



جمهوری اسلامی ایران

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شماره استاندارد ایران

5353



آب - جستجو و شمارش اسپورکلیستریدیوم‌های احیاکننده سولفیت با استفاده از صافی غشایی 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 پیشنهادهای 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 استانداردهای 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 اعضای 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 مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردها را با تصویب شورای عالی استاندارد اجباری نماید. 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 استفاده کنندگان از خدمات سازمان‌ها و موسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و گواهی کنندگان سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست محیطی، آزمایشگاه‌ها و کالیبره کنندگان 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 تائید 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 اسپورکلیستریدئوم‌های
احیاءکننده سولفیت با استفاده از صافی غشایی در آب**

رئیس

روحبخش خالقدوست - متخصص علوم آزمایشگاهی
دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن
عباس

اعضاء

زندوکیلی- فاطمه لیسانس تغذیه مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
محبعلی- قاسمعلی فوق لیسانس میکروبیولوژی پژوهشگاه شرکت ملی نفت ایران
صدیقی- هما لیسانس بیولوژی شرکت آب و فاضلاب استان تهران
قائم‌ی- نسرین فوق لیسانس بهداشت سازمان حفاظت از محیط‌زیست

دبیر

روشن طبری - مژده فوق لیسانس قارچ شناسی مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

فهرست مطالب

کمیسیون استاندارد آب - جستجو و شمارش اسپورکلیستریدئوم‌های
احیاءکننده سولفیت با استفاده از صافی غشایی در آب
هدف و دامنه کاربرد

اصطلاحات و تعاریف
اساس آزمایش
محیطهای کشت
وسایل لازم
نمونه برداری
روش کار
بیان نتایج و گزارش آزمون

بسمه تعالی

پیشگفتار

استاندارد آب - جستجو و شمارش اسپور کلوستریدیوم‌های احیاکننده سولفیت با استفاده از صافی غشایی در آب که توسط کمیسیون‌های مربوط تهیه و تدوین شده و در هفدهمین جلسه کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی مورخ 78/9/28 مورد تصویب قرار گرفته است، اینک به استناد بند یک ماده 3 قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه 1371 به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفتهای ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات با استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هرگونه پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استاندارد ارائه شود، در هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین برای مراجعه به استانداردهای ایران باید همواره از آخرین تجدیدنظر آنها استفاده کرد. در تهیه و تدوین این استاندارد سعی شده است که ضمن توجه به شرایط موجود و نیازهای جامعه، در حد امکان بین این استاندارد و استاندارد ملی کشورهای صنعتی و پیشرفته هماهنگی ایجاد شود. منبع و مأخذی که برای تهیه این استاندارد به کار رفته به شرح زیر است:

1-International Standard (ISO) 6461/2 - 1986 Water quality - Detection and enumeration of the spores of sulfite - reducing anaerobes(clostridia)
 Part2:Method by membrane filtration.

کمیسیون استاندارد آب - جستجو و شمارش اسپور کلستریدیوم‌های احیاکننده سولفیت با استفاده از صافی غشایی در آب

مقدمه

اسپور کلستریدیوم‌های احیاکننده سولفیت، بطور وسیعی در محیط پراکنده هستند، و در مدفوع انسان، حیوان، فاضلاب و خاک یافت می‌شوند. آن‌ها برخلاف کلیفرمها و اشریشیاکلی به مدت طولانی در آب باقی می‌مانند، و نسبت به مواد شیمیایی و عوامل فیزیکی از اشکال رویشی مقاوم‌ترند و می‌توانند نشانه وجود نقص در فرآیند تصفیه آب در تصفیه‌خانه‌ها محسوب شوند، و به عنوان شاخص آلودگی متناوب معرفی شوند.

1 هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، جستجو و شمارش اسپور کلستریدیوم‌های احیاکننده سولفیت با استفاده از صافی غشایی می‌باشد، و برای پی بردن به عملکرد صافی در تصفیه‌خانه‌ها کاربرد دارد. بنابراین، دارای ارزش و اهمیت اختصاصی بوده، و برای پایش روزمره شبکه‌های توزیع آب توصیه نمی‌شود.

