جمهوری اسلامی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شمارهٔ استاندارد ایران

3140

روش شناسائی و شمارش پسودوموناس آئروژنیوزا

چاپ اول

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران تنها سازمانی است در ایران که بر طبق قانون میتواند استاندارد رسمی فرآورده‌ها را تعیین و تدوین و اجرای آنها را با کسب موافقت شورایعالی استاندارد اجباری اعلام نماید. وظایف و هدفهای موسسه عبارتست از:

(تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی – انجام تحقیقات بمنظور تدوین استاندارد بالا بردن کیفیت کالاهای داخلی، کمک به بهبود روشهای تولید و افزایش کارائی صنایع در جهت خودکفائی کشور– ترویج استانداردهای ملی – نظارت بر اجرای استانداردهای اجباری – کنترل کیفی کالاهای صادراتی مشمول استاندارد اجباری و جلوگیری از صدور کالاهای نامرغوب به منظور فراهم نمودن امکانات رقابت با کالاهای مشابه خارجی و حفظ بازارهای بین المللی کنترل کیفی کالاهای وارداتی مشمول استاندارد اجباری به منظور حمایت از مصرف کنندگان و تولیدکنندگان داخلی و جلوگیری از ورود کالاهای نامرغوب خارجی راهنمائی علمی و فنی تولیدکنندگان، توزیع کنندگان و مصرف کنندگان – مطالعه و تحقیق درباره روشهای تولید، نگهداری، بسته بندی و ترابری کالاهای مختلف – ترویج سیستم متریک و کالیبراسیون وسایل سنجش – آزمایش و تطبیق نمونه کالاها با استانداردهای مربوط، اعلام مشخصات و اظهارنظر مقایسه‌ای و صدور گواهینامه‌های لازم) .

موسسه استاندارد از اعضاء سازمان بین المللی استاندارد می باشد و لذا در اجرای وظایف خود هم از آخرین پیشرفتهای علمی و فنی و صنعتی جهان استفاده می نماید و هم شرایط کلی و نیازمندیهای خاص کشور را مورد توجه قرار می دهد.

اجرای استانداردهای ملی ایران به نفع تمام مردم و اقتصاد کشور است و باعث افزایش صادرات و فروش داخلی و تأمین ایمنی و بهداشت مصرف کنندگان و صرفه جوئی در وقت و هزینه ها و در نتیجه موجب افزایش درآمد ملی و رفاه عمومی و کاهش قیمتها می شود.

استاندارد روش شناسائی و شمارش پزودوموناس آئروژنیوزا
(روش غنی سازی)

رئیس

وزیری – بزرگمهر	دکترای میکروبیولوژی مواد غذائی	اداره کل نظارت بر مواد غذائی و بهداشتی – (وزارت بهداشت , درمان و آموزش پزشکی)

اعضاء

پور منصور – مهدخت	پزشک	انستیتو پاستور ایران
روحبخش	دکترای علوم آزمایشگاهی	آزمایشگاه ماد
خالقدوست – عباس		
روشن طبری – مژده	فوق لیسانس قارچ شناسی	مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
کریم – گیتی	دامپزشک	دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران گروه صنایع غذائی

دبیر

حق شناس – فریده	فوق لیسانس بیولوژی	مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

فهرست مطالب

روش شناسائی و شمارش پردوموناس آئروژینوزا (روش غنی سازی)
مقدمه
هدف و دامنه کاربرد
تعریف
اساس روش
وسایل لازم
محیطهای کشت , محلولهای رقیق کننده و معرف‌ها
نکات لازم در برداشت نمونه‌های آب
روش آزمایش
شناسائی سویه‌های نامشخص
بیان نتایج

بسمه تعالی

پیشگفتار

استاندارد روش شناسائی و شمارش پزودوموناس آئروژینوزا که به وسیله کمیسیون فنی میکروبیولوژی تهیه و تدوین شده و در نود و دومین کمیته ملی استاندارد کشاورزی و غذائی مورخ 1369/11/14 مورد تائید قرار گرفته , اینک به استناد ماده یک قانون مواد الحاقی به قانون تأسیس مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب آذرماه 1349 به عنوان استاندارد رسمی ایران منتشر می‌گردد .

برای حفظ همگامی و همآهنگی با پیشرفتهای ملی و جهانی در زمینه صنایع و علوم , استانداردهای ایران در مواقع لزوم مورد تجدید نظر قرار خواهند گرفت و هرگونه پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها برسد در هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه واقع خواهد شد .

بنابراین برای مراجعه به استانداردهای ایران باید همواره از آخرین چاپ و تجدید نظر 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 .

لذا با بررسی امکانات و مهارتهای موجود و اجرای آزمایشهای لازم این استاندارد با استفاده از منابع زیر تهیه گردیده است :

1 ـ استاندارد شماره 2325 ایران ـ آئین کاربرد روشهای عمومی آزمایش‌های میکربی مواد غذائی

2- bhadauria – R & ahrarn D. G (1980)

Loss of effetiveness of preservative systeme of mascaras with AGE
Applied and enviromental microbiology P 665- 667
3- Carson L.A.Favero.M.S bond W.W. & Petersen N.J. (1973)
Morphological, Biochemical, and Growth characteristics of pseudomonas
cepacia from distilled water applied Microbiology P 476 – 483
4- Fingold S.M martin W.J (1982)
Diagnostic Microbiology sixth edition P 254
5- International standard 8360. Part 1 – 1988
water quality – detection and enumeration of pseudomonas
Aeruginosa – method by enrichment in liquid medium
6- International standard 5667 – Part 2 (1988)
water quality – sampling – guidance on sampling techniques
7- international standard 5667 – Part 3 (1988)
Water quality – sampling – guidance on the preservation and
Handling of samples.
8- Joklik, Willett, Amos (1984)
zinsser microbiology eighteenth edition
9- Starr.M.P. (1983)
Phytopathogenic bacteria - Verlag Newyork Berlin - Heidelberg Tokyo.
10- Wilson.L.A. & ahearn D.G (1977)
Pseudomonas induced corneal ulcers associated with contaminated AGE
Mascaras American Journal of ophthalmology VOL 84-P 112 - 119

روش شناسائی و شمارش پردوموناس آئروژینوزا [1] (روش غنی سازی)

0 ـ مقدمه

پزودوموناس‌ها دسته‌ای از باکتریها هستند که بویژه با شرایط زندگی در محیطهای آبی سازگاری یافته‌اند . این باکتریها در انسان و حیوانات و گیاهان می‌توانند بیماری زا باشند .

مهم‌ترین آنها پزودوموناس آئروژینوزا است که می‌تواند به دلایل متفاوتی در آب وجود داشته و منابع آلودگی آن متغیر باشد لذا نمی‌توان از آن به عنوان نشانگر [2] آلودگی مدفوعی استفاده کرد و اهمیت وجودی آن را همیشه نمی‌توان به دقت تعیین کرد . این باکتری در افرادی که از عدسی‌های داخل چشمی استفاده می‌کنند سبب التهاب قرنیه چشم شده و نیز در افرادی که مکانیسم‌های ایمنی آنها ضعیف شده است می‌تواند ایجاد بیماری نماید .

مقاومت این باکتری در برابر شرایط کمبود مواد غذائی و همچنین ترکیبات ضد عفونی کننده باعث شده است که به صورت یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد عفونت‌های بیمارستانی درآید .

پزودوموناس آئروژینوزا و گونه‌های وابسته به آن از تعدادی از ترکیبات چهارتائی آمونیوم [3] و صابون‌های هگزاکلروفن [4] جدا شده‌اند . وجود پزدوموناس آئروژینوزا در آب آشامیدنی , آبهای پرشده در بطری استخرهای شنا و منابع آب بیمارستان‌ها و فرآورده‌های بهداشتی و آرایشی مانند شامپو ـ لوسیون‌ها ـ کرم‌ها و ریمل‌ها می‌تواند خطراتی را برای مصرف کننده بهمراه داشته باشد . به همین دلیل تدوین استاندارد روش

مرجع برای شناسائی و شمارش آن در این نوع فرآورده‌ها ضروری است .

1 ـ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد ارائه روش مرجع جهت شناسائی و شمارش پزودوموناس آئروژینوزا بروش MPN می‌باشد .
این روش به ویژه در مواردی توصیه می‌شود که تعداد قابل انتظار این باکتری در نمونه مورد آزمایش کم بوده و مقادیر بالنسبه بالائی از ماده ضد عفونی کننده بکار رفته , در نمونه باقی مانده است .

2 ـ تعریف

از نظر این استاندارد پزودوموناس آئروژینوزا باکتری است که در محیطهای کشت دارای آسپاراژین و اتانول می‌تواند رشد کرده و تولید رنگیزه[5] فلورسنت محلول در آب بنماید . این باکتریها همچنین هنگامی که در محیطهای کشت دارای شیر و آگار در 42 درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شوند پرگنه‌های مشخص تولید می‌کنند (برخی از سویه‌های ممکنست فاقد رنگیزه باشند که در این صورت شناسائی آنها طبق آزمایشهای تائیدی بند 8 این استاندارد انجام می‌گیرد .)

3 ـ اساس روش

3-1- غنی سازی ـ حجم‌های مشخصی از نمونه آب یا رقت‌های تهیه شده از نمونه مورد آزمایش به محیط کشت انتخابی افزوده شده و در شرایطی که ذکر خواهد شد گرمخانه گذاری می‌شوند .

3-2- شمارش ـ ظروف حاوی محیط کشت و نمونه کشت شده , به منظور مشاهده رشد و یا تولید رنگیزه[6] فلورسانت در

زیر نور ماوراء بنفش مورد بررسی و در صورت لزوم با روش بیشترین شمارش احتمالی [7] (MPN) مورد شمارش قرار می‌گیرد .

3-3- تائید ـ از هر یک از ظروفی که از نظر رشد و یا تولید رنگیزه فلورسانتی مثبت بوده‌اند برداشت کرده و در محیط آگار شیردار کشت داده می‌شود . پس از گرمخانه گذاری , ظروف پتری از نظر وجود پرگنه‌های مشخص پزودوموناس آئروژینوزا مورد مطالعه قرار می‌گیرند .

3-3-1- به منظور بدست آوردن کشت خالص , پرگنه‌های رشد یافته در بند 3-3 مجددا در محیط آگار شیردار کشت داده می‌شوند . هر یک از کشت‌های خالص سرانجام طبق جدول شماره یک بند 7-2 و در صورت نیاز به آزمایشهای تائیدی طبق جدول شماره 2 بند 8 مورد آزمایش قرار گیرند .

4 ـ وسایل لازم

وسایل لازم شامل وسایل معمولی آزمایشگاه میکروبشناسی باضافه لامپ ماوراء بنفش که طول موج نور ساطع شده از آن بین 20±360 نانومتر (میلی‌میکرون) باشد .

5 ـ محیطهای کشت ، محلولهای رقیق کننده و معرف‌ها

کلیه موادی که در این آزمایش‌ها بکار می‌روند باید از خلوص [8] آزمایشگاهی لازم برخوردار باشند محیطهای کشت و معرفها باید با آب مقطر تهیه گردند . در صورتی که از محیطهای کشت تجارتی استفاده می‌گردد باید طبق دستور کارخانه سازنده آماده شوند .

5-1- محلولهای رقیق‌کننده : می‌توان یکی از سه محلول رقیق کننده زیر را بکار برد .

5-1-1- آب پپتنه (آب پپتن‌دار)

5-1-1-1- ترکیب

پپتن	Peptore	۱ گرم
آب مقطر	Distilled Water	یک لیتر

5-1-1-2- طرز تهیه : پپتن را در حدود 950 میلی‌لیتر آب حل کرده و PH را در صورت لزوم با افزودن محلول سود نرمال و یا هیدروکلریک اسید نرمال در 7±0/1 تنظیم کنید . سپس حجم آب را به 1000 میلی‌لیتر رسانده و در ظرف مناسب تقسیم کنید و مدت 15 دقیقه در 121±1 درجه سلسیوس اتوکلاو نمائید .

5-1-2- آب پپتنه نمکدار

5-1-2-1- ترکیب :

پپتن	Peptone	۱ گرم
سدیم کلراید	Sodium Chloride	۸/۵ گرم
آب مقطر	Distilled Water	یک لیتر

5-1-2-2- طرز تهیه : پپتن و سدیم کلراید را در حدود 950 میلی‌لیتر آب حل کرده و مانند بند فوق آنرا تهیه کنید .

5-1-3- محلول رینگر $\frac{1}{4}$

5-1-3-1- ترکیب :

سدیم کلراید	Sodium Chloride	۲/۲۵ گرم
پتاسیم کلراید	Potassium Chloride	۰/۱۰۵ گرم
کلسیم کلراید بدون آب	Calcium Chloride Anhydrous	۰/۱۲ گرم
سدیم بی کربنات	Sodium Bicarbonate	۰/۰۵ گرم
آب مقطر	Distilled Water	یک لیتر

5-1-3-2- طرز تهیه : مواد فوق را در آب مقطر حل کرده و پس از تقسیم به حجمهای مورد نظر در اتوکلاو 1±121 درجه سلسیوس برای 15 دقیقه سترون کنید و تا موقع مصرف در یخچال نگهداری نمائید .

یادآوری ـ در مورد فرآورده‌های آرایشی و بهداشتی استفاده از رقیق کننده آب پپتنه بند (5-1-1) بهتر است .

5-2- محیطهای کشت

5-2-1- محیط غنی کننده آبگوشت آسپاراژین با اتانول [9] (محیط در یک 10)

5-2-1-1- ترکیب محیط

ترکیب		(۲) غلظت معمولی	(۳) غلظت بیشتر
دی ال آسپاراژین	DL-Asparagin	۲ گرم	۳/۲ گرم
ال پرولین	L -Proline	۱ گرم	۱/۶ گرم
دی پتاسیم هیدرژن فسفات بدون آب	Anhydrous Dipotassiun Hydrogen Phosphate	۱ گرم	۱/۶ گرم
منیزیم سولفات با ۷ ملکول آب	Magnesium Sulfate Heptahydrate	۰/۵ گرم	۰/۸ گرم
پتاسیم سولفات بدون آب	Anhydrous Potassium Sulfate	۱۰ گرم	۱۶ گرم
اتانول ۹۶ درجه	Ethanol	۲۵میلی لیتر	۴۰ میلی لیتر
آب مقطر	Distilled Water	تا یک لیتر	تا یک لیتر

2- Single Strength
3-Conentrated

5-2-1-2- طرز تهیه : کلیه مواد فوق را باستثنای اتانول در مقداری آب حل کنید .

سپس اتانول را به محیط افزوده و در ظروف درپیچ‌دار تقسیم کنید . در ظروف را کمی سفت کنید و آنها مدت 15 دقیقه در 121±1 درجه سلسیوس اتوکلاو نمائید . پس از پایان مدت و خارج کردن محیط کشت از اتوکلاو , به منظور جلوگیری از تبخیر اتانول , بی‌درنگ سرپیچ‌ها را کاملا سفت کنید .

5-2-2- محیط کشت آگار شیردار با سیتریماید [10]

5-2-2-1- ترکیب محیط : این محیط از دو بخش زیر تشکیل می‌گردد .

ترکیب		مقدار
عصاره مخمر از نوع باکتریولژیك	Bacteriological Yeast Extract	۳ گرم
پپتن از نوع باکتریولژیك	Bacteriological Peptore	۱۰ گرم
سدیم کلراید	Sodium Chloride	۵ گرم
آب مقطر	Distilled Water	تایك لیتر

مواد فوق را با هم مخلوط کرده و در بن ماری تا دمای جوش حرارت دهید پس از حل شدن مواد pH آن را بین ۷/۲ تا ۷/۴ تنظیم کرده و بمدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۱±۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو نمائید .

1- Milk Agar With Cetrimide Medium

مواد فوق را با هم مخلوط کرده و در بن ماری تا دمای جوش حرارت دهید پس از حل شدن مواد PH آن را بین 7/2 تا 7/4 تنظیم کرده و به مدت 20 دقیقه و در دمای 1±121 درجه سلسیوس اتوکلاو نمائید .

ب ـ بخش دوم محیط :

ب ـ بخش دوم محیط :

ترکیب		مقدار
آبگوشت عصاره مخمر (تهیه شده طبق جدول فوق)	Yeast Extract Broth	۲۵۰ میلی لیتر
آگار	Agar	۱۵ گرم
هگزادسیل تری متیل آمونیوم بروماید (سیتریماید)	Hexa Decyltri Methyl Ammonium Bromide (Cetrimide)	۰/۳ گرم
شیر خشک بدون چربی	Skim Milk Powder	۱۰۰ گرم
آب مقطر	Distilled Water	تا ۷۵۰ میلی لیتر

آبگوشت عصاره مخمر تهیه شده طبق بند 5-2-2-1- الف با سیتریماید و آگار مخلوط کرده و در بن ماری تا دمای جوش حرارت داده تا مواد کاملا حل شوند . (مخلوط اول)

در یک ظرف شیشه‌ای جداگانه شیر خشک بدون چربی را به آب مقطر افزوده و مخلوط کنید تا کاملا حل شود (مخلوط دوم) سپس مخلوط اول و دوم را بطور جداگانه به مدت 5 دقیقه در دمای 1±121 درجه سلسیوس اتوکلاو نمائید . به منظور پیشگیری از کار املیزه شدن شیر لازم است بلافاصله پس از پایان زمان اتوکلاو هر دو مخلوط را خارج کرده و آنها را تا دمای 50 الی 55 درجه سلسیوس سرد کنید . بعد مخلوط دوم

را با رعایت شرایط سترونی به مخلوط اول افزوده و تکان دهید تا یکنواخت شود .

5-2-2-2- آماده کردن ظروف پتری محتوی محیط آگار شیردار ـ حدود 15 میلی‌لیتر از محیط آگار شیردار آماده شده را به هر یک از ظروف پتری سترون افزوده و پس از بسته‌شدن محیط و قبل از استفاده از آن , ظروف را به مدت 30 دقیقه در دمای 50 الی 55 درجه سلسیوس بطور واژگون و با درباز و یا به مدت 2 ساعت با در باز در دمای 37 درجه سلسیوس قرار دهید تا سطح محیط خشک شود .

ظروف پتری حاوی محیط کشت را می‌توان حداکثر مدت یکماه در یخچال (4±1 درجه سلسیوس) نگهداری کرد .

6 ـ نکات لازم در برداشت نمونه‌های آب

برای نمونه‌برداری از آبهای آشامیدنی و یا نمونه‌های آب استخر , برکه‌ها و سایر آبهای بطری نشده , باید از بطری‌های شیشه‌ای سترون شده و یا ظروف پلاستیکی سترون استفاده کرد .

در هنگام نمونه‌برداری باید توجه داشت تا آلودگی ثانوی پیش نیاید و بطری‌های شیشه‌ای باید قبل از سترون شدن با آب و ماده , شوینده مناسب شسته شده و با آب مقطر آبکشی شوند . این ظروف باید در دمای خشک سترون کردن را (160 درجه سلسیوس) تحمل نمایند و در این دما نباید موادی از خود آزاد نمایند که برای رشد باکتریها باز دارنده باشند .

برای نمونه‌برداری از آبهای کلر زده شده باید پس از سترون کردن ظروف بازاء هر 125 میلی‌لیتر حجم ظرف , یک میلی‌لیتر از محلول یک درصد سدیم تیوسولفات ($Na_2S_2O_3$) سترون اضافه شود تا اثر بازدارندگی کلر را خنثی سازد .

آبهای نمونه‌برداری شده باید تا رسیدن به آزمایشگاه و پس از آن تا زمان آزمایش در دمای بین 2 تا 5 درجه سلسیوس نگهداری شوند .

لازم است که زمان بین نمونه‌برداری تا آزمایش از 6 ساعت بیشتر نباشد .

7 ـ روش آزمایش

در صورتی که شمارش باکتری مورد نظر باشد می‌توان از روش بیشترین شمارش احتمالی (MPN) سه لوله‌ای و یا 5 لوله‌ای استفاده کرد . (مراجعه به جداول انتهای استاندارد)

چنانچه شمارش مورد نظر نباشد حجم معینی از نمونه را می‌توان مستقیماً و یا با تهیه رقت به محیط غنی کننده افزود .

7–1– کشت ـ یک میلی‌لیتر از نمونه مورد آزمایش و یا رقت‌های تهیه شده از آن را به 4 میلی‌لیتر از محیط آبگوشت آسپاراژین اتانول بند 5–2–1 در لوله بیفزائید در صورتی که حجم‌های 10 میلی‌لیتری و یا 50 میلی‌لیتری مورد آزمایش قرار می‌گیرند با استفاده از ظروف بزرگتر , هم حجم نمونه مورد آزمایش از محیط آسپاراژین ـ اتانول با غلظت بیشتر (بند 5–2–1–1) به آن اضافه کنید .

7–2– گرمخانه‌گذاری ـ ظروف کشت داده شده را به مدت 48 ساعت در دمای 1±37 درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری نمائید و پس از این مدت ظروف را از نظر رشد , یا پیدایش فلوئورسانس با استفاده از لامپ ماوراء بنفش بند 3 در یک اطاق تاریک مشاهده کنید .

از هر یک از ظروف محیط غنی کننده که رشد و یا حالت فلورسانس را نشان می‌دهند یک حلقه کشت (آنس) برداشت کرده و در سطح محیط آگار شیردار بند 5–2–2 کشت داده و

ظروف پتری را در دمای 42±0/5 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت گرمخانه گذاری نمائید . پس از پایان این مدت کشت‌ها را از نظر رشد , تولید رنگیزه و ئیدرولیز کازئین (با شفاف شدن محیط شیر در پیرامون پرگنه مشخص می‌گردد) بررسی نمائید . نتایج آزمایش را مانند آنچه در جدول (شماره یک) نشان داده شده است یادداشت کنید .

جدول شماره ۱ ـ

نوع واکنش	۱	۲	۳
	مشخص	نامشخص	*
ئیدرولیز کازئین	+	+	+
رشد در ۴۲±۰/۵ درجه سلسیوس	+	+	+
پیدایش حالت فلورسانس فقط زیر نور ماوراء بنفش	+	+	−
تولید رنگیزه سبز آبی (پیوسانین)	+	−	−

+ = واکنش مثبت

− = واکنش منفی

* = باکتریهای دیگر گاهی واکنشهای نامشخصی مانند ستون 2 و 3 جدول نشان می‌دهند در چنین مواردی آزمایشهای تکمیلی به منظور شناسائی سویه‌های نامشخص طبق بند 8 این استاندارد ادامه می‌یابد :

یادآوری 1 ـ تولید رنگیزه در محیط کشت ممکنست در اثر رشد باکتریهای دیگری غیر از پزودوموناس آئروژینوزا بازداشته شود . در چنین مواردی قبل از اینکه ظروف پتری از

نظر رنگیزه مورد بررسی قرار گیرند باید در حرارت آزمایشگاه در مجاورت نور قرار گیرند .

7-3- شمارش ـ تمام ظروف محیط غنی کننده بند 5-2-1 که رشد و یا حالت فلورسانس از خود نشان داده و پس از کشت دوباره بر روی محیط آگار شیردار پرگنه‌های بدست آمده از آنها واکنشهای ستون 1 مندرج در جدول شماره یک را نشان می‌دهند به عنوان ظروف مثبت از نظر پزودوموناس آئروژینوزا تلقی می‌گردند و آنهائی که واکنش‌های ستون 2 را نشان می‌دهند به احتمال قوی پزودوموناس آئروژینوزا هستند که می‌توان آنها را نیز مانند موارد ستون 3, بر طبق بند 8 این استاندارد مورد آزمایشهای تائیدی قرار داد .

8 ـ شناسائی سویه‌های نامشخص

در صورت لزوم می‌توان سویه‌های بدون رنگیزه را مورد آزمایشهای تائیدی قرار داد . برای این منظور یک پرگنه مشخص و جدا شده بر روی محیط آگار شیردار را انتخاب کرده و آزمایشهای تائیدی مندرج در جدول شماره 2 را بر روی آن انجام دهید .

جـــــــــــــدول شماره ۲

آزمایش	واکنش	آزمایش	واکنش
رنگ آمیزی گرم	باکتریهای میله ای شکل و گرم منفی بدون هاگ	احیاء نیترات	(۱) + نیتریت ها شکسته شده وآمونیاك تولید میشود .
حرکت	+	ذوب ژلاتین	+
اکسیداز	+	هیدرولیز کازئین	+
کاتالاز	+	هیدرولیز نشاسته	–
رشد در۴۲ درجه سلسیوس	+ +	تولید ایندوسیانین	+ در ۹۰درصد سویه ها
رشد در ۴ درجه سلسیوس	–	ال – آرژینین دی – هیدرولاز	+ در۹۹درصد سویه ها
محیط HUGH& LIEFSON (O-F) (۲)	(اکسیداتیو)O	ال – اورنیتین دکر – بوکسیلاز	– در۰۰ درصدسویه ها
تولید هیدروژن سولفوره درمحیط کلیکلرآهن دار (۲)	–		

۱ – بعضی از سویه ها احیاء نیترات را تا حد تولید گاز پیش میبرند که باید باافزودن پودر روی ، مثبت بودن آزمایش را نشان داد .

2- (O-F) = Oxidation-fermentation

9 ـ بیان نتایج

با استفاده از جدول بیشترین تعداد احتمالی (MPN) و آن تعداد از ظروف محیط غنی کننده و آزمایشهای تائیدی که از نظر وجود پزودوموناس آئروژینوزا مثبت بوده‌اند , بیشترین تعداد احتمالی این باکتری را در 100 میلی‌لیتر از آب یا نمونه مورد آزمایش محاسبه کنید .

در صورتی که شمارش مورد نظر نباشد می‌توان نتایج را به صورت وجود یا عدم این باکتری در 100 میلی‌لیتر از نمونه

ذکر کرد . در مواردی که حجم‌های بیشتری مورد آزمایش قرار گیرد مانند آبهای پر شده در بطری , نتایج آزمایش باید با ذکر حجم نمونه همراه باشد .

1- Pseudomonas aeruginosa

2- Indicator

3- Quaternary Ammonium Compounds

4- Hexachlorophene Soaps

5- Pigment

6- MOST PROBABLE NUMBER

7- MOST PROBABLE NUMBER

8- Analytical Reagent Quality

9- Aspargin Broth With (Drake , s Medium 10)
Ethanol

10- Milk Agar With Cetrimide Medium

ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI NUMBER

3140

Detection and enumesation of pseuds monas aeruginosa - Method by enrichment in liquid medium

1st Edition