



جمهوری اسلامی ایران

Islamic Republic of Iran

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

Institute of Standards and Industrial Research of Iran



استاندارد ملی ایران

۲۹۴۶

تجدیدنظر دوم

ISIRI

2946

2nd.revision

میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جستجو و
شمارش اشیشیاکلی 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 - شهر صنعتی، صندوق پستی ۱۶۳-۳۱۵۸۵



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

تلفن مؤسسه در کرج: ۰۲۶۱-۲۸۰۶۰۳۱-۸



تلفن مؤسسه در تهران: ۰۲۱-۸۸۷۹۴۶۱-۵



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



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



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، صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط با موضوع صورت میگیرد. سعی بر این است که استانداردهای ملی، در جهت مطلوبیت ها و مصالح ملی و با 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 و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال میشود و پس از دریافت نظرات و پیشنهادها در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در 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 بررسی در کمیته ملی مربوط و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی چاپ و منتشر می 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 توجه به شرایط کلی و نیازمندیهای خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین المللی استفاده 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 و عمومی، 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 آنها اجباری نماید.

همچنین بمنظور اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمانها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و گواهی کنندگان سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت 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 استاندارد میکروبیولوژی مواد غذایی و فوراکی داه- روش جستجو و

شمارش اشریشیاکلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی

(تجدید نظر)

رئیس

رحیمی فرد ، ناهید

(دکترای میکروب شناسی)

سمت یا نمایندگی

وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی -

اداره کل آزمایشگاه کنترل غذا و دارو

اعضاء

ابراهیمی امام ، غلامحسن

(لیسانس صنایع غذایی)

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

پیروز ، بهناز

(فوق لیسانس میکروب شناسی)

وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی -

اداره کل آزمایشگاه کنترل غذا و دارو

زند و کیلی ، فاطمه

(فوق لیسانس علوم بهداشتی در تغذیه)

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

ضرغامپور ، زهره

(فوق لیسانس میکروب شناسی)

وزارت نیرو- شرکت آب و فاضلاب تهران

دبیر

ادریس ، شادی

(لیسانس زیست شناسی)

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

فهرست اعضاء شرکت کننده در هفتاد و نهمين اجلاس يه كميته ملي استاندارد

ميكروبيولوژي و بيولوژي مورخ ۱۳۸۴/۷/۶

رئيس كميته ملي

ابوعلي ، رحيم
(فوق ليسانس صنايع غذايي)

سمت يا نمايندگي

مؤسسه استاندارد و تحقيقات صنعتي ايران

اعضاء

ابراهيمي امام ، غلامحسن
(ليسانس صنايع غذايي)

مؤسسه استاندارد و تحقيقات صنعتي ايران

ادريس ، شادي
(ليسانس زيست شناسي)

مؤسسه استاندارد و تحقيقات صنعتي ايران

پيروز ، بهناز
(فوق ليسانس ميكروب شناسي)

اداره كل آزمايشگاه هاي كنترل غذا و دارو

رحيمي فرد ، ناهيد
(دكتراي ميكروب شناسي)

اداره كل آزمايشگاه هاي كنترل غذا و دارو

زند وكيلى ، فاطمه
(فوق ليسانس علوم بهداشتي در تغذيه)

مؤسسه استاندارد و تحقيقات صنعتي ايران

شريعتي ، منيژه
(ليسانس صنايع غذايي)

مؤسسه استاندارد و تحقيقات صنعتي ايران

ضرغامپور ، زهره
(فوق ليسانس ميكروب شناسي)

شرکت آب و فاضلاب تهران وزارت نيرو

فرزاد ، رضا
(فوق ليسانس ميكروب شناسي)

انستيتو پاستور ايران

شرکت مهram

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

سازمان حمایت از مصرف کنندگان و تولید کنندگان

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

کهن نیا ، ناصر

(فوق لیسانس میکروبی شناسی)

لولا ور ، پرویز

(دکترای دامپزشکی)

محمدیان جزی ، سهراب

(لیسانس)

مولوی ، فاطمه

(فوق لیسانس)

دیبر

پیراوی ونک ، زهرا

(فوق لیسانس صنایع غذایی)

پیشگفتار

استاندارد میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - 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 در هفتادونهمین 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 :

۱- استاندارد ملی ایران ۲۹۴۶ : سال ۱۳۷۴ - چاپ سوم - تجدید نظر اول - 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

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

میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جستجو و شمارش اشریشیا کلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی (تجدید نظر)

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد تعیین روش جستجو و شمارش بیشترین تعداد احتمالی^۱ اشریشیا کلی^۲ 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 و همچنین نمونه های در تماس با مواد غذایی کاربرد دارد.

