۱	۱	۲	۰/۳۰	۰	۱	۰
۲/۵۰	۰/۰۵	۱/۷۰	۰/۱۲	۳	۳	۳	۳	۰	۰/۶۱	۱	۱	۰
۲/۵۰	۰/۰۵	۱/۷۰	۰/۱۲	۱	۲	۲	۲	۳	۰/۶۲	۰	۲	۰
۴/۶۰	۰/۱۸	۳/۵۰	۰/۳۵	۳	۰	۰	۰	۰	۰/۹۴	۰	۳	۰
۲/۵۰	۰/۰۱	۱/۷۰	۰/۰۲	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۳۶	۰	۰	۱
۲/۵۰	۰/۵۰	۱/۷۰	۰/۱۲	۱	۱	۱	۲	۲	۰/۷۲	۱	۰	۱
۴/۶	۰/۲	۳/۵	۰/۴	۳	۳	۰	۰	۰	۱/۱	۲	۰	۱
۲/۷۰	۰/۰۶	۲/۰۰	۰/۱۳	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۷۴	۰	۱	۱
۴/۶	۰/۲	۳/۵	۰/۴	۲	۲	۲	۳	۳	۱/۱	۱	۱	۱
۴/۶	۰/۲	۳/۵	۰/۴	۱	۱	۱	۲	۲	۱/۱	۰	۲	۱
۵/۲	۰/۲	۳/۸	۰/۵	۲	۳	۳	۳	۳	۱/۵	۱	۲	۱
۵/۲	۰/۲	۳/۸	۰/۵	۲	۳	۳	۳	۳	۱/۶	۰	۳	۱
۴/۶۰	۰/۰۷	۳/۵۰	۰/۱۵	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۹۲	۰	۰	۲
۴/۶	۰/۲	۳/۵	۰/۴	۱	۱	۱	۱	۲	۱/۴	۱	۰	۲
۵/۲	۰/۲	۳/۸	۰/۵	۳	۳	۳	۳	۰	۲/۰	۲	۰	۲
۵/۲	۰/۲	۳/۸	۰/۴	۱	۱	۱	۱	۱	۱/۵	۰	۱	۲
۵/۲	۰/۲	۳/۸	۰/۵	۱	۱	۱	۲	۲	۲/۰	۱	۱	۲
۵/۲	۰/۲	۳/۸	۰/۵	۱	۱	۱	۲	۲	۲/۰	۱	۱	۲

ادامه جدول الف ـ۱ـ MPN برای ۳×۱ گرم(میلی لیتر)،۳×۰/۱گرم(میلی لیتر)و۳×۰/۰۱ گرم(میلی لیتر)												
۱۴/۲	۰/۵	۹/۴	۰/۹	۳	۳	۳	۳	۰	۲/۷	۲	۱	۲
۵/۶	۰/۲	۴/۰	۰/۵	۱	۱	۱	۱	۱	۲/۱	۰	۲	۲
۱۴/۲	۰/۵	۹/۴	۰/۹	۱	۲	۲	۲	۳	۲/۸	۱	۲	۱
۱۴/۲	۰/۵	۹/۴	۰/۹	۳	۰	۰	۰	۰	۳/۵	۲	۲	۲
۱۴/۲	۰/۵	۹/۴	۰/۹	۱	۲	۲	۲	۳	۲/۹	۰	۳	۲
۱۴/۲	۰/۵	۹/۴	۰/۹	۳	۳	۳	۳	۰	۳/۶	۱	۳	۲
۱۴/۲	۰/۳	۹/۴	۰/۵	۱	۱	۱	۱	۱	۲/۳	۰	۰	۳
۱۵/۷	۰/۵	۱۰/۴	۰/۹	۱	۱	۱	۱	۱	۳/۸	۱	۰	۳
۲۵/۰	۱/۰	۱۸/۱	۱/۶	۲	۲	۲	۳	۳	۶/۴	۲	۰	۳
۲۵/۰	۰/۵	۱۸/۱	۰/۹	۱	۱	۱	۱	۱	۴/۳	۰	۱	۳
۲۷/۰	۱/۱	۱۹/۹	۱/۷	۱	۱	۱	۱	۱	۷/۵	۱	۱	۳
۴۴	۲	۳۶	۳	۱	۲	۲	۲	۳	۱۲	۲	۱	۳
۵۲	۲	۳۸	۳	۳	۳	۰	۰	۰	۱۶	۳	۱	۳
۴۳/۰	۱/۲	۳۶/۰	۱/۸	۱	۱	۱	۱	۱	۹/۳	۰	۲	۳
۵۲	۲	۳۸	۳	۱	۱	۱	۱	۱	۱۵	۱	۲	۳
۵۶	۲	۴۰	۳	۱	۱	۱	۱	۲	۲۱	۲	۲	۳
۱۵۲	۵	۹۹	۹	۲	۲	۳	۳	۳	۲۹	۳	۲	۳
۱۵۲	۳	۹۹	۴	۱	۱	۱	۱	۱	۲۴	۰	۳	۳
۲۸۳	۵	۱۹۸	۹	۱	۱	۱	۱	۱	۴۶	۱	۳	۳
۵۷۰	۱۰	۴۰۰	۲۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱۱۰	۲	۳	۳
									>۱۱۰	۳	۳	۳

