www.abpsoil.com

ابنیه پایدار سبز

ISIRI
7023
1st.edition
APR. 2004

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
مؤسسه استاندارد وتحقیقات صنعتی ایران
Institute of Standards and Industrial Research of Iran

استانداردملی ایران
۷۰۲۳
چاپ اول
فروردین۱۳۸۳

آب– جستجو وشناسایی سیانوباکترها–

روش آزمون میکروبیولوژی

Water - Detection and enumeration of cyanobacteria- Microbiological test method

www.abpsoil.com
ابنیه پایدار سبز

نشانی مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران : کرج ـ شهر صنعتی، صندوق پستی ۱۶۳-۳۱۵۸۵
دفتر مرکزی : تهران ـ ضلع جنوبی میدان ونک، صندوق پستی ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵
تلفن مؤسسه در کرج: ۸-۲۸۰۶۰۳۱-۰۲۶۱
تلفن مؤسسه در تهران: ۵-۸۸۷۹۴۶۱-۰۲۱
دورنگار: کرج ۲۸۰۸۱۱۴-۰۲۶۱ ـ تهران ۸۸۸۷۱۰۳ - ۸۸۸۷۰۸۰ - ۰۲۱
بخش فروش ـ تلفن: ۲۸۰۷۰۴۵-۰۲۶۱ دورنگار: ۲۸۰۷۰۴۵-۰۲۶۱
پیام نگار: Standard @ isiri.or.ir
بهاء: ۱۸۷۵ ریال

	Headquarters :	Institute Of Standards And Industrial Research Of Iran
	P.O.Box:	31585-163 Karaj – IRAN
	Tel:	0098 261 2806031-8
	Fax:	0098 261 2808114
	Central Office :	Southern corner of Vanak square, Tehran
	P.O.Box:	14155-6139 Tehran-IRAN
	Tel:	0098 21 8879461-5
	Fax:	0098 21 8887080, 8887103
	Email:	Standard @ isiri.or.ir
	Price:	1875 RLS

« بسمه تعالی»

آشنایی با مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب قانون، تنها مرجع رسمی کشور است که عهده دار وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) میباشد.

تدوین استاندارد در رشته های مختلف توسط کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه، صاحبنظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی واقتصادی آگاه ومرتبط با موضوع صورت میگیرد. سعی بر این است که استانداردهای ملی، در جهت مطلوبیت ها و مصالح ملی وبا توجه به شرایط تولیدی، فنی و فن آوری حاصل از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع شامل: تولیدکنندگان ،مصرف کنندگان، بازرگانان، مراکز علمی و تخصصی و نهادها و سازمانهای دولتی باشد.پیش نویس استانداردهای ملی جهت نظرخواهی برای مراجع ذینفع واعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال میشود و پس از دریافت نظرات وپیشنهادها در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح ودر صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که توسط مؤسسات و سازمانهای علاقمند و ذیصلاح و با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می شود نیز پس از طرح و بررسی در کمیته ملی مربوط و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی چاپ ومنتشرمی گردد. بدین ترتیب استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مفاد مندرج در استاندارد ملی شماره ((۵)) تدوین و در کمیته ملی مربوط که توسط مؤسسه تشکیل میگردد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد میباشد که در تدوین استانداردهای ملی ضمن توجه به شرایط کلی ونیازمندیهای خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین المللی استفاده می نماید.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون به منظور حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی وعمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردها را با تصویب شورای عالی استاندارد اجباری نماید. مؤسسه می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه بندی آنرا اجباری نماید.

همچنین بمنظور اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمانها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و گواهی کنندکان سیستم های مدیریت کیفیت ومدیریت زیست محیطی، آزمایشگاهها و کالیبره کنندگان وسایل سنجش، مؤسسه استاندارد اینگونه سازمانها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران مورد ارزیابی قرار داده و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آنها اعطا نموده و بر عملکرد آنها نظارت می نماید. ترویج سیستم بین المللی یکاها ، کالیبراسیون وسایل سنجش تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی از دیگر وظایف این مؤسسه می باشد.

کمیسیون استاندارد آب - جستجو و شناسایی سیانوباکتر ها – روش آزمون میکروبیولوژی

رئیس	نمایندگی
غلامی ، میترا (دکترای بهداشت محیط)	دانشگاه علوم پزشکی ایران
اعضاء	
زندوکیلی ، فاطمه (فوق لیسانس علوم بهداشتی در تغذیه)	موسسه استانداردوتحقیقات صنعتی ایران
سرگزی، مریم (لیسانس میکروب شناسی)	شرکت آبهای شهرها و شهرکهای استان تهران
سهراب نیا ، نوشین (لیسانس میکروب شناسی)	شرکت آب و فاضلاب استان تهران
صدیقی ، هما (لیسانس بیولوژی)	شرکت آب و فاضلاب استان تهران
ضرغامپور ، زهره (فوق لیسانس میکروب شناسی)	شرکت آب و فاضلاب استان تهران
عابدیان ، زینب (فوق لیسانس میکروب شناسی)	انستیتو پاستور ایران
ملا کرمی ، شبنم (لیسانس میکروب شناسی)	سازمان حفاظت محیط زیست
دبیر	
زرسازی ، گیتا (لیسانس صنایع – استاندارد و کنترل کیفیت)	مؤسسه استاندارد وتحقیقات صنعتی ایران

فهرست مندرجات

صفحه

پیشگفتار ب
مقدمه ت
هدف ۱
دامنه کاربرد ۱
مراجع الزامی ۱
نمونه برداری ۲
مواد لازم ۲
وسائل لازم ۳
روش اجرائی آزمون ۵
بیان نتایج ۱۰
گزارش آزمون ۱۳
جدول شماره ۱- تبدیل در روش صافی غشائی براساس ۳۰ نقطه ۱٤
ادامه ״ ״ ״ ״ ״ ״ ۱۵

پیشگفتار

استاندارد " آب - جستجو و شناسایی سیانوباکترها-روش آزمون میکروبیولوژی " که توسط کمیسیون های فنی مربوطه تهیه و تدوین شده و در پنجاهمین جلسه کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی مورخ ۸۲/۹/۱۰ مورد تصویب قرار گرفته است ، اینک به استناد بند ۱ ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات موسسه 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 پیشرفتهای ملی و جهانی در زمینه صنایع ، علوم و خدمات استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدیدنظر خواهد شد و هرگونه پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها 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 تجدیدنظر 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 مأخذ که برای تهیه این استاندارد بکار رفته به شرح زیر است :

W.E.F Aw.wA A.P.H.A Standard methods for the examination of water and waste water . 1998 Detection and enumerarion of cyanobacteria

مقدمه

سیانوباکترها[1] گروهی از میکروارگانیسم های تک سلولی هستند که به دلیل داشتن رنگدانه و قابلیت انجام عمل فتوسنتز در رده جلبک ها قرار می گیرند و به جلبک های سبز - آبی معروفند. رنگ آنها ناشی از وجود کلروفیل a ورنگدانه های فیکوسیانین[2] وفیکواریترین[3] دراین ارگانیسم ها بوده و از آنجائیکه اندازه آنها بین ۰/۵ الی ٦۰ میکرون می باشد ، جزء بزرگترین ارگانیسم های پروکاریوتیک[4] محسوب می شوند .

سیانوباکترها در دریاچه ها ، رودخانه ها و آب آشامیدنی به ویژه در منابع آبی حاوی ازت و فسفر بخوبی رشد و تکثیر می یابند . برخی از آنها در رسوبات کف مخازن آب ، و برخی دیگر در سطح آب به اشکال منفرد و یا کلنی دیده می شوند .

گروهی از سیانوباکترها در سیستم های آبرسانی ایجاد رنگ و بو و کدورت می کنند . همچنین باعث مسدود نمودن صافی های ماسه ای در تصفیه خانه ها و خورندگی لوله های آبرسانی می شوند (مانند آنابنا[5] ، میکروسیس تیس[6] و اسیلاتوریا[7]) . حضورسیانوباکترها در آب از نظر تولید سم حائز اهمیت است. برخی از گونه های آن تولید نوروتوکسین[8] می کنند که سیستم عصبی را تحت تأثیر قرار داده و برخی دیگر نیز تولید هپاتوتوکسین[9] می کنند که با آسیب های کبدی همراه است . این سموم معمولاً پس از مرگ سیانوباکترها آزاد شده و وارد محیط می شوند . کاربرد فرآیند انعقاد و لخته سازی مؤثر و ته نشینی ، بین ۹۰ الی ۹۵ درصد از جلبک های ورودی به تصفیه خانه ها را می تواند حذف کند . همچنین استفاده از کربن فعال و یا ازون در از بین بردن سموم لیپوپلی ساکاریدی[10] سیانوباکترها مؤثر می باشند .

1- Cyanobacteria
2- Ficocyanine
3- Ficoeritrine
4- Procariotic
5- Anabaena
6- Microcystis
7- Oscillatoria
8- Neurotoxins
9- Hepatotoxins
10-Lipo Polysaccharides

آب- جستجو و شناسایی سیانوباکترها - روش آزمون میکروبیولوژی

۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد تعیین روش میکروسکوپی برای شناسایی سیانوباکتر در آب می باشد .

۲ دامنه کاربرد

این استاندارد برای انواع مختلف مانند آب آشامیدنی ، آب سطحی و آب زیرزمینی کاربرد دارد .

یادآوری- این استاندارد شناسایی سم سیانوباکتر را در بر نمی گیرد.

۳ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد به آنها ارجاع شده است. بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد محسوب می شود. در این مورد مراجع دارای تاریخ چاپ و یا تجدید نظر اصلاحیه ها و تجدید نظرهای بعدی این مدارک مورد نظر نیست. معهذا بهتر است کاربران ذینفع این استاندارد امکان کاربرد آخرین اصلاحیه ها و تجدید نظرها ی الزامی زیر را مورد بررسی قرار دهند. در مورد مراجع بدون تاریخ چاپ و یا تجدید نظر آخرین چاپ و یا تجدیدنظر آن مدارک الزامی ارجاع داده شده مورد نظر است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربران این استاندارد الزامی است.

۱- استاندارد ملی ایران ٤٢٠٨ : سال ١٣٧٦ آئین کار نمونه برداری از آب جهت آزمونهای باکتریولوژیکی

۲- استاندارد ملی ایران ٤٢٠٧ : سال ١٣٧٦ آئین کار آزمونهای باکتریولوژیکی آب

۳- استاندارد ملی ایران ٢٧٤٧ : سال ١٣٨٠ آئین کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

۴ نمونه برداری

دست کم یک لیتر آب را مطابق استاندارد ملی ایران ۴۲۰۸ سال ۱۳۷۶ ، نمونه برداری کنید .

۴-۱ نگهداری نمونه

۴-۱-۱ نگهداری نمونه بیشینه ۲۴ ساعت پس از نمونه برداری در دمای ۲ تا ۳ درجه سلسیوس بدون افزودن نگهدارنده ، ا مکان پذیر است .

۴-۱-۲ چنانچه نمونه به مدت بیش از ۲۴ ساعت نگهداری شود ، لازم است از محلول فرمالدئید و یا لوگل استفاده شود تا رنگ سلول ها ثابت باقی بماند .

۴-۱-۲-۱ چنانچه از محلول فرمالدئید استفاده شود ، ۵ میلی لیتر محلول پاک کننده ۲۰ درصد (طبق بند ۵-۱-۲) و یک میلی لیتر محلول استاندارد سولفات مس (طبق بند ۵-۱-۳) را به آن اضافه کنید .

۴-۱-۲-۲ برای نگهداری جلبک هایی که مقاومت کمتری دارند ، مانند:تاژک داران بی غلاف ، محلول لوگل مناسب تر است و باید به ازاء هر ۱۰۰ میلی لیتر نمونه آب ، یک میلی لیتر محلول لوگل به آن اضافه نموده و سپس در تاریکی نگهداری کنید .

یادآوری- نمونه بند ۴-۱-۲-۲ را تا یکسال می توانید نگهداری کنید .

۵ مواد لازم

۵-۱ محلولها

۵-۱-۱ محلول فرمالدئید

محلول فرمالدئید ۳۷ تا ۴۰ درصد تهیه کنید .

۵-۱-۲ محلول پاک کننده ۲۰ درصد

۲۰ میلی لیتر محلول پاک کننده خانگی (مانند مایع ظرفشویی) را با ۱۰۰ میلی لیتر آب رقیق کنید.

۵-۱-۳ محلول سولفات مس (اشباع شده)

۲۱ گرم سولفات مس را در ۱۰۰ میلی لیتر آب حل کنید .

۵-۱-۴ محلول لوگل

۶۰ گرم یدید پتاسیم و ٤٠ گرم کریستال ید را در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب حل کنید .

۵-۱-۵ محلول گزیلول

این محلول بصورت تجارتی در دسترس می باشد .

۵-۲ محیط مانتینی[1]

این محیط بصورت تجارتی در دسترس می باشد .

۵-۳ ماده چسبنده شفاف مانند لاک ناخن بیرنگ

۵-۴ الکل ۱- پروپانل

۶ وسایل لازم

از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروب شناسی طبق استاندارد ملی ایران ۲۷٤۷ و همچنین از وسایل زیر استفاده کنید .