2 اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاح و /یا واژه با تعریف زیر بکار می‌رود.
1-2 کلستریدیوم‌های احیاکننده سولفیت باکتری‌های بی‌هوازی هستند، که اسپور تولید می‌کنند، و به خانواده با سیلاسه و جنس کلستریدیوم‌ها تعلق دارند.

3 اساس آزمایش

جستجو و شمارش اسپور کلستریدیوم‌های احیاکننده سولفیت، در حجم معینی از آب، و با استفاده از صافی به ترتیب زیر انجام می‌گیرد:

1-3 انتخاب اسپورها

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

2-3 صافی غشایی و کشت

نمونه آب از یک صافی غشایی با روزه‌های 0/2 میکرومتری که اسپورهای باکتری بر روی آن باقی بماند، عبور داده می‌شود. صافی بر روی یک محیط‌کشت اختصاصی مانند سولفیت آبیرون آگار قرار



گرفته و پس از گرمخانه گذاری، در درجه حرارت 37 ± 1 درجه سلسیوس به مدت 48 ساعت، پرگنه‌های سیاه شمارش می‌شوند.

4 محیط‌های کشت

1-4 به منظور بهتر بودن تکرارپذیری نتایج، توصیه می‌شود، که برای تهیه رقیق کننده‌ها و محیط‌های کشت، از مواد پایه خشک و یا محیط‌های خشک آماده، استفاده گردد. در صورت استفاده از محیط‌های کشت تجارتي آماده، بایستی طبق دستور سازنده عمل شود. مواد شیمیائی که برای تهیه محیط‌های کشت بکار می‌رود، بایستی دارای کیفیت شیمیائی شناخته شده بوده، و آب مصرفی نیز بایستی آب مقطر باشد. pH باید توسط pHسنج در 25 درجه سلسیوس اندازه‌گیری شود. اگر محیط کشت فوراً به مصرف نمی‌رسد، و توصیه دیگری نشده باشد، می‌توان آن را در تاریکی و در دمای 4 درجه سلسیوس به مدت تا یک ماه نگهداری نمود.

2-4 محیط کشت سولفیت آیرون آگار sulfite Iron Agar
1-2-4 محیط پایه (آگار مغذی)

ترکیب	مقدار
عصاره گوشت	3 گرم
پپتون	10 گرم
کلرید سدیم	5 گرم
آگار	15 گرم
آب مقطر	1000 گرم

روش تهیه

مواد فوق را به آب مقطر اضافه نموده، و آن را بجوشانید. سپس pH محیط را در 25 درجه سلسیوس با محلول سود یک مولار در $7/6 \pm 0/1$ تنظیم نموده، و در حجم‌های 18 میلی‌لیتری در لوله‌های آزمایش تقسیم نموده، و به مدت 20 دقیقه در اتوکلاو در دمای 121 ± 1 درجه سلسیوس، سترون نمائید. پس از جامد شدن، محیط را در یخچال نگهداری کنید.

2-2-4 محلول سولفیت سدیم (Na_2SO_4)



10 گرم سولفیت سدیم را در 100 میلی لیتر آب مقطر حل نموده، و توسط صافی سترون کنید. سپس محلول را در 2 الی 5 درجه سلسیوس نگهداری نموده، و هر دو هفته یکبار از محلول تازه استفاده نمائید.

3-2-4 محلول سولفات آهن ($FeSO_3$)

8 گرم سولفات آهن دو ظرفیتی را در 100 میلی لیتر آب مقطر حل نموده، و با صافی سترون کنید. سپس محلول فوق را در 2 الی 5 درجه سلسیوس نگهداری نموده، و هر دو هفته یکبار از محلول تازه استفاده نمائید.

4-2-4 محیط کشت کامل

قبل از آزمایش محیط پایه بند (1-2-4) را ذوب نموده، و به هر 18 میلی لیتر محیط کشت، 1 میلی لیتر از محلول سولفیت سدیم و پنج قطره از محلول سولفات آهن دو ظرفیتی اضافه کنید.

3-4 تریپتوز سولفیت کار Tryptise sulfite Agar

ترکیب (نام مواد)	مقدار
تریپتوز	15 گرم
سوی تن	5 گرم
عصاره مخمر	5 گرم
سدیم متابی سولفیت	1 گرم
آمونیم سیترات آهن سه ظرفیتی	1 گرم
آگار	15 گرم
آب مقطر	1000 میلی لیتر

روش تهیه

مواد فوق را به آب مقطر اضافه نموده، و آن را بجوشانید.