۱- برای تفسیر نتایج، رده های ذکر شده به پیوست ب مراجعه کنید .

الف-۲ محاسبه بیشترین تعداد احتمالی MPN در روش ۵ لوله ای (۱۵ لوله ای)

محاسبه بیشترین تعداد احتمالی در روش۵ لوله ای (۱۵ لوله ای)طبق جدول الف ـ۲ به شرح زیر انجام شود.

جدول الف ـ ۲ ـ MPN برای ۵×۱ گرم(میلی لیتر)،۵×۰/۱گرم(میلی لیتر)و۵×۰/۰۱ گرم(میلی لیتر)

حدود اطمینان				رده مورد قبول هنگامی که تعداد آزمون برابر باشد با[1]					MPN	تعداد نتایج مثبت		
۹۹٪		۹۵٪										
حد بالا	حدپایین	حد بالا	حد پایین	۱۰	۵	۳	۲	۱				
۰/۹۳	۰/۰۰	۰/۶۵	۰/۰۰						<۰/۱۸	۰	۰	۰
۰/۹۳	۰/۰۰	۰/۶۵	۰/۰۰	۱	۱	۲	۲	۲	۰/۱۸	۱	۰	۰
۰/۹۳	۰/۰۰	۰/۶۵	۰/۰۱	۱	۱	۲	۲	۲	۰/۱۸	۰	۱	۰
۱/۴۰	۰/۰۲	۰/۹۹	۰/۰۷	۲	۲	۳	۳	۳	۰/۳۶	۱	۱	۰
۱/۴۰	۰/۰۲	۰/۹۹	۰/۰۷	۱	۲	۲	۲	۳	۰/۳۷	۰	۲	۰
۲/۱۰	۰/۰۹	۱/۴۰	۰/۱۷	۳	۳	۰	۰	۰	۰/۵۵	۱	۲	۰
۲/۱۰	۰/۰۹	۱/۴۰	۰/۱۷	۳	۳	۳	۳	۰	۰/۵۶	۰	۳	۰
۱/۴۰	۰/۰۱	۰/۹۹	۰/۰۲	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۲۰	۰	۰	۱
۱/۴۰	۰/۰۲	۱/۰۰	۰/۰۷	۱	۱	۱	۱	۲	۰/۴۰	۱	۰	۱
۲/۱۰	۰/۰۹	۱/۴۰	۰/۱۷	۳	۳	۳	۰	۰	۰/۶۰	۲	۰	۱
۱/۴۰	۰/۰۳	۱/۱۰	۰/۰۷	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۴۰	۰	۱	۱
۲/۱۰	۰/۰۹	۱/۴۰	۰/۱۷	۱	۲	۲	۲	۳	۰/۶۱	۱	۱	۱
۲/۸۰	۰/۲۰	۲/۲۰	۰/۳۳	۳	۰	۰	۰	۰	۰/۸۱	۲	۱	۱
۲/۱۰	۰/۰۹	۱/۴۰	۰/۱۸	۱	۱	۱	۱	۲	۰/۶۱	۰	۲	۱
۲/۸۰	۰/۲۰	۲/۲۰	۰/۳۳	۲	۳	۳	۳	۳	۰/۸۲	۱	۲	۱
۲/۸۰	۰/۲۰	۲/۲۰	۰/۳۳	۲	۳	۳	۳	۳	۰/۸۳	۰	۳	۱
۲/۸	۰/۲	۲/۲	۰/۳	۳	۰	۰	۰	۰	۱/۰	۱	۳	۱
۲/۸	۰/۲	۲/۲	۰/۳	۳	۰	۰	۰	۰	۱/۱	۰	۴	۱
۲/۱۰	۰/۰۴	۱/۴	۰/۰۸	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۴۵	۰	۰	۲
۲/۱۰	۰/۰۹	۱/۵۰	۰/۱۸	۱	۱	۱	۱	۲	۰/۶۸	۱	۰	۲
۲/۸۰	۰/۲۰	۲/۲۰	۰/۳۳	۳	۳	۳	۳	۰	۰/۹۱	۲	۰	۲

