جمهوری اسلامی ایران

Islamic Republic of Iran

سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI

13321-3

1st.Edition

استاندارد ملی ایران

۱۳۳۲۱-۳

چاپ اول

کمپوست- ویژگی های میکروبی و روش های آزمون- قسمت۳ : ویژگی ها و روش های آزمون کلی فرم های مدفوعی

Compost – Microbial specification and test methods – Part 3 : Specification and test methods of fecal coliforms

ICS:07.100.99;13.030;65.080

به نام خدا

آشنایی با سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استاندارد های ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان سازمان*، صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع، شامل تولید کنندگان، مصرف کنندگان، صادر کنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود. پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظر خواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذی صلاح و با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند درکمیته ملی طرح و بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شوند که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی شماره ۵ تدوین ودر کمیته ملی استاندارد مربوط که سازمان استاندارد تشکیل می دهد به تصویب رسیده باشند.

سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)[1]، کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک(IEC)[2] و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML) [3]است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی(CAC) [5]در کشور فعالیت می کند. در تدوین استاندارد های ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور، از آخرین پیشرفت های علمی ، فنی و صنعتی جهان و استاندارد های بین المللی بهره گیری می شود.

سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای 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 استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و / یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد اجباری نماید.سازمان می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی ودرجه بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمان ها و موسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، سازمان استاندارد این گونه سازمان ها و موسسات را بر اساس ضوابط نظام تایید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تایید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آنها نظارت می کند. ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استاندارد های ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

---

* سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

1- International Organization for Standardization
2- International Electrotechnical Commission
3- Organization International de Metrologie Legal (International Organization for Legal Metrology)
4-Contact Point
5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

" کمپوست – ویژگی های میکروبی و روش های آزمون –

قسمت ۳ : ویژگی ها و روش های آزمون کلی فرم های مدفوعی "

رئیس:	**سمت و/ یا نمایندگی**
قزوینی، کیارش	عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی
(دکترای میکروبیولوژی)	درمانی خراسان رضوی
دبیران:	
آرین نژاد ، محمد رضا	کارشناس آزمایشگاه کارخانه کمپوست
(لیسانس علوم آزمایشگاهی)	سازمان بازیافت و تبدیل مواد شهرداری مشهد
رضائی، الهام	مسئول واحد ساماندهی پسماندهای صنعتی وپزشکی
(فوق لیسانس شیمی آلی)	سازمان بازیافت و تبدیل مواد شهرداری مشهد
عابدینی طرقبه ، جواد	مسئول آزمایشگاه کارخانه کمپوست
(دانشجوی دکترای شیمی آلی)	سازمان بازیافت و تبدیل مواد شهرداری مشهد
اعضا: **(اسامی به ترتیب حروف الفبا)**	
آدینه نیا ، علی	معاون فنی و عمران سازمان بازیافت و تبدیل مواد شهرداری مشهد
(لیسانس برق و الکترونیک)	
اسماعیلی شاندیز، احمد	کارشناس استاندارد و تحقیقات صنعتی خراسان رضوی
(لیسانس مهندسی کشاورزی)	
بحرینی ، معصومه	عضو هیات علمی دانشگاه فردوسی مشهد
(فوق لیسانس میکروبیولوژی)	
سهرابی، محمد	مشاور سازمان بازیافت و تبدیل مواد شهرداری مشهد
(فوق لیسانس مهندسی صنایع غذایی)	
جاوید ، نصر ا...	مدیرکارخانه کمپوست سازمان بازیافت و تبدیل مواد شهرداری مشهد
(لیسانس طراحی صنعتی)	
عباسی ، صغری	مسئول آزمایشگاه میکروبیولوژی اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی
(دکترای عمومی پزشکی)	استان خراسان رضوی
نجف پور ، علی اصغر	عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی
(دکترای بهداشت محیط)	استان خراسان رضوی
نجفی ، علی	مدیر عامل سازمان بازیافت و تبدیل مواد شهرداری مشهد
(لیسانس جغرافیا)	
یاور منش ، مسعود	عضو هیات علمی دانشگاه فردوسی مشهد
(دکترای میکروبیولوژی مواد غذایی)	

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
آشنایی با موسسه استاندارد	ج
کمیسیون فنی تدوین استاندارد	د
پیش گفتار	و
۱ هدف و دامنه کاربرد	۱
۲ مراجع الزامی	۱
۳ اصطلاحات و تعاریف	۲
۴ ویژگی ها	۳
۵ ایمنی	۳
۶ نمونه برداری	۴
۷ اصول آزمون	۷
۸ روش انجام آزمون	۱۸
۹ تجزیه داده ها و محاسبات	۲۱
۱۰ کالیبراسیون تجهیزات و استاندارد سازی	۲۷
۱۱ روش محک نمونه	۲۷
۱۲ کنترل کیفیت	۳۵
۱۳ پیشگیری از آلودگی و مدیریت پسماند	۳۹
پیوست الف (الزامی) شکل ها	۴۰
پیوست ب (اطلاعاتی)فهرست کتابشناسی	۴۵

پیش گفتار

استاندارد " کمپوست – ویژگی های میکروبی و روش های آزمون – قسمت ۳: ویژگی ها و روش های آزمون کلی فرم های مدفوعی " که پیش نویس آن در کمیسیون های مربوط تهیه و تدوین شده و در دویست و هفتاد و دومین اجلاس کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی و بیولوژی مورخ ۱۳۸۹/۱۱/۲۵ مورد تصویب قرار گرفته است ، اینک به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات سازمان 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 ، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر گونه پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استاندارد ها ارائه شود ، هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت . بنابراین باید همواره از آخرین تجدید نظر استانداردهای ملی استفاده کرد .

منبع و ماخذی که برای تهیه این استاندارد بکار رفته به شرح ذیل است :

- US EPA , Method 1680 , July 2006 , Fecal Coliform in Swage Sludge (Biosolids),by Multiple – Tube Fermentation using Lauryl Tryptose Broth (LTB)and EC Medium.

کمپوست– ویژگی های میکروبی و روش های آزمون–

قسمت ۳ : ویژگی ها و روش های آزمون کلی فرم های مدفوعی

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد تعیین ویژگی ها، روش های نمونه برداری وآزمون کلی فرم های مدفوعی در کمپوست با استفاده از روش تخمیر چند لوله ای برای جداسازی و شمارش است که به روش MPN[1] نیز مشهور است.
این استاندارد در مورد شناسایی وشمارش کلی فرم های مدفوعی در کمپوست و تقسیم بندی آن به درجه یک و درجه دو برای مصارف زراعی و کشاورزی کاربرد دارد.

۲ مراجع الزامی

مدارک زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد ملی به آن ها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد ملی محسوب می شود.
در صورتی که به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه هاو تجدید نظرهای بعدی آن مورد نظر این استاندارد ملی ایران نیست و در مورد مدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدید نظر و اصلاحیه های بعدی آن ها مورد نظر است.
استفاده از مراجع زیر برای این استاندارد الزامی است:

۲-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ سال ۱۳۸۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام – راهنمای الزامات کلی برای آزمون
۲-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۷۱۶، سال ۱۳۸۷، کمپوست – ویژگی های فیزیکی و شیمیایی
۲-۳ استاندارد ملی ایران شماره۱-۱۳۳۲۱ ، سال ۱۳۹۰ ،کمپوست ویژگی های میکروبی و روش های آزمون- قسمت ۱: ویژگی های عمومی
۲-۴ استاندارد ملی ایران شماره ۲-۱۳۳۲۱،سال۱۳۹۰ ،کمپوست ویژگی های میکروبی و روش های ازمون- قسمت ۲:ویژگی ها و روش های آزمون سالمونلا

۳ اصطلاحات و تعاریف

1- Most Probable Number

در این استاندارد اصطلاحات و تعاریف زیر به کار می رود:

۳-۱

کلی فرم مدفوعی

کلی فرم های مدفوعی باکتری هایی گرم منفی، بدون اسپور، میله ای شکل هستند که در روده ها و مدفوع انسان و سایر حیوانات خونگرم یافت می شوند. مهمترین کلی فرم مدفوعی اشرشیاکلی است.

۳-۲

کمپوست

برای تعریف کمپوست به استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۷۱۶، کمپوست – ویژگی های فیزیکی و شیمیایی مراجعه کنید.

۳-۳

روش تهی[1]

آزمونه ای از آب مقطر سترون که دقیقاً مانند یک نمونه در شرایط شیشه های آزمایشگاهی، تجهیزات، محیط کشت و روش های آزمون کاربردی در مورد نمونه ها قرار می گیرد. روش تهی برای تصدیق سترون بودن تجهیزات، مواد و مواد اولیه به کار می رود.

۳-۴

کنترل منفی

یک کشت کنترلی، که وقتی دقیقاً مانند نمونه میدانی آزمون شود ، نتیجه مشخص منفی برای یک روش آزمون با یک نوع محیط کشت تولید می کند.

۳-۵

کنترل مثبت

یک کشت کنترلی، که وقتی دقیقاً مانند نمونه میدانی آزمون شود، نتیجه مشخص مثبت برای یک روش آزمون با یک نوع محیط کشت تولید می کند.

۳-۶

1-Blank method

محیط کشت انتخابی

محیط کشتی است که رشد میکروارگانیسم های ناخواسته را متوقف و رشد میکروارگانیسم مورد نظر را تسریع کند.

۷-۳

نمونه های جامد

نمونه ای که بیش از ۷ درصد مواد جامد بر پایه وزن خشک داشته باشند.

۴ ویژگی ها

میزان کلی فرم های مدفوعی در کمپوست درجه یک باید کمتر از MPN ۱۰۰۰ در گرم براساس وزن خشک و در کمپوست درجه دو کمتر از MPN ۲×۱۰^{۶} در گرم بر اساس وزن خشک باشد. سایر ویژگی های میکروبی در استاندارد ملی ایران شماره۱-۱۳۳۲۱ ،کمپوست – ویژگی های میکروبی و روش های آزمون- قسمت ۱ : ویژگی های عمومی و استاندارد ملی ایران شماره۲-۱۳۳۲۱ ،سال۱۳۹۰ ،کمپوست ویژگی های میکروبی و روش های آزمون- قسمت ۲:ویژگی ها و روش های آزمون سالمونلا بیان شده است.

یادآوری – از آنجایی که زمانی که جدول MPN بر اساس توزیع پوآسون[1] تنظیم شده است، اگر نمونه به طور مناسب جهت اطمینان از توزیع باکتری ها قبل از تقسیم ، مخلوط نشده باشد ، مقدار MPN بدست آمده صحیح نخواهد بود.

۵ ایمنی

۵-۱ کاربر باید آموزش های مرتبط با روشهای ایمنی مورد نیاز در آزمایشگاه میکروبیولوژی از جمله آماده سازی و استفاده از محیط های کشت، معرف ها، مواد و واکنشگرها و همچنین نحوه بکارگیری تجهیزات سترون سازی را فرا گرفته باشد.

۵-۲ کارکنان آزمایشگاه و نمونه برداران در معرض برخی خطرات از جمله آلودگی با میکروارگانیسم های بیماری زا قرار دارند. از اینروی باید روشهای ایمنی برای مقابله با میکروارگانیسم های بیماری زا و نقل و انتقال نمونه ها را رعایت کنند.

۵-۳ استفاده از دهان برای مکیدن پیپت ممنوع است.

1-Poisson distrribution

۵-۴ در این استاندارد تمام موارد ایمنی و کاربرد آنها قید نشده و مسئولیت ایجاد ایمنی مناسب و موازین بهداشتی قبل از انجام آزمون ها با آزمایشگاه است. برای اطلاعات بیشتر در مورد وسایل و نکات ایمنی به استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹: سال ۱۳۸۶مراجعه کنید.

۶ نمونه برداری

۶-۱ بهترین محل نمونه برداری انتهای فرآیند تولید، از روی نوار نقاله، توده های کمپوست و توده های انبار شده است.

۶-۲ جمع آوری نمونه در ظروف سترون و غیر سمی از جنس شیشه یا پلاستیک و دارای درب بدون نشت، صورت پذیرد. همه تجهیزات نمونه برداری باید تمیز و سترون باشند.

۶-۳ وسایل و تجهیزات نمونه برداری

۶-۳-۱ کیسه های پلاستیکی سترون به ظرفیت حدود ۴ کیلوگرم
۶-۳-۲ ظروف شیشه ای یا پلاستیکی درب دار سترون
۶-۳-۳ مته نمونه برداری سترون
۶-۳-۴چمچه سترون(از چمچه منحنی (کج بیل) استفاده نشود)
۶-۳-۵ یخدان
۶-۳-۶ یخ
۶-۳-۷ یخ های بسته بندی[1]
۶-۳-۸ بیلچه های باغبانی سترون
۶-۳-۹ فویل آلومینیوم سترون یا کاغذ کرافت[2]
۶-۳-۱۰ محفظه سترون مثل سطل از جنس فولاد ضد زنگ یا پلاستیکی متناسب برای جمع آوری نمونه ها
۶-۳-۱۱ بیل تخت

۶-۴ روش تمیز کردن وسایل و ظروف

۶-۴-۱ ابتدا ظروف نمونه گیری را با شوینده ها و آب بشویید.
۶-۴-۲ با آب شهری آبکشی کنید.

1- Ice pack

2 - Kraft paper

۶-۴-۳ با HCl ۱۰٪ شستشو دهید.

۶-۴-۴ با آب مقطر شستشو دهید.

۶-۴-۵ در معرض هوا خشک کنید.

۶-۴-۶ به وسیله فویل بسته بندی و در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای $121^{\circ}C$ قرار داده شود (فشار PSI ۱۵).

۶-۵ روش نمونه گیری از هاضم[1]

۶-۵-۲ لوله خروجی را از کمپوست قدیمی تخلیه کنید واجازه دهید به کمک جریان خروجی کمپوست به محفظه یا دستگاه جمع آوری کننده، درجه حرارت آن تا حد درجه حرارت هاضم افزایش پیدا کند.

۶-۵-۲ بوسیله یک کیسه نایلونی به ظرفیت حدود ۴ کیلو گرم، نمونه کمپوست را از لوله خروجی جمع آوری و بدون تماس نمونه با سایر قسمت های کیسه به جز قسمت داخلی آن ، بسته بندی کنید . دقت شود حتماً حدود ۱٫۳ سانتی متر فضای خالی در بسته بندی برای تولید گاز در نظر گرفته شود.

یاد آوری – زمانیکه از کمپوست هاضم بی هوازی نمونه گیری می شود، باقی گذاشتن فضای خالی اهمیت بیشتری می یابد.

۶-۶ روش نمونه برداری از نوار نقاله خروجی

۶-۶-۱ با استفاده از بیلچه سترون نمونه را مستقیماً از نوار نقاله در ظرف سترون جمع آوری و بدون مخلوط کردن و آلودگی با دیگر نقاط در ظروف سترون بسته بندی کنید. باقی گذاشتن فضای خالی در بسته بندی برای تولید گاز ضروری نیست.

۶-۷ روش نمونه برداری از توده های کمپوست ، بار کامیون یا موارد مشابه

۶-۷-۱ مواد سطحی را تا عمق حدود ۱۵ سانتی متر کنار بزنید و سپس مواد زیرین را برای نمونه برداری به ۴ قسمت مساوی[2] تقسیم کنید.

۶-۷-۲ با استفاده از یک بیلچه سترون نمونه برداری کنید. در صورتیکه ارتفاع توده زیاد باشد از یک مته سترون یا لوله تو خالی استفاده کنید.

۶-۷-۳ از هر ۴ قسمت جداگانه نمونه بگیرید و در ظرف سترون جمع کنید.

۶-۷-۴ بعد از اینکه همه نمونه ها برداشته شد، به یک سطح سترون منتقل و با چند بار برگردانیدن، آنها را کاملاً مخلوط کنید.

1- Digester

2- Quadrants

۶-۷-۵ حجم نمونه را بوسیله مخروط سازی و چهار قسمت کردن کاهش دهید. اگر هنوز حجم نمونه بزرگ است هر یک از چهار قسمت را نیز به چهار قسمت دیگر تقسیم کنید و نیمی از آنها را حذف کنید. نمونه را در داخل ظروف شیشه ای یا پلاستیکی قرار دهید.

۶-۷-۶ روش جایگزین برای بند ۶-۷-۵ این است که به طور تصادفی با یک بیل تخت از توده کمپوست که روی یک سطح سترون کاملاً مخلوط شده، نمونه برداری و در ظرف سترون قرار دهید. از آنجایی که مته های خمیده ذرات با اندازه خاص را نمونه برداری می کنند، استفاده از آنها توصیه نمی شود.

۶-۸ موارد زیر را در دفتر ثبت کنید:

۶-۸-۱ نام و موقعیت محل نمونه برداری

۶-۸-۲ تاریخ

۶-۸-۳ زمان ورود

۶-۸-۴ نام و شماره تماس واحد تولید کننده اولیه

۶-۹ موارد زیر را روی ظرف نمونه درج و سپس در دفتر ثبت کنید:

۶-۹-۱شماره نمونه

۶-۹-۲ تاریخ و زمان نمونه برداری

۶-۹-۳ نام نمونه بردار

۶-۹-۴ محل نمونه برداری

۶-۹-۵ عواملی از جمله نوع آزمون، اندازه گیری های میدانی، pH و دما

۶-۹-۶ حجم

۶-۹-۷ مشاهدات

۶-۱۰ انتقال نمونه

نمونه های کمپوست جهت آزمایش باکتری شناسی در طول انتقال به آزمایشگاه باید در دمای کمتر از $۱۰^{\circ}C$ نگهداری شوند و نباید منجمد شوند. برای اطمینان از دمای انبارش نمونه ها باید در ظروف عایق شده قرار داده شوند .بلافاصله نمونه ها را در یخچال قرار دهید و در اولین فرصت آزمایش را انجام دهید. دقت کنید قبل از آزمایش درجه حرارت نمونه به دمای محیط رسیده باشد.

۶-۱۱ زمان نگهداری و محدودیت دما

این روش فقط در مورد نمونه های مربوط به شمارش کلی فرم مدفوعی کمپوست درجه یک هضم شده هوازی و درجه دو و کمپوست هضم شده بی هوازی درجه دو، مجاز است نمونه ها قبل از انجام آزمایش حداکثر تا۲۴ ساعت نگهداری شوند در

مورد بقیه نمونه ها آزمون باید حداکثر تا ۸ ساعت بعد از نمونه برداری انجام شود، که حداکثر ۶ ساعت زمان برای انتقال نمونه و۲ ساعت برای آماده سازی نمونه ها می باشد. نمونه ها باید تا زمان آزمون در دمای کمتر از $۱۰^{0}C$ نگهداری در عین حال نباید منجمد شوند.