سپس pH محیط را در دمای 25 درجه سلسیوس در $7/6 \pm 0/1$ تنظیم نمائید. محیط را در حجم های 18 میلی لیتری در لوله های آزمایش تقسیم نموده، و در اتوکلاو به مدت 15 دقیقه در دمای 121 ± 1 درجه



سلسیوس، سترون نمائید. پس از جامد شدن، محیط را در یخچال در دمای 4-5 درجه سلسیوس نگهداری کنید.

5 وسایل لازم

از دستگاهها و وسایل معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی استفاده نمائید.

6 نمونه برداری

نمونه برداری باید طبق استاندارد ملی ایران شماره 4208 (آئین کار نمونه برداری از آب جهت آزمون های باکتریولوژیکی) انجام شود.

7 روش کار

1-7 انتخاب اسپورها

قبل از انجام آزمایش، نمونه بایستی در بن ماری 75 ± 5 درجه سلسیوس از زمانیکه درجه حرارت به 75 برسد، به مدت 15 دقیقه حرارت داده شود. برای کنترل درجه حرارت مقداری آب معمولی را به یک ظرف مشابه اضافه نموده، و یک دماسنج را در آن قرار داده، و ظرف را در مجاورت نمونه مورد آزمون در بن ماری بگذارید. از زمانیکه دماسنج حرارت 75 درجه سلسیوس را نشان می دهد، زمان را یادداشت نموده، و بعد از 15 دقیقه نمونه مورد آزمون را از بن ماری خارج نمائید.

2-7 تلقیح و گرمخانه گذاری

1-2-7 برای آبهای آشامیدنی، چشمه، آب چاه، آبهای معدنی، آب دریا و آبهای سطحی که آلودگی شان به کلستریدیوم ها کمتر می باشد 100 میلی لیتر، و برای آبهایی که دارای آلودگی بیشتری می باشند، حجم کمتری را صاف نمائید. برای آزمایش نمونه های کمتر از 10 میلی لیتر، بایستی آنها را با 10 الی 100 میلی لیتر از آب سترون یا محلول رقیق کننده مخلوط کنید.

2-2-7 نمونه را طوری رقیق نمائید تا پرگنه های سیاه به طور مجزا تشکیل شوند، و به آسانی قابل شمارش باشند.

3-2-7 پس از صاف نمودن، صافی غشائی را توسط انبرک سترون بردارید. روی آن را به طرف کف پلیت قرار دهید، و دقت نمائید تا حباب هوا در ته صافی تشکیل نگردد. سپس ضمن اینکه صافی را توسط انبرک نگه داشته اید، 18 میلی لیتر از محیط کشت کامل بند (4-4) یا محیط کشت ذوب شده بند (3-4) یا درجه حرارت حدود 50 درجه سلسیوس را بر روی صافی بریزید. پس از اینکه



محیط جامد شد، در شرایط بی‌هوایی در درجه حرارت 37 ± 1 درجه سلسیوس به مدت 24 الی 48 ساعت، گرمخانه‌گذاری نمائید.

3-7 نتیجه

پس از 24 الی 48 ساعت پرگنه‌های سیاه را در محیط کشت شمارش نمائید.

8 بیان نتایج و گزارش آزمون

در گزارش آزمون بایستی روش کار و نتایج به دست آمده، یعنی تعداد پرگنه‌های کلستریدیوم‌های بی‌هوایی احیاکننده سولفیت، در حجم نمونه بیان شود. زمان گرمخانه‌گذاری 48 ساعته بایستی حتماً گزارش شود، و اگر امکان نباشد که در این زمان شمارش انجام گیرد، بایستی پس از 24 ساعت شمارش بطور تقریبی گزارش گردد. در گزارش آزمون، بایستی هرگونه جزئیات کار و یا عواملی که ممکن است بر نتایج کار تأثیر بگذارد، بیان شود. گزارش آزمون، بایستی حاوی کلیه اطلاعاتی باشد، که برای مشخص کردن کامل نمونه لازم است.



ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI NUMBER

5353



Detection and Enumeration of the Spores of Sulfite - reducing
Anaerobes (clostridia) - Method by Membrane filtration

1st Edition