ادامه جدول الف ـ۲ـMPN برای ۵×۱ گرم(میلی لیتر)،۵×۰/۱گرم(میلی لیتر)و۵×۰/۰۱ گرم(میلی لیتر)												
۲/۳۰	۰/۱۰	۱/۷۰	۰/۱۹	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۶۸	۰	۱	۲
۲/۸۰	۰/۲۰	۲/۲۰	۰/۳۳	۱	۱	۱	۲	۲	۰/۹۲	۱	۱	۲
۳/۴	۰/۲	۲/۵	۰/۴	۳	۳	۳	۰	۰	۱/۲	۲	۱	۲
۲/۸۰	۰/۲۰	۲/۲۰	۰/۳۴	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۹۳	۰	۲	۲
۳/۴	۰/۲	۲/۵	۰/۹	۲	۲	۲	۳	۳	۱/۲	۱	۲	۲
۴/۴	۰/۴	۳/۴	۰/۶	۳	۰	۰	۰	۰	۱/۴	۲	۲	۲
۳/۴	۰/۲	۲/۵	۰/۴	۱	۲	۲	۲	۳	۱/۲	۰	۳	۲
۴/۴	۰/۴	۳/۴	۰/۶	۳	۳	۳	۳	۰	۱/۴	۱	۳	۲
۴/۴	۰/۴	۳/۴	۰/۶	۳	۳	۳	۳	۰	۱/۵	۰	۴	۲
۲/۸۰	۰/۱۲	۲/۲۰	۰/۲۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۷۸	۰	۰	۳
۲/۹	۰/۲	۲/۲	۰/۴	۱	۱	۱	۱	۱	۱/۱	۱	۰	۳
۴/۴	۰/۴	۳/۴	۰/۶	۲	۲	۳	۳	۳	۱/۳	۲	۰	۳
۳/۴	۰/۲	۲/۵	۰/۴	۱	۱	۱	۱	۱	۱/۱	۰	۱	۳
۴/۴	۰/۴	۳/۴	۰/۶	۱	۱	۱	۱	۲	۱/۴	۱	۱	۳
۴/۴	۰/۴	۳/۴	۰/۶	۲	۳	۳	۳	۳	۱/۷	۲	۱	۳
۴/۴	۰/۴	۳/۴	۰/۶	۱	۱	۱	۱	۱	۱/۴	۰	۲	۳
۵/۱	۰/۵	۳/۹	۰/۷	۱	۱	۲	۲	۲	۱/۷	۱	۲	۳
۵/۲	۰/۵	۳/۹	۰/۷	۳	۳	۳	۳	۰	۲/۰	۲	۲	۳
۵/۲	۰/۵	۳/۹	۰/۷	۱	۱	۱	۲	۲	۱/۷	۰	۳	۳
۵/۲	۰/۵	۳/۹	۰/۷	۲	۲	۳	۳	۳	۲/۱	۱	۳	۳
۹/۴	۰/۷	۶/۶	۱/۰	۳	۳	۰	۰	۰	۲/۴	۲	۳	۳
۵/۲	۰/۵	۴/۰	۰/۷	۲	۲	۲	۳	۳	۲/۱	۰	۴	۳
۹/۴	۰/۷	۶/۶	۱/۰	۳	۳	۳	۳	۰	۲/۴	۱	۴	۳
۹/۴	۰/۷	۶/۶	۱/۰	۳	۳	۰	۰	۰	۲/۵	۰	۵	۳
۴/۴	۰/۳	۳/۴	۰/۴	۱	۱	۱	۱	۱	۱/۳	۰	۰	۴
۴/۴	۰/۴	۳/۴	۰/۵	۱	۱	۱	۱	۱	۱/۷	۱	۰	۴
۵/۲	۰/۵	۳/۹	۰/۷	۲	۲	۲	۲	۳	۲/۱	۲	۰	۴
۹/۴	۰/۷	۶/۶	۱/۰	۳	۰	۰	۰	۰	۲/۵	۳	۰	۴
۵/۱	۰/۴	۳/۹	۰/۶	۱	۱	۱	۱	۱	۱/۷	۰	۱	۴