یاد آوری – روش های انتقال و زمان نگهداری نمونه ها لازم الاجرا هستند. در غیر اینصورت نتایج بدست آمده معتبر نمی باشد.

۷ اصول آزمون

ابتدا در مرحله آزمون احتمالی[۱] مقدار مشخصی از نمونه در محیط کشت LTB[۲] تلقیح و بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در^{o}C ۳۵، در صورت رشد میکروبی و تولید گاز از این محیط به محیط کشت EC[۳] تلقیح می شود. در مرحله آزمون تاییدی در نمونه مثبت رشد میکروبی و تولید گاز در محیط EC مشاهده می شود. برای مرحله تایید ، از آزمونهای بیوشیمیایی اختصاصی شامل: سیتوکروم اکسیداز [۴]، سیترات[۵]، تخمیر لاکتوز، ایندول[۶]، هیدرولیزONPG[۷]، متیل رد[۸]و ووگس-پروسکار[۹] استفاده می شود. تعداد کلی فرم مدفوعی به صورت MPN/g بر اساس وزن خشک[۱۰] محاسبه و گزارش می شود.

۷-۱ مواد و شناساگرها

یاد آوری ۱ – باید در تمامی آزمون ها از معرف های با درجه آزمایشگاهی استفاده شود. آگار مورد مصرف برای آماده سازی محیط کشت نیز باید برای مصارف میکروبیولوژی مناسب باشد.

یاد آوری ۲ – تا حد امکان از محیط کشت های تجاری استفاده شود . درجه حرارت نگهداری، زمان مصرف محیط ها و معرف ها در جدول ۱ بند۷-۱-۹ مشخص گردیده است.

یاد آوری ۳ – آب مقطر مورد مصرف باید درجه آزمایشگاهی مطابق با استانداردهای ایران شماره۹۸۹۹ سال ۱۳۸۶، در خصوص آب مورد مصرف در آزمایشگاه، داشته باشد.

۷-۱-۱ محلول ذخیره با فرفسفات رقیق کننده

1- Pressumptive
2-Lauryl Tryptose Broth
3-EC Medium
4-Cytochrome oxidase
5- Citrate
6- Indol
7- σ-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside
8- Methyl-Red
9- Voges-Proskauer
10- Dry Weight

۳۴ گرم مونو پتاسیم دی هیدروژن فسفات را در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید. بوسیله محلول سود یک نرمال pH را در حد ۷/۲ تنظیم کنید و حجم را بوسیله آب مقطر به یک لیتر برسانید. سپس در دمای$۱۲۱^{\circ}C$ و فشار PSI ۱۵به مدت ۱۵ دقیقه توسط اتوکلاو یا بوسیله عبور دادن از فیلتر ۰/۲۲میکرومتر سترون کنید.

۷-۱-۲ محلول ذخیره کلرید منیزیم

۳۸ گرم کلرید منیزیم بی آب ($MgCl_2$) یا ۸۱/۱ گرم منیزیم کلرید ۶ آبه ($MgCl_2.6H_2o$) را به یک لیتر آب مقطر بیافزایید و در درجه حرارت $۱۲۱^{\circ}C$ و فشار PSI ۱۵ به مدت ۱۵ دقیقه توسط اتوکلاو با بوسیله عبور دادن از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر سترون کنید.

یادآوری : محلول های آماده را بعد از سترون سازی، تا زمان مصرف در یخچال نگهداری کنید .درصورت مشاهده کپک یا سایر موارد آلودگی، محلول جدیدی تهیه کنید .

۷-۱-۳ محلول کاری بافر فسفات رقیق کننده

۱/۲۵ میلی لیتر از محلول ذخیره بافرفسفات را با ۵ میلی لیتر از محلول ذخیره منیزیم کلرید در یک لیتر آب مقطر مخلوط، در حجم های مشخص و مناسب برای استفاده رقیق سازی یا بافر تقسیم و در اتو کلاو در دمای $۱۲۱^{\circ}C$ و فشار ۱۵PSI به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید. pH نهایی باید۷±۰/۲ باشد.

یاد آوری۱- مدت زمان سترون سازی در اتو کلاو باید متناسب با حجم بافر در محفظه ها و اندازه بار باشد.

یاد آوری۲- برای سترون سازی، لوله های آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر محلول رقیق کننده را داخل یک محفظه قابل سترون با مقدار کمی آب برای کاهش تبخیر و جلوگیری از شکستگی لوله ها جاسازی کنید.

۷-۱-۴ محیط کشت LTB

۷-۱-۴-۱ترکیب

تریپتوز	۲۰/۰ g
لاکتوز	۲۵/۰ g
دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4)	۲/۷۵ g
مونوپتاسیم هیدروژن فسفات (KH_2PO_4)	۲/۷۵ g
سدیم کلراید ($NaCl$)	۵/۰ g
سدیم لوریل سولفات	۰/۱ g
آب مقطر	۱/۰ L

۷-۱-۴-۲ برای تهیه محیط کشت LTB با غلظت معمولی (۱X) مواد بالا را به یک لیتر آب مقطر اضافه و بوسیله حرارت دادن حل کنید. به کمک اسید کلریدریک نرمال یا سدیم هیدروکسید نرمال، pH را در حدود ۰/۲ ± ۶/۸تنظیم کنید.
حجم های ۱۰ میلی لیتری از محیط کشت را در لوله های آزمایش با ابعاد ۱۵۰×۲۵ میلی متر که هر کدام دارای یک لوله دورهام وارونه است، توزیع و در دمای $121^{\circ}C$ و فشار PSI ۱۵ به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو سترون کنید لوله های دورهام باید حاوی محیط کشت و فاقد حباب هوا باشند. این محیط کشت برای حجم های تلقیح کمتر یا مساوی یک میلی لیتر به کار برده می شود.

۷-۱-۴-۳ محیط کشت LTB با غلظت دو برابر (۲X)، مطابق بند ۷-۱-۴-۲ تهیه می شود، با این تفاوت که به جای یک لیتر ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر استفاده می شود.

یادآوری- محیط کشت LTB (۲X) به این جهت برای تلقیح های ۱۰ میلی لیتری لازم است که از رقیق شدن بیش از حد محیط کشت جلوگیری شود.

۷-۱-۵ محیط کشت EC

۷-۱-۵-۱ ترکیب

تریپتوز یا تریپتیکاز	۲۰/۰ g
لاکتوز	۵/۰ g
مخلوط نمک های صفراوی یا نمک صفراوی شماره ۳	۱/۵ g
دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4)	۴۴/۰ g
مونوپتاسیم هیدروژن فسفات (KH_2PO_4)	۱/۵ g
سدیم کلراید	۵ /۰ g
آب مقطر	۱/۰ L

۷-۱-۵-۲ پس از افزودن مواد به یک لیتر آب مقطر آنها را مخلوط و به کمک حرارت کاملاً حل کنید. در صورت نیاز بوسیله اسید کلریدریک نرمال یا سدیم هیدروکسید نرمال، pH را درحد ۰/۲±۶/۹ تنظیم کنید. قبل از سترون کردن۱۰میلی لیتر از محیط کشت را در لوله های آزمایش با ابعاد۱۵۰×۱۶میلی متر که هرکدام دارای یک لوله دورهام وارونه هستند، توزیع کنید . پس از بستن درب، آنها را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای $121^{\circ}C$ و فشار PSI ۱۵ اتوکلاو کنید. لوله های دورهام باید حاوی محیط کشت و فاقد حباب هوا باشند.

۷-۱-۶ آگار عصاره قلب [1]

1- Heart Infusion Agar

۷-۱-۶-۱ ترکیب

عصاره ۵۰۰ گرم از گوشت قلب گوساله	۱۰/۰ g
باکتوتریپتوز	۱۰/۰ g
سدیم کلراید	۵/۰ g
باکتو آگار	۱۵/۰ g
آب مقطر	۱/۰ L

۷-۱-۶-۲ پس از افزودن مواد به یک لیتر آب مقطر آنها را مخلوط و به کمک حرارت کاملاً حل کنید. بوسیله اسید کلریدریک نرمال یا سدیم هیدروکسید نرمال، pH را در حد ۰/۲±۷/۴ تنظیم کنید. به مدت ۱۵ دقیقه در $121^{0}C$ اتوکلاو و در پلیت های سترون با ابعاد ۱۰۰×۱۵ میلی متر ریخته شود قبل از تلقیح، دمای محیط کشت به دمای اتاق برسد. به منظور تضمین کیفیت طبق بند ۱۲ علاوه بر محیط کشت های فوق از سایر محیط کشت ها نیز می توان استفاده کرد.

۷-۱-۷ کنترل مثبت

۷-۱-۷-۱ یک کشت ذخیره از اشرشیاکلی ATCC #۲۵۹۲۲ را به عنوان کنترل مثبت برای ارزیابی محیط های کشت LTB و EC در نظر بگیرید.

یادآوری- بیش از ۵ انتقال از کشت اولیه انجام نشود. این کار آلودگی ثانویه را در طول انتقال و تعویض ژنتیکی کشت به حداقل می رساند. از این رو توصیه می شود که در زمان دریافت سویه اولیه باکتری، برای کارهای بعدی تعدادی در درجه حرارت ۲۰- درجه نگهداری شود.

۷-۱-۸ کنترل منفی

۷-۱-۸-۱ یک کشت ذخیره از انتروباکترآئروژنز ATCC #۱۳۰۴۸ را به عنوان کنترل منفی برای ارزیابی محیط کشت EC تهیه کنید.

۷-۱-۸-۲ یک کشت ذخیره پسودوموناس ATCC #۲۷۸۵۳ را به عنوان کنترل منفی برای ارزیابی محیط کشت LTB تهیه کنید.

۷-۱-۹ دما و زمان نگهداری معرف ها و محلول ها در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- زمان نگهداری برای محیط و معرف های آماده

محیط ها و شناساگرها	زمان ماندگاری
EC,LTB,HIA آگار یا براث (لوله با درب شل)	۲ هفته
EC,LTB,HIA آگار یا براث(لوله با درب محکم)	۳ ماه
پلیت های آگار آماده (پلیت به حالت وارونه نگهداری شود)	۲ هفته

حجم زیاد آگار (فلاسک با درب محکم یا بطری)	۳ ماه
یادآوری- در صورتی که محیط های کشت، مواد و شناساگرها در یخچال نگهداری می شوند ، قبل از تلقیح باید به دمای اتاق برسند. برای اطمینان از رسیدن به دمای اتاق قبل از استفاده ، آنها را حداقل ۱ تا ۱/۵ ساعت قبل از آزمون از یخچال خارج کنید .	

۷-۲ وسایل و تجهیزات

از وسایل و تجهیزات موجود در آزمایشگاه میکروبیولوژی مطابق استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹ و همچنین از وسایل زیر استفاده کنید:

۷-۲-۱ بطری های بروسیلیکات با درب پیچی ، با زینه تا۹۹ میلی لیتر یا لوله های شیشه ای بروسیلیکات یا پلاستیکی درب پیچی، دارای زینه تا ۹ میلی لیتر

۷-۲-۲ لوله های شیشه ای بروسیلیکات با ابعاد ۱۶×۱۵۰ میلی متر و درب آلومینیومی، فولاد ضد زنگ یا هرگونه درب قابل اتو کلاو شدن

۷-۲-۳ لوله های دورهام یا ویال بروسیلیکات با ابعاد ۱۰×۷۵میلی متر

۷-۲-۴ لوله های شیشه ای بروسیلیکات با ابعاد ۱۶×۱۰۰ میلی متر و درب پلاستیکی پیچی قابل اتو کلاو شدن

۷-۲-۵ جا لوله ای برای نگهداری لوله ها

۷-۲-۶ جا پیپتی از جنس فولاد ضد زنگ، آلومینیوم یا شیشه بروسیلیکات برای پیپت های شیشه ای

۷-۲-۷ پیپت سترون شیشه ای یا پلاستیکی سرگشاد با حجم های مناسب

۷-۲-۸ پیپت حباب دار یا پیپتور اتوماتیک

۷-۲-۹ لوپ های تلقیح پلاتینی، با حداقل قطر ۳ میلی متر ، یا لوپ های سترون پلاستیکی

۷-۲-۱۰ چوب اپلیکاتور سترون یکبار مصرف

۷-۲-۱۱ چراغ آزمایشگاهی[1] یا چراغ الکلی

۷-۲-۱۲ سرنگ کورن وال سترون[2] برای برداشت حداقل ۵ میلی متر

۷-۲-۱۳ پمپ پخش محیط های کشت

۷-۲-۱۴ انکوباتور میکروبیولوژیکی با عایق آب و هوا، رطوبت کنترل شده و قابلیت تنظیم درجه حرارت در ۳۵°C±۰/۵°C

۷-۲-۱۵ بن ماری درپوش دار با سیستم سیرکوله و حداقل حرارت ۴۴/۵ °C±۰/۲ °C

۷-۲-۱۶ پلیت پلاستیکی سترون میکروبیولوژی در ابعاد ۱۰۰×۱۵ میلی متر

۷-۲-۱۷ ارلن مایر ۱ و ۲ لیتری

۷-۲-۱۸ همزن مغناطیسی

۷-۲-۱۹ همزن پلیت

۷-۲-۲۰ مخلوط کن با قابلیت سترون شدن محفظه

1- Bunsen burner

2- Cornwall Syringe

۷-۲-۲۱ حمام آب گرم[3] با قابلیت نگهداری دما در $۵۰^{0}C$

۷-۲-۲۲ ترازوی آزمایشگاهی ۰/۱ میلی گرم

۷-۲-۲۳ دماسنج دارای گواهی کالیبراسیون

۷-۲-۲۴ دستکش لاتکس برای کار با نمونه ها

۷-۲-۲۵ pH متر

۷-۲-۲۶ کروسیبل[4] یا ظرف تبخیر آلومینیومی

۷-۲-۲۷ مخلوط کن ورتکس

۷-۲-۲۸ فلاسک بروسیلیکات درب دار با حجم ۲۰۰۰- ۲۵ میلی لیتر

۷-۲-۲۹ استوانه مدرج پوشیده شده با فویل آلومینیوم یا کاغذ کرافت و سترون به حجم ۱۰۰تا ۱۰۰۰ میلی لیتر

۷-۲-۳۰ آون با قابلیت تنظیم دما $۱۰۳^{0}C$ تا $۱۰۵^{0}C$

۷-۲-۳۱ بشر شیشه ای یا پلاستیکی با اندازه های مختلف

۷-۲-۳۲ تشت استیل با ابعاد ۲۵×۶۶×۷۶ سانتی متر

۷-۲-۳۳ اتوکلاو با قابلیت تنظیم دمای $۱۲۱^{0}C$ (فشار۱۵PSI)

۷-۳ آماده سازی نمونه

۷-۳-۱ همگن سازی

همگن سازی بر پایه جامد یا مایع بودن نمونه انجام می شود. نمونه های مایع عموماً به نمونه هایی گفته می شود که حداکثر ۷ درصد جامدات کل براساس وزن خشک داشته باشند.

۷-۳-۱-۱ نمونه های مایع

۳۰۰ میلی لیتر از نمونه را در مخلوط کن سترون ریخته با دور بالا به مدت ۱ تا ۲ دقیقه همگن کنید. pH باید در حدود ۷ تا ۷/۵ تنظیم شود. در صورت نیاز با افزودن اسید کلریدریک نرمال یا هیدروکسید سدیم نرمال این کار انجام می شود. این نمونه از این پس به عنوان همگن اصلی در نظر گرفته می شود. هنگام تنظیم pH حجم نمونه همگن نباید بیش از ۵٪ افزایش یابد (۱۵میلی لیتر).

۷-۳-۱-۲ نمونه های جامد

۰/۱ ± ۳۰ گرم از نمونه خوب مخلوط شده را در پلیت سترون توزین کنید. نمونه حتی الامکان باید شامل کل مواد موجود در کمپوست جامد باشد. برای مثال اگر بخشی از کمپوست خرده چوب است، ممکن است لازم باشد مخلوط کردن یا خرد کردن قبل از آزمایش انجام شود. قطعات بزرگ چوب که براحتی خرد نمی شوند را می توان قبل از همگن سازی دور انداخت. نمونه

3-Water bath

4- Crucible

را به آسیاب مخلوط کن سترون منتقل و برای جداکردن باقی مانده نمونه از آسیاب مخلوط کن از ۲۷۰ میلی لیتر آب بافرسترون (بند ۷-۱-۳) استفاده کنید. نمونه را می توانید مستقیماً در مخزن سترون آسیاب وزن کنید.
درب آسیاب مخلوط کن را بپوشانید و آن را روی سرعت بالا به مدت یک تا دو دقیقه تنظیم کنید. این نمونه از این پس به عنوان همگن اصلی در نظر گرفته می شود. حجم ۱/۰ میلی لیتر از نمونه همگن حاوی ۰/۱ گرم از نمونه اصلی است. pH باید بین ۷/۵-۷ باشد و در صورت نیاز بوسیله افزودن اسید کلریدریک نرمال یا سود نرمال تنظیم شود.

یاد آوری- سوسپانسیون باکتری را در دمای اتاق بیش از ۳۰ دقیقه نگهداری نکنید. برای جلوگیری از تکثیر نمونه های محک زده شده از یخ مرطوب یا نگهداری در دمای $۴^{0}C \pm ۱^{0}C$ استفاده کنید.

۷-۳-۲ رقیق سازی و تلقیح

ممکن است بعضی نمونه ها قبل از انجام آزمایش نیاز به رقیق سازی داشته باشند. حجم مناسب نمونه منجر به صدور نتایجی با تخمین تعداد کلی فرم مدفوعی می شود. به علت اینکه تعداد کلی فرم مدفوعی در نمونه های رقیق نشده از دامنه سنجش این روش فراتر نرود، لازم است. طبق بندهای ۷-۳-۲-۱و۷-۳-۲-۲ و براساس مایع یا جامد بودن نمونه اصلی رقیق سازی و تلقیح کنید.در صورت نیاز رقت های بیشتری را آزمایش کنید. از روش های دیگر تلقیح و سایر رقت ها می توان استفاده کرد اما برای اطمینان از انتقال مقدار کافی نمونه اولیه کمپوست در ابتدای طرح رقیق سازی، باید در اولین انتقال ۱۱ میلی لیتر از نمونه همگن به ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی یا ۱۰ میلی لیتر از نمونه همگن به ۹۰ میلی لیتر آب رقیق سازی اضافه شود.

یاد آوری- سوسپانسیون باکتری را در دمای اتاق بیش از ۳۰ دقیقه نگهداری نکنید. برای انتقال بعضی نمونه ها بهتر است از پیپت سترون با خروجی بزرگ که قادر است ذرات معلق را منتقل کند، استفاده کنید. اگر نمونه ها محک هستند، حداکثر ۱ ساعت بین همگن سازی نمونه های محک زده نشده و آزمون نمونه های محک زده شده وقت سپری شود.

۷-۳-۲-۱ نمونه های کمپوست مایع درجه یک

چهار سری ۵ لوله ای برای آزمایش۱، $۱۰^{-۱}$ ، $۱۰^{-۲}$ و $۱۰^{-۳}$ میلی لیتر از نمونه اصلی استفاده شود . شکل شماره ۲ در پیوست الف را برای مروری بر طرح تلقیح مشاهده کنید . (برای نمونه های محک زده شده چهار سری ۵ لوله ای برای آزمایش$۱۰^{-۲}$، $۱۰^{-۳}$، $۱۰^{-۴}$ و $۱۰^{-۵}$ میلی لیتر از نمونه اصلی استفاده می شود.)

۷-۳-۲-۱-۱ رقیق سازی

(الف) بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از نمونه همگن اصلی به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون (بند۷-۱-۳) منتقل کنید و پس از بستن درب حداقل ۲۵ مرتبه آن را به شدت تکان دهید. این رقت «الف»نامگذاری شود، که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۱}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

(ب) بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از رقت «الف» به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون منتقل کنید وپس از بستن درب حداقل ۲۵ مرتبه آن را به شدت تکان دهید . این رقت «ب»نامگذاری شود، که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۲}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

(ج) بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از رقت «ب» به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون منتقل کنید وپس از بستن درب حداقل ۲۵ مرتبه آن را به شدت تکان دهید. این رقت «ج»نامگذاری شود، که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۳}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

(د) رقت های اضافی برای آزمایش نمونه های های محک:

- بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از رقت «ج» به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون منتقل کنید و پس از بستن درب حداقل ۲۵ مرتبه آن را به شدت تکان دهید. این رقت «د»نامگذاری شود، که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۴}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.
- بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از رقت «د» به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون منتقل کنید و پس از بستن درب حداقل ۲۵ مرتبه آن را به شدت تکان دهید. این رقت «ه»نامگذاری شود، که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۵}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

۷-۳-۲-۱-۲ تلقیح

(الف) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از نمونه همگن اصلی به هر یک از ۵ لوله سری اول استفاده شود (فقط نمونه های محک زده نشده).

(ب) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از رقت «الف» به هر یک از ۵ لوله سری دوم استفاده شود (فقط نمونه های محک زده نشده). این حجم حاوی $۱۰^{-۱}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

(ج) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از رقت «ب» به هر یک از ۵ لوله استفاده شود (نمونه های محک زده شده یا محک زده نشده). این حجم حاوی $۱۰^{-۲}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

(د) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از رقت «ج» به هر یک از ۵ لوله استفاده شود (نمونه های محک زده شده یا محک زده نشده). این حجم حاوی $۱۰^{-۳}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

(ه) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از رقت «د» به هر یک از ۵ لوله استفاده شود (نمونه های محک زده شده). این حجم حاوی $۱۰^{-۴}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

(و) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از رقت «ه» به هر یک از ۵ لوله استفاده شود (نمونه های محک زده شده). این حجم حاوی $۱۰^{-۵}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

۷-۳-۲-۱-۳ برای نمونه های کمپوست مایع درجه یک باقیمانده بند ۷-۳-۲-۱-۱ و ۷-۳-۲-۱-۲ را تکرار و زمانیکه تلقیح به پایان رسید برای ادامه آزمایش به بند ۸-۱-۱-۴ مراجعه کنید.

۷-۳-۲-۲ نمونه های کمپوست جامد درجه یک

برای نمونه های محک زده نشده، چهار سری ۵ لوله ای برای آزمایش ۱، $۱۰^{-۱}$ ، $۱۰^{-۲}$ و $۱۰^{-۳}$ گرم از نمونه اصلی استفاده می شود. سری اول لوله ها باید حاوی محیط کشت با غلظت مضاعف باشد. شکل شماره ۳ در پیوست الف را برای مروری بر

طرح تلقیح مشاهده کنید (برای نمونه های محک زده شده چهار سری ۵ لوله ای برای آزمـایش $۱۰^{-۲}$، $۱۰^{-۳}$ ، $۱۰^{-۴}$ و $۱۰^{-۵}$ گرم از نمونه اصلی استفاده می شود).

۷-۳-۲-۲-۱ رقیق سازی

(الف) حجم ۱ میلی لیتر از نمونه همگن حاوی $۱۰^{-۱}$ گرم از نمونه اصلی است (بند ۷-۳-۱-۲).

(ب) بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از محتویات مخلوط کن را به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون (بند۷-۱-۳) منتقل وپس از بستن درب حداقل ۲۵ مرتبه آن را به شدت تکان دهید. این رقت «الف»نامگذاری شود که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۲}$ گرم از نمونه اصلی است.

(ج) بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از رقت «الف» به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیـق سـازی سـترون منتقـل ومانند قبل مخلوط شود. این رقت «ب»نامگذاری شود که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۳}$ گرم از نمونه اصلی است.

(د) رقت های اضافی برای آزمایش نمونه های های محک:

- بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از رقت «ب»به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون منتقـل و مانند قبل مخلوط شود. این رقت «ج»نامگذاری شود که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۴}$ گرم از نمونه اصلی است.
- بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از رقت «ج»به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون منتقـل و مانند قبل مخلوط شود. این رقت «د»نامگذاری شود که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۵}$ گرم از نمونه اصلی است.

۷-۳-۲-۲-۲ تلقیح

(الف) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱۰ میلی لیتر از نمونه همگن شده اصلی و هر یک از ۵ لوله سری اول استفاده شود (فقط نمونه های محک زده نشده). این حجم حاوی ۱ گرم از نمونه اصلی است.

یاد آوری ۱- این سری از لوله ها باید حاوی محیط کشت با غلظت مضاعف باشند.

یاد آوری ۲- زمانیکه از لوله های حاوی ویال وارونه (دورهام) استفاده می کنید ، لوله ها را تکان ندهید.

یاد آوری ۳- مواد جامدی که براحتی مخلوط نمی شوند را بوسیله لوپ سترون در محیط کشت مایع غوطه ور کنید.

(ب)) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از مخلوط همگن شده به هر یک از ۵ لوله استفاده شود (فقط نمونه هـای محک زده نشده). این حجم حاوی $۱۰^{-۱}$ گرم از نمونه اصلی است.

(ج) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از رقت «الف» به هر یک از ۵ لوله استفاده شود (نمونه های محک زده نشده یا محک زده شده). این حجم حاوی $۱۰^{-۲}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

(د) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از رقت «ب» به هر یک از ۵ لوله استفاده شود (نمونه های محک زده شده یـا محک زده نشده). این حجم حاوی $۱۰^{-۳}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

(ه) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از رقت «ج» به هر یک از ۵ لوله استفاده شود (نمونه های محـک زده شـده). این حجم حاوی حاوی $۱۰^{-۴}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

(و) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از رقت «د» به هر یک از ۵ لوله استفاده شود (نمونه های محک زده شده) . این حجم حاوی $۱۰^{-۵}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

۷-۳-۲-۲-۳ برای نمونه های کمپوست جامد درجه یک باقیمانده بند ۷-۳-۲-۲-۱ و ۷-۳-۲-۲-۲ را تکرار و زمانیکه تلقیح به پایان رسید برای ادامه آزمایش به بند ۸-۱-۱-۴ مراجعه کنید.

۷-۳-۲-۳ نمونه های کمپوست مایع درجه دو

برای نمونه های محک زده نشده چهار سری ۵ لوله ای برای آزمایش $۱۰^{-۳}$، $۱۰^{-۴}$ ، $۱۰^{-۵}$ و $۱۰^{-۶}$ میلی لیتر از نمونه اصلی استفاده شود (رقت های اضافی در صورت نیاز آزمایش خواهند شد). شکل شماره ۴ در پیوست الف را برای مروری بر طرح تلقیح مشاهده کنید. (برای نمونه های محک زده شده ۵ سری ۵ لوله ای برای آزمایش $۱۰^{-۵}$، $۱۰^{-۶}$ ، $۱۰^{-۷}$ ، $۱۰^{-۸}$و $۱۰^{-۹}$ میلی لیتر از نمونه اصلی استفاده شود.)

۷-۳-۲-۳-۱ رقیق سازی

(الف) بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از نمونه همگن شده اصلی بند(۷-۱۰-۱-۱) را به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون (بند۷-۱-۳) منتقل وپس از بستن درب، حداقل ۲۵ مرتبه آن را به شدت تکان دهید. این رقت «الف» نامگذاری شود که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۱}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

(ب) بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از رقت «الف» به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون منتقل و مانند قبل مخلوط شود. این رقت «ب»نامگذاری شود که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۲}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

(ج) بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از رقت «ب» به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون منتقل و مانند قبل مخلوط شود. این رقت «ج»نامگذاری شود که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۳}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

(د) بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از رقت «ج» به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون منتقل و مانند قبل مخلوط شود. این رقت «د»نامگذاری شود که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۴}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

(ه) بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از رقت «د» به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون منتقل و مانند قبل مخلوط شود. این رقت «ه»نامگذاری شود که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۵}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

(و) بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از رقت «ه» به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون منتقل و مانند قبل مخلوط شود. این رقت «و»نامگذاری شود که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۶}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

(ز) رقت های اضافی برای آزمایش نمونه های های محک:

- بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از رقت «و» به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون منتقل و مانند قبل مخلوط شود. این رقت «ز»نامگذاری شود که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۷}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.
- بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از رقت «ز» به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون منتقل و مانند قبل مخلوط شود. این رقت «ح»نامگذاری شود که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۸}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

- بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از رقت «ح» به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون منتقل و مانند قبل مخلوط شود. این رقت «ط»نامگذاری شود که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۹}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

۷-۳-۲-۳-۲ تلقیح

(الف) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از رقت «ج» به هر یک از ۵ لوله سری اول استفاده شود (فقط نمونه های محک زده نشده). این حجم حاوی $۱۰^{-۳}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

(ب) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از رقت «د» به هر یک از ۵ لوله سری دوم استفاده شود (فقط نمونه های محک زده نشده). این حجم حاوی $۱۰^{-۴}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

(ج) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از رقت «ه» به هر یک از ۵ لوله استفاده شود (نمونه های محک زده شده یا محک زده نشده). این حجم حاوی $۱۰^{-۵}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

(د) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از رقت «و» به هر یک از ۵ لوله استفاده شود (نمونه های محک زده شده یا محک زده نشده). این حجم حاوی $۱۰^{-۶}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

(ه) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از رقت «ز» به هر یک از ۵ لوله استفاده شود (نمونه های محک زده شده). این حجم حاوی $۱۰^{-۷}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

(و) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از رقت «ح» به هر یک از ۵ لوله استفاده شود (نمونه های محک زده شده). این حجم حاوی $۱۰^{-۸}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

(ز) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از رقت «ط» به هر یک از ۵ لوله استفاده شود (نمونه های محک زده شده). این حجم حاوی $۱۰^{-۹}$ میلی لیتر از نمونه اصلی است.

۷-۳-۲-۳-۳ برای نمونه های کمپوست مایع درجه دو باقیمانده بند ۷-۳-۲-۳-۱ و ۷-۳-۲-۳-۲ را تکرار و زمانیکه تلقیح به پایان رسید برای ادامه آزمایش به بند ۸-۱-۱-۴ مراجعه کنید.

۷-۳-۲-۴ نمونه های کمپوست جامد درجه دو

برای نمونه های محک زده نشده چهار سری ۵ لوله ای برای آزمایش$۱۰^{-۳}$، $۱۰^{-۴}$ ، $۱۰^{-۵}$و $۱۰^{-۶}$ گرم از نمونه اصلی استفاده می شود (رقت های اضافی در صورت نیاز آزمایش خواهند شد). شکل شماره ۵ در پیوست الف را برای مروری بر طرح تلقیح مشاهده کنید. (برای نمونه های محک زده شده ۵ سری ۵ لوله ای برای آزمایش$۱۰^{-۵}$، $۱۰^{-۶}$ ، $۱۰^{-۷}$ ،$۱۰^{-۸}$و $۱۰^{-۹}$ گرم از نمونه اصلی استفاده می شود.)

۷-۳-۲-۴-۱ رقیق سازی

(الف) حجم ۰/۱ میلی لیتر از نمونه همگن حاوی $۱۰^{-۱}$ گرم از نمونه اصلی است.

(ب) بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از محتویات مخلوط کن را به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون (بند۷-۱-۳) منتقل وپس از بستن درب حداقل ۲۵ مرتبه آن را به شدت تکان دهید . این رقت «الف»نامگذاری شود که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۲}$ گرم از نمونه اصلی است.

(ج) بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از رقت «الف» به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون منتقل و مانند قبل مخلوط شود. این رقت «ب»نامگذاری شود که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۳}$ گرم از نمونه اصلی است.

(د) بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از رقت «ب» به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون منتقل و مانند قبل مخلوط شود. این رقت «ج»نامگذاری شود که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۴}$ گرم از نمونه اصلی است.

(ه) بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از رقت «ج» به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون منتقل و مانند قبل مخلوط شود. این رقت «د»نامگذاری شود که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۵}$ گرم از نمونه اصلی است.

(و) بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از رقت «د» به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون منتقل و مانند قبل مخلوط شود. این رقت «ه»نامگذاری شود که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۶}$ گرم از نمونه اصلی است.

(ز) رقت های اضافی برای آزمایش نمونه های های محک:

- بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از رقت «ه»به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون منتقل و مانند قبل مخلوط شود. این رقت «و»نامگذاری شود که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۷}$ گرم از نمونه اصلی است.
- بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از رقت «و»به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون منتقل و مانند قبل مخلوط شود. این رقت «ز»نامگذاری شود که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۸}$ گرم از نمونه اصلی است.
- بوسیله یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از رقت «ز»به بطری حاوی ۹۹ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون منتقل و مانند قبل مخلوط شود. این رقت «ح»نامگذاری شود که یک میلی لیتر از آن حاوی $۱۰^{-۹}$ گرم از نمونه اصلی است.

۷-۳ -۲-۴-۲ تلقیح

(الف) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از رقت «ب» به هر یک از ۵ لوله سری اول استفاده شود (فقط نمونه های محک زده نشده). این حجم حاوی $۱۰^{-۳}$ گرم از نمونه اصلی است.

(ب) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از رقت «ج» به هر یک از ۵ لوله سری دوم استفاده شود (فقط نمونه های محک زده نشده). این حجم حاوی $۱۰^{-۴}$ گرم از نمونه اصلی است.

(ج) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از رقت «د» به هر یک از ۵ لوله استفاده شود (نمونه های محک زده شده یا محک زده نشده). این حجم حاوی $۱۰^{-۵}$ گرم از نمونه اصلی است.

(د) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از رقت «ه» به هر یک از ۵ لوله استفاده شود (نمونه های محک زده شده یا محک زده نشده). این حجم حاوی $۱۰^{-۶}$ گرم از نمونه اصلی است.

(ه) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از رقت «و» به هر یک از ۵ لوله استفاده شود (نمونه های محک زده شده). این حجم حاوی $۱۰^{-۷}$ گرم از نمونه اصلی است.

(و) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از رقت «ز» به هر یک از ۵ لوله استفاده شود (نمونه های محک زده شده). این حجم حاوی $۱۰^{-۸}$ گرم از نمونه اصلی است.

(ز) یک پیپت سترون برای تلقیح ۱ میلی لیتر از رقت «ح» به هر یک از ۵ لوله استفاده شود (نمونه های محک زده شده). این حجم حاوی $۱۰^{-۹}$ گرم از نمونه اصلی است.

۷-۳ -۲-۴-۳ زمانیکه تلقیح به پایان رسید برای ادامه آزمایش به بند ۸-۱-۱-۴ مراجعه کنید.

۸ روش انجام آزمون

۸-۱ روش آزمون محیط های LTB/EC

در این روش، از محیط کشت های LTB وEC برای تعیین تعداد کلی فرم هـای مـدفوعی بـه روش MPNدر نمونـه هـای کمپوست درجه یک و دو استفاده می شود. اگر چه تعداد کل نمونه هـا بـرای کمپوسـت مشـخص نشـده اسـت، امـا توصـیه می شود که نمونه برداری در طول دو هفته انجام شود و تعداد نمونه ها حداقل هفت باشد آزمون ۷ نمونه در زمـان مصـرف، برآورنده الزامات پایش نشاندهی کاهش عامل بیماری زا در هر دو کمپوست درجه یک و دو می گـردد. در ایـن روش محـیط کشت LTB برای تشخیص احتمالی و محیط EC جهت تایید تشخیص کلی فرم های مدفوعی بکار می رود. محـیط EC را نمی توان جهت جداسازی مستقیم کلی فرم های مدفوعی از نمونه های کمپوست جامد بکار برد زیرا بـرای بازیـابی مناسـب کلی فرم های مدفوعی، غنی سازی در محیط LTB لازم است. دقت آزمون با افزایش تکـرار در هـر نمونـه آزمـونی افـزایش می یابد. از آنجاییکه تعداد کلی فرم مدفوعی نمونه ها متغیر است ، توصیه می شود حداقل ۷ نمونه توسط ایـن روش آزمـون شوند. میانگین هندسی تعداد کلی فرم های مدفوعی در ۷ نمونـه در کمپوسـت درجـه ۲ نبایـد از MPN/g ۲×۱۰^{۶} تجـاوز نماید. برای کمپوست درجه یک اگر چه تعداد خاصی نمونه مشخص نشده، اما توصیه می شود تعداد حاقـل هفـت نمونـه در طول دو هفته گرفته شود و میانگین هندسی تعداد کلی فرم های مدفوعی در هفت نمونـه کمپوسـت درجـه یـک بایـد زیـر MPN/g ۱۰۰۰ کل مواد جامد (براساس وزن خشک) باشد. برای اطلاع کلی از روش MPN بـه شـکل ۱ در پیوسـت الـف مراجعه شود.

۸-۱-۱ مرحله احتمالی با محیط کشت LTB

۸-۱-۱-۱ محیط کشت LTB را آماده کرده و در لوله های آزمایش طبق بند ۷-۱-۴ تقسیم کنید.

یاد آوری- اگر محیط کشت در یخچال نگهداری می شود، ۱ تا ۱/۵ ساعت قبل از تلقیح از یخچال خارج شود، بـه طوریکـه قبـل از اسـتفاده بـه دمای اتاق برسد.

۸-۱-۱-۲ برای هر نمونه (بند ۷-۳) ، لوله های آزمایش در ۴ ردیف ۵ تایی مرتب شود. به لوله های حاوی ۱۰ میلـی لیتـر محیط کشت LTB(۲X)،۱۰ میلی لیتر از نمونه همگن تلقیح کنید، روی لوله های هر ردیف مشخصات کامل نمونه و رقـت تلقیحی یادداشت شود.

یاد آوری - برای اطمینان از اینکه ۱۰ میلی لیتر تلقیح باعث رقت بیش از حد محیط LTB بیش از حد نشـود، از غلظـت LTB(۲X) اسـتفاده می شود.

۸-۱-۱-۳ رقیق سازی و تلقیح نمونه ها بسته به درجه یک یا دو و مایع یا جامد بودن آنها براساس بند۷-۳-۲ انجام شود.

۸-۱-۱-۴ لوله های LTB و کنترل های مربوط را در درجه حرارت $۳۵^{\circ}C \pm ۰/۵^{\circ}C$ گرمخانه گذاری کنید. پس از ۲±۲۴ ساعت با چرخاندن آرام لوله ها آنها را از نظر رشد و تولید گاز بررسی کنید. اگر هیچ گازی تولید نشده بود لوله ها را به مدت ۲±۲۴ ساعت دیگر گرمخانه گذاری کنید. ارزیابی نهایی پس از ۳±۴۸ ساعت انجام می شود.

۸-۱-۱-۵ پس از ۳±۴۸ ساعت لوله های کدر همراه با تجمع گاز در لوله دورهام، به عنوان واکنش مثبت احتمالی تلقی می شوند.

یاد آوری- وجود گاز بدون کدورت (رشد) معمولا بدلیل اشتباه در مرحله توزیع محیط کشت و دورهام گذاری ویا تکان دادن نادرست لوله ها بعد از گرمخانه گذاری است.

۸-۱-۱-۶ برای لوله هایی که واکنش احتمالی آنها مثبت است ، به مرحله تأییدی (بند۸-۱-۲) بروید. (تصویر۱)

۸-۱-۲ مرحله تأیید کلی فرم های مدفوعی با استفاده از محیط EC

۸-۱-۲-۱ محیط کشت مایع EC را طبق بند۷-۱-۵ آماده و در لوله های آزمایش تقسیم کنید . هر لوله دارای واکنش احتمالی مثبت LTB را در یک لوله محیط EC تلقیح کنید.

یاد آوری- اگر محیط کشت در یخچال نگهداری می شود، یک تا یک و نیم ساعت قبل از تلقیح از یخچال خارج شود، به طوریکه قبل از استفاده به دمای اتاق برسد.

۸-۱-۲-۲ لوله های مثبت مرحله قبل (واکنش احتمالی) را به آرامی تکان دهید.

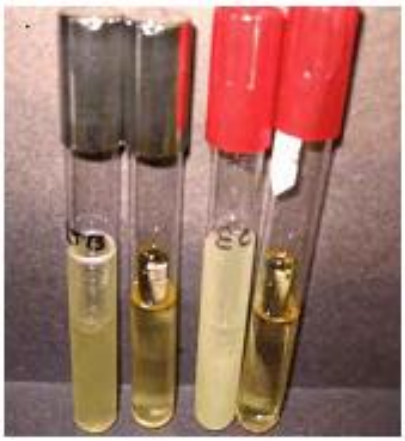
۸-۱-۲-۳ برای انتقال رشد از هر لوله دارای واکنش مثبت احتمالی LTB به لوله های مترادف آن حاوی محیط کشت مایع EC از لوپ سترون یا چوب اپلیکاتور سترون استفاده کنید .

۸-۱-۲-۴ همه لوله های EC را ۳۰ دقیقه پس از تلقیح در حمام آب گرم در دمای $۴۴/۵^{\circ}C \pm ۰/۲^{\circ}C$ بمدت۲±۲۴ ساعت گرمخانه گذاری کنید. سطح آب را در لوله های غوطه ور بالاتر از محیط کشت حفظ کنید .

۸-۱-۲-۵ بعد از گرمخانه گذاری هر یک از لوله ها را از نظر رشد و تولید گاز بررسی کنید .تولید گاز همراه با کدورت پس از ۲±۲۴ ساعت گرمخانه گذاری بیانگر واکنش تأییدی مثبت و عدم تولید گاز بیانگر واکنش تأییدی منفی کلی فرم های مدفوعی است (تصویر۱).

یاد آوری- وجود گاز بدون کدورت (رشد) معمولا بدلیل اشتباه در مرحله توزیع محیط کشت و دورهام گذاری ویا تکان دادن نادرست لوله ها بعد از گرمخانه گذاری است.

۸-۱-۲-۶ واکنش های مثبت و منفی را یادداشت کنید و محاسبات MPN در گرم کل مواد جامد (وزن خشک)را مطابق بند ۸-۲-۱ و بر اساس نتایج مثبت مرحله تأییدی انجام دهید.



تصویر۱- در محیط LTB (دولوله سمت چپ با درب نقره ای) و EC (دولوله سمت راست با درب قرمز)، کلی فرم های مدفوعی کدورت و گاز تولید کرده اند(لوله۱و۳،زمانیکه از سمت چپ شمارش کنید).

۸-۲ تعیین کل مواد جامد

۸-۲-۱ تعیین درصد وزن خشک

آزمونه دیگری از نمونه همزمان به عنوان نمونه مورد آزمون برداشته شود.

هشدار- آون باید زیر هود یا تهویه باشد .نمونه های بشدت آلوده ممکن است باعث ایجاد آلودگی شدید در آزمایشگاه شوند.

۸-۲-۲ بلافاصله پس از توزین نمونه جهت بررسی میکروبیولوژی، ۱۰تا۳۰ گرم از نمونه را در یک کروسیبل یا ظرف تبخیر آلومینیومی و در آون و در دمای $۱۰۳^{0}C$ تا $۱۰۵^{0}C$ بمدت یک شبانه روز قرار دهید. نمونه خشک شده قبل از توزین در دسیکاتور خنک شود. درصد ماده خشک را از فرمول زیر محاسبه کنید.

فرمول (۱)

$$\text{درصد وزن خشک} = \frac{\text{وزن نمونه خشک بر حسب گرم}}{\text{وزن نمونه بر حسب گرم}} \times ۱۰۰$$

۸-۳ تصدیق[1]

آزمونهای مستقلی مانند اکسیداز، سیترات، تخمیر لاکتوز، اندول، هیدرولیز ONPG ، متیل رد و ووکس پروسکاور را می توان برای تصدیق نتایج مثبت و منفی بکار برد و به همین شکل می توان از سیستم های تشخیص چند آزمونی تجاری برای تصدیق نتایج مثبت و منفی استفاده کرد. چنین سیستم هایی برای انتروباکترباسه باید شامل تخمیر لاکتوز، هیدرولیز ONPG و آزمون سیتوکروم اکسیداز باشند.

1- Verification

یاد آوری- بسته به میزان خطا در آزمونهای مثبت و منفی، توصیه می شود آزمونگر تمامی لوله های مثبت و منفـی دارای رشـد را حـداقل یکـی برای هر درجه کمپوست که بطور معمول ماهیانه آزمون می کند، مورد تصدیق قرار دهد.

۹ تجزیه داده ها و محاسبات

تعداد احتمالی باکتری های کلی فرم مدفوعی براساس آزمون تاییدی با استفاده از EC و بر حسب MPN محاسبه می شود. با توجه به تفاوت زیاد مقدار مواد جامد کمپوست ، نتایج کلی فرم مدفوعی در نمونه هـای کمپوسـت جامـد بایـد بـر مبنـای بیشترین تعداد احتمالی در گرم کل کمپوست جامد (وزن خشک) باشد . MPN/g کـل مـواد جامـد (وزن خشـک) در سـه مرحله محاسبه می شود.

- انتخاب رقت های معنی دار
- محاسبه MPN/mL (وزن مرطوب)
- تبدیل به MPN/g کل مواد جامد (وزن خشک)

روش محاسبه میانگین هندسی در بند۹-۴ ارائه شده است.

۹-۱ مرحله ۱ انتخاب رقت های معنی دار:

رقت، مقدار میلی لیتر یا گرم نمونه اصلی تلقیح شده در هر سری از لوله ها است. به عنوان مثال، در نمونـه هـای کمپوسـت جامد درجه دو (بند ۷-۳-۲-۴) در ۴ردیف ۵ لوله ای $۱۰^{-۳}$، $۱۰^{-۴}$ ، $۱۰^{-۵}$ و $۱۰^{-۶}$گرم از نمونه اصلی تلقیح شده است، تنهـا ۳ سری از ۴ سری رقت برای محاسبه MPN استفاده می شوند.۳رقت منتخب، رقت های معنـی دار مـی باشـند و بـر اسـاس معیارهای زیر انتخاب می شوند. مثال رقت های معنی دار در جدول ۲ ارائه شده که در آن صـورت کسـر تعـداد لولـه هـای مثبت در هر سری رقت نمونه و مخرج تعداد کل لوله های تلقیح شده در هرسری رقت است.

۹-۱-۱ بالاترین، رقتی که در همه ۵ لوله ای ها تلقیح شده و نتیجه مثبت داده است به همراه دو رقت بالای متعاقـب آن را انتخاب کنید(در جدول ۲ مثال الف$۱۰^{-۴}$رقت بالاترو یا بیشتر از$۱۰^{-۳}$ است).

یاد آوری- بالاترین رقت شامل بیشترین رقیق کردن و کمترین مقدار نمونه است و پایین ترین رقت شامل کمترین رقیق کردن و بیشترین مقدار نمونه است.

۹-۱-۲ اگر پایین ترین رقت مورد آزمون، کمتر از ۵ لوله مثبت دارد، آن را به همراه ۲ رقت بالاترش انتخاب کنید(جدول ۲ مثال ب و ج).

۹-۱-۳ اگر در رقت بالاتر از سه رقت معنی دار انتخاب شده توسط روش فوق یک نتیجه مثبت رخ دهد، انتخاب را به پایین ترین رقتی که کمتر از ۵ نتیجه مثبت دارد و دو رقت بالاتر تغییر دهید(جدول ۲ مثال د).

۹-۱-۴ اگر پس از بکار بردن قوانین فوق نتایج مثبتی در رقت های بالاتر انتخاب نشده وجود داشته باشند، این نتایج را به نتایج بالاترین رقت منتخب اضافه کنید(جدول ۲ مثال ه).

۹-۱-۵ اگر برای انتخاب ۳ رقت تعداد کافی رقت های بالا آزمون نشده باشد، رقت پایین تر را انتخاب کنید. (جدول ۲ مثال و).

مثالهایی با محاسبات MPN/mL در جدول ۲ ارایه شده است .

جدول ۲ – مثالهایی از انتخاب رقت های معنی دار محاسبه MPN/mL

مثال (مایع یا جامد)	$۱۰^{-۳}$ gیاmL	$۱۰^{-۴}$ gیاmL	$۱۰^{-۵}$ gیاmL	$۱۰^{-۶}$ gیاmL	مرحله ۱ : رقت های معنی دار	مرحله۲ : (بالاترین رقت معنی دار /MPN ازجدول ۲) وزن مرطوب = MPN/mL
الف	۵ از ۵	۵ از ۵	۳ از ۵	۰ از ۵	۰-۳-۵	۷٫۹۲ ÷ $۱۰^{-۴}$=۷۹۲۰۰MPN/mL ۷۹۰۰۰MPN/mL
ب	۴ از ۵	۵ از ۵	۱ از ۵	۰ از ۵	۱-۵-۴	۴٫۸۳ ÷ $۱۰^{-۳}$=۴۸۳۰MPN/mL ۴۸۰۰MPN/mL
ج	۰ از ۵	۱ از ۵	۰ از ۵	۰ از ۵	۰-۱-۰	۰٫۱۸ ÷ $۱۰^{-۳}$=۱۸۰MPN/mL
د	۵ از ۵	۳ از ۵	۱ از ۵	۱ از ۵	۱-۱-۳	۷٫۹۲ ÷ $۱۰^{-۴}$=۷۹۲۰۰MPN/mL ۷۹۰۰۰MPN/mL
ه	۴ از ۵	۴ از ۵	۰ از ۵	۱ از ۵	۱-۴-۴	۱٫۳۷ ÷ $۱۰^{-۴}$=۱۳۷۰MPN/mL ۱۴۰۰۰MPN/mL
و	۵ از ۵	۵ از ۵	۵ از ۵	۲ از ۵	۲-۵-۵	۵۴٫۲۲ ÷ $۱۰^{-۴}$=۵۴۲۲۰۰MPN/mL ۵۴۰۰۰۰MPN/mL

* رقت های معنی دار خط کشی و بالاترین رقت، پر رنگ شده است.

۹-۲ مرحله ۲ محاسبه MPN/mL (وزن مرطوب)

۹-۲-۱ حدود اطمینان۹۵٪ مقدار شاخص MPN را با استفاده از تعداد لوله های مثبت در۳ سری رقت های مشخص از جدول شماره ۳ استخراج وMPN /mLرا با استفاده از فرمول زیر محاسبه کنید. به منظور حذف کردن ضرب عدد ۱۰ در شاخص MPN در معادله زیر جدول ۳ با یک عامل ۱۰ تنظیم شده است.

یاد آوری- مثال اعداد محاسبه شده در جداول زیر در انتهای هر مرحله گرد شده است. اگر آزمایشگاه شما دوباره این مثال ها را با استفاده از یک صفحه گسترده محاسبه و در انتها گرد کند، ممکن است اندکی تفاوت بدست آید.

۹-۲-۲ زمانی که از جداول MPN غیر از جدول این استاندارد استفاده شود، مراحل و محاسبات اضافی برای گزارش نهایی تعیین مقدارMPN/g (وزن خشک) مورد نیاز است.

فرمول (۲)

$$MPN/mL = \frac{\text{شاخص MPN بر گرفته از جدول ۳}}{}$$

بیشترین حجم آزمون شده در سری رقت های تعیین MPN

جدول۳ – شاخص MPN و حدود اطمینان ۹۵٪ برای مجموعه های مختلف نتایج مثبت در روش ۵ لوله ای برای هر رقت

مجموعه مثبت ها	شاخص MPN	حدود اطمینان ۹۵٪		مجموعه مثبت ها	شاخص MPN	حدود اطمینان ۹۵٪	
		پایین تر	بالاتر			پایین تر	بالاتر
۰-۰-۰	<۰/۱۸۰۳	-----	------	۱-۳-۰	۰/۸۳	۰/۱۲	۱/۹۶
۰-۰-۱	۰/۱۸	۰/۰۳	۰/۶۳	۱-۳-۱	۱/۰۴	۰/۲۰	۲/۴۳
۰-۰-۲	۰/۳۶	۰/۰۳	۱/۰۱	۱-۳-۲	۱/۲۵	۰/۲۹	۲/۹۶
۰-۰-۳	۰/۵۴	۰/۰۳	۱/۳۷	۱-۳-۳	۱/۴۷	۰/۳۸	۳/۶۴
۰-۰-۴	۰/۷۲	۰/۰۸	۱/۷۴	۱-۳-۴	۱/۶۹	۰/۴۸	۴/۶۰
۰-۰-۵	۰/۹۱	۰/۱۵	۲/۱۲	۱-۳-۵	۱/۹۱	۰/۵۷	۵/۶۶
۰-۱-۰	۰/۱۸	۰/۰۳	۰/۶۳	۱-۴-۰	۱/۰۵	۰/۲۱	۲/۴۵
۰-۱-۱	۰/۳۶	۰/۰۳	۱/۰۱	۱-۴-۱	۱/۲۷	۰/۳۰	۳/۰۰
۰-۱-۲	۰/۵۵	۰/۰۳	۱/۳۸	۱-۴-۲	۱/۴۸	۰/۳۹	۳/۷۰
۰-۱-۳	۰/۷۳	۰/۰۸	۱/۷۵	۱-۴-۳	۱/۷۰	۰/۴۸	۴/۶۸
۰-۱-۴	۰/۹۱	۰/۱۵	۲/۱۴	۱-۴-۴	۱/۹۳	۰/۵۸	۵/۷۵
۰-۱-۵	۱/۱۰	۰/۲۳	۲/۵۶	۱-۴-۵	۲/۱۵	۰/۶۷	۶/۵۷
۰-۲-۰	۰/۳۷	۰/۰۳	۱/۰۲	۱-۵-۰	۱/۲۸	۰/۳۰	۳/۰۳
۰-۲-۱	۰/۵۵	۰/۰۳	۱/۳۹	۱-۵-۱	۱/۵۰	۰/۴۰	۳/۷۵
۰-۲-۲	۰/۷۴	۰/۰۸	۱/۷۶	۱-۵-۲	۱/۷۲	۰/۴۹	۴/۷۷
۰-۲-۳	۰/۹۲	۰/۱۵	۲/۱۵	۱-۵-۳	۱/۹۵	۰/۵۸	۵/۸۳
۰-۲-۴	۱/۱۱	۰/۲۳	۲/۵۸	۱-۵-۴	۲/۱۷	۰/۶۸	۶/۶۴
۰-۲-۵	۱/۲۹	۰/۳۱	۳/۰۷	۱-۵-۵	۲/۴۰	۰/۷۷	۷/۳۱
۰-۳-۰	۰/۵۶	۰/۰۳	۱/۴۰	۲-۰-۰	۰/۴۵	۰/۰۳	۱/۱۹
۰-۳-۱	۰/۷۴	۰/۰۹	۱/۷۷	۲-۰-۱	۰/۶۸	۰/۰۶	۱/۶۴
۰-۳-۲	۰/۹۳	۰/۱۶	۲/۱۷	۲-۰-۲	۰/۹۱	۰/۱۵	۲/۱۳
۰-۳-۳	۱/۱۲	۰/۲۳	۲/۶۰	۲-۰-۳	۱/۱۵	۰/۲۵	۲/۶۹
۰-۳-۴	۱/۳۰	۰/۳۱	۳/۱۰	۲-۰-۴	۱/۳۹	۰/۳۵	۳/۳۸
۰-۳-۵	۱/۴۹	۰/۳۹	۳/۷۲	۲-۰-۵	۱/۶۴	۰/۴۶	۴/۳۷
۰-۴-۰	۰/۷۵	۰/۰۹	۱/۷۹	۲-۱-۰	۰/۶۸	۰/۰۶	۱/۶۶
۰-۴-۱	۰/۹۴	۰/۱۶	۲/۱۹	۲-۱-۱	۰/۹۲	۰/۱۵	۲/۱۶
۰-۴-۲	۱/۱۲	۰/۲۴	۲/۶۳	۲-۱-۲	۱/۱۶	۰/۲۵	۲/۷۲
۰-۴-۳	۱/۳۱	۰/۳۲	۳/۱۳	۲-۱-۳	۱/۴۱	۰/۳۶	۳/۴۳
۰-۴-۴	۱/۵۰	۰/۴۰	۳/۷۷	۲-۱-۴	۱/۶۶	۰/۴۶	۴/۴۷
۰-۴-۵	۱/۶۹	۰/۴۸	۴/۶۲	۲-۱-۵	۱/۹۲	۰/۵۷	۵/۷۱
۰-۵-۰	۰/۹۴	۰/۱۶	۲/۲۱	۲-۲-۰	۰/۹۳	۰/۱۶	۲/۱۸

۲/۷۶	۰/۲۶	۱/۱۸	۲-۲-۱	۲/۶۵	۰/۲۴	۱/۱۳	۰-۵-۱
۳/۴۹	۰/۳۶	۱/۴۳	۲-۲-۲	۳/۱۷	۰/۳۲	۱/۳۳	۰-۵-۲
۴/۵۶	۰/۴۷	۱/۶۸	۲-۲-۳	۳/۸۲	۰/۴۰	۱/۵۲	۰-۵-۳
۵/۸۱	۰/۵۸	۱/۹۴	۲-۲-۴	۴/۷۰	۰/۴۸	۱/۷۱	۰-۵-۴
۶/۷۵	۰/۶۹	۲/۲۱	۲-۲-۵	۵/۶۳	۰/۵۶	۱/۹۰	۰-۵-۵
۲/۷۹	۰/۲۶	۱/۱۹	۲-۳-۰	۰/۶۸	۰/۰۳	۰/۲۰	۱-۰-۰
۳/۵۵	۰/۳۷	۱/۴۴	۲-۳-۱	۱/۰۸	۰/۰۳	۰/۴۰	۱-۰-۱
۴/۶۷	۰/۴۸	۱/۷۰	۲-۳-۲	۱/۴۹	۰/۰۳	۰/۶۰	۱-۰-۲
۵/۹۱	۰/۵۹	۱/۹۷	۲-۳-۳	۱/۹۱	۰/۱۱	۰/۸۱	۱-۰-۳
۶/۸۳	۰/۷۰	۲/۲۳	۲-۳-۴	۲/۳۶	۰/۱۹	۱/۰۱	۱-۰-۴
۷/۵۹	۰/۸۲	۲/۵۱	۲-۳-۵	۲/۸۷	۰/۲۸	۱/۲۲	۱-۰-۵
۳/۶۱	۰/۳۸	۱/۴۶	۲-۴-۰	۱/۰۹	۰/۰۳	۰/۴۰	۱-۱-۰
۴/۷۷	۰/۴۹	۱/۷۲	۲-۴-۱	۱/۵۰	۰/۰۳	۰/۶۱	۱-۱-۱
۶/۰۰	۰/۶۰	۱/۹۹	۲-۴-۲	۱/۹۲	۰/۱۱	۰/۸۱	۱-۱-۲
۶/۹۲	۰/۷۲	۲/۲۶	۲-۴-۳	۲/۳۸	۰/۱۹	۱/۰۲	۱-۱-۳
۷/۶۸	۰/۸۳	۲/۵۴	۲-۴-۴	۲/۹۰	۰/۲۸	۱/۲۳	۱-۱-۴
۸/۳۶	۰/۹۴	۲/۸۲	۲-۴-۵	۳/۵۴	۰/۳۷	۱/۴۴	۱-۱-۵
۴/۸۸	۰/۵۰	۱/۷۴	۲-۵-۰	۱/۵۱	۰/۰۳	۰/۶۱	۱-۲-۰
۶/۱۰	۰/۶۱	۲/۰۱	۲-۵-۱	۱/۹۴	۰/۱۲	۰/۸۲	۱-۲-۱
۷/۰۰	۰/۷۳	۲/۲۹	۲-۵-۲	۲/۴۰	۰/۲۰	۱/۰۳	۱-۲-۲
۷/۷۶	۰/۸۴	۲/۵۷	۲-۵-۳	۲/۹۳	۰/۲۹	۱/۲۴	۱-۲-۳
۸/۴۵	۰/۹۵	۲/۸۶	۲-۵-۴	۳/۵۹	۰/۳۸	۱/۴۶	۱-۲-۴
۹/۱۰	۱/۰۷	۳/۱۵	۲-۵-۵	۴/۵۱	۰/۴۷	۱/۶۷	۱-۲-۵
۸/۰۹	۰/۹۰	۲/۷۱	۴-۳-۰	۰/۰۰۲۸	۰/۱۰	۰/۷۹	۳-۰-۰
۹/۳۴	۱/۱۱	۳/۲۶	۴-۳-۱	۰/۰۰۶۳	۰/۲۱	۱/۰۶	۳-۰-۱
۱۰/۶۰	۱/۳۲	۳/۸۶	۴-۳-۲	۰/۰۱۰۳	۰/۳۳	۱/۳۵	۳-۰-۲
۱۱/۹۲	۱/۵۴	۴/۵۱	۴-۳-۳	۰/۰۱۴۷	۰/۴۶	۱/۶۵	۳-۰-۳
۱۳/۳۱	۱/۷۶	۵/۲۱	۴-۳-۴	۰/۰۱۹۳	۰/۵۹	۱/۹۶	۳-۰-۴
۱۴/۷۷	۱/۹۶	۵/۹۳	۴-۳-۵	۰/۰۲۴۱	۰/۷۳	۲/۲۹	۳-۰-۵
۹/۵۳	۱/۱۴	۳/۳۵	۴-۴-۰	۲/۵۰	۰/۲۲	۱/۰۷	۳-۱-۰
۱۰/۸۴	۱/۳۷	۳/۹۸	۴-۴-۱	۳/۲۹	۰/۳۴	۱/۳۷	۳-۱-۱
۱۲/۲۳	۱/۵۹	۴/۶۶	۴-۴-۲	۴/۵۲	۰/۴۷	۱/۶۷	۳-۱-۲
۱۳/۶۸	۱/۸۱	۵/۳۹	۴-۴-۳	۶/۰۱	۰/۶۰	۱/۹۹	۳-۱-۳
۱۵/۲۱	۲/۰۲	۶/۱۵	۴-۴-۴	۷/۱۰	۰/۷۴	۲/۳۲	۳-۱-۴
۱۶/۸۱	۲/۲۳	۶/۹۳	۴-۴-۵	۸/۰۰	۰/۸۸	۲/۶۷	۳-۱-۵
۱۱/۱۱	۱/۴۱	۴/۱۱	۴-۵-۰	۳/۳۵	۰/۳۵	۱/۳۸	۳-۲-۰
۱۲/۵۶	۱/۶۴	۴/۸۳	۴-۵-۱	۴/۶۴	۰/۴۸	۱/۷۰	۳-۲-۱
۱۴/۰۹	۱/۸۷	۵/۵۹	۴-۵-۲	۶/۱۳	۰/۶۲	۲/۰۲	۳-۲-۲

۳-۲-۳	۲/۳۶	۰/۷۶	۷/۲۰	۳-۵-۴	۶/۳۹	۲/۰۹	۱۵/۷۰
۳-۲-۴	۲/۷۱	۰/۹۰	۸/۱۰	۴-۵-۴	۷/۲۲	۲/۳۰	۱۷/۳۹
۳-۲-۵	۳/۰۸	۱/۰۴	۸/۹۴	۴-۵-۵	۸/۰۶	۲/۵۰	۱۹/۱۶
۳-۳-۰	۱/۷۲	۰/۴۹	۴/۷۷	۵-۰-۰	۲/۴۰	۰/۷۶	۷/۶۳
۳-۳-۱	۲/۰۵	۰/۶۳	۶/۲۴	۵-۰-۱	۳/۱۴	۱/۰۶	۹/۰۸
۳-۳-۲	۲/۴۰	۰/۷۷	۷/۳۱	۵-۰-۲	۴/۲۷	۱/۴۶	۱۱/۴۲
۳-۳-۳	۲/۷۶	۰/۹۲	۸/۲۱	۵-۰-۳	۵/۷۸	۱/۹۲	۱۴/۴۶
۳-۳-۴	۳/۱۳	۱/۰۶	۹/۰۶	۵-۰-۴	۷/۵۹	۲/۳۹	۱۸/۱۶
۳-۳-۵	۳/۵۲	۴/۲۰	۹/۸۹	۵-۰-۵	۹/۵۳	۱/۶۵	۲۲/۳۴
۳-۴-۰	۲/۰۹	۰/۶۴	۶/۳۶	۵-۱-۰	۳/۲۹	۱/۱۲	۹/۴۰
۳-۴-۱	۲/۴۴	۰/۷۹	۷/۴۲	۵-۱-۱	۴/۵۶	۱/۵۶	۱۲/۰۲
۳-۴-۲	۲/۸۱	۰/۹۳	۸/۳۳	۵-۱-۲	۶/۳۱	۲/۰۷	۱۵/۵۳
۳-۴-۳	۳/۱۹	۱/۰۸	۹/۱۸	۵-۱-۳	۸/۳۹	۲/۵۷	۱۹/۸۵
۳-۴-۴	۳/۵۸	۱/۲۳	۱۰/۰۲	۵-۱-۴	۱۰/۶۲	۳/۰۴	۲۴/۸۵
۳-۴-۵	۳/۹۹	۱/۳۷	۱۰/۸۶	۵-۱-۵	۱۲/۹۵	۳/۰۴	۳۰/۹۰
۳-۵-۰	۲/۴۸	۰/۸۰	۷/۵۳	۵-۲-۰	۴/۹۳	۱/۶۷	۱۲/۷۶
۳-۵-۱	۲/۸۶	۰/۹۵	۸/۴۴	۵-۲-۱	۷/۰۰	۲/۲۴	۱۶/۹۴
۳-۵-۲	۳/۲۵	۱/۱۰	۹/۳۱	۵-۲-۲	۹/۴۴	۲/۸۰	۲۲/۱۳
۳-۵-۳	۳/۶۵	۱/۲۵	۱۰/۱۷	۵-۲-۳	۱۲/۰۵	۳/۳۱	۲۸/۴۳
۳-۵-۴	۴/۰۷	۱/۴۰	۱۱/۰۳	۵-۲-۴	۱۴/۷۹	۳/۸۱	۳۷/۱۴
۳-۵-۵	۴/۵۰	۱/۵۴	۱۱/۸۹	۵-۲-۵	۱۷/۶۷	۵/۰۳	۵۲/۳۰
۴-۰-۰	۱/۳۰	۰/۳۱	۳/۱۱	۵-۳-۰	۷/۹۲	۲/۴۷	۱۸/۸۶
۴-۰-۱	۱/۶۶	۰/۴۶	۴/۴۵	۵-۳-۱	۱۰/۸۶	۳/۰۸	۲۵/۴۴
۴-۰-۲	۲/۰۷	۰/۶۴	۶/۳۱	۵-۳-۲	۱۴/۰۶	۳/۶۸	۳۴/۴۵
۴-۰-۳	۲/۵۳	۰/۸۲	۷/۶۴	۵-۳-۳	۱۷/۵۰	۴/۳۴	۵۱/۳۱
۴-۰-۴	۳/۰۲	۱/۰۲	۸/۸۱	۵-۳-۴	۲۱/۲۲	۵/۲۹	۶۷/۹۸
۴-۰-۵	۳/۵۵	۱/۲۱	۹/۹۶	۵-۳-۵	۲۵/۲۷	۸/۱۴	۷۹/۷۱
۴-۱-۰	۱/۶۹	۰/۴۸	۴/۶۰	۵-۴-۰	۱۲/۹۹	۳/۴۸	۳۱/۰۸
۴-۱-۱	۲/۱۲	۰/۶۶	۶/۴۶	۵-۴-۱	۱۷/۲۴	۴/۲۹	۴۹/۷۵
۴-۱-۲	۲/۵۸	۰/۸۵	۷/۷۹	۵-۴-۲	۲۲/۱۲	۵/۶۳	۷۰/۸۷
۴-۱-۳	۳/۱۰	۱/۰۵	۸/۹۸	۵-۴-۳	۲۷/۸۱	۸/۸۲	۸۶/۰۰
۴-۱-۴	۳/۶۵	۱/۲۵	۱۰/۱۶	۵-۴-۴	۳۴/۵۴	۱۱/۵۹	۱۰۱/۱۰
۴-۱-۵	۴/۲۵	۱/۴۵	۱۱/۳۸	۵-۴-۵	۴۲/۵۶	۱۴/۳۷	۱۱۸/۰۰
۴-۲-۰	۲/۱۶	۰/۶۷	۶/۶۱	۵-۵-۰	۲۳/۹۸	۷/۶۲	۷۶/۲۹
۴-۲-۱	۲/۶۴	۰/۸۷	۷/۹۴	۵-۵-۱	۳۴/۷۷	۱۱/۷۲	۱۰۱/۶۰
۴-۲-۲	۳/۱۷	۱/۰۸	۹/۱۵	۵-۵-۲	۵۴/۲۲	۱۷/۹۱	۱۴۱/۹۰
۴-۲-۳	۳/۷۵	۱/۲۹	۱۰/۳۷	۵-۵-۳	۹۱/۷۸	۲۶/۷۲	۲۲۰/۱۰
۴-۲-۴	۴/۳۸	۱/۵۰	۱۱/۶۴	۵-۵-۴	۱۶۰/۹۰	۳۸/۳۷	۴۱۰/۳۰

۴-۲-۵	۵/۰۴	۱/۷۱	۱۲/۹۷	۵-۵-۵	>۱۶۰/۹۰	-----	-----

۹-۳ مرحله ۳تبدیل MPN/mL وزن مرطوب به MPN/g کل مواد جامد براساس وزن خشک:

برای تحلیل و محاسبات تعیین درصد کل مواد جامد به بند ۸-۲ مراجعه کنید.

برای تبدیل به MPN/g کل مواد جامد براساس وزن خشک فرض بر این است که؛

MPN/mL (وزن مرطوب) = MPN/g (وزن مرطوب)

بنابراین امکان محاسبه MPN/g کل مواد جامد براساس وزن خشک از طریق فرمول زیر فراهم می شود.

فرمول (۳)

MPN/g (وزن خشک) = [MPN/mL وزن مرطوب مرحله دو] / درصدکل مواد جامد (به صورت یک عدد اعشاری بیان می شود) ×۴

مثال هایی برای تبدیل به MPN/g براساس وزن خشک و محاسبات مربوطه در جدول ۴ ارایه شده است.

جدول ۴– مثال های برای تبدیل به MPN/g کل مواد جامد (وزن خشک) ادامه مرحله۲در جدول۳

مثال (مایع یا جامد)	کل مواد جامد	مرحله ۳ : وزن خشک MPN/g = درصدکل مواد جامد / (وزن مرطوب MPN/mL مرحله۲)
الف	٪۴	وزن خشک MPN/g ۷۹۰۰۰÷۰٫۰۴= ۱۹۷۵۰۰≈۲٫۰×۱۰^۶
ب	٪۶۰	وزن خشک MPN/g ۴۸۰۰÷۰٫۶= ۸۰۰۰≈۸٫۰×۱۰^۳
ج	٪۵۶	وزن خشک MPN/g ۱۸۰÷۰٫۵۶= ۳۲۱≈۳٫۲×۱۰^۲
د	٪۲۲	وزن خشک MPN/g ۱۴۰۰۰÷۰٫۲۲= ۶۳۶۳۶≈۶٫۴×۱۰^۴
ه	٪۱۸	وزن خشک MPN/g ۴۰۰۰÷۰٫۱۸= ۲۲۲۲۲ ≈۲٫۲×۱۰^۴
و	٪۴۳	وزن خشک MPN/g ۵۴۰۰۰۰÷۰٫۴۳= ۱۲۵۵۸۱۴≈۱٫۳×۱۰^۶

۹-۴ محاسبه میانگین هندسی

برای بررسی کاهش عوامل بیماری زا در کمپوست درجه ۲ میانگین هندسی تعداد کلی فرم های مدفوعی بایستی ۷ نمونه جمع آوری شده به طریق زیر محاسبه می شود:

- تبدیل MPN کلی فرم مدفوعی در گرم (وزن خشک) به اندازه لگاریتم در مبنای ۱۰
- گرفتن میانگین اندازه های لگاریتم در مبنای ۱۰
- گرفتن آنتی لگاریتم از میانگین اندازه های لگاریتم در مبنای ۱۰

یک مثال در جدول ۵ ارایه شده است.

جدول ۵– محاسبه میانگین هندسی تعداد کلی فرم های مدفوعی برای نمونه های کمپوست

شماره نمونه	**(وزن خشک)MPN/g(کلی فرم مدفوعی)**	$Log_{۱۰}$
۱	$۶۰۰۰۰۰=۶/۰\times۱۰^{۵}$	۵/۷۸
۲	$۴۲۰۰۰۰۰=۴/۲\times۱۰^{۶}$	۶/۶۲
۳	$۱۷۰۰۰۰۰=۱/۷\times۱۰^{۶}$	۶/۲۳
۴	$۱۴۰۰۰۰۰=۱/۴\times۱۰^{۶}$	۶/۱۵
۵	$۴۰۰۰۰۰=۴/۰\times۱۰^{۵}$	۵/۶۰
۶	$۱۱۰۰۰۰۰=۱/۱\times۱۰^{۶}$	۶/۰۴
۷	$۵۱۰۰۰۰=۵/۱\times۱۰^{۵}$	۵/۷۱
میانگین مقادیر log_{10} =۶/۰۲= ۷/(۵/۷۸+۶/۶۲+۶/۲۳+۶/۱۵+۵/۶۰+۶/۰۴+۵/۷۱)		
آنتی لگاریتم۶/۰۲ = (وزن خشک)g /میانگین هندسیMPNکلی فرم های مدفوعی $۱/۰\times۱۰^{۶}$ =۱۰۴۷۱۲۸		

۱۰ کالیبراسیون تجهیزات و استاندارد سازی

۱-۱۰ دمای داخل گرمخانه ها (انکوباتورها) و حمام های آب گرم (بن ماری ها) دوبار در روز به فاصله حداقل ۴ ساعت بررسی شود. اینکار برای اطمینان از عملکرد صحیح در محدوده های اعلام شده روش آزمون می باشد. اندازه گیری ها در دفتر وقایع دستگاه ثبت شود.

۲-۱۰ دمای داخل یخچال و فریزر حداقل روزی یکبار برای اطمینان از عملکرد صحیح در محدوده های اعلام شده روش آزمون بررسی و اندازه گیری ها در دفتر ثبت وقایع یخچال و فریز ثبت شود.

۳-۱۰ دما سنج ها و گرمخانه ها را هر شش ماه با دماسنج های قابل ردیابی و معتبر کالیبره نمایید. مخزن جیوه از لحاظ شکستگی بررسی شود.

۴-۱۰ pH متر را قبل از هر بار استفاده با محلول های استاندارد (۴/۰، ۷/۰ و ۱۰/۰) تا نزدیکترین دامنه مورد آزمون کالیبره کنید.

۵-۱۰ ترازوهای دارای سطح بارگیر را ماهی یک بار با وزنه های قابل ردیابی و تایید شده رده F2 کالیبره کنید.

۱۱ روش محک نمونه [1]

1- Sample Spiking Procedure

2-Initial precision and recovery

3-Ongoning precision and recovery

۱۱-۱ به منظور پایش کارایی اولیه و مستمر روش، تهیه و آزمون نمونه های مرجع محک جهت برآوردن الزامات کنترل کیفیت در این استاندارد انجام می گیرد .برای آزمونهای IPR [۲] (بند ۱۲- ۴) و OPR [۳] (بند ۱۲-۵) لازم است نمونه ها را با سوسپانسیون محک تهیه شده در آزمایشگاه به شرح ذیل محک بزنید. بند ۱۱ به روش زیر تنظیم شده است: آماده سازی سوسپانسیون محک اشرشیا کلی (بند۱۱-۲)، رقیق سازی سوسپانسیون محک (بند۱۱-۳)، شمارش سوسپانسیون محک (بند۱۱-۴)

۱۱-۲ تهیه سوسپانسیون های محک اشرشیا کلی (درجه یک و دو)

۱۱-۲-۱ کشت ذخیره

با تلقیح اشرشیا کلی ATCC #۲۵۹۲۲ در محیط آگار عصاره قلب و گرمخانه گذاری در ۳۵°C±۳°C به مدت ۴±۲۰ ساعت یک کشت ذخیره آماده کنید (یا محیط غیر انتخابی دیگر به عنوان مثال : تریپتیک سوی آگار). کشت ذخیره در تاریکی و دمای اتاق به مدت ۳۰ روز می تواند نگهداری شود.

۱۱-۲-۲ لوریل تریپتوزبراث ۱٪

محلول ۱٪ LTB را از ترکیب ۹۹ میلی لیتر محلول بافرفسفات سترون و ۱ میلی لیتر LTB اصلی در یک بطری با درب پیچی یا ظرف رقیق سازی آب قابل مهروموم، تهیه کنید . این محلول را به خوبی هم بزنید.

۱۱-۲-۳ سوسپانسیون رقیق نشده محک

یک لوپ پر از سوسپانسیون اشرشیا کلی ATCC #۲۵۹۲۲ را در شرایط سترون به محلول ۱ ٪ LTB منتقل و حداقل ۲۵ مرتبه همزنی و در دمای ۳۵°C±۳°C به مدت ۴±۲۰ ساعت گرمخانه گذاری شود. سوسپانسیون محک حاصل حاوی تعداد $۱/۰\times۱۰^{۷}$ تا $۱/۰\times۱۰^{۸}$ اشرشیا کلی CFU/mL می باشد. که به آن، سوسپانسیون رقیق نشده محک می گویند.

۱۱-۳ رقیق سازی سوسپانسیون محک

۱۱-۳-۱ حداقل ۲۵ مرتبه بطری سوسپانسیون محک را به شدت تکان دهید . توسط یک پیپت سترون ۱ میلی لیتر از این سوسپانسیون به ۹۹ میلی لیتر محلول بافرفسفات (بند ۷-۱-۳) اضافه و پس از بستن در بطری حداقل ۲۵ مرتبه به خوبی تکان داده شود. این سوسپانسیون رقیق شده محک «الف»نامگذاری شود. تعداد باکتری ها در ۱ میلی لیتر از رقت «الف»معادل $۱۰^{-۲}$ میلی لیتر از سوسپانسیون رقیق نشده محک اصلی است.

۱۱-۳-۲ توسط یک پیپت سترون ۱۱میلی لیتر از سوسپانسیون رقیق محک «الف» به ۹۹ میلی لیتر محلول سترون بافر فسفات اضافه و پس از بستن درب بطری حداقل ۲۵ مرتبه به خوبی تکان داده شود. این سوسپانسیون رقیق محک «ب»نامگذاری شود. تعداد باکتری ها در ۱میلی لیتر از رقت«ب»حاوی $۱۰^{-۳}$ میلی لیتر از سوسپانسیون رقیق نشده محک اصلی است.

۱۱-۳-۳ توسط یک پیپت سترون ۱۱ میلی لیتر از سوسپانسیون رقیق محک «ب» به ۹۹ میلی لیتر محلول سترون بافر فسفات اضافه و پس از بستن درب بطری حداقل ۲۵ مرتبه به خوبی تکان داده شود. این سوسپانسیون رقیق محک «ج»نامگذاری شود .تعداد باکتری ها در ۱ میلی لیتر از رقت «ج» معادل $۱۰^{-۴}$ میلی لیتر از سوسپانسیون رقیق نشده محک اصلی است.

۱۱-۳-۴ توسط یک پیپت سترون ۱۱ میلی لیتر از سوسپانسیون رقیق محک «ج» به ۹۹ میلی لیتر محلول سترون بافرفسفات اضافه و پس از بستن درب بطری حداقل ۲۵ مرتبه به خوبی تکان داده شود. این سوسپانسیون رقیق محک «د» نامگذاری شود. تعداد باکتری ها در ۱ میلی لیتر از رقت «د» معادل $۱۰^{-۵}$ میلی لیتر از سوسپانسیون رقیق نشده محک اصلی است.

۱۱-۳-۵ توسط یک پیپت سترون ۱۱ میلی لیتر از سوسپانسیون رقیق محک «ج» به ۹۹ میلی لیتر محلول سترون بافرفسفات اضافه و پس از بستن درب بطری حداقل ۲۵ مرتبه به خوبی تکان داده شود. این سوسپانسیون رقیق محک «د» نامگذاری شود. تعداد باکتری ها را در ۱ میلی لیتر از رقت «ه» معادل $۱۰^{-۶}$ میلی لیتر از سوسپانسیون رقیق نشده محک اصلی است.

۱۱-۴ شمارش سوسپانسیون محک

۱۱-۴-۱ آگار عصاره قلب را طبق بند ۷-۱-۶ آماده و ۱۰تا ۱۵ میلی لیتر در هر پلیت بریزید و اجازه دهید به حالت جامد در آید.از خشک بودن سطح آگار اطمینان حاصل کنید.

یاد آوری- برای اطمینان از خشک بودن سطح آگار، پلیت ها را ترجیحاً چند روز قبل تهیه و در دمای اتاق به حالت وارونه قرار دهید یا با استفاده از یک هود لامینار و جریان هوا آنها را خشک کنید.

۱۱-۴-۲ هر یک از موارد زیر را در سه تکرار انجام دهید که منجر به ارزیابی ۹ پلیت کشت شده می شود:

* با پیپت ۰/۱ میلی لیتر از رقت «ج» را بر روی سطح از قبل خشک پلیت HIA بریزید (معادل $۱۰^{-۵}$میلی لیتر از سوسپانسیون محک اصلی).
* با پیپت ۰/۱ میلی لیتر از رقت «د» را بر روی سطح از قبل خشک پلیت HIA بریزید (معادل $۱۰^{-۶}$ میلی لیتر از سوسپانسیون محک اصلی).
* با پیپت ۰/۱ میلی لیتر از رقت «ه» را بر روی سطح از قبل خشک پلیت HIA بریزید (معادل $۱۰^{-۷}$ میلی لیتر از سوسپانسیون محک اصلی).

۱۱-۴-۳ برای هر یک از پلیت های پخش شده با استفاده از میله شیشه ای یا پخش کننده، مایع تلقیح را در سطح محیط کشت با گردانیدن پلیت پخش کنید.

۱۱-۴-۴ اجازه دهید تا مایع تلقیح کاملاً در محیط کشت جذب شود.

۱۱-۴-۵ پلیت ها را به حالت وارونه در دمای $۳۵^{\circ}C \pm ۰/۵^{\circ}C$ بمدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری کنید.

۱۱-۴-۶ پرگنه های هر پلیت را شمارش و ثبت کنید . به بند ۱۱-۷ محاسبه درصد بازیابی محک آماده آزمایشگاهی مراجعه کنید.

۱۱-۵ محک نمونه های کمپوست درجه یک

نمونه کمپوست درجه یک همگن شود (بند۷-۳-۱). برای شمارش کلی فرم های مدفوعی در نمونه محک زده نشده رقیق سازی و تلقیح را مطابق بند ۷-۳-۲ انجام دهید . بعد از رقیق سازی نمونه محک زده نشده و تلقیح آن در محیط کشت، به روش ذیل آن رامحک بزنید.

یاد آوری- زمانی که هدف از محک نمونه کمپوست تعیین درصد بازیابی است ، باید تعداد اشرشیاکلی در سوسپانسیون محک غیر رقیق مشخص شود.

۱۱-۵-۱ نمونه های مایع : پس از آزمون نمونه همگن محک زده نشده با روش LTB/EC و آماده سازی سری رقت ها ، ۲۸۴ میلی لیتر از ۳۰۰ میلی لیتر نمونه اصلی همگن محک زده نشده باقی می ماند. برای محک نمونه به ازای هر ۱۰۰ میلی لیتر از نمونه همگن محک زده نشده باقی مانده، ۱ میلی لیتر از رقت «ب» سوسپانسیون محک اضافه درب گذاری و با سرعت بالا برای مدت ۲-۱ دقیقه مخلوط کنید. این نمونه محک همگن است. حجم سوسپانسیون رقیق نشده محک اضافه شده به هر میلی لیتر از نمونه کمپوست محک ۱×۱۰^{-۵} میلی لیتر به ازای هر میلی لیتر [کمپوست ۲۸۴ mL/(۲٫۸mL $\times۱۰^{-۳}$mL)] است که به آن $V_{spiked\ per\ unit\ compost}$ اطلاق می شود. به بند ۷-۳-۲-۱ رقیق سازی و تلقیح مراجعه کنید.

۱۱-۵-۲ نمونه های جامد:پس از آزمون نمونه همگن محک زده نشده با روش LTB/EC و آماده سازی سری رقت ها سری، ۲۳۴ میلی لیتر از ۳۰۰ میلی لیتر نمونه محک زده نشده باقی می ماند. برای محک نمونه به ازای هر ۱۰۰ میلی لیتر از نمونه همگن محک زده نشده باقی مانده، یک میلی لیتر از رقت «ب» سوسپانسیون محک اضافه، درب گذاری و با سرعت بالا برای مدت ۲-۱ دقیقه مخلوط کنید. این نمونه محک همگن است. حجم سوسپانسیون رقیق نشده محک اضافه شده به هر میلی لیتر از نمونه کمپوست محک ۱×۱۰^{-۴} میلی لیتر به ازای هر میلی لیتر[کمپوست ۲٫۳۴g/(۲٫۳mL $\times۱۰^{-۳}$mL)] است که به آن $V_{spiked\ per\ unit\ compost}$ اطلاق می شود. به بند ۷-۳-۲-۲ رقیق سازی و تلقیح مراجعه کنید.

۱۱-۶ محک نمونه های کمپوست درجه ۲

نمونه محک زده نشده کمپوست درجه دو را همگن کنید (بند ۷-۳-۱) برای شمارش کلی فرم های مدفوعی در نمونه محک زده نشده رقیق سازی و تلقیح را مطابق بند ۷-۳-۲ انجام دهید. بعد از رقیق سازی و تلقیح نمونه محک زده نشده در محیط کشت، نمونه کمپوست را به شرح ذیل محک بزنید.

یاد آوری- زمانیکه هدف از محک نمونه کمپوست تعیین درصد بازیابی است، باید تعداد اشرشیاکلی در سوسپانسیون رقیق نشده محک مشخص شود.

پس از آماده شدن سری رقت ها از نمونه همگن محک زده نشده (بند۷-۳-۲) ، ۲۸۹ میلی لیتر از ۳۰۰ میلی لیتر نمونه اصلی محک زده نشده باقی می ماند. پس از سنجش نمونه محک زده نشده و آماده سازی رقت، برای محک نمونه به ازای هر

۱۰۰ میلی لیتر باقیمانده از نمونه همگن محک زده نشده، یک میلی لیتر از سوسپانسیون رقیق نشده محک خوب مخلوط شده اضافه ، درب گذاری و با سرعت بالا برای مدت ۲-۱ دقیقه مخلوط کنید. این نمونه محک همگن است.

یاد آوری- حجم سوسپانسیون رقیق نشده محک اضافه شده به ازای هر میلی لیتر یا گرم (وزن مرطوب) در کمپوست درجه دو با حجم این سوسپانسیون در کمپوست درجه یک به علت باقی ماندن حجم های مختلف از نمونه محک زده نشده همگن متفاوت است.

۱۱-۶-۱ نمونه های مایع: حجم سوسپانسیون رقیق نشده محک اضافه شده به ازای هر میلی لیتر در نمونه کمپوست محک زده شده ۱×۱۰^{-۲} میلی لیتر است [کمپوست ۲۸۹mL/(سوسپانسیون محک ۲٫۹ mL)] که به آن $V_{spiked\ per\ unit\ compost}$ اطلاق می شود. بقیه مراحل را مطابق بند ۷-۳-۲-۲ (رقیق سازی و تلقیح) انجام دهید.

۱۱-۶-۲ نمونه های جامد: حجم سوسپانسیون رقیق نشده محک اضافه شده به هر گرم از نمونه کمپوست محک زده نشده ۱×۱۰^{-۲}میلی لیتر به ازای هر گرم است.[کمپوست ۲۸٫۹mL/(سوسپانسیون محک ۲٫۹ mL)]که به $V_{spiked\ per\ unit\ compost}$ اطلاق می شود بقیه مراحل را مطابق بند ۷-۳-۲-۲ (رقیق سازی و تلقیح) انجام دهید.

۱۱-۷ محاسبه درصد بازیابی محک آماده آزمایشگاهی

درصد بازیابی اشرشیا کلی محک طی چهار مرحله زیر انجام می شود.

یاد آوری- مثال اعداد محاسبه شده در جداول زیر در انتهای هر مرحله گرد شده است. اگر آزمایشگاه شما دوباره این مثال ها را با استفاده از یک صفحه گسترده را محاسبه کند، ممکن است اندکی تفاوت بدست آید.

۱۱-۷-۱ مرحله ۱ : محاسبه تعداد اشرشیا کلی (بر حسب CFU/mL) در سوسپانسیون رقیق نشده محک

۱۱-۷-۱-۱ تعداد اشرشیا کلی بر حسب CFU/mL در سوسپانسیون محک با محاسبه همه پلیت ها که شمارش آنها بین دامنه قابل قبول ۳۰ تا ۳۰۰ پرگنه در هر پلیت است، معین می شود.

۱۱-۷-۱-۲ اگر تعداد پرگنه ها از محدوده مورد قبول بیشتر باشد،(یعنی ۳۰۰ <) یا اینکه پرگنه ها از یکدیگر مجزا نباشند نتایج باید تحت عنوان غیر قابل شمارش (TNTC) [1] تلقی شود.

۱۱-۷-۱-۳ تعداد اشرشیا کلی (بر حسب CFU/mL) در سوسپانسیون رقیق نشده محک از فرمول زیر محاسبه شود (مثالی از محاسبات در جدول ۶ ارایه شده است):

$$EC_{\ Undiluted\ Spiked} = (CFU_1+CFU_2+\ldots+CFU_n)/(V_1+V_2+\ldots+V_n) \qquad \text{فرمول (۴)}$$

که در آن :

1- Too Numerous To Count

$EC_{Undiluted\ Spiked}$ اشرشیا کلی (CFU/mL) در سوسپانسیون رقیق نشده محک؛

CFU تعداد پرگنه های تشکیل شده در هر پلیت HIA قابل شمارش(۳۰ CFU تا ۳۰۰CFU)؛

V حجم نمونه رقیق نشده تلقیح شده در هر پلیت HIA قابل شمارش (۳۰ CFU تا ۳۰۰ CFU)؛

n تعداد پلیت های شمارش شده در محدوده قابل قبول (۳۰ CFU تا ۳۰۰ CFU) در هر پلیت.

جدول ۶– مثال محاسبات تراکم اشرشیا کلی سوسپانسیون محک

مثال ها	آزمایش سه نسخه ای CFU/plate از پلیت های HIA			CFU/mL اشرشیا کلی در سوسپانسیون محک رقیق نشده ($EC_{Undiluted\ Spiked}$)
	پلیتهای mL $۱۰^{-۵}$	پلیتهای mL $۱۰^{-۶}$	پلیتهای mL $۱۰^{-۷}$	
مثال ۱	۳۰۱،۲۵۰،۲۷۵	۵،۱۰،۳۰	۰،۰،۰	(۲۷۵+۲۵۰+۳۰)/($۱۰^{-۵}$ +$۱۰^{-۵}$+ $۱۰^{-۶}$) = ۵۵۵/(۲/۱×$۱۰^{-۵}$)=۲۶۴۲۸۵۷۱= ۲/۶×$۱۰^{۷}$ CFU/mL
مثال ۲	غیر قابل شمارش، غیر قابل شمارش، غیر قابل شمارش	۲۹۹، غیر قابل شمارش ، غیر قابل شمارش	۳۲،۱۰۹،۱۲	(۲۹۹+۱۰۹+۳۲)/($۱۰^{-۶}$ +$۱۰^{-۷}$+ $۱۰^{-۷}$) = ۴۴۰/(۱/۲×$۱۰^{-۶}$)=۳۶۶۶۶۶۶۶۷= ۳/۷×$۱۰^{۸}$ CFU/mL
یاد آوری - تعداد اشرشیا کلی محک رقیق نشده براساس پلیت های در محدوده قابل شمارش (۳۰ تا ۳۰۰ در هر پلیت) محاسبه شده است .				

۱۱-۷-۲ مرحله ۲: محاسبه تعداد اشرشیا کلی محک بر حسب CFU/mL یا CFU/g (وزن مرطوب)

۱۱-۷-۲-۱ حجم سوسپانسیون رقیق نشده محک در هر واحد (بر حسب mL یا g) از نمونه های محک کمپوست درجدول ۷ ارایه شده است.

جدول ۷ – حجم سوسپانسیون رقیق نشده محک رقیق سازی نشده در هر واحد (mL یا g) از نمونه های محک کمپوست

نوع نمونه محک	حجم محک در هر واحد کمپوست
درجه یک مایع	۱/۰×$۱۰^{-۵}$ mL به ازای هر میلی لیتر کمپوست
درجه یک جامد	۱/۰×$۱۰^{-۴}$ mL به ازای هر گرم کمپوست (وزن مرطوب)
درجه دو مایع	۱/۰×$۱۰^{-۲}$ mL به ازای هر میلی لیتر کمپوست
درجه دو جامد	۱/۰×$۱۰^{-۱}$ mL به ازای هر گرم کمپوست (وزن مرطوب)

۱۱-۷-۲-۲ تعداد اشرشیا کلی محک وزن مرطوب از فرمول زیر محاسبه می شود. مثالی از محاسبات در جدول ۸ ارایه شده است.

فرمول (۵)

$$\text{Spiked EC}_{\text{Wet weight}} = (\text{EC}_{\text{undiluted spike}}) \times (V_{\text{spiked per unit compost}})$$

که در آن:

$Spiked\ EC_{Wet\ weight}$ تعداد اشرشیا کلی محک بر حسب CFU در هر میلی لیتر یا گرم از کمپوست (وزن مرطوب)؛

$EC_{undiluted\ spike}$ اشرشیا کلی بر حسب CFU در میلی لیتر از سوسپانسیون محک رقیق نشده؛

$V_{spiked\ per\ unit\ compost}$ میلی لیتر از سوسپانسیون محک رقیق نشده به ازای هر میلی لیتر یا گرم ازکمپوست محک زده شده.

جدول ۸- مثال محاسبات اشرشیا کلی محک

اشرشیا کلی رقیق نشده محک	حجم نمونه محک	اشرشیا کلی محک (وزن مرطوب)
مثال ۱ : $۲/۶\times۱۰^{۷}$CFU/mL	درجه یک مایع : $۱/۰\times۱۰^{-۵}$میلی لیتر در هر میلی لیتر کمپوست	$(۲/۶\times۱۰^{۷}\text{CFU/mL})\times(۱/۰\times۱۰^{-۵}\text{mL/mL})=۲/۶\times۱۰^{۲}\text{CFU/mL}$
	درجه یک جامد : $۱/۰\times۱۰^{-۴}$میلی لیتر در هر گرم کمپوست (وزن مرطوب)	$(۲/۶\times۱۰^{۷}\text{CFU/mL})\times(۱/۰\times۱۰^{-۴}\text{mL/g})=۲/۶\times۱۰^{۳}\text{CFU/g}$(وزن مرطوب)
	درجه دو مایع : $۱/۰\times۱۰^{-۲}$میلی لیتر در هر میلی لیتر کمپوست	$(۲/۶\times۱۰^{۷}\text{CFU/mL})\times(۱/۰\times۱۰^{-۲}\text{ mL/mL})=۲/۶\times۱۰^{۵}\text{CFU/mL}$
	درجه دو جامد : $۱/۰\times۱۰^{-۱}$میلی لیتردر هرگرم کمپوست (وزن مرطوب)	$(۲/۶\times۱۰^{۷}\text{CFU/mL})\times(۱/۰\times۱۰^{-۱}\text{ mL/g})=۲/۶\times۱۰^{۶}\text{CFU/g}$(وزن مرطوب)
مثال ۲ : $۳/۷\times۱۰^{۸}$CFU/mL	درجه یک مایع : $۱/۰\times۱۰^{-۵}$میلی لیتر در هر میلی لیتر کمپوست	$(۳/۷\times۱۰^{۸}\text{CFU/mL})\times(۱/۰\times۱۰^{-۵}\text{ mL/mL})=۳/۷\times۱۰^{۳}\text{CFU/mL}$

	درجه یک جامد : $۱/۰\times۱۰^{-۴}$میلی لیتر در هر گرم کمپوست (وزن مرطوب)	$(۳/۷\times۱۰^{۸}CFU/mL)\times(۱/۰\times۱۰^{-۴}mL/g)=۳/۷\times۱۰^{۴}CFU/g$(وزن مرطوب)
	درجه دو مایع : $۱/۰\times۱۰^{-۲}$میلی لیتر در هر میلی لیتر کمپوست	$(۳/۷\times۱۰^{۸}CFU/mL)\times(۱/۰\times۱۰^{-۲}\ mL/mL)=۳/۷\times۱۰^{۶}CFU/mL$
	درجه دو جامد: $۱/۰\times۱۰^{-۱}$میلی لیتر در هر گرم کمپوست (وزن مرطوب)	$(۳/۷\times۱۰^{۸}CFU/mL)\times(۱/۰\times۱۰^{-۱}\ mL/g)=۳/۷\times۱۰^{۷}CFU/g$(وزن مرطوب)

۱۱-۷-۳ مرحله ۳: تبدیل به تعداد واقعی اشرشیا کلی محک CFU/g در کل مواد جامد (وزن خشک)

۱۱-۷-۳-۱ تعداد واقعی اشرشیا کلی محک را بر حسب CFU/g درکل مواد جامد (وزن خشک) را با استفاده از اشرشیا کلی محک mL یا g (وزن مرطوب) به عنوان صورت کسر در فرمول تبدیل کنید، در ادامه و در جدول ۹ مثال هایی ارایه شده است.

جدول ۹- مثالهای تبدیل به تعداد واقعی اشرشیا کلی محک بر حسب CFU/g درکل مواد جامد (وزن خشک)

مثال کل مواد جامد	وزن خشکCFU/g اشرشیا کلی محک واقعی = درصد کل مواد جامد/g یا CFU/mL
درجه یک مایع : ۹ ٪	$۲/۶\times۱۰^{۲}/۰/۰۹=۲۸۸۹=۲/۹\times۱۰^{۳}$ CFU/g(وزن خشک)
درجه یک جامد: ۸۲ ٪	$۲/۶\times۱۰^{۳}/۰/۸۲=۳۱۷۱=۳/۲\times۱۰^{۳}$ CFU/g(وزن خشک)
درجه دو مایع : ۴ ٪	$۲/۶\times۱۰^{۵}/۰/۰۴=۶۵۰۰۰۰۰=۶/۵\times۱۰^{۶}$ CFU/g(وزن خشک)
درجه دو جامد : ۲۳ ٪	$۲/۶\times۱۰^{۶}/۰/۲۳=۱۱۳۰۴۳۴۸=۱/۱\times۱۰^{۷}$ CFU/g(وزن خشک)
درجه یک مایع : ۷ ٪	$۳/۷\times۱۰^{۳}/۰/۰۷=۵۲۸۵۷=۵/۳\times۱۰^{۴}$ CFU/g(وزن خشک)

درجه یک جامد: ۸۸ ٪	۳٫۷×۱۰^۴ / ۰٫۸۸=۴۲۰۴۵=۴٫۲×۱۰^۴ CFU/g(وزن خشک)
درجه دو مایع : ۳ ٪	۳٫۷×۱۰^۶ / ۰٫۰۳=۱۲۳۳۳۳۳۳۳=۱٫۲×۱۰^۸ CFU/g(وزن خشک)
درجه دو جامد : ۴۰ ٪	۳٫۷×۱۰^۷ /۰٫۰۴=۹۲۵۰۰۰۰۰=۹٫۳×۱۰^۷ CFU/g(وزن خشک)

۱۱-۷-۴ مرحله۴ : محاسبه درصد بازیابی

۱۱-۷-۴-۱ درصد بازیابی از فرمول زیر محاسبه می شود:

$$R = 100 \times \frac{(Ns-Nu)}{T}$$ فرمول (۶)

که در آن :

R درصد بازیابی؛

N_s کلی فرم های مدفوعی بر حسب MPN/g وزن خشک در نمونه محک زده شده؛

N_u کلی فرم های مدفوعی بر حسب MPN/g وزن خشک در نمونه محک زده نشده؛

T تعداد واقعی اشرشیا کلی محک بر حسب CFU/g وزن خشک در نمونه محک زده شده.

۱۱-۷-۴-۲ مثالی از محاسبات درصد بازیابی در جدول ۱۰ ارایه شده است.

جدول ۱۰ – مثال محاسبات درصد بازیابی

نوع کمپوست	Ns	Nu	T	درصد بازیابی (R)
درجه یک مایع	۲٫۵×۱۰^۳	۱٫۵×۱۰^۱	۲٫۹×۱۰^۳	۱۰۰×[(۲٫۵×۱۰^۳) -(۱٫۵×۱۰^۱)]/۲٫۹×۱۰^۳=٪۸۶
درجه یک جامد	۳٫۹×۱۰^۳	۵٫۰×۱۰^۲	۳٫۲×۱۰^۳	۱۰۰×[(۳٫۹×۱۰^۳) -(۵٫۰×۱۰^۲)]/۳٫۲×۱۰^۳=٪۱۰۷
درجه دو مایع	۱٫۴×۱۰^۸	۱٫۷×۱۰^۶	۱٫۲×۱۰^۸	۱۰۰×[(۱٫۴×۱۰^۸) -(۱٫۷×۱۰^۶)]/۱٫۲×۱۰^۸=٪۱۱۵
درجه دو جامد	۸٫۳×۱۰^۶	۸٫۰×۱۰^۵	۱٫۱×۱۰^۷	۱۰۰×[(۸٫۳×۱۰^۶) -(۸٫۰×۱۰^۵)]/۱٫۱×۱۰^۷=٪۶۸

۱۲ کنترل کیفیت

کمینه الزامات برای برنامه کنترل کیفیت آزمون نمونه ها در این استاندارد شامل: تایید توانمندی اولیه آزمایشگاه از طریق عملکرد صحت و بازیابی اولیه آزمونها (IPR)(بند ۱۲-۴)،تایید توانمندی مستمر آزمایشگاه از طریق عملکرد آزمون های صحت و بازیابی مستمر(OPR) (بند ۱۲-۵)، آزمونهای محک ماده اولیه (MS)[1] (بند ۱۲-۶) آزمونهای روزانه کنترل های

مثبت و منفی (بند ۱۲-۱)، روش های شاهد (بند ۱۲-۲) و بررسی سترون بودن محیط های کشت (بند ۱۲-۳) می باشند. برای آزمونهای IPR ، OPR و آزمونهای محک لازم است نمونه ها با هر دو محلول سوسپانسیون های محک آماده آزمایشگاهی ذکر شده در بند ۱۱ آزمون شود.

۱۲-۱ کنترلهای کشت

۱۲-۱-۱ کنترلهای منفی: آزمایشگاه برای اطمینان از کارایی صحیح محیط های کشت LTB و EC باید کنترلهای منفی را در نظر بگیرید. زمانیکه یک بهر[2] جدید از محیط کشت یا معرف مورد استفاده قرار می گیرد، کنترلهای منفی باید آزمایش شوند. در آزمایشگاه به طور مستمر، هر روزی که نمونه ها آزمایش می شوند باید یک کنترل منفی آزمایش شود.

۱۲-۱-۱-۱ همانطور که در بند ۱۱ توصیف شده است کنترل های منفی توسط تلقیح یک نمونه کنترل منفی مشخص و شناخته شده از گونه های کلی فرم کل (به عنوان مثال ۲۷۸۵۳# ATCC پسودوموناس) درمحیط کشت LTB و یک نمونه کنترل منفی مشخص و شناخته شده از گونه کلی فرم های مدفوعی (به عنوان مثال ۲۷۸۵۳# ATCC انتروباکتر آئروژنز) انجام می شوند. قابلیت حیات کنترل های منفی را باید در محیط های غیر اختصاصی(به عنوان مثال نوترینت آگار و تریپتیک سوی آگار) ارزیابی کنید.

۱۲-۱-۱-۲ اگر کنترل منفی پاسخ مورد انتظار را نشان نداد، محیط کشت یا معرف همراه و یا کنترل منفی را بررسی و یا تعویض نمایید و سپس آزمایش کنترل منفی مناسب را دوباره تکرار کنید.

۱۲-۱-۲ کنترلهای مثبت : آزمایشگاه برای اطمینان از کارایی صحیح محیط های کشت LTB و EC باید کنترلهای مثبت را آزمون نماید. زمانی که یک بهر جدید از محیط کشت ویا معرف مورد استفاده قرار می گیرد باید کنترلهای مثبت آزمایش شوند در آزمایشگاه به طور مستمر، هر روزی که نمونه ها آزمایش می شوند باید یک کنترل مثبت آزمایش شود.

۱۲-۱-۲-۱ همانطور که در بند ۱۱ توصیف شده، کنترلهای مثبت بوسیله تلقیح یک کنترل مثبت مشخص و شناخته شده (به عنوان مثال اشرشیا کلی ۲۵۹۲۲# ATCC) در محیط های کشت LTB و EC انجام می شوند.

۱۲-۱-۲-۲ اگر کنترل مثبت پاسخ مورد انتظار را نشان نداد، محیط کشت یا معرف همراه و یا کنترل مثبت را بررسی و یا تعویض و سپس آزمایش کنترل مثبت مناسب را دوباره تکرار کنید.

۱۲-۲ روش شاهد

در این روش ۲۰ میلی لیتر آب مقطر سترون برای تایید سترون بودن تجهیزات، مواد و ملزومات آزمایش می شود و فقدان رشد دلیل عدم آلودگی به ارگانیسم مورد نظر است. در آزمایشگاه به طور مستمر باید، هر روزی که نمونه ها آزمایش می شوند روش شاهد انجام شود.

۱۲-۳ بررسی سترون بودن محیط کشت

1-Matrix Spike

2- Batch

برای بررسی سترون بودن محیط های کشت تعدادی از محیط های موجود از هر بهر محیط کشت را در دمـای$35^{\circ}C \pm 0.5^{\circ}C$ (در مورد محیط کشت LTB) یا $44.5^{\circ}C \pm 0.5^{\circ}C$ (در مورد EC) برای مدت ۲±۲۴یا ۳±۴۸ساعت گرمخانه گذاری و از نظر رشد باکتری بررسی کنید. به ازای هر ۵۰ عدد در هر بهر یک عدد و اگر کمتر از ۵۰ عدد باشد نیز یکـی در نظـر گرفتـه شود.

جدول ۱۱ – ضوابط مورد قبول دقت و بازیابی اولیه و مستمر (IPR , OPR)

آزمون کارایی	ضوابط پذیرش LTB/EC
دقت اولیه و بازیابی (IPR) • میانگین درصد بازیابی • صحت (به عنوان حداکثر انحراف معیار نسبی)	 ٪۲۲۱ - ٪۶۵ ٪۸۴
دقت و بهبود مستمر OPR به عنوان درصد بازیابی	٪۳۹۱- ٪۳۷

۱۲-۴ صحت و بازیابی اولیه IPR

آزمونهای IPR برای نشان دادن عملکرد قابل قبول روش (بازیابی و صحت) استفاده می شوند و باید بوسـیله هـر آزمایشـگاه قبل از به کار گیری روش برای پایش نمونه های میدانی به کار گرفته شوند . این استاندارد به کار گیـری ایـن آزمـون هـا را برای هر آزمونی توصیه می کند اما الزام نمی نماید .نمونه های IPR باید همـراه بـا یـک روش شـاهد مناسـب(بنـد۱۲-۲) و بررسی های مناسب سترون بودن محیط های کشت (بند ۱۲-۳) انجام شوند . آزمونهای IPR باید به شرح زیر انجام شوند:

۱۲-۴-۱ ۴ نمونه ۳۰ گرمی ازکمپوست استاندارد تهیه و نمونه ها را با اشرشیا کلی ATCC #۲۵۹۲۲ طبق بند۱۱ تلقـیح کنید. هر نمونه IPR با توجه به روش ارائه شده در بند های ۷-۳ و۸ فرآوری و آزمون و میزان کلی فرم های مدفوعی طبـق بند ۹ به صورت MPN/g در (براساس ماده خشک) محاسبه شود.

۱۲-۴-۲ درصد بازیابی همه نمونه های IPR را با استفاده از معادله مناسب طبق بند۱۱ محاسبه کنید.

۱۲-۴-۳ با استفاده از درصد بازیابی های ۴ آزمون ، میانگین درصد و انحراف معیار نسبی (RSD) بازیابی هـا را محاسـبه، آن را بر میانگین تقسیم و در ۱۰۰ ضرب کنید. متوسط بازیابی و انحـراف معیـار را بـا ضـوابط مربوطـه IPR در جـدول ۱۱ مقایسه کنید. اگر میانگین و انحراف معیار برای بازیابی کلی فرم های مدفوعی دارای ضوابط قابل قبول باشد، کارایی سیسـتم قابل قبول و آزمون نمونه های میدانی می تواند شروع شود. اگر میانگین انحراف معیار بازیابی خارج از دامنـه مـورد پـذیرش باشد، کارایی سیستم غیر قابل قبول است. در این صورت شناسایی مشـکل بوسـیله ارزیـابی هـر مرحلـه از فرآینـد آزمـایش، (محیط کشت ، معرف ها و کنترلها) انجام و پس از رفع مشکل آزمونهای IPR را تکرار کنید.

۱۲-۵ صحت و بازیابی مستمر (OPR)

برای اثبات توانمندی مستمر سیستم آزمایشگاهی، آزمایشگاه باید بـه صـورت روزمـره نمونـه هـای تلقـیح شـده کمپوسـت استاندارد را پردازش و آزمایش کند. آزمایشگاه باید به ازاء هر ۲۰ نمونه میدانی یا محک و یا هفته ای یک نوبت (هر کدام که فراوان تر باشد) یک نمونه OPR را آزمون کند. نمونه های OPR باید همراه با روش شاهد مناسـب (بنـد ۱۲-۵) و بررسـی سترون بودن محیط کشت (بند ۱۲-۳) باشند. آزمونهای OPR عبارتند از :

۱۲-۵-۱ یک نمونه ۳۰ گرمی کمپوست استاندارد به روش محک نمونه مطابق بند ۱۱ با اشرشیا کلی ATCC #۲۵۹۲۲ ، تلقیح شود. هر نمونه OPR را با توجه به روش ارائه شده در بندهای ۷-۳ و ۸ فرآوری و آزمون کلی فرم های مدفوعی طبق بند ۹ به صورت MPN/g در (براساس ماده خشک) محاسبه شود.

۱۲-۵-۲ درصد بازیابی نمونه OPR را با استفاده از معادله مناسب طبق بند ۱۱ محاسبه شود.

۱۲-۵-۳ نتیجه درصد OPR (بازیابی)را با ضوابط مربوطه OPR در جدول ۱۱ مقایسه کنید. اگر نتیجه OPR با ضوابط قابل قبول بازیابی مطابقت داشته باشد، کارایی سیستم قابل قبول و آزمایش نمونه های میدانی می تواند ادامه یابد . اگر نتیجهOPR خارج از ضوابط قابل قبول باشد ، کارایی سیستم غیر قابل قبول است. در اینصورت شناسایی مشکل بوسیله ارزیابی هر مرحله از فرآیند آزمون(محیط کشت، معرف ها و کنترل دما) انجام وپس از رفع مشکل آزمونهای OPR تکرار شود.

۱۲-۵-۴ نتایج نمونه های OPR و IPR به عنوان بخشی از برنامه تضمین کیفیت آزمایشگاه باید به صورت بروز شده به منظور پایش روش کارایی مستمر در جداول و سوابق نگهداری شود. آزمایشگاه همچنین باید بیانیه ای مبنی بر صحت روش ارائه شده در این استاندارد را بوسیله محاسبه میانگین درصد بازیابی (R) و انحراف معیار از درصد بازیابی (S_r) ارائه نماید. صحت را به عنوان یک بازه بازیابی از $R-۲S_r$ تا $R+۲\ S_r$ بیان کنید.

۱۲-۶ آزمون های محک ماده اولیه (MS)

آزمون MS برای تعیین اثر یک ماده اولیه خاص بر بازیابی کلی فرم های مدفوعی انجام می گیرد. آزمایشگاه باید زمانیکه یک نمونه کمپوست بدون سابقه آزمایش قبلی در آزمایشگاه آنالیز می شود، نمونه MS را مورد آزمون قرار دهد. پس از آن ۵ درصد نمونه های میدانی هر توده کمپوست (یک نمونه از هر ۲۰ نمونه) باید شامل یک نمونه MS باشد. بایستی همراه با نمونه مورد آزمایش جهت ماده اولیه نمونه ای نیز از همان محل برداشته شده و به عنوان نمونه شاهد با استفاده از یک روش شاهد مناسب (بند ۱۲-۲) و بررسی سترون بودن محیط کشت مورد آزمون قرار گیرد (بند۱۲-۳).

در صورت امکان آزمون MS باید همراه یک نمونه OPR(بند ۱۲-۵) با استفاده از رویه تلقیح (سوسپانسیون محک تهیه شده در آزمایشگاه) باشد. انجام آزمون MS به شرح زیر است:

۱۲-۶-۱ دو نمونه میدانی ۳۰ گرمی پی در پی از یک محل جمع آوری و آماده سازی شوند. یک نمونه تلقیح نمی شود و برای تعیین غلظت زمینه یا محیطی کلی فرم های مدفوعی برای محاسبه بازیابی های MS آزمایش خواهد شد. نمونه دیگر با اشرشیا کلی ATCC #۲۵۹۲۲ ، به روش محک ذکر شده در بند ۱۱ ، تلقیح و به عنوان نمونه MS به کار می رود.

۱۲-۶-۲ به منظور برآورد دقیق غلظت کلی فرم های مدفوعی رقت هایی را براساس نتایج قبلی یا میزان مورد انتظار آنها در نمونه های میدانی، انتخاب کنید. این رقت ها باید در محدوده شناسایی روش باشند.

۱۲-۶-۳ نمونه MS را با سوسپانسیون آماده آزمایشگاهی تعریف شده در بند۱۱ محک بزنید. نمونه های میدانی محک زده نشده و محک زده شده را مطابق روشهای بند۷-۳و ۸ فرآوری و آزمایش کنید.

۱۲-۶-۴ برای نمونه MS کلی فرم های مدفوعی ، MPN/g را برحسب ماده خشک مطابق بند ۹ محاسبه کنید و تعداد MPN را در هر گرم وزن خشک براساس غلظت محیطی کلی فرم های مدفوعی مشاهده شده در نمونه های محک زده نشده تنظیم کنید.

۱۲-۶-۵ پس از تنظیم بر مبنای کلی فرم های مدفوعی محیطی در نمونه محک زده نشده، درصد بازیابی (R) را برای نمونه MS با استفاده از معادله مناسب طبق بند ۱۱ محاسبه کنید.

۱۲-۶-۶ درصد بازیابیMS را با ضوابط معیارهای کارایی روش در جدول ۱۲ مقایسه کنید. اگر بازیابی MS با معیارهای قابل قبول بازیابی مطابقت داشته باشد کارایی سیستم مورد تأییداست و آزمایش نمونه های میدانی کمپوست می تواند ادامه یابد. اگر بازیابی MS غیر قابل قبول و نتیجه نمونه OPRمرتبط با این بهر از نمونه ها قابل قبول باشد، ممکن است تداخل یک ماده اولیه باعث حصول نتایج ضعیف باشد. اگر بازیابی MS غیر قابل قبول است ، تمام داده های مربوط به عملیات میدانی را اصلاح کنید.

جدول ۱۲ – صحت آزمون محک و ضوابط پذیرش بازیابی

آزمون عملکرد	ضوابط پذیرش LTB/EC
کمپوست درجه یک: آزمون های محک اولیه (MS) درصد بازیابی MS	٪۳۰-٪۲۴۲
کمپوست درجه دو: آزمون های محک اولیه (MS) درصد بازیابی MS	٪۸ -٪۷۰۹
کمپوست درجه یک: آزمون های محک اولیه، نسخه آزمون های محک اولیه(MS/MSD) • میانگین درصد بازیابی • صحت (به عنوان حداکثر انحراف معیار نسبی)	 ٪۳۰-٪۲۴۲ ٪۱۵۰
کمپوست درجه دو : آزمون های محک اولیه، نسخه آزمون های محک اولیه (MS/MS) • میانگین درصد بازیابی • صحت (به عنوان حداکثر انحراف معیار نسبی)	 ٪۸ -٪۷۰۹ ٪۱۲۵

۱۲-۶-۷ آزمایشگاه ها باید نمودار کنترل مقایسه بازیابی های MS برای تمام مواد اولیه و مربوط به هر بهر و نیز نتایج تجمیعی نمونه OPR را ثبت و نگهداری کنند . این نمودار آزمایشگاه ها را در شناسایی اثرات ماده اولیه روی روش بازیابی کمک می نماید. همچنین ممکن است برای شناسایی اثرات موقتی یا موردی ماده اولیه از یک منبع خاص کمک نماید.

۱۳ مدیریت پسماند و پیشگیری از آلودگی

۱۳-۱ در صورت مدیریت صحیح و بازیافت محلول ها و معرف های مصرفی در این روش تهدید کلی برای محیط زیست در بر نخواهد داشت.

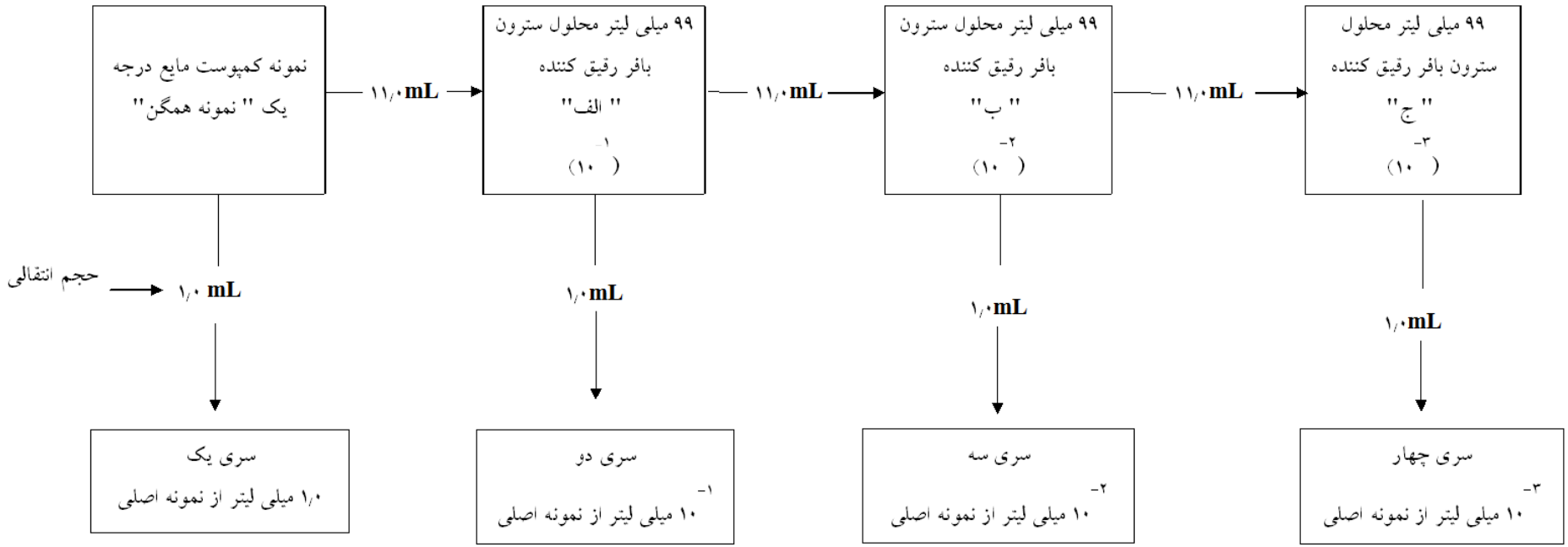
۱۳-۲ محلول ها و معرف ها را باید در حجم های لازم برای هر آزمایش تهیه کنید تا ضایعات مواد به حداقل برسد.

۱۳-۳ نمونه ها، مواد مرجع، لوازم آلوده یا مشکوک به آلودگی با باکتری زنده یا ویروس باید قبل از دفع بی خطر سازی شوند.

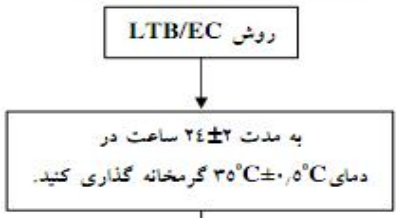
پیوست الف
(الزامی)
شکل ها

شامل نمودار شماتیک عملیات رقیق سازی، تلقیح (بند ۷-۳) و روش انجام آزمون (بند ۸) می باشند. این نمودارها بسته به درجه یک یا دو و مایع یا جامد بودن کمپوست متفاوت هستند.

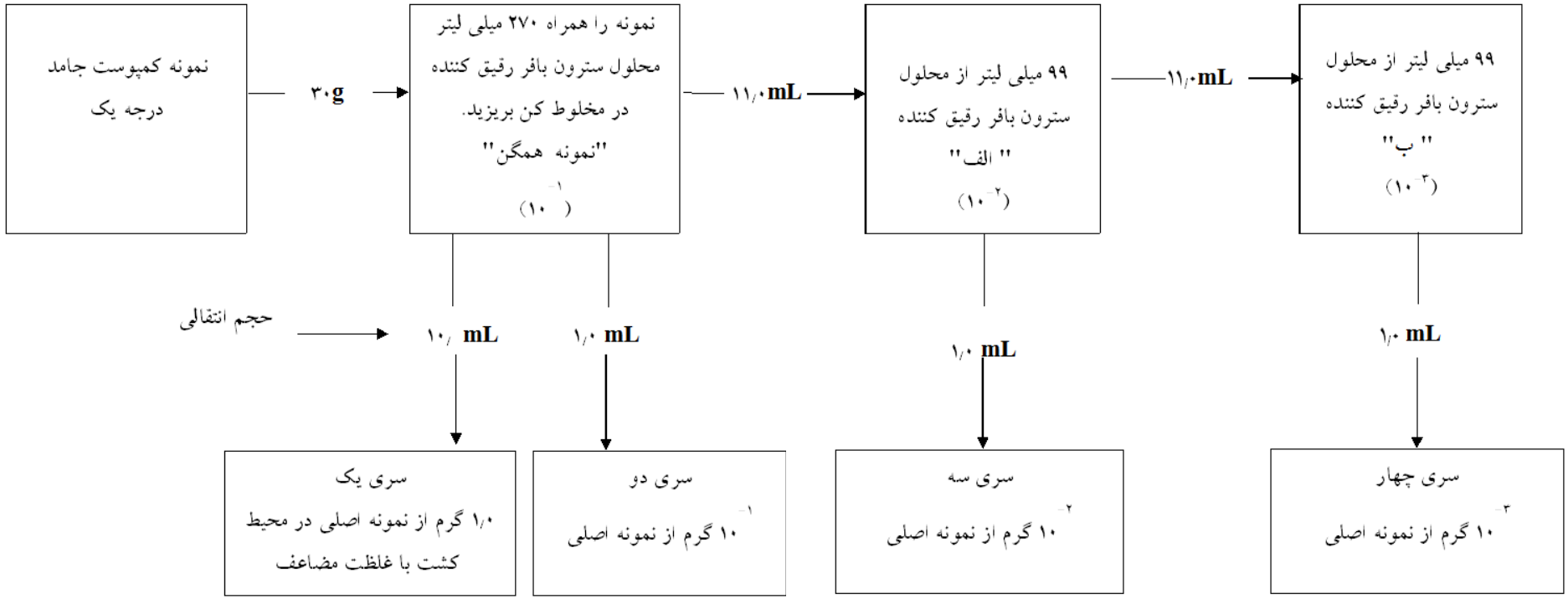
شکل ۲ – نمودار شماتیک رقیق سازی و تلقیح کمپوست مایع درجه یک



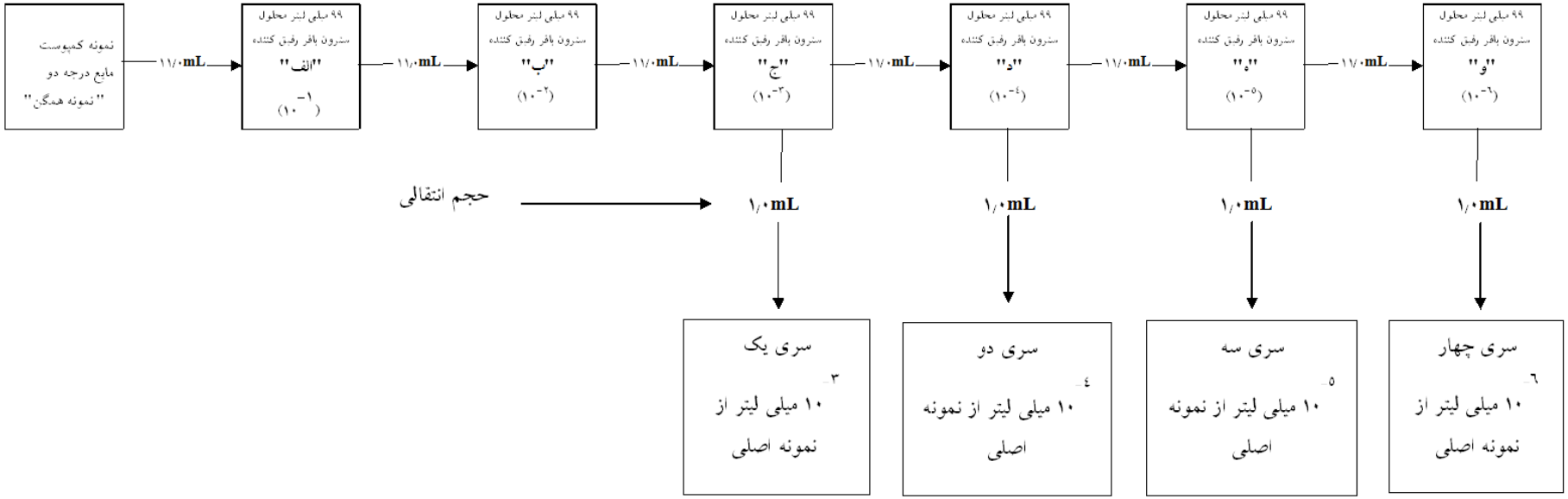
شکل ۱ – روش تخمیر چند لوله ای



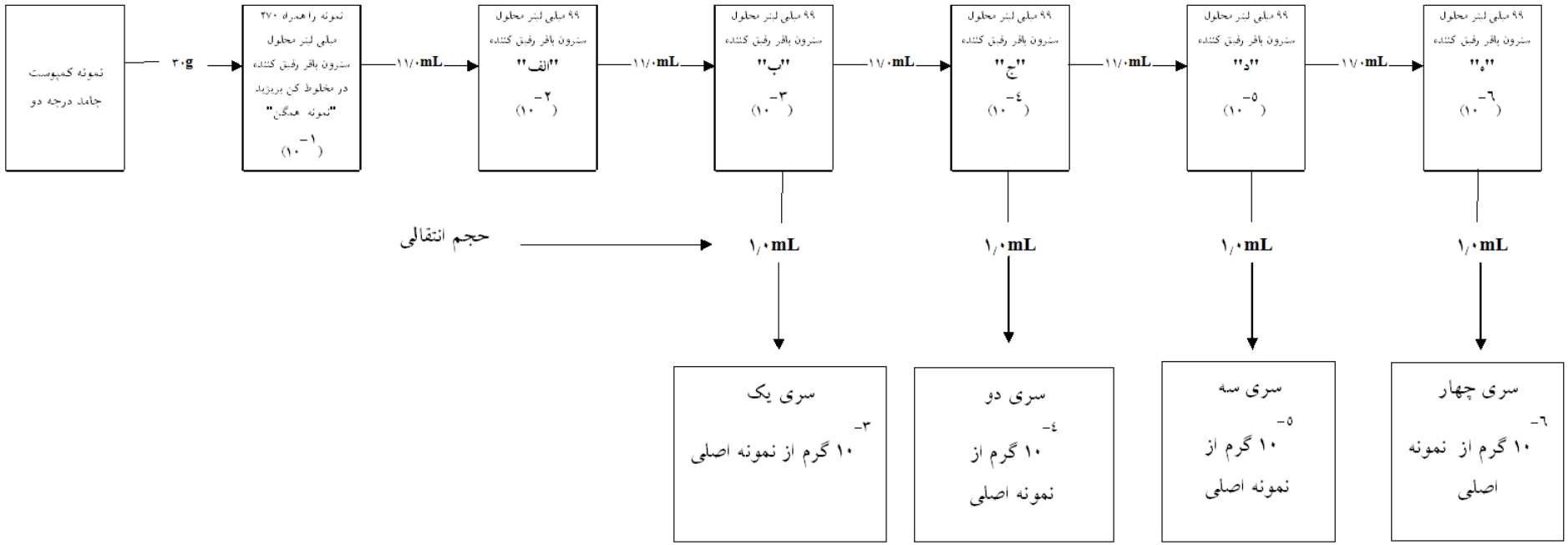
شکل ۳ – نمودار شماتیک رقیق سازی و تلقیح کمپوست جامد درجه یک



شکل ۴ – نمودار شماتیک رقیق سازی و تلقیح کمپوست مایع درجه دو



شکل ۵– نمودار شماتیک رقیق سازی و تلقیح کمپوست جامد درجه دو



پیوست ب

(اطلاعاتی)

فهرست کتاب شناسی

1- American Public Health Association , American Water Works Association , and Water Environment Federation . 1995. Standard Methods for Water and Wastrewater. 20th Edition. Sections 9020, 9221, 9222.
2- US EPA.EPA-821-R-04-009:December 2004, Results of the Interlaboratory Validation of EPA Method 1680 (LTB/EC) for Fecal Coliforms in Biosolids.
3- American Chemical Society (ACS),2000, Reagent Chemicals, American Chemical Society Specifications. American Chemical Society, New York. For suggestions of the testing of reagents not listed by the American Chemical Society, see AnalaR Standards for Laboratory Chemicals, BDH, Poole, Dorset, UK and the United States Pharmacopeia .
4- Bordner,R., J.A. Winter, and P.V. Scarpono (eds.).1978. Microbiological Methods for Monitoring the Envirnoment, Water and Wastes EPA-600/8-78-017. Office of Research and Development. US EPA.
5- Klee,A. J. A computer program for the determination of the most probable number ans its confidence limits, 1993, Journal of Microbiological Methods. 18:91-98.