یادآوری - 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. معهذاً 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 تجدیدنظر، آخرین چاپ و/یا تجدیدنظر آن مدارک الزامی ارجاع داده شده مورد نظر است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

- ۱-۲ - استاندارد ملی ایران ۳۵۶: سال ۱۳۸۰ - میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - تهیه سوسپانسیون اولیه و رقتهای اعشاری برای آزمایشهای میکروبیولوژی
- ۲-۲ - استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵: سال ۱۳۸۰ - میکروبیولوژی - آئین کاربرد روشهای عمومی آزمایشهای میکروبیولوژی
- ۳-۲ - استاندارد ملی ایران ۲۷۴۷: سال ۱۳۸۰ - میکروبیولوژی - آئین کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

2-4 ISO6887-2: Microbiology of food and animal feeding stuffs-Preparation of test sample, initial suspension 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 suspension 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 suspension 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:

۳-۱ اشیشیاکلی

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

۳-۲ شمارش اشیشیاکلی

منظور بیشترین تعداد احتمالی اشیشیاکلی در هر میلی لیتر یا هر گرم از آزمون است .

۴ اساس آزمایش

۴-۱ روش مستقیم

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

۴-۱-۲ محیط تلقیح شده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس تا مدت زمان ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شده و از نظر تولید گاز پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی می گردد.

۴-۱-۳ در صورت مشاهده کدورت یا گاز در لوله، از آن به لوله حاوی محیط کشت مایع انتخابی EC^۱ تلقیح می شود.

1-Ec broth

۴-۱-۴ سپس لوله EC تلقیح شده طبق بند ۴-۱-۳ 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.

۴-۱-۵ در صورت مشاهده گاز در لوله بند ۴-۱-۴ ، از آن به لوله حاوی آب پیتونه بدون اندول تلقیح می شود.

۴-۱-۶ سپس لوله تلقیح شده بند ۴-۱-۵ در دمای ۴۴ درجه سلسیوس تا مدت زمان ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شده و از نظر تولید اندول بررسی می شود.

۴-۱-۷ لوله هایی که در محیط کشت انتخابی بند ۴-۱-۱ کدورت یا گاز ایجاد می کنند و در محیط کشت تاییدی EC گاز تولید و در آب پیتونه در ۴۴ درجه سلسیوس ، اندول تولید می کنند ، از نظر وجود اشیریشیا کلی درمقدار معینی از وزن یا حجم نمونه ، مثبت درنظر گرفته می شوند.

۴-۲ روش شمارش

۴-۲-۱ سه لوله از محیط کشت غنی کننده انتخابی با غلظت مضاعف با مقدار معینی از سوسپانسیون اولیه تلقیح می شود.

۴-۲-۲ 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.

۴-۲-۳ لوله ها در دمای 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.

۴-۲-۴ از هر لوله محیط کشت با غلظت مضاعف که کدورت یا گاز تولید کرده و همچنین از هر لوله محیط کشت با غلظت معمولی که در آن گاز تولید 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 - در صورت استفاده از محیط های کشت تجاری ، محیط های کشت را طبق دستور سازنده انجام دهید .

۴- ۱ مملول رقیق کننده

با توجه به نوع فرآورده ، برای تهیه محلول های رقیق کننده به استاندارد ملی ایران ۳۵۶ : سال ۱۳۸۰ مراجعه کنید. 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

۴- ۲ ممیط های کشت و معرف ها

۴- ۲- ۱ آب بگوشت لوریل سولفات^۲ (ممیط غنی کننده انتفاپی)

۴- ۲- ۱- ۱ مواد تشکیل دهنده :

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

۱- تا تدوین استانداردهای ملی ایران به ترتیب به استانداردهای بین المللی ، ISO8261، ISO 6887_2، ISO6887_3 و ISO6887_4 مراجعه کنید.

2_Lauryl sulfate broth
3-Enzymatic digest of plant and animal tissues ,
4_Lactose ,
5_Di Potassium monohydrogen phosphate(K₂HPO₄),
6_Potassium dihydrogen phosphate(KH₂PO₄),
7_Sodium chloride
8_Sodium lauryl sulfate[CH₃(CH₂)₁₁OSO₃Na]

۲-۱-۲-۶ روش تهیه

مواد فوق را در آب حل نموده و در صورت لزوم آن را حرارت دهید. pH محیط را به گونه ای تنظیم کنید تا پس از سترون شدن در ۲۵ درجه سلسیوس $0/2 \pm 6/8$ باشد. سپس محیط کشت با غلظت معمولی و غلظت مضاعف را در حجم های ۱۰ میلی لیتری به ترتیب در لوله هایی به ابعاد 16×160 و 20×200 میلی 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.

۲-۲-۶ ممیبا آبگوشت EC (ممیبا انتفاپی)

۱-۲-۲-۶ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار مواد
کازئین هضم شده آنزیمی ^۱	۲۰ گرم
لاکتوز ^۲	۵ گرم
نمکهای صغراوی ^۳	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

۲-۲-۲-۶ 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 سلسیوس $0/2 \pm 6/8$ باشد. سپس محیط را در حجم های ۱۰ میلی لیتری در لوله هایی به ابعاد 16×160 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 باشند.

۳-۲-۶ آزمون کارایی^۴ جهت تضمین کیفیت ممیبا کشت

جهت آزمون کارایی محیط کشت، به استاندارد ملی ایران به شماره^۵ ... مراجعه کنید.

1-Enzymatic digest of casein

2- Lactose

3-Bile salts

4-performance testing

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

۶-۲-۱۴ ممیٹ آب پپٹونہ بدون اندول^۱

۶-۲-۱۴-۱ مواد تشکیل دهنده

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

۶-۲-۱۴-۲ 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 $7/3 \pm 0/2$ باشد، سپس آنرا در مقادیر ۵ تا ۱۰ میلی لیتری در لوله های آزمایش با ابعاد ۱۶×۱۶۰ میلی لیتر تقسیم و در اتو کلاو ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون نمایید.

۶-۲-۵ معرف اندول (معرف کواکس)^۲

۶-۲-۵-۱ مواد تشکیل دهنده

نام مواد	مقدار مواد
۴-دی متیل آمینو بنزالدئید ^۳	۵ گرم
۲-متیل بوتان-۱-ال یا پنتان-۱-ال ^۴	۷۵ میلی لیتر
اسید کلریدریک ^۵ با چگالی ۱/۱۸ تا ۱/۱۹	۲۵ میلی لیتر
گرم در میلی لیتر در ۲۰ درجه سلسیوس	

۶-۲-۵-۲ روش تهیه

۴-دی متیل آمینو بنز آلدهید را به الکل اضافه نموده و در حمام آب بادمای ۵۰ الی ۵۵ درجه سلسیوس قرار دهید. پس از حل شدن آن را در دمای اتاق قرار داده تا سرد شود، سپس اسید را به آرامی به آن بیفزایید، در این 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

از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی بر طبق استاندارد ملی ایران ۲۷۴۷: سال ۱۳۸۰ و به ویژه وسایل زیر استفاده کنید.

یادآوری - 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 /ol
5-Hydrochloric acid

۷-۱ دستگاه سترونی با دمای فشک (آون)^۱ و دستگاه سترونی مرطوب (اتوکلاو)^۲

به استاندارد ملی ایران ۲۷۴۷: سال ۱۳۸۰ مراجعه کنید.

۷-۲ گرمخانه

قابل تنظیم در دمای 1 ± 37 و 1 ± 44 درجه سلسیوس

۷-۳ حمام آب

قابل تنظیم در دمای 1 ± 44 درجه سلسیوس

۷-۴ لوله های آزمایش

در اندازه های 160×16 ، 180×18 و 200×20 میلی متر

۷-۵ ملقه کشت^۳

از جنس پلاتین - ایریدیوم یا نیکل - کروم، با قطر حدود ۳ میلیمتر یا حلقه کشت سترون یکبار مصرف با حجم حدود ۱۰ میکرولیتر

۷-۶ لوله های دوره ها

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

۷-۷ پیپت های توزیع

با ظرفیت اسمی ۱ و ۱۰ میلی لیتر

۷-۸ pH متر

باتوانایی اندازه گیری ۰/۰۱ واحد pH و دقت حدود ۰/۱ \pm واحد pH در ۲۵ درجه سلسیوس

۸ آماده سازی آزمايه

با توجه به نوع فرآورده آزمايه را مطابق با استاندارد ملی ایران ۳۵۶: سال ۱۳۸۰ آماده 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^۴ ... مراجعه کنید.

۹ روش اجرای آزمون

۹-۱ روش جستجو

۹-۱-۱ تهیه آزمون و سوسپانسیون اولیه

1-Oven
2-Autoclave
3-Loop

۴- تا تدوین استانداردهای ملی ایران به ترتیب از راست به چپ استانداردهای بین المللی، ISO 8261، ISO 6887-2، ISO 6887-3 و ISO 6887-4 مراجعه کنید.

با توجه به نوع فرآورده، آزمون را مطابق استاندارد ملی ایران ۳۵۶: سال ۱۳۸۰ تهیه نمایید. 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 لیتر از سوسپانسیون اولیه را به ۹ میلی لیتر محیط لوریل سولفات با غلظت معمولی طبق بند ۲-۶ اضافه کنید (معادل ۰/۱ 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 غلظت مضاعف طبق بند ۲-۶ اضافه کنید (معادل ۱ گرم یا ۱ میلی لیتر از نمونه).

برای حجم های بیشتر، X میلی لیتر یا X گرم از آزمون را به ۹X میلی لیتر از رقیق کننده اضافه کنید. سپس سوسپانسیون اولیه را به ۹۰X میلی لیتر از غلظت معمولی لوریل سولفات طبق بند ۲-۶ 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 بند ۲-۶ اضافه کنید.

۹-۱-۲ گرمخانه گذاری محیط کشت انتفاپی (آبگوشت لوریل سولفات)

لوله های تلقیح شده با غلظت معمولی و مضاعف لوریل سولفات رادر دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲ ± ۲۴ ساعت 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 باید ۲ ± ۴۸ ساعت باشد. برای برخی از فرآورده های شیری (مانند کازئین) لوله دورهام ممکن است به انتهای لوله محیط کشت بچسبد. اگر پس از ۴۸ ساعت دوره گرمخانه گذاری، کدورت مشاهده شد، اما گاز تولید نگردید، از این لوله به لوله حاوی محیط کشت EC تلقیح کرده و طبق بند ۹-۱-۳ عمل کنید.

۹-۱-۳ تلقیح و گرمخانه گذاری محیط انتفاپی (آبگوشت EC)

پس از گرمخانه گذاری لوله های کشت با غلظت مضاعف طبق بند ۹-۱-۲، چنانچه هرگونه کدورت یا گاز مشاهده شد، یا پس از گرمخانه گذاری لوله های کشت با غلظت معمولی طبق بند ۹-۱-۲، 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

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

زمان گرمخانه گذاری را تا 48 ± 2 ساعت ادامه دهید. برای صدف های خوراکی زنده مدت زمان گرمخانه گذاری نباید از 24 ± 2 ساعت بیشتر باشد.

۹-۱۴ تلقیح و گرمخانه گذاری آب پیتونه

پس از گرمخانه گذاری لوله ها طبق بند ۹-۱-۳، چنانچه در آنها گاز مشاهده شد، از آن، بوسیله حلقه کشت، به محیط آب پیتونه طبق بند ۶-۴ که دمای آن به ۴۴ درجه سلسیوس رسیده است، تلقیح کنید و در دمای ۴۴ درجه سلسیوس به مدت 48 ± 2 ساعت گرمخانه گذاری کنید.

۹-۱-۵ بررسی تولید اندول

۰/۵ میلی لیتر از معرف اندول طبق بند ۶-۵ را به لوله های آب پیتونه که طبق بند ۹-۱-۴ 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.

۹-۱-۶ تفسیر نتایج

چنانچه در هریک از لوله های بند ۹-۱-۳ گاز مشاهده شد و در لوله آب پیتونه بند ۹-۱-۴ اندول تولید شد، از نظر وجود اشریشیا کلی در حجم و یا وزن مورد آزمون، مثبت و در غیر این صورت منفی در نظر گرفته می شود.

۹-۲ روش شمارش

۹-۲-۱ تهیه آزمون، سوسپانسیون اولیه و (قته)

با توجه به نوع فرآورده، آزمون را طبق استاندارد ملی ایران ۳۵۶: سال ۱۳۸۰ تهیه نمایید. 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. رقت های مناسب را جهت اطمینان از اینکه تمام لوله های آخرین رقت نتایج منفی خواهند داد، آماده کنید.

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

۹-۲-۲-۱ 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. ۹-۲-۲-۲ به هریک از سه لوله محیط کشت غنی کننده انتخابی با غلظت مضاعف طبق بند ۶-۲، با استفاده از یک پیپت سترون ۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه را انتقال دهید. این آزمون برابر با یک گرم نمونه در هر لوله می باشد.

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

۳-۲-۲-۹ سپس به سه لوله محیط کشت غنی کننده انتخابی با غلظت معمولی طبق بند ۶-۲ با استفاده از پیت سترون دیگری ، یک میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه را تلقیح کنید . این آزمون برابر با ۰/۱ گرم نمونه در هر لوله می باشد.

۴-۲-۲-۹ با استفاده از رقت ۰/۱ بدست آمده در بند ۹-۲-۲-۳ رقت های بعدی مانند ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ را می توان تهیه کرد . برای هر رقت از پیت سترون جدید استفاده کنید و به دقت لوله های کشت تلقیح شده را مخلوط کنید.

۵-۲-۲-۹ لوله های محیط کشت با غلظت مضاعف در بند ۹-۲-۲-۲ را و همچنین لوله های محیط کشت با غلظت معمولی در بند ۹-۲-۲-۳ و ۹-۲-۲-۴ را در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت زمان ۲۴+۲ 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 48 ± 2 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 تولید گاز ایجاد شد ، از آن به محیط EC طبق بند ۹-۲-۳ تلقیح کنید.

۳-۲-۹ کشت و گرمخانه گذاری محیط کشت انتخابی (EC)

۱-۳-۲-۹ از هر لوله محیط کشت با غلظت مضاعف طبق بند ۹-۲-۲-۵ که در آن کدورت یا گاز مشاهده می شود و از هر لوله محیط کشت با غلظت معمولی طبق بند ۹-۲-۲-۵ که فقط گاز در آن مشاهده می شود، به وسیله حلقه کشت به لوله حاوی محیط کشت EC طبق بند ۶-۳ تلقیح کنید.

۲-۳-۲-۹ لوله های تلقیح شده طبق بند ۹-۲-۳-۱ را در حمام آب گرم و یا گرمخانه در ۴۴ درجه سلسیوس به مدت 24 ± 2 ساعت قرار دهید. چنانچه در این مرحله هیچ گازی در محیط کشت EC ایجاد نشد ، گرمخانه گذاری را تا مدت زمان 48 ± 2 ساعت ادامه دهید. برای صدف های زنده ، کل دوره گرمخانه گذاری از 24 ± 2 ساعت نباید بیشتر باشد.

۴-۲-۹ تلقیح و گرمخانه گذاری آب پیتونه

با استفاده از حلقه کشت از هر لوله گرمخانه گذاری شده طبق بند ۹-۲-۳-۲ که در آن گاز مشاهده شود ، به لوله حاوی آب پیتونه که دمای آن به ۴۴ درجه سلسیوس رسیده است ، تلقیح کنید و به مدت زمان $48 + 2$ ساعت در دمای ۴۴ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری کنید.

۵-۲-۹ بررسی تولید اندول

۰/۵ میلی لیتر از معرف اندول طبق بند ۶-۵ به لوله های آب پیتونه که طبق بند ۹-۲-۴ 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.

۹-۲-۶ تفسیر نتایج

چنانچه در هر یک از لوله های تلقیح و گرمخانه گذاری شده طبق بند ۹-۲-۳ گاز مشاهده شد و در لوله های آب پیتونه طبق بند ۹-۲-۴ اندول تولید شد ، از نظر وجود اشیریشیاکلی 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

۱-۱۰ روش مستقیم

بر اساس تفسیر نتایج طبق بند ۹-۱-۶ وجود یا عدم وجود احتمالی اشیریشیاکلی را در آزمون ، بر اساس وزن در گرم ، یا حجم در میلی لیتر از نمونه مورد آزمون گزارش کنید.

۱۰-۲ روش شمارش

برای شمارش اشیریشیاکلی طبق بندهای ۱۰-۲-۱ و ۱۰-۲-۲ عمل کنید.

۱۰-۱-۱ انتخاب رقتها

۱۰-۱-۱-۱ 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 (۱/۰ و ۰/۱) را انتخاب کنید. به مثال یک از جدول یک و بند ۱۰-۲-۱-۲ مراجعه کنید.

اگر تعداد سری رقت های تهیه شده بعد از 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.

۱۰-۲-۱-۲ 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 .

۱۰-۲-۱-۳ 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 از لوله ها مثبت نباشند.
یاد آوری - سوسپانسیون اولیه و نمونه مایع نیز رقت در نظر گرفته می شود .

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

MPN		تعداد لوله های مثبت که پس از گرمخانه گذاری سه لوله تلقیح شده برای مقادیر مختلف نمونه به دست آمده است					مثال
سایر فرآورده ها	فرآورده های مایع	10^{-3} ml	10^{-2} ml	10^{-1} ml	1 ml	10 ml	فرآورده مایع
g^{-1}	ml^{-1}	$10^{-4} g$	$10^{-3} g$	$10^{-2} g$	$10^{-1} g$	1 g	سایر فرآورده ها
$1/5 \times 10^2$	$1/5 \times 10$	۰	۱	۲	۳	۳	۱
$2/4 \times 10^2$	$2/4 \times 10$	۰	۰	۳	۳	۳	۲
$7/4 \times 10$	$7/4$	۰	۱	۱	۲	۲	۳
$2/4 \times 10$	$2/4$	۰	۰	۰	۳	۳	۴
$2/1$	$2/1 \times 10^{-1}$	۰	۱	۰	۲	۲	۵

۲-۲-۱۰. مناسبه بیشترین تعداد احتمالی (MPN)

بر حسب ، تعداد نمونه های مورد آزمایش قرار گرفته به ازای هر بهر در جدول های پیوست الف ۱- و الف ۲- قابل قبول بودن لوله های مثبت را که برطبق بند ۱۰-۲-۱ 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 ، در صورتی که فقط نتایج رده یک در جدول پیوست ب قابل قبول باشد ، توالی ۲۲۱ هنگامی قابل بیان است که ۱۰ نمونه از هر بهر مورد آزمون 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 هر ردیف که بر این اساس قابل قبول محسوب می شود ، شاخص MPN را با استفاده از جدول های شرح داده شده در پیوست الف - ۱ و الف-۲ تعیین کنید.

تعداد میکروارگانیزم 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 از سری های سه تایی لوله ، اگر عدد MPN ، در هر گرم ۰/۷۴ باشد طبق پیوست الف - ۱ با حدود اطمینان ۹۵٪ ، حد پائین آن ۰/۱۳ و حد بالای آن ۲/۰۰ در هر گرم نمونه است.

مثال ۲ - چنانچه عدد MPN در هر گرم ۲۴ باشد ، طبق پیوست الف - ۱ با حدود 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:

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

۲-۱ مشخصات کامل نمونه

۳-۱ تاریخ نمونه برداری و روش استفاده شده در نمونه برداری در صورت آگاهی

۴-۱ تاریخ انجام آزمون

۵-۱ روش جستجو و شمارش طبق استاندارد ملی ایران ۲۹۴۶ : سال ۱۳۸۴

۶-۱ دمای گرمخانه گذاری

۷-۱ نتایج آزمون بدست آمده طبق بند ۱۰ استاندارد ملی ایران ۲۹۴۶ : سال ۱۳۸۴

۸-۱ تمام جزئیاتی که طبق این استاندارد ملی انجام نگرفته و می تواند بر نتایج آزمون تاثیر گذار باشد.

۹-۱ نام و نام خانوادگی و امضای آزمایش کننده

پیوست الف

جدول MPN

(الزامی)

الف. ۱. مناسبه بیشترین تعداد احتمالی (MPN) در روش سه لوله ای (۹ لوله ای) محاسبه بیشترین تعداد احتمالی در روش سه لوله ای (۹ لوله ای) طبق جدول الف - ۱ به شرح زیر انجام شود .

جدول الف - ۱. MPN برای ۱×۳ گرم (میلی لیتر)، ۱×۳/۰ گرم (میلی لیتر) و ۱×۳/۰ گرم (میلی لیتر)

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

ادامه جدول الف -۱- MPN برای ۱×۳ گرم (میلی لیتر)، ۰/۱×۳ گرم (میلی لیتر) و ۰/۰۱×۳ گرم (میلی لیتر)

۲	۱	۲	۲/۷	۰	۳	۳	۳	۳	۰/۹	۹/۴	۰/۵	۱۴/۲
۲	۲	۰	۲/۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۵	۴/۰	۰/۲	۵/۶
۱	۲	۱	۲/۸	۳	۲	۲	۲	۱	۰/۹	۹/۴	۰/۵	۱۴/۲
۲	۲	۲	۳/۵	۰	۰	۰	۰	۳	۰/۹	۹/۴	۰/۵	۱۴/۲
۲	۳	۰	۲/۹	۳	۲	۲	۲	۱	۰/۹	۹/۴	۰/۵	۱۴/۲
۲	۳	۱	۳/۶	۰	۳	۳	۳	۳	۰/۹	۹/۴	۰/۵	۱۴/۲
۳	۰	۰	۲/۳	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۵	۹/۴	۰/۳	۱۴/۲
۳	۰	۱	۳/۸	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۹	۱۰/۴	۰/۵	۱۵/۷
۳	۰	۲	۶/۴	۳	۳	۲	۲	۲	۱/۶	۱۸/۱	۱/۰	۲۵/۰
۳	۱	۰	۴/۳	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۹	۱۸/۱	۰/۵	۲۵/۰
۳	۱	۱	۷/۵	۱	۱	۱	۱	۱	۱/۷	۱۹/۹	۱/۱	۲۷/۰
۳	۱	۲	۱۲	۳	۲	۲	۲	۱	۳	۳۶	۲	۴۴
۳	۱	۳	۱۶	۰	۰	۰	۳	۳	۳	۳۸	۲	۵۲
۳	۲	۰	۹/۳	۱	۱	۱	۱	۱	۱/۸	۳۶/۰	۱/۲	۴۳/۰
۳	۲	۱	۱۵	۱	۱	۱	۱	۱	۳	۳۸	۲	۵۲
۳	۲	۲	۲۱	۲	۱	۱	۱	۱	۳	۴۰	۲	۵۶
۳	۲	۳	۲۹	۳	۳	۳	۲	۲	۹	۹۹	۵	۱۵۲
۳	۳	۰	۲۴	۱	۱	۱	۱	۱	۴	۹۹	۳	۱۵۲
۳	۳	۱	۴۶	۱	۱	۱	۱	۱	۹	۱۹۸	۵	۲۸۳
۳	۳	۲	۱۱۰	۱	۱	۱	۱	۱	۲۰	۴۰۰	۱۰	۵۷۰
۳	۳	۳	>۱۱۰									

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 روش ۵ لوله ای (۱۵ لوله ای) طبق جدول الف- ۲ به شرح زیر انجام شود.

جدول الف - ۲ - MPN برای ۵×۱ گرم (میلی لیتر)، ۵×۱/۰ گرم (میلی لیتر) و ۵×۰/۱ گرم (میلی لیتر)

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

ادامه جدول الف پ- MPN برای ۵×۵ گرم (میلی لیتر)، ۵×۱۰ گرم (میلی لیتر) و ۵×۱۰۰ گرم (میلی لیتر)

۲	۱	۰	۰/۶۸	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۱۹	۱/۷۰	۰/۱۰	۲/۳۰
۲	۱	۱	۰/۹۲	۲	۲	۱	۱	۱	۰/۳۳	۲/۲۰	۰/۲۰	۲/۸۰
۲	۱	۲	۱/۲	۰	۰	۳	۳	۳	۰/۴	۲/۵	۰/۲	۳/۴
۲	۲	۰	۰/۹۳	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۳۴	۲/۲۰	۰/۲۰	۲/۸۰
۲	۲	۱	۱/۲	۳	۳	۲	۲	۲	۰/۹	۲/۵	۰/۲	۳/۴
۲	۲	۲	۱/۴	۰	۰	۰	۰	۳	۰/۶	۳/۴	۰/۴	۴/۴
۲	۳	۰	۱/۲	۳	۲	۲	۲	۱	۰/۴	۲/۵	۰/۲	۳/۴
۲	۳	۱	۱/۴	۰	۳	۳	۳	۳	۰/۶	۳/۴	۰/۴	۴/۴
۲	۴	۰	۱/۵	۰	۳	۳	۳	۳	۰/۶	۳/۴	۰/۴	۴/۴
۳	۰	۰	۰/۷۸	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۲۱	۲/۲۰	۰/۱۲	۲/۸۰
۳	۰	۱	۱/۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۴	۲/۲	۰/۲	۲/۹
۳	۰	۲	۱/۳	۳	۳	۳	۲	۲	۰/۶	۳/۴	۰/۴	۴/۴
۳	۱	۰	۱/۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۴	۲/۵	۰/۲	۳/۴
۳	۱	۱	۱/۴	۲	۱	۱	۱	۱	۰/۶	۳/۴	۰/۴	۴/۴
۳	۱	۲	۱/۷	۳	۳	۳	۳	۲	۰/۶	۳/۴	۰/۴	۴/۴
۳	۲	۰	۱/۴	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۶	۳/۴	۰/۴	۴/۴
۳	۲	۱	۱/۷	۲	۲	۲	۱	۱	۰/۷	۳/۹	۰/۵	۵/۱
۳	۲	۲	۲/۰	۰	۳	۳	۳	۳	۰/۷	۳/۹	۰/۵	۵/۲
۳	۳	۰	۱/۷	۲	۲	۱	۱	۱	۰/۷	۳/۹	۰/۵	۵/۲
۳	۳	۱	۲/۱	۳	۳	۳	۲	۲	۰/۷	۳/۹	۰/۵	۵/۲
۳	۳	۲	۲/۴	۰	۰	۰	۳	۳	۱/۰	۶/۶	۰/۷	۹/۴
۳	۴	۰	۲/۱	۳	۳	۲	۲	۲	۰/۷	۴/۰	۰/۵	۵/۲
۳	۴	۱	۲/۴	۰	۳	۳	۳	۳	۱/۰	۶/۶	۰/۷	۹/۴
۳	۵	۰	۲/۵	۰	۰	۰	۳	۳	۱/۰	۶/۶	۰/۷	۹/۴
۴	۰	۰	۱/۳	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۴	۳/۴	۰/۳	۴/۴
۴	۰	۱	۱/۷	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۵	۳/۴	۰/۴	۴/۴
۴	۰	۲	۲/۱	۳	۲	۲	۲	۲	۰/۷	۳/۹	۰/۵	۵/۲
۴	۰	۳	۲/۵	۰	۰	۰	۰	۳	۱/۰	۶/۶	۰/۷	۹/۴
۴	۱	۰	۱/۷	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۶	۳/۹	۰/۴	۵/۱

ادامه جدول الف پ- MPN برای ۵×۱ گرم (میلی لیتر)، ۵×۱/۰ گرم (میلی لیتر) و ۵×۱/۰ گرم (میلی لیتر)

۴	۱	۱	۲/۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۷	۴/۱	۰/۵	۵/۳
۴	۱	۲	۲/۶	۳	۳	۲	۲	۲	۱/۰	۶/۶	۰/۷	۹/۴
۴	۱	۳	۳/۱	۰	۰	۰	۰	۳	۱/۰	۶/۶	۰/۷	۹/۴
۴	۲	۰	۲/۲	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۷	۴/۸	۰/۵	۶/۱
۴	۲	۱	۲/۶	۲	۱	۱	۱	۱	۱/۰	۶/۶	۰/۷	۹/۴
۴	۲	۲	۳/۲	۳	۳	۳	۲	۲	۱/۰	۶/۶	۰/۷	۹/۴
۴	۲	۳	۳/۸	۰	۰	۰	۰	۳	۱/۳	۱۰/۰	۰/۹	۱۴/۷
۴	۳	۰	۲/۷	۱	۱	۱	۱	۱	۱/۰	۶/۶	۰/۷	۹/۴
۴	۳	۱	۳/۳	۲	۲	۱	۱	۱	۱/۰	۶/۶	۰/۷	۹/۴
۴	۳	۲	۳/۹	۳	۳	۳	۳	۲	۱/۳	۱۰/۰	۰/۹	۱۴/۷
۴	۴	۰	۳/۴	۲	۲	۱	۱	۱	۱/۳	۱۰/۰	۰/۹	۱۴/۷
۴	۴	۱	۴/۰	۳	۳	۲	۲	۲	۱/۳	۱۰/۰	۰/۹	۱۴/۷
۴	۴	۲	۴/۷	۰	۰	۰	۳	۳	۱/۴	۱۱/۳	۰/۹	۱۴/۷
۴	۵	۰	۴/۱	۳	۳	۳	۳	۲	۱/۳	۱۰/۰	۰/۹	۱۴/۷
۴	۵	۱	۴/۸	۰	۰	۳	۳	۳	۱/۴	۱۱/۳	۰/۹	۱۴/۷
۵	۰	۰	۲/۳	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۷	۶/۶	۰/۵	۹/۴
۵	۰	۱	۳/۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱/۰	۶/۶	۰/۷	۹/۴
۵	۰	۲	۴/۳	۳	۲	۲	۲	۱	۰/۳	۱۰/۰	۰/۹	۱۴/۷
۵	۰	۳	۵/۸	۳	۰	۰	۳	۳	۲/۱	۱۴/۹	۱/۴	۲۰/۰
۵	۱	۰	۳/۳	۱	۱	۱	۱	۱	۱/۰	۱۰/۰	۰/۷	۱۴/۷
۵	۱	۱	۴/۶	۱	۱	۱	۱	۱	۱/۴	۱۱/۳	۰/۹	۱۴/۷
۵	۱	۲	۶/۳	۲	۲	۱	۱	۱	۲/۱	۱۴/۹	۱/۴	۲۰/۰
۵	۱	۳	۸/۴	۳	۳	۳	۳	۲	۳/۴	۱۱/۰	۲/۱	۲۷/۰
۵	۲	۰	۴/۹	۱	۱	۱	۱	۱	۱/۵	۱۴/۹	۰/۹	۲۰/۰
۵	۲	۱	۷/۰	۱	۱	۱	۱	۱	۲/۲	۱۶/۸	۱/۴	۲۳/۰
۵	۲	۲	۹/۴	۲	۲	۱	۱	۱	۳/۴	۲۲/۰	۲/۱	۲۸/۰
۵	۲	۳	۱۲	۳	۳	۲	۲	۲	۳	۲۴	۰/۹	۳۲
۵	۲	۴	۱۵	۰	۰	۰	۰	۳	۶	۳۵	۱/۴	۴۵
۵	۳	۰	۷/۹	۱	۱	۱	۱	۱	۲/۳	۲۲/۰	۲/۱	۲۷/۰

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

پیوست ب
جدول ب - 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 وجود دارد که احتمال آن کمتر از حداقل احتمال در نظر گرفته شده در این رده باشد.
۳	هنگامی که تعداد میکروارگانیسمها در فرآورده برابر MPN 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.
<p>یادآوری ۱ - 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 و سه (به جدول های الف - ۱ و الف - ۲ و جدول فوق مراجعه کنید).</p> <p>یادآوری ۲ - 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.</p>	

ICS: 07.100.30

صفحة: ٢٠
