جمهوری اسلامی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شمارهٔ استاندارد ایران

3620

جستجو و شمارش استرپتوکک های مدفوعی در آب به روش صافی غشائی

چاپ اول

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

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

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

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

اجرای استانداردهای ملی ایران بنفع تمام مردم و اقتصاد کشور است و باعث افزایش صادرات و فروش داخلی و تأمین ایمنی و بهداشت مصرف کنندگان و صرفه جوئی در وقت و هزینه‌ها و در نتیجه موجب افزایش درآمد ملی و رفاه عمومی و کاهش قیمتها میشود.

کمیسیون استاندارد جستجو و شمارش استرپتوکک های مدفوعی در آب به روش صافی غشائی

رئیس

ایماندل – کرامت‌الله	متخصص بهداشت محیط	دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
پورمنصور – مهدخت	پزشک	انستیتو پاستور
روشن طبری – مژده	فوق لیسانس قارچ شناسی	مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
صدیقی – هما	لیسانس بیولوژی	شرکت آب و فاضلاب استان تهران
محبعلی – قاسمعلی	فوق لیسانس میکروبیولوژی	مرکز پژوهش وزارت نفت

اعضاء

دبیر

زند وکیلی – فاطمه	لیسانس علوم تغذیه	مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

فهرست مطالب

جستجو و شمارش استرپتوکک‌های مدفوعی در آب به روش صافی غشائی

هدف

دامنه کاربرد

تعاریف و اصطلاحات

اساس روش

محیطهای کشت و معرف‌ها

دستگاهها و وسائل

نمونه‌برداری آب

روش کار

بسمه تعالی

پیشگفتار

استاندارد جستجو و شمارش استرپتوکک‌های مدفوعی در آب به روش صافی غشائی که بوسیله کمیسیون فنی مربوطه تهیه و تدوین شده و در یکصد و پنجاه و دومین کمیته ملی استاندارد کشاورزی و غذائی مورخ 74/3/2 مورد تأیید قرار گرفته , اینک به استناد بند 1 ماده 3 قانون اصلاحی قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه 1371 به عنوان استاندارد رسمی ایران منتشر می‌گردد .

برای حفظ همگامی و هماهنگی با 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 واقع 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 حتی‌المقدور بین این استاندارد و استاندارد کشورهای صنعتی و پیشرفته هماهنگی ایجاد شود .

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

International standard – ISO 7899/2 – 1984
detection and enumeration of faecal streptococci

International standard – ISO 5667/3 – 1985
guideance on the preservation and handling of samples
Guidelines for drinking water quality W.H.O 1993

جستجو و شمارش استرپتوکک‌های مدفوعی در آب به روش صافی غشائی

1 ـ هدف

هدف از تدوین این استاندارد تعیین روش مرجع جهت شناسائی و شمارش استرپتوکک‌های مدفوعی در آب بوسیله صافی غشائی [1] می‌باشد .

2 ـ دامنه کاربرد

این استاندارد در مورد کلیه آب‌های آشامیدنی کاربرد دارد . بجز در مواردی که بعد از صاف کردن آب توسط صافی‌های غشائی مقادیر قابل توجهی از ذرات و مواد بروی صافی‌های باقی می‌ماند .

3 ـ تعاریف و اصطلاحات

3 ـ 1 ـ استرپتوکک‌های مدفوعی فرضی ـ در این استاندارد منظور باکتریهائی هستند که روی محیط کشت بندهای 5–2–1 و 5–2–2 دارای واکنش مثبت می‌باشند .

3 ـ 2 ـ استرپتوکک‌های مدفوعی ـ منظور باکتریهائی هستند که دارای واکنش مثبت روی محیط کشت بند 5–2–3 و از نظر آزمون کاتالاز منفی می‌باشند .

4 ـ اساس روش

4 ـ 1 ـ صاف‌کردن , گرمخانه گذاری و شمارش

در این روش شمارش استرپتوکک‌های مدفوعی بر اساس صاف کردن حجم معینی از آب با استفاده از صافی غشائی (بار وزنه‌هائی به قطر 0/45 میکرون) می‌باشد . پس از قرار دادن صافی روی محیط کشت انتخابی دارای سدیم آزیدو 2-3-5 تری فنیل تترازولیوم کلراید [2] و گرمخانه‌گذاری , کلیه پرگنه‌های برجسته که دارای رنگ قرمز شاه بلوطی یا صورتی حتی در مرکز پرگنه هستند به عنوان تعداد فرضی استرپتوکک‌های مدفوعی شمارش می‌شود .

یادآوری ـ استرپتوکک‌های مدفوعی با احیأ تی تی سی به فورمازان [3]قرمز ایجاد پرگنه‌های قرمز می‌کنند همچنین سدیم آزید موجود در محیط نیز از رشد باکتریهای گرم منفی جلوگیری می‌کند .

4 ـ 2 ـ آزمون تأئیدی

در صورت لزوم می‌توان روی یک محیط انتخابی تر تأیید نمود . برای این منظور باکتری فوق را روی محیط کشت صفرا , اسکولین آزید آگار کشت داده و در دمای 44 درجه سلسیوس به مدت 48 ساعت قرار دهید .

استرپتوکک‌های مدفوعی روی این محیط رشد کرده و با هیدرولیز اسکولین تولید 6 و 7 دی هیدروکسی کومارین می‌کنند که پس از واکنش با یون آهن سه ظرفیتی ایجاد ترکیب خرمائی تا سیاه رنگ می‌کنند که در سطح محیط پخش می‌شوند .

درمورد پرگنه‌های مشکوک آزمون کاتالاز طبق بند 8-2 این استاندارد انجام می‌شوند .

پرگنه‌هائی را که اسکولین مثبت و کاتالاز منفی هستند می‌توان به عنوان استرپتوکک مدفوعی در نظر گرفت .

5 ـ محیطهای کشت و معرف‌ها

توجه ـ از آنجا که کلیه محیطهای شرح داده شده حاوی ماده بسیار سمی و جهش زای سدیم آزید هستند , بنابراین هنگام تهیه محیط کشت باید از تماس و خصوصاً استنشاق پودر آن خودداری نمود . همچنین این محیطها نباید با اسیدهای معدنی قوی مخلوط شوند زیرا تولید ماده سمی هیدروژن آزید NH_3 می‌کنند .

یادآوری ـ چون محلول‌هائی که حاوی آزید هستند در صورت تماس با لوله‌های فلزی (برای مثال از طریق سینک‌های ظرفشوئی) ایجاد ترکیبات قابل انفجار می‌کنند لذا باید در این زمینه توجه خاص مبذول داشت . توصیه می‌شود دور ریز محلول‌های حاوی آزید را باآب فراوان مخلوط و رقیق نمود و پس از جمع‌آوری درون ظروف پلاستیکی (پی وی سی پلی اتیلن و پلی استیون) با دقت به مجرای فاضلاب ریخت .

5 ـ 1 ـ مواد اولیه

بمنظور بدست آوردن نتایج هماهنگ از مواد شیمیائی با کیفیت یکسان و با درجه خلوص معین و محیطهای کشت مناسب استفاده نمائید . باید در نظر داشت که نیمه عمر محیطهای کشت حاوی سدیم آزید کوتاه است بنابراین تاریخ انقضای محیط باید مورد توجه قرار گیرد .

5-2- محیطهای کشت

5 ـ 2 ـ1 محیط کااف ـ استرپتوکوکوس آگار Streptococcus KF – Agar

5 ـ 2 ـ 1 ـ 1 ـ محیط پایه

ترکیب	مقدار	
پروتئوزپپتون	10 گرم	proteose peptone
عصاره مخمر	10 گرم	yeast extract
سدیم کلراید	5 گرم	sodium (NaCl) chloride
سدیم کلیسروفسفات	10 گرم	sodium glycerophosphate
مالتوز	20 گرم	maltose
لاکتوز	1 گرم	lactose
سدیم آزید	0/4 گرم	
بروموکروزول ارغوانی (محلول اتانولی 15 گرم در لیتر)	1 میلی‌لیتر	
آگار	20–12 گرم(بر اساس دستورالعمل سازنده)	
آب مقطر	تا 1000 میلی‌لیتر	

روش تهیه :

ترکیبات فوق را با جوشانیدن در آب حل کنید و پس از آن برای مدت 5 دقیقه اضافی دیگر در بن ماری جوش حرارت داده , صبر کنید تا دمای محیط به 60 ـ 50 درجه سلسیوس برسد .

5 ـ 2 ـ 1 ـ 2 ـ محلول تی . تی . سی Triphenyl tetrazolium chloride solution

ترکیب	مقدار

5,3,2 تری فنیل تترازولیوم کلراید	1 گرم
آب مقطر	100 میلی‌لیتر

روش تهیه :

رنگ فوق را در آب ریخته و با تکان دادن حل کنید . سپس آن را با استفاده از صافی غشائی با روزنه‌هائی به قطر 0/22 میکرون سترون کنید . محلول فوق را دور از نور قرار دهید .

5 ـ 2 ـ 1 ـ 3 ـ محیط کامل

ترکیب	مقدار
محیط پایه (بند 5–2–1–1)	1000 میلی‌لیتر
محلول تی . تی . سی (بند 5–2–1–2)	10 میلی‌لیتر

روش تهیه :

محلول تی . تی . سی را به محیط پایه که تا دمای 50 الی 60 درجه سلسیوس سرد شده است اضافه کنید . (چون تی . تی . سی نسبت به حرارت ناپایدار است بنابراین رعایت دمای فوق الزامی است .)

محیط را درون پلیت‌های سترون حداقل به قطر 3 میلی‌متر ریخته و در یک سطح صاف و خنک قرار دهید .

پلیت‌های آماده را می‌توان حداکثر به مدت 30 روز در تاریکی و دمای 2+4 درجه سلسیوس نگه‌داری نمود .

5 ـ 2 ـ 2 ـ ام انتروکوکوس آگار m–entrococcus agar

5 ـ 2 ـ 2 ـ 1 ـ محیط پایه

ترکیبات	مقدار	
تریپتوز	20 گرم	tryptose
عصاره مخمر	5 گرم	yeast extract
گلوکز	2 گرم	glucose

هیدروژن فسفات دی پتاسیم	4 گرم	Dipotassium hydrogen , ortho phosphate (k2Hpo4)
سدیم آزید	0/4 گرم	sodium azide(NaN3)
آگار	15 گرم	agar
آب مقطر	تا 1000 میلی‌لیتر	distilled water

روش تهیه :

ترکیبات فوق را با حرارت دادن در بن ماری جوش حل کنید و پس از حل شدن برای مدت 5 دقیقه اضافی دیگر در بن ماری جوش حرارت دهید . سپس تا دمای 50 الی 60 درجه سلسیوس سرد کنید .

5 ـ 2 ـ 2 ـ 2 ـ محلول تی تی سی triphenyl tetrazolium chloride solution به بند 5–2–1–2 مراجعه کنید .

5 ـ 2 ـ 2 ـ 3 ـ محیط کامل

ترکیب	تعداد
محیط پایه (5–2–2–1)	1000 میلی‌لیتر
محلول تی تی سی (5–2–2–2)	10 میلی‌لیتر

روش تهیه :

محلول تی تی سی را به محیط پایه که تادمای 50 الی 60 درجه سلسیوس سرد شده است اضافه کنید و در صورت لزوم PH محیط را با محلول کربنات سدیم (100 گرم در لیتر) سترون به 7/2 برسانید . 20 میلی‌لیتر از محیط را به هر یک از پلیت‌هائی با قطر 9 سانتیمتر ریخته و در یک سطح صاف و خنک قرار دهید .

پلیت‌های آماده را می‌توان به مدت حداکثر 30 روز در تاریکی و دمای 2+4 درجه سلسیوس نگهداری نمود .

5 ـ 2 ـ 3 ـ محیط صفرا ـ اسکولین آزید آگار azide agar – Bile – aesculin

ترکیب	مقدار	
تریپتون	17 گرم	tryptone
پپتون	3 گرم	peptone
عصاره مخمر	5 گرم	yeast exract
صفرای گاو به صورت	10 گرم	ox–bile dehdrated
سدیم کلراید	5 گرم	Sodium chloride (Nacl)
اسکولین	1 گرم	aesculin
سیترات آمونیم آهن سه ظرفیتی	0/5 گرم	Ammoniom iron (111)citrate
سدیم آزید	0/15 گرم	Sodium azide (NaN3)
آگار	12 تا 20 گرم	agar

(طبق دستور سازنده)

روش تهیه :

ترکیبات فوق را با جوشانیدن در آب حل کنید سپس به حجم‌های 250 میلی‌لیتر در ظروف در پیچ‌دار با ظرفیت 500 میلی‌لیتر تقسیم کرده و در حرارت 1+121 درجه سلسیوس به مدت 15 دقیقه سترون کنید .

PH را به گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون شدن 7/1+0/1 باشد . (در دمای 25 درجه سلسیوس .) پس از سترون شدن تا دمای 50 الی 60 درجه سلسیوس خنک کنید و در پلیت‌هائی با عمق حداقل 3 میلی‌متر تقسیم کرده و در یک سطح صاف و خنک قرار دهید .

5 ـ 3 ـ محلول پراکسید هیدروژن

محلول 30 گرم در لیتر

6 ـ دستگاهها و وسائل

دستگاههای مورد نیاز شامل وسائل معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی و تجهیزات زیر می‌باشد .

6 ـ 1 ـ کلیه وسائل صافی غشائی شامل : دستگاه صاف کننده , قیف فولادی صفحه نگهدارنده صافی غشائی , گیره تثبیت کننده , ارلن مایر تخلیه , لوله‌های رابط , پمپ خلاء , صافی‌های غشائی سترون با روزنه‌هائی بقطر 0/45 میکرون و 0/22 میکرون .

7 ـ نمونه‌برداری آب

برای نمونه‌برداری از آب‌های آشامیدنی و سایر آب‌های بطری نشده از بطری‌های شیشه‌ای و یا ظروف پلاستیکی سترون استفاده می‌شود . این ظروف باید دمای خشک سترونی (160 درجه سلسیوس) را تحمل نمایند و در این دما نباید موادی را آزاد کنند که برای رشد باکتری‌ها بازدارنده باشند .

ظروف قبل از سترون شدن با آب و ماده شوینده مناسب شسته و با آب مقطر آب کشی شوند و پس از شستشو با اسید نیتریک HNO3 مجددا با آب مقطر آبکشی شوند .

در صورتی که نمونه‌برداری از شیر آب انجام می‌گیرد , باید داخل و خارج شیر آب را کاملا تمیز نمود و پس از باز گذاشتن شیر آب برای مدت یک دقیقه , شیر را بسته و با استفاده از چراغ الکلی سرشیر را حرارت دهید , سپس آن را باز کرده تا آب خارج شود و خنک گردد .

ظروف نمونه‌برداری باید کاملا از آب پر شود و در هنگام نمونه‌برداری دقت نمود تا آلودگی ثانوی پیش نیاید .

برای نمونه‌برداری از آب‌های کلر زده شده , پیش از سترون کردن ظرف به ازاء هر 125 میلی‌لیتر حجم ظرف 0/1 میلی‌لیتر از محلول 10 درصد تیوسولفات سدیم ($Na2S2O3$) اضافه کنید تا اثر بازدارندگی کلر را خنثی سازد . در مواردی که باقیمانده کلر بیش از 5 پی پی ام [4] می‌باشد مقادیر بیشتر تیوسولفات لازم است . در مورد آب‌هائی که غلظت فلزات سنگین در آنها بیش از 0/01 میلی‌گرم در لیتر است 0/3 میلی‌لیتر از محلول 15 درصد اتیلن دی امین تتراستیک [5] اسید به ازای هر 500 میلی‌لیتر حجم ظرف اضافه شود .

آبهای نمونه‌برداری شده تا رسیدن به آزمایشگاه و پس از آن تا زمان آزمایش در دمای 2 الی 5 درجه سلسیوس نگه‌داری شود . لازم است که زمان بین نمونه‌برداری تا آزمایش از 6 ساعت بیشتر نباشد .

8 ـ روش کار

8 ـ 1 ـ صاف کردن , گرمخانه‌گذاری

پس از صاف کردن حجم معینی از آب با استفاده از صافی غشائی آن را روی پلیت حاوی محیط کشت کاراف استرپتوکوکوس آگار بند 5–2–1 و یا محیط ام انتروکوکوس آگار بند 5–2–2 قرار دهید . سپس پلیت‌ها را به مدت 48 ساعت در دمای 1+(37 یا 35) درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری کنید .

یادآوری 1 ـ کلیه عملیات صاف کردن باید در مجاورت شعله و با استفاده از وسائل سترون انجام شود .

8 ـ 2 ـ شمارش

پس از پایان مدت گرمخانه‌گذاری کلیه پرگنه‌های برجسته قرمز , صورتی و شاه بلوطی رنگ (حتی در مرکز پرگنه‌ها) را شمارش کرده و به عنوان استرپتوکک مدفوعی فرضی در نظر بگیرید .

یادآوری 2 ـ نظر به اینکه در برخی موارد باکتری‌هائی به جز استرپتوکک‌های گروه D نیز می‌توانند پرگنه‌ای با مشخصات بالا ایجاد کنند , لذا افزایش دمای گرمخانه به 44+0/5 درجه سلسیوس (پس از گرمخانه‌گذاری اولیه در 37+1 درجه سلسیوس برای مدت 5+1 ساعت) می‌تواند از رشد آنها جلوگیری کند .

8 ـ 3 ـ آزمون تأئیدی

پرگنه‌های مشکوک را روی محیط صفرا , اسکولین , آزید آگار بند 5–2–3 کشت دهید و به مدت 48 ساعت در دمای 44+0/5 درجه سلسیوس قرار دهید .

کلیه پرگنه‌هائی را که خرمائی تا سیاه رنگ هستند و یا دو رنگ فوق در محیط اطراف آنها پخش شده است , مثبت در نظر بگیرید .

8 ـ 4 ـ آزمون کاتالاز

یک قطره از محلول آب اکسیژنه بند 5–3 را روی پرگنه‌های مشکوک که در محیط صفرا , اسکولین , آزید آگار بند 5–2–3 رشد کرده‌اند قرار دهید متصاعد شدن حباب‌های اکسیژن دلیل بر وجود آنزیم کاتالاز است . استرپتوکک‌های مدفوعی کاتالاز منفی می‌باشند .

یادآوری 3 ـ به منظور حذف خطاهای ناشی از واکنش کاذب کاتالاز منفی آزمایش را روی یک محیط غیر انتخابی مثل آگار مغذی (Nutricnt Agar) تکرار کنید . از آنجا که آنزیم فوق

فقط در کشت‌های زنده وجود دارد بنابراین آزمایش را روی کشت 18 تا 24 ساعت انجام دهید .

1- Membranc filter

2- Formazan

3- triphenyl tetrazolium chloride solution

4- Part per million(P.P.M)

5- Ethylene diamine tetra acetic acid (E.D.T.A)

ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI NUMBER

3620

Detection and enumeration of faecal streptococci in water, by membrane filter method

1st Edition