ادامه جدول الف ـ۲ـMPN برای ۵×۱ گرم(میلی لیتر)،۵×۰/۱گرم(میلی لیتر)و۵×۰/۰۱ گرم(میلی لیتر)											
۵/۳	۰/۵	۴/۱	۰/۷	۱	۱	۱	۱	۱	۲/۱	۱	۱	۴
۹/۴	۰/۷	۶/۶	۱/۰	۲	۲	۲	۳	۳	۲/۶	۲	۱	۴
۹/۴	۰/۷	۶/۶	۱/۰	۳	۰	۰	۰	۰	۳/۱	۳	۱	۴
۶/۱	۰/۵	۴/۸	۰/۷	۱	۱	۱	۱	۱	۲/۲	۰	۲	۴
۹/۴	۰/۷	۶/۶	۱/۰	۱	۱	۱	۲	۱	۲/۶	۱	۲	۴
۹/۴	۰/۷	۶/۶	۱/۰	۲	۲	۳	۳	۳	۳/۲	۲	۲	۴
۱۴/۷	۰/۹	۱۰/۰	۱/۳	۳	۰	۰	۰	۰	۳/۸	۳	۲	۴
۹/۴	۰/۷	۶/۶	۱/۰	۱	۱	۱	۱	۱	۲/۷	۰	۳	۴
۹/۴	۰/۷	۶/۶	۱/۰	۱	۱	۱	۲	۲	۳/۳	۱	۳	۴
۱۴/۷	۰/۹	۱۰/۰	۱/۳	۲	۳	۳	۳	۳	۳/۹	۲	۳	۴
۱۴/۷	۰/۹	۱۰/۰	۱/۳	۱	۱	۱	۲	۲	۳/۴	۰	۴	۴
۱۴/۷	۰/۹	۱۰/۰	۱/۳	۲	۲	۲	۳	۳	۴/۰	۱	۴	۴
۱۴/۷	۰/۹	۱۱/۳	۱/۴	۳	۳	۰	۰	۰	۴/۷	۲	۴	۴
۱۴/۷	۰/۹	۱۰/۰	۱/۳	۲	۳	۳	۳	۳	۴/۱	۰	۵	۴
۱۴/۷	۰/۹	۱۱/۳	۱/۴	۳	۳	۳	۰	۰	۴/۸	۱	۵	۴
۹/۴	۰/۵	۶/۶	۰/۷	۱	۱	۱	۱	۱	۲/۳	۰	۰	۵
۹/۴	۰/۷	۶/۶	۱/۰	۱	۱	۱	۱	۱	۳/۱	۱	۰	۵
۱۴/۷	۰/۹	۱۰/۰	۰/۳	۱	۲	۲	۲	۳	۴/۳	۲	۰	۵
۲۰/۰	۱/۴	۱۴/۹	۲/۱	۳	۳	۰	۰	۳	۵/۸	۳	۰	۵
۱۴/۷	۰/۷	۱۰/۰	۱/۰	۱	۱	۱	۱	۱	۳/۳	۰	۱	۵
۱۴/۷	۰/۹	۱۱/۳	۱/۴	۱	۱	۱	۱	۱	۴/۶	۱	۱	۵
۲۰/۰	۱/۴	۱۴/۹	۲/۱	۱	۱	۱	۲	۲	۶/۳	۲	۱	۵
۲۷/۰	۲/۱	۱۱/۰	۳/۴	۲	۳	۳	۳	۳	۸/۴	۳	۱	۵
۲۰/۰	۰/۹	۱۴/۹	۱/۵	۱	۱	۱	۱	۱	۴/۹	۰	۲	۵
۲۳/۰	۱/۴	۱۶/۸	۲/۲	۱	۱	۱	۱	۱	۷/۰	۱	۲	۵
۲۸/۰	۲/۱	۲۲/۰	۳/۴	۱	۱	۱	۲	۲	۹/۴	۲	۲	۵
۳۲	۰/۹	۲۴	۳	۲	۲	۲	۳	۳	۱۲	۳	۲	۵
۴۵	۱/۴	۳۵	۶	۳	۰	۰	۰	۰	۱۵	۴	۲	۵
۲۷/۰	۲/۱	۲۲/۰	۲/۳	۱	۱	۱	۱	۱	۷/۹	۰	۳	۵

ادامه جدول الف ـ۲ـMPN برای ۵×۱ گرم(میلی لیتر)،۵×۰/۱گرم(میلی لیتر)و۵×۰/۰۱ گرم(میلی لیتر)												
۳۲	۲	۲۴	۳	۱	۱	۱	۱	۱	۱۱	۱	۳	۵
۴۵	۴	۳۵	۵	۱	۱	۱	۲	۱	۱۴	۲	۳	۵
۵۱	۱/۵	۳۹	۷	۱	۲	۲	۲	۳	۱۷	۳	۳	۵
۵۱	۲	۳۹	۷	۲	۳	۳	۳	۳	۲۱	۴	۳	۵
۴۵	۳	۳۵	۳	۱	۱	۱	۱	۱	۱۳	۰	۴	۵
۵۱	۴	۳۹	۶	۱	۱	۱	۱	۱	۱۷	۱	۴	۵
۵۷	۴	۴۴	۷	۱	۱	۱	۱	۱	۲۲	۲	۴	۵
۹۲	۶	۷۰	۱۰	۱	۱	۱	۱	۲	۲۸	۳	۴	۵
۹۲	۶	۷۰	۱۰	۱	۱	۲	۲	۲	۳۵	۴	۴	۵
۱۵۰	۹	۱۰۶	۱۵	۳	۳	۳	۰	۰	۴۳	۵	۴	۵
۹۲	۴	۷۰	۷	۱	۱	۱	۱	۱	۲۴	۰	۵	۵
۱۵۰	۶	۱۰۶	۱۰	۱	۱	۱	۱	۱	۳۵	۱	۵	۵
۲۲۳	۱۰	۱۶۶	۱۵	۱	۱	۱	۱	۱	۵۴	۲	۵	۵
۳۳۸	۱۵	۲۵۳	۲۳	۱	۱	۱	۱	۱	۹۲	۳	۵	۵
۶۲۰	۲۰	۴۶۰	۴۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱۶۰	۴	۵	۵
									>۱۶۰	۵	۵	۵
۱ برای تفسیر نتایج، رده های ذکر شده به پیوست ب مراجعه کنید .												

پیوست ب

جدول ب ـ تفسیر داده ها

(الزامی)

رده	تعریف
۱	هنگامیکه تعداد میکروارگانیسمها در فرآورده برابر MPN است ،نتیجه بدست آمده بیشترین شانس را دارد که به عدد واقعی نزدیک باشد.در این حالت حداکثر پنج درصد شانس بدست آمدن نتیجه ای وجود دارد که احتمال آن کمتر از حداقل در نظر گرفته شده در این رده باشد.
۲	هنگامیکه تعداد میکروارگانیسمها در فرآورده برابر MPN است ،نتیجه بدست آمده نسبت به رده یک شانس کمتری دارد که به عدد واقعی نزدیک باشد.در این حالت یک درصد شانس بدست آمدن نتیجه ای جود دارد که احتمال آن کمتر از حداقل احتمال در نظر گرفته شده در این رده باشد.
۳	هنگامی که تعداد میکروارگانیسمها در فرآورده برابرMPN است ، نتیجه بدست آمده نسبت به رده دو شانس کمتری دارد که به عدد واقعی نزدیک باشد. در این حالت حداکثر ۰/۱ درصد شانس بدست آمدن نتیجه ای وجود دارد که احتمال آن کمتر از حداقل احتمال در نظر گرفته شده در این رده باشد.
صفر	هنگامی که تعداد میکروارگانیسمها در فرآورده برابر MPN است ، نتیجه بدست آمده نسبت به رده سه شانس کمتری دارد که به عدد واقعی نزدیک باشد،و فقط ۰/۱ درصد شانس بدست آمدن نتیجه ای بدون اشتباه در این رده وجود دارد.

یاد آوری ۱ **ـ قبل از شروع آزمون باید رده قابل قبول جهت انجام آزمون تعیین گردد . یعنی فقط رده یک ، یک و دو یا حتی یک و دو وسه (به جدول های الف – ۱ والف – ۲و جدول فوق مراجعه کنید).**

یادآوری ۲ **ـ چنانچه تصمیم گیری براساس نتایج مهم است ، تنها نتایج رده یک یا در بیشتر مواقع رده یک و دو باید قابل قبول باشد . نتایج رده صفر باید با حداکثر احتیاط مورد ملاحظه قرار گیرد.**

ICS: 07.100.30

صفحه: ۲۰

- -