۶-۱ دستگاه پمپ خلاء

۶-۲ صافی غشایی با اندازه روزنه ۰/۲ تا ۰/۸ میکرون

۶-۳ قیف ایم هاف[2]

۶-۴ سیفون

۶-۵ لام سدویک رفتر[3]

۶-۶ سانتریفوژ با قابلیت دور ۱۰۰۰g در دقیقه

۶-۷ پنس سر صاف

۶-۸ محفظه[4]

۶-۹ میکرومترچشمی مشبک[5]

1- Mounting Medium
2- Imhoff
3- Sedgwick Rafter
4- Chamber
5- Whipple gread

۶-۱۰ میکروسکوپ

۶-۱۰-۱ میکروسکوپ ترکیبی[1]

این نوع میکروسکوپ دارای لنزهای چشمی ۱۰ یا ۱۲/۵ برابر و لنزهای شیئی ۱۰ و ۲۰ و ۴۰ و ۱۰۰ برابر می باشد و میزان بزرگنمایی آنها بسته به نوع میکروارگانیسم و اندازه لنزها متفاوت است.از لنزهای شیئی به گونه ای استفاده کنید تا فاصله مناسب برای شمارش لام بدست آید .

۶-۱۰-۲ میکروسکوپ ترکیبی معکوس[2]

در این نوع میکروسکوپ عدس شیئی ، پائین یک سطح در حال حرکت قرار دارند و نور از بالا می تابد . میزان بزرگنمایی آن بستگی به نوع میکروارگانیسم دارد و معمولاً حداکثر بزرگنمایی مفید برای هرعدسی شیئی ۱۰۰۰ برابر می باشد . قبل از استفاده ، نمونه را داخل یک محفظه استوانه ای دارای انتـهای شیشه ای شفاف و (طبق نازک بند ٦-٨) بریزید و سپس تعداد میروارگانیسم های ته نشین شده را در ظرف فوق شمارش کنید .

۶-۱۰-۳ میکروسکوپ استرئوسکوپیک (لوپ)[3]

این نوع میکروسکوپ از دو میکروسکوب کامل ساخته شده است که در یک دستگاه دو چشمی قرار گرفته ، تا یک حالت قائم تری نسبت به تصاویر معکوس ایجاد کند. همچنین دارای یک جفت عدسی چشمی با بزرگنمایی ۱۰ و یا ۱۵ برابر و در ترکیب با عدسی های شیئی ۱ تا ۸ برابر می باشد که بزرگنمایی بین ۱۰ تا ۱۲۰ برابر ایجاد می کند .

۶-۱۰-۴ میکروسکوپ اپی فلوئورسنس[4]

در این نوع میکروسکوپ ، نورهای تصادفی سبب تحریک الکترونهای موجود در ترکیبات درون سلولی مانند رنگدانه ها و رنگ های جذب کننده می شوند و انرژی منتشر شده در هنگام برگشت الکترون در تراز پایه ، به صورت نور فلوئورسنس دیده می شوند که برای شناسایی و تشخیص میکروسکوپی سلول های دارای کلروفیل مورد استفاده قرار می گیرد. طول موج تحریک و انتشار برای هر رنگدانه ثابت است و نیاز به ترکیب فیلتر نوری و منبع نور ندارد .

1- Compound microscope
2- Inverted compound microscope
3- Stereoscopic microscope
4- Epifluorescence microscope

۷ روش اجرای آزمون

۷-۱ آماده سازی نمونه

۷-۱-۱ تغلیظ به روش سانتریفوژ

حداقل یک لیتر نمونه آب را با دور ۱۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ کنید . در این روش اگرچه عمل ته نشینی سریعتر انجام می پذیرد ، ولی ممکن است به ارگانیسمهای شکننده آسیب برسد . لذا توصیه می شود از این روش فقط در شرایط خاص استفاده کنید .

۷-۱-۲ تغلیظ به روش ته نشینی

حداقل یک لیتر نمونه آب را به آرامی داخل استوانه مدرج یک لیتری و یا قیف ایم هاف (طبق بند ٦-۳) بریزید و به منظور توزیع یکنواخت نمونه ، آن را به آرامی حرکت دهید. به ازاء هر یک میلی لیتر از عمق آب داخل ستون ، یک ساعت زمان ته نشینی در نظر بگیرید. سپس آب رویی را با دقت به گونه ای تخلیه کنید که در رسوبات تغییری حاصل نشود. رسوب را به آرامی مخلوط نموده تا میکروارگانیسم های ته نشین شده بصورت شناور در آیند. در این روش میکروارگانیسم ها در رسوبات بدون تغییر باقی می مانند .

یادآوری- برای تغلیظ نمونه می توانید از یک سری ستون استفاده کنید.به این ترتیب که ر سوب موجود در ستون اول به ستونهای کوچکتر بعدی منتقل شود .

۷-۱-۳ تغلیظ به روش صافی غشایی

حداقل یک لیتر نمونه آب را پس از یکنواخت نمودن آن مطابق استاندارد ملی ایران به ٤٢٠٧ سال صاف کنید.اندازه روزنه صافی غشایی بین ۰/۳ تا ۰/۸ میکرون و میزان خلاء دستگاه پمپ خلاء ۵۰ کیلوپاسکال باشد.

عملیات صاف سازی را تا حدی ادامه دهید که حدود ۰/۵ سانتی متر از نمونه آب بر روی صافی باقی بماند تا از خشک شدن آن جلوگیری شود .

یادآوری۱- **چنانچه کدورت آب زیاد باشد ، می توان از صافی هایی با اندازه روزنه بیشتر استفاده شود .**

یادآوری۲- **برای حذف باقیمانده آب، توصیه می شود فشار کمتر از ۱۲ کیلوپاسکال استفاده شود.**

۷-۲ آماده سازی لام برای شمارش

۷-۲-۱ تهیه لام سدویک رفتر

۱ میلی لیتر از نمونه تهیه شده در (طبق بند ۷-۱) را داخل لام سدویک رفتر بریزید .

۷-۲-۲ تهیه لام مرطوب نیمه پایدار سیانوباکتر

۰/۱ میلی لیتر از نمونه تغلیظ شده (طبق بند ۷-۱) را توسط پی پت مدرج تنظیم شده به آرامی مخلوط نموده و بر روی یک لام شیشه ای تمیز بریزید. سپس لامل بر روی آن قرار داده و با استفاده از یک ماده چسبنده شفاف مانند لاک ناخن بیرنگ آن را ثابت کنید تا از تبخیر آب جلوگیری شود . لام فوق را در تاریکی به مدت طولانی می توانید نگهداری کنید .

یادآوری- **از اضافه نمودن گلیسیرین به لام اجتناب کنید زیرا همزمان با تبخیر آب موجود در رسوبات ، میکروارگانیسم ها در گلیسیرین جذب شده و یا از بین می روند .**

۷-۲-۳ تهیه لام پایدار سیانوباکتر

دو قطره روغن سدر[1] بر روی یک لام شیشه ای معمول در آزمایشگاه میکروب شناسی بریزید وبلافاصله صافی تهیه شده در (طبق بند ۷-۱-۳)را توسط گیره سرصاف بر روی لام فوق قرار دهید . سپس دوباره دو قطره روغن سدر را بر روی صافی ریخته و با لامل بپوشانید . برای شفاف سازی لام حاوی صافی را به مدت ۲٤ الی ٤۸ ساعت نگهداری کنید .

1- Immerssion Oil

یادآوری۱- برای کاهش مدت زمان شفاف سازی صافی ، از حرارت حدود ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۱ تا ۲ ساعت می توانید استفاده کنید .

یادآوری۲- برای شفاف شدن صافی ها می توانید لام را در الکل ۱- پروپانل غوطه ور نموده تا الکل جانشین آب باقیمانده در آن شود. سپس محلول گزیلول بر روی آن ریخته و صافی را همراه با محیط پایه (طبق بند ۵-۲) بر روی یک لام شیشه ای بگذارید و روی آن را با لامل بپوشانید .

۷-۲-۴ تهیه لام به روش لاکی دراپ[1]

لام فوق را به روش مرطوب نیمه پایدار (طبق بند ۷-۲-۲) تهیه کنید .

۷-۳ بررسی میکروسکوپی

۷-۳-۱ تنظیم میکروسکوپ

میکروسکوپ باید قبل از استفاده از آن تنظیم شود . وسیله معمول برای تنظیم میکروسکوپ یک درجه میکرومتر چشمی مشبک (طبق بند ٦-۹)است که در محل چشمی میکروسکوپ قرار داده می شود و دارای یک سطح مدرج در مقیاس دقیق و استاندارد شده است که بر روی یک سطح شیشه ای قرار می گیرد.

میکرومتر چشمی مشبک دارای یک درجه بندی دقیق است که به ۱۰۰ مربع کوچکتر تقسیم شده است ویک مربع نزدیک به مرکز آن، به ۲۵ مربع کوچکتر تقسیم می شوند.ابعاد خارجی آن به گونه ای است که با یک عدسی چشمی ۱۰ برابر و یک عدسی شیئی ۱۰ برابر وسعت تقریباً ۱ میلی لیتر متر مربع را بر روی سطح میکروسکوپ تعیین می کند . با توجه به اینکه سطوح میکروسکوپ ها ممکن است با یکدیگر متفاوت باشند، لذا باید درجه میکرومتر چشمی مشبک را برای هر میکروسکوپ بطور جداگانه تنظیم کنید. میکرومترچشمی را وسط خط واقع در لبه چپ آن بر روی نشانه صفر صفحه مدرج تنظیم نموده ، عرض تصویر میکرومتر چشمی مشبک را با دقت ۰/۰۱ میلی متر بر روی صفحه مدرج آن تعیین کنید.

1- Lacky drop

یادآوری- چنانچه میکروسکوپ در بزرگنمایی بالاتر از حد یاد شده تنظیم شده باشد، ازلام سدویک رفتر نمی توانید استفاده کنید زیرا درجه کامل بر روی میکرومتر دیده نمی شود و باید (طبق بند ۷-۳-۲-٤) با روش بزرگنمایی بالا انجام شود. همچنین انداه گیری را با تقریب ۰/۰۰۱ میلی متر انجام دهید .

۷-۳-۲ شمارش سیانوباکتر

۷-۳-۲-۱ شمارش سیانوباکترها با استفاده از لام سدویک رفتر

با استفاده از پی پت ، دقیقاً یک میلی لیتر از نمونه تهیه شده در (طبق بند ۷-۱) را داخل لام سدویک رفتر ریخته و (طبق بند ٦-۱۰-۱) و یا (طبق بند ٦-۱۰-۳) توسط میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰۰ یا۲۰۰ برابر، تمام سطح لام را شمارش کنید .

یادآوری- از روش فوق زمانی استفاده کنید که تعداد ارگانیسم ها در حد متوسطی باشند .

۷-۳-۲-۲ شمارش سیانوباکترها به روش خطی[1]

ارگانیسم های سیانوباکتر را (طبق بند ۷-۳-۲-۱) در طول یک خط شمارش کنید .

۷-۳-۲-۳ شمارش سیانوباکترها به روش منطقه ای[2]

درمورد نمونه هایی که در هر منطقه لام ۱۰ سیانوباکتر یا بیشتر باشد ، از روش فوق استفاده کنید و حداقل ۱۰ نقطه را بطور تصادفی انتخاب، سپس بخش راست و پایین لام را شمارش نموده و بخش چپ و بالا را شمارش نکنید .

یادآوری- چنانچه تعدادی ازارگانیسم ها در تقاطع دو یا چند میکرومتر چشمی مشبک قرارگیرند، آنها را بطور جداگانه شمارش نموده و به شمارش کل آنها اضافه کنید .

1- Strip count
2-Field Count

۷-۳-۲-۴ شمارش سیانوباکترها با بزرگنمایی بالا

نمونه را (طبق بند ۷-۱) تهیه کنید . سپس در محفظه بند ٦-۸ ریخته تا ته نشین شود . محفظه را به آرامی بر روی میکروسکوپ ترکیبی معکوس بند ٦-۱۰-۲ قرار داده و بصورت خطی و یا منطقه ای شمارش کنید .

۷-۳-۲-۵ شمارش سیانوباکترها با استفاده از گسترش صافی غشایی

نمونه را (طبق بند ۷-۱-۳) تهیه نموده و پس از آماده سازی آن ،(طبق بند ۷-۲-۳) حداقل ۱۰ یا ۳۰ نقـطه لام را بصورت تصادفی انتخاب کنید.سپس (طبق بند ۷-۳-۲-۳)با میکروسکوپ بند ٦-۱۰-۳ شمارش نمائید .

یادآوری- بزرگنمائی و اندازه عدسی باید به گونه ای باشد تا بیشترین تعداد سیانوباکتر را در محدوده بین ۷۰ تا ۹۰ درصد منطقه میکروسکوپی نمایان کند . سپس اندازه منطقه را بوسیله قسمتی و یا همه میکرومتر چشمی مشبک تنظیم نمائید .

۷-۳-۲-۶ شمارش سیانوباکترها با استفاده از روش لاکی دراپ

لام را (طبق بند ۷-۲-۲) تهیه کنید. سپس (طبق بند ٦-۱۰) و با استفاده از عدسی های ایمرسیون آن را بررسی کنید.

یادآوری- لام را به گونه ای شمارش کنید که دقت آن (طبق بند۸-۷) شود .

۸ بیان نتایج

۸-۱ بیان نتایج با استفاده از لام سدویک رفتر

تمام سطح لام را (طبق بند ۷-۳-۲-۱) شمارش نموده و با استفاده از فرمول زیر تعداد آنها را در یک میلی لیتر نمونه مطابق فرمل ۱ محاسبه کنید :

فرمول ۱ $$\text{تعداد در یک میلی لیترنمونه} = \frac{\text{میلی متر مکعب } ۱۰۰۰ \times C}{L \times D \times W \times S} = \frac{C \times ۱۰۰۰}{۵۰ \times ۱ \times \frac{۲۰}{۱۲} \times ۱}$$

C = تعداد ارگانیسمهای شمارش شده در یک میلی لیتر

L = طول لام سدویک رفتر بر حسب میلی متر

D = عمق لام سدویک رفتر بر حسب میلی متر

W = پهنای تصویر میکرومتر چشمی مشبک

S = تعداد شمارش شده (عدد ۱)

سپس عدد بدست آمده را در ضرایب رقت و یا غلظت آن محاسبه کنید .

۸-۲ بیان نتایج با استفاده از روش خطی

ارگانیسمهای سیانوباکتر را (طبق بند ۷-۳-۲-۲) شمارش نموده و با استفاده از فرمول ۱ (طبق بند ۸-۱ تعداد آنها را در یک میلی لیتر نمونه محاسبه کنید .

۸-۳ بیان نتایج با استفاده از روش منطقه ای

ارگانیسمهای سیانوباکتر را (طبق بند ۷-۳-۲-۳) شمارش نموده و با استفاده از فرمول زیر تعداد آنها را در یک میلی لیتر نمونه مطابق فرمول ۲ محاسبه کنید :

فرمول ۲ $$\text{تعداد کل ارگانیسمها در یک میلی لیتر نمونه} = \frac{\text{میلی متر مکعب } ۱۰۰۰ \times C}{A \times D \times F}$$

C = تعداد ارگانیسمهای شمارش شده در ۱۰ منطقه

A = $\frac{۲۰}{۱۲}$ سطح یک منطقه (سطح تصویر میکرومتر چشمی مشبک) برحسب میلی متر مربع

D = تعداد منطقه های شمارش شده (۱۰ منطقه)

F = تعداد منطقه های شمارش شده

سپس عدد بدست آمده را در ضرایب رقت و یا غلظت آن محاسبه کنید .

۸-۴ بیان نتایج با استفاده از روش بزرگنمایی بالا

ارگانیسمهای سیانوباکتر را (طبق بند ۷-۳-۲-٤) شمارش نموده و با استفاده از فرمول های شماره ۳ و ٤ تعداد آنها را در یک میلی لیتر نمونه محاسبه کنید :

فرمول شماره ۳

$$\text{شمارش خطی دریک میلی لیترنمونه} = \frac{C \times A_t}{L \times W \times S \times V}$$

C = تعداد ارگانیسمهای شمارش شده

A_t = مساحت کل کف چمبر ته نشین

L = طول یک خط

W = عرض یک خط

S = تعداد خانه ها[1] در یک خط

V = حجم نمونه ته نشین شده

فرمول شماره ٤

$$\text{شمارش منطقه ای دریک میلی لیترنمونه} = \frac{C \times A_t}{A_f \times F \times V}$$

1- Streap

C = تعداد ارگانیسمهای شمارش شده

A_t = مساحت محفظه ته نشین

A_f = مساحت یک منطقه

F = تعداد منطقه های شمارش شده

V = حجم نمونه ته نشین شده

۸-۵ بیان نتایج با استفاده از روش گسترش صافی غشایی

ارگانیسمهای سیانوباکتر را (طبق بند ۷-۳-۲-۵) شمارش نموده و با استفاده از فرمول شماره ۵ تعداد آنها را در یک میلی لیتر نمونه محاسبه کنید :

فرمول شماره ۵

$$\text{تعداد در یک میلی لیترنمونه} = \frac{N \times Q}{V \times D}$$

N = تراکم ارگانیسمهای دیده شده در هر منطقه (طبق جدول شماره یک)

Q = تعداد منطقه ها در هر صافی

V = مقدار حجم صاف شده

D = فاکتور رقیق سازی (۹۶٪ برای فرمالین ۴۰٪)

۸-۶ بیان نتایج با استفاده از روش لاکی دراپ

ارگانیسمهای سیانوباکتر را (طبق بند ۷-۳-۲-۶) شمارش نموده و با استفاده از فرمول ۶ تعداد آنها را در یک میلی لیتر نمونه محاسبه کنید :

فرمول شماره ۶

$$\text{تعداد در یک میلی لیتر نمونه} = \frac{C \times A_t}{A_S \times S \times V}$$

C = تعداد ارگانیسمهای شمارش شده

A_t = مساحت لامل

A_S = مساحت یک منطقه

S = تعداد منطقه های شمارش شده

V = حجم نمونه در زیر لامل

۸-۷ تعیین حد اطمینان از شمارش میکروارگانیسم ها

چنانچه توزیع ارگانیسم ها بصورت یکنواخت نباشد ، لازم است خطای شمارش طبق توزیع پواسون تعیین گردد .

مثال : با حدود اطمینان ۹۵٪ به عنوان درصدی از تعداد واحدهای شمارش شده (N) معادل است با $(۱۰۰)^{۲}$ $(۱۰۰)^{۲}$ ۷۲۰۰ .

بنابراین اگر ۱۰۰واحد شمارش شود (N =۱۰۰) حدود اطمینان ۹۵ درصد آن بطور تقریبی ۲۰ ± است .

$$۱۰۰ \pm \left(\frac{۲۰}{۱۰۰} N \right) \qquad ۱۰۰ \pm \left(\frac{۲۰}{۱۰۰} \times ۱۰۰ \right) = ۲۰$$

چنانچه ٤۰۰ واحد شمارش شود (N =٤۰۰)حدود اطمینان۱۰ درصد آن بطور تقریبی٤۰ ± می باشد .

$$٤۰۰ \pm \left(\frac{۱۰}{۱۰۰} \times ٤۰۰ \right) \qquad ٤۰۰ \pm \left(\frac{۱۰}{۱۰۰} \times ٤۰۰ \right) = ۱۰$$

۹ گزارش آزمون

نتایج را بصورت " تعداد سیانوباکتر شمارش شده در حجم مشخصی از نمونه تغلیظ شده بطور مثال یک میلی لیتر گزارش کنید " .

چنانچه سیانوباکتر در بررسی میکروسکوپی مشاهده نگردید ، گزارش را بصورت " سیانوباکتر در ۱ میلی لیتر نمونه مشاهده نگردید " بیان کنید .

۹-۱ گزارش آزمون باید دارای آگاهی های زیر باشد :

۹-۱-۱ روش آزمون مطابق با استاندارد ملی ایران .....

۹-۱-۲ - مشخصات کامل نمونه

۹-۱-۳ - نوع نمونه / تاریخ نمونه برداری

۹-۱-۴ - تاریخ انجام آزمون

۹-۱-۵ - بیان نتایج (طبق بند ۸) این استاندارد

۹-۱-۶ اطلاعات دیگری که مربوط به روش باشد

پیوست الف

جدول ۱ - تبدیل در روش صافی غشایی براساس ۳۰ نقطه

تعداد کل	(F) = ۱۰۰ × تعداد کل گونه های مشاهدشده / تعداد کل منطقه های آزمایش شده	تعداد ارگانیسم در هر منطقه (N)
۱	۳/۳	۰/۰۳
۲	۶/۷	۰/۰۷
۳	۱۰	۰/۱۰
٤	۱۳/۳	۰/۱٤
٥	۱٦/۷	۸/۱۸
٦	۲۰	۰/۲۲
۷	۲۳/۳	۰/۲٦
۸	۲٦/۷	۰/۳۱
۹	۳۰	۰/۳٥
۱۰	۳۳/۳	۰/٤۰
۱۱	۳٦/۷	۰/٤٥
۱۲	٤۰	۰/٥۱
۱۳	٤۳/۳	۰/٥۷
۱٤	٤٦/۷	۰/٦۳
۱٥	٥۰	۰/٦۹
۱٦	٥۳/۳	۰/۷٦
۱۷	٥٦/۷	۰/۸۳
۱۸	٦۰	۰/۹۱
۱۹	٦۳/۳	۱۰۰
۲۰	٦٦/۷	۱/۱۰
۲۱	۷۰	۱/۲۰

ادامه جدول ۱

تبدیل در روش صافی غشایی براساس ۳۰ نقطه

تعداد کل	۱۰۰ × تعداد کل گونه های مشاهدشده / تعداد کل منطقه های آزمایش شده = (F)	تعداد ارگانیسم در هر منطقه (N)
۲۲	۷۳/۳	۱/۳۲
۲۳	۷۶/۷	۱/٤۷
۲٤	۸۰	۱/٦۱
۲۵	۸۳/۳	۱/۷۹
۲٦	۸٦/۷	۲/۰۲
۲۷	۹۰	۲/۳۰
۲۸	۹۳/۳	۲/۳۰
۲۹	۹٦/۷	۲/۷۱
۳۰	۱۰۰	۳/٤۲