



جمهوری اسلامی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شماره استاندارد ایران

۷۲۲۳



آب - جستجو و شناسایی ویبریوکلا -

روش آزمون میکروبیولوژی

چاپ اول

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، صاحبان مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط با موضوع صورت میگیرد. سعی بر این است که

استانداردهای ملی، در جهت مطلوبیت ها و مصالح ملی و با 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 و اعضای کمیسیون های 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 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 و منتشر می 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 و نیازمندیهای 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 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. 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 کنندگان سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت 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 – مستجمه و شناسایی ویبریولوژیا

روش آزمون میکروبیولوژی

رئیس	سمت یا نمایندگی
مهوش ، اسکوئی (دکترای میکروب شناسی)	انستیتو پاستور ایران
اعضاء	
اصلانی ، محمد مهدی (دکترای میکروبیشناسی)	انستیتو پاستور ایران
زندوکیلی ، فاطمه (فوق لیسانس علوم بهداشتی در تغذیه)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
سرگزی ، مریم (لیسانس میکروب شناسی)	شرکت آبهای شهرها و شرکهای استان تهران
شقاقی ، غلامرضا (فوق لیسانس بهداشت محیط و حرفه ای)	وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی - اداره سلامت
صدیقی ، هما (لیسانس بیولوژی)	شرکت آب و فاضلاب استان تهران
ضرغامپور ، زهره (فوق لیسانس میکروب شناسی)	شرکت آب و فاضلاب استان تهران
عابدی ، زهرا (فوق لیسانس میکروب شناسی)	انستیتو پاستور ایران
غلامی ، میترا (دکترای بهداشت محیط)	دانشگاه علوم پزشکی ایران
دبیر	
زرسازي ، گیتا (لیسانس صنایع- استاندارد و کنترل کیفیت)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

پیشگفتار

آب - جستجو و شناسایی ویبریوکلا - روش آزمون میکروبیولوژی که توسط کمیسیون های فنی مربوطه تهیه و تدوین شده و درپنجاه و سومین جلسه کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی مورخ ۸۲/۱۲/۱۷ 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 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 بکار رفته به شرح زیر است :

W.E.F. A.W.W.A A.P.H.A Standard methods for the examination of water and waste water . 1998 water-Detection and identification of vibrio cholera .

مقدمه

ویبریوکلا^۱ گروهی از میکروارگانیسم های میله ای شکل ، خمیده ، گرم منفی ، بدون اسپور و متحرک هستند که تا کنون بیش از ۸۰ گروه سرولوژیکی آن شناخته شده است و به دو گروه عمده ویبریوکلا 01^۲ و ویبریوکلا غیر 01^۳ طبقه بندی می شوند . ویبریوکلا 01 دارای دو زیر گروه^۴ التور^۵ و کلاسیک^۶ می باشد که نوع التور آن عامل بیماری وبا بوده و با آنتی سرم های اینابا^۷ ، اگاوا^۸ و هیکوچیما^۹ سروتایپ^{۱۰} می شوند برخی از سویه های ویبریوکلا 01

-
- 1-Vibrio cholera
 - 2-Vibrio Cholera-01
 - 3-Vibrio Cholera-Non 01
 - 4-Biotype
 - 5-Eltor
 - 6-Clasical
 - 7-Inaba
 - 8-Ogawa
 - 9-Hikojima

آنروتوکسین^{۱۱} ایجاد نموده که با حمله به سلولهای پوششی روده موجب دفع شدید آب و کاهش الکترولیