



جمهوری اسلامی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شماره استاندارد ایران

5354



آب - جستجو و شمارش اسپورکلیتری دیوم احیاء کننده سولفیت به روش
غنی سازی در آب

چاپ اول



آشنایی با موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
 موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب
 قانون، تنها مرجع رسمی کشور است که عهده دار وظیفه
 تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) می‌باشد.
 تدوین استاندارد در رشته‌های مختلف توسط
 کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان موسسه،
 صاحب‌نظران مراکز و موسسات علمی، پژوهشی، تولیدی
 و اقتصادی آگاه و مرتبط با موضوع صورت می‌گیرد.
 سعی بر این است که استانداردهای ملی، در جهت
 مطلوبیت‌ها و مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی،
 فنی و فن آوری حاصل از مشارکت آگاهانه و منصفانه
 صاحبان حق و نفع شامل:
 تولید کنندگان، مصرف کنندگان، بازرگانان، مراکز علمی
 و تخصصی و نهادها و سازمان‌های دولتی باشد. پیش
 نویس استانداردهای ملی جهت نظرخواهی برای مراجع
 ذینفع و اعضای کمیسیون‌های فنی مربوط ارسال
 می‌شود. و پس از دریافت نظرات و پیشنهادات در کمیته
 ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به
 عنوان استاندارد ملی (رسمی) چاپ و منتشر می‌شود.
 پیش‌نویس استانداردهایی که توسط موسسات و
 سازمان‌های علاقمند و ذیصلاح و با رعایت ضوابط
 تعیین شده تهیه می‌شود نیز پس از طرح و بررسی در
 کمیته ملی مربوط و در صورت تصویب، به عنوان
 استاندارد ملی چاپ و منتشر می‌گردد. بدین ترتیب
 استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مفاد مندرج
 در استاندارد ملی شماره «5» تدوین و در کمیته ملی



مربوط که توسط موسسه تشکیل می‌گردد به تصویب رسیده باشد.

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضاء اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد می‌باشد که در تدوین استانداردهای ملی ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی استفاده می‌نماید.

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون به منظور حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردها را با تصویب شورای عالی استاندارد اجباری نماید. موسسه می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه بندی آن را اجباری نماید. همچنین به منظور اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و موسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و گواهی‌کنندگان سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست محیطی، آزمایشگاه‌ها و کالیبره‌کنندگان وسایل سنجش، موسسه استاندارد اینگونه سازمان‌ها و موسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران مورد ارزیابی قرار داده و در صورت احراز شرایط لازم، گواهی نامه تأیید صلاحیت به آنها اعطا نموده و بر عملکرد آنها نظارت



می‌نماید. ترویج سیستم بین‌المللی یکاها، کالیبراسیون
وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام
تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی
از دیگر وظائف این موسسه می‌باشد.

کمیسیون استاندارد آب - جستجو و شمارش اسپورکلیتری دیوم احیاء کننده سولفیت به روش غنی سازی در آب

رئیس

روحبخش خالقدوست متخصص علوم آزمایشگاهی
- عباس آزمایشگاه تشخیص طبی

اعضاء

زندوکیلی - فاطمه	لیسانس تغذیه	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
محبعلی - عباسعلی	فوق لیسانس میکروبیولوژی	پژوهشگاه شرکت نفت
صدیقی - هما	لیسانس بیولوژی	شرکت آب و فاضلاب استان تهران
قائمی - نسرین	فوق لیسانس بهداشت	سازمان حفاظت از محیط زیست

دبیر

روشن طبری - مژده
قارچ شناسی
موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

فهرست مطالب

مقدمه

هدف و دامنه کاربرد

تعریف

اساس روش

محیطهای کشت و معرفها

دستگاهها و وسایل لازم

نمونه برداری

روش کار



بسمه تعالی

پیشگفتار

استاندارد آب- جستجو و شمارش اسپور
 کلسترییدیوم‌های احیاً کننده سولفیت به روش غنی سازی
 در آب که به وسیله کمیسیون فنی مربوطه تهیه و تدوین
 شده و در هفتمین کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی
 مورخ 28/9/78 مورد تایید قرار گرفته ، اینک به استناد
 بند 1 ماده 3 قانون اصلاحی قوانین و مقررات موسسه
 استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه
 1371 بعنوان استاندارد رسمی ایران منتشر می‌گردد.
 برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های
 ملی و جهانی در زمینه صنایع و علوم استانداردهای
 ایران در مواقع لزوم مورد تجدیدنظر قرار خواهند گرفت
 و هر گونه پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این
 استانداردها برسد، در هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی
 مربوط مورد توجه قرار خواهد شد. بنابراین برای
 مراجعه به استانداردهای ایران باید همواره از آخرین
 چاپ و تجدیدنظر آنها استفاده نمود.
 در تهیه و تدوین این استاندارد سعی شده است که ضمن
 توجه به شرایط موجود و نیازهای جامعه، حتی المقدور
 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 منبع زیر
 تهیه گردیده است:



1- International Standard (ISO) 6461/1-1987
Water quality-Detection and enumeration of
the spores of sulfite-reducing anaerobes
(clostridia)
Part 1: Method by enrichment in a liquid
medium.

جستجو و شمارش اسپور کلوستریدیوم‌های احیاء کننده سولفیت به روش غنی سازی در آب

0 مقدمه

اسپورکلوستریدیوم‌های احیا کننده سولفیت بطور وسیعی در محیط پراکنده هستند. و در مدفوع انسان، حیوان، فاضلاب و خاک یافت میشوند. آنها برخلاف کلیفرم‌ها و اشرشیاکلی به مدت طولانی در آب باقی می‌مانند و نسبت به مواد شیمیایی و عوامل فیزیکی از اشکال رویشی مقاومترند و می‌توانند نشانه حساس‌تری به آلودگی باشند. این میکروارگانیسم‌ها به غلظت‌های معمولی کلر که برای ضد عفونی کردن آب بکار می‌رود نیز مقاومند، بنابراین برای کنترل مفید می‌باشند.

1 هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد جستجو و شمارش اسپورکلوستریدیوم‌های احیا کننده سولفیت به روش غنی



سازی در محیط مایع می‌باشد و برای انواع آبها، از جمله آبهای کدر قابل اجرا است.

2 تعریف

کلستریدیوم‌های احیا کننده سولفیت باکتری‌های بی هوازی هستند که اسپور تولید می‌کنند و به خانواده با سیلاسه و جنس کلستریدیوم‌ها تعلق دارند.

3 اساس روش

جستجو و شمارش اسپورکلستریدیوم‌های احیا کننده سولفیت در حجم معینی از آب با روش غنی سازی به ترتیب زیر انجام می‌گیرد:

3-1 انتخاب اسپورها

اسپورها با حرارت دادن نمونه برای از بین بردن اشکال رویشی و ایجاد شوک حرارتی انتخاب میشوند.

3-2 محیط کشت غنی کننده

جستجو و شمارش اسپورکلستریدیوم‌های احیا کننده سولفیت با تلقیح مقدار معینی آزمون به محیط کشت مایع و سپس گرمخانه‌گذاری در 37 ± 1 درجه سلسیوس به مدت 48 ساعت در شرایط بی هوازی انجام میشود.

4 محیطهای کشت و معرفها

4-1 به منظور بهتر شدن تکرارپذیری نتایج توصیه

می‌شود که برای تهیه رقیق کننده‌ها و محیطهای کشت از مواد پایه خشک و یا محیطهای خشک و یا محیطهای خشک آماده استفاده شود. در صورت استفاده از محیطهای کشت و معرفهای تجارتي بایستی طبق دستور سازنده عمل شود.



مواد شیمیایی که برای تهیه محیطهای کشت و معرفیها به کار می‌رود بایستی دارای کیفیت شیمیایی شناخته شده بوده و آب مصرفی نیز بایستی آب مقطر و عاری از مواد بازدارنده رشد میکروارگانیسم‌ها باشد. pH توسط pH سنج در 25 درجه سلسیوس اندازه‌گیری میشود.

اگر محیط کشت فوراً به مصرف نمی‌رسد و توصیه دیگری نشده باشد می‌توان آنها را در 4 درجه سلسیوس تا یکماه نگهداری نمود.

4- 2 محیطهای کشت و محلولهای رقیق کننده

4- 2- 1 محیط کشت برای تشخیص

اسپورکلستریدیوم‌ها

4- 2- 1- 1 محیط پایه با غلظت معمولی

ترکیب

نام مواد	مقدار	
پپتون حاصل از گوشت	۱۰ گرم	Peptone tryptic digest of meat
عصاره گوشت	۱۰ گرم	Meat extract
عصاره مخمر	۱/۵ گرم	Yeast extract
نشاسته	۱ گرم	starch
استارت سدیم کریستالیزه	۵ گرم	Hydrated sodium acetate
گلوکز	۱ گرم	Glucose
هیدروکلرایدال سیستین	۵/۰ گرم	L - cysteine - hydrochloride
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر	Distilled water

روش تهیه:



پپتون، عصاره گوشت، استات سدیم و عصاره مخمر را در 800 میلی لیتر آب حل کنید و با 200 میلی لیتر آب باقیمانده محلولی از نشاسته را به شرح زیر تهیه نمایید. نشاسته را در مقدار کمی آب سرد حل کنید تا به شکل خمیر درآید. بقیه آب را حرارت دهید تا بجوشد و در حالیکه مخلوط نشاسته را به آهستگی به هم می‌زنید آب را به آن اضافه نمایید تا کاملاً حل شود سپس این محلول را به مخلوط اولی اضافه کرده آنقدر حرارت دهید تا بجوش آید و کاملاً حل شود. پس از گلوکز و هیدروکلراید ال سیستین را در آن حل نمایید pH محیط را توسط سود یک نرمال به $7/1-7/2$ برسانید و در حجمهای 25 میلی لیتری در ظروف مناسب تقسیم و در حرارت 121 ± 1 درجه سلسیوس به مدت 15 دقیقه سترون نمایید.

4- 2- 1- 2 محیط پایه با غلظت دو برابر برای تهیه محیط با غلظت دو برابر، ترکیبات داده شده در محیط کشت بند (4- 2- 1- 1) را برای 500 میلی لیتر آب مقطر در نظر بگیرید و مانند بند (4- 2- 1- 1) عمل کنید.

سپس محیط کشت را در مقادیر 10 میلی لیتر و 50 میلی لیتر به ترتیب در ظروف مناسب 25 و 100 میلی لیتری تقسیم نموده و در حرارت 121 ± 1 درجه سلسیوس به مدت 15 دقیقه در اتوکلاو سترون نمایید.

4- 2- 3 محلول سولفیت سدیم (Na_2SO_3)
4 گرم سولفیت سدیم را در 100 میلی لیتر آب مقطر حل نموده و به کمک صافی سترون کنید سپس محلول را 2



الی 5 درجه سلسیوس نگهداری و هر دو هفته یکبار از محلول تازه استفاده نمائید.

4- 2- 4 نیترات آهن سه ظرفیتی ($C_6H_5C_7Fe$)

7 گرم سیترات آهن سه ظرفیتی را در 100 میلی لیتر آب مقطر حل نموده و با صافی سترون کنید سپس

محلول فوق را 2 الی 5 درجه سلسیوس نگهداری و هر دو هفته یکبار از محلول تازه استفاده نمائید.

4- 2- 5 محیط کامل

4- 2- 5- 1 در هنگام آزمایش حجمهای مساوی از

محلول سولفیت سدیم بند (4- 2- 3) و نیترات آهن سه ظرفیتی بند (4- 2- 4) را مخلوط کنید.

4- 2- 5- 2 نیم میلی لیتر از مخلوط بند (4- 2- 5- 1) را

به هر یک از ظروف محتوی محیط با غلظت معمولی یا

یک برابر غلظت بند (4- 2- 1- 1) را که جهت خروج

هوای حل شده در آن قبلا حرارت داده و خنک شده است به آرامی اضافه نمائید.

4- 2- 5- 3 از مخلوط بند (4- 2- 5- 1) 0/4 میلی لیتر

را به طور جداگانه به ظروف حاوی 10 میلی لیتر و 2

میلی لیتر را به ظروف حاوی 50 میلی لیتر محیطهای با

غلظت دو برابر بند (4- 2- 1- 2) که قبلا حرارت داده و

خنک شده است به آرامی اضافه نمائید.

4- 2- 2 محلولهای رقیق کننده

محلولهای رقیق کننده را طبق استاندارد شماره 356

ملی ایران (آماده کردن نمونههای مواد غذایی و شمارش

میکروارگانیسرها) تهیه کنید.

5 دستگاهها و وسایل لازم



از دستگاهها و وسایل معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی استفاده نمائید.

6 نمونه برداری

به استاندارد ملی آئین کار نمونهن برداری از آب جهت آزمونهای باکتریولوژیکی با شماره 4208 مراجعه شود.

7 روش کار

7-1 انتخاب اسپورها

قبل از انجام آزمایش نمونه را بایستی به مدت 15 دقیقه در 75 درجه سلسیوس در بن ماری حرارت داد برای کنترل دما مقداری آب معمولی را به یک ظرف مشابه اضافه نموده و پس از قرار دادن یک دماسنج در آن ظرف را در مجاورت نمونه مورد آزمون در بن ماری بگذارید از زمانیکه دماسنج دمای 75 درجه سلسیوس را نشان داد زمان را یادداشت نموده و 15 دقیقه بعد نمونه مورد آزمون را از بن ماری خارج نمائید.

7-2 تلقیح و گرمخانه گذاری

7-2-1 50 میلی لیتر نمونه بند (7-1) را به ظرف 100 میلی لیتری حاوی 59 میلی لیتر محیط کشت کامل با دو برابر غلظت بند (4-2-5-3) اضافه کنید.
7-2-2 ده میلی لیتر از نمونه بند (7-1) را بطور جداگانه به پنج لوله حاوی 10 میلی لیتر محیط کشت کامل با دو برابر غلظت بند (4-2-5-3) اضافه کنید.



7-2-3 یک میلی لیتر از نمونه بند (7-1) را بطور جداگانه به پنج لوله حاوی 25 میلی لیتر محیط با غلظت معمولی بند (4-2-5-2) اضافه نمائید. 7-2-4 در مواردی که نمونه مورد آزمون شدیداً آلوده می باشد می توانید نمونه اولیه را رقیق کرده سپس بر روی رقت تهیه شده آزمایش را انجام دهید. هنگامیکه آزمایشات کیفی آب آشامیدنی یا آب آشامیدنی بطری شده بدون انجام شمارش بیشترین تعداد احتمالی مورد نظر باشد 100 میلی لیتر نمونه را به ظروف 200 میلی لیتر حاوی 100 میلی لیتر محیط کشت با غلظت دو برابر بند (4-2-5-3) اضافه نمائید.

در صورت لزوم ب منظور کم کردن فضای خالی بالای ظروف محیط کشت با غلظت معمولی بند (4-2-5-2) را تا حداکثر حجم به کلیه ظروف تلقیح شده اضافه کنید به طوری که تا گلوی ظرف پر شود سپس درب آنها را با درپوش مناسب ببندید و در شرایط بی هوازی در 37 ± 1 درجه سلسیوس به مدت 48 ساعت گرمخانه گذاری نمائید.

توجه:

کشت هایی که حجمشان زیاد است و درب آنها کاملاً بسته شده ممکن است در اثر تولید گاز منفجر شود.

7-3 تفسیر نتایج

محیط هایی که به دلیل احیا سولفیت و رسوب سولفیت آهن سه ظرفیتی به رنگ سیاه در می آیند مثبت تلقی میشود که بایستی آنها را طبق جدول پیوست شمارش نمائید.



یادآوری:

در صورتیکه از محیط کشت تازه تهیه شده استفاده نمی‌شود بایستی آنها را قبل از آزمایش مدت نیم ساعت در بن ماری جوش قرار دهید تا اکسیژن محلول در آن خارج شود سپس بدون تکان دادن محیط کشت را خنک نموده و استفاده کنید.

گزارش کار:

گزارش کار باید روش بکار رفته را بیان نماید و نتایج بیشترین تعداد احتمالی اسپور کلوستریدیوم‌های احیاکننده سولفید را در حجم نمونه بیان کند. همچنین بایستی جزئیات کار و یا عواملی را که ممکن است بر نتایج کار تاثیر بگذارد بیان شود.

گزارش کار بایستی حاوی کلیه اطلاعاتی باشد که برای مشخص کردن کامل نمونه لازم است.

تعداد لوله‌هایی که واکنش مثبت نشان می‌دهند.			بیشترین تعداد احتمالی در ۱۰۰ میلی‌لیتر
۱ لوله حاوی ۵۰ میلی‌لیتر نمونه	۵ لوله هر یک حاوی ۱۰ میلی‌لیتر نمونه	۵ لوله هر یک حاوی ۱ میلی‌لیتر نمونه	
۰	۰	۰	< ۱
۰	۰	۱	۱
۰	۰	۲	۲
۰	۱	۰	۱
۰	۱	۱	۲
۰	۱	۲	۳
۰	۲	۰	۲
۰	۲	۱	۳
۰	۲	۲	۴
۰	۳	۰	۳
۰	۳	۱	۵
۰	۴	۰	۵
۱	۰	۰	۱
۱	۰	۱	۳
۱	۰	۲	۴
۱	۰	۳	۶
۱	۱	۰	۳
۱	۱	۱	۵
۱	۱	۲	۷
۱	۱	۳	۹
۱	۲	۰	۵
۱	۲	۱	۷
۱	۲	۲	۱۰
۱	۲	۳	۱۲
۱	۳	۰	۸
۱	۳	۱	۱۱
۱	۳	۲	۱۴
۱	۳	۳	۱۸
۱	۳	۴	۲۱
۱	۴	۰	۱۳
۱	۴	۱	۱۷
۱	۴	۲	۲۲
۱	۴	۳	۲۸
۱	۴	۴	۳۵
۱	۴	۵	۴۳
۱	۵	۰	۲۴
۱	۵	۱	۳۵
۱	۵	۲	۵۴
۱	۵	۳	۹۲
۱	۵	۴	۱۶۱
۱	۵	۵	> ۱۸۰



ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI NUMBER

5354



Detection and enumeration of the spores of sulfite reducing
anaerobes (clostridia)
Method by enrichment in a liquid medium

1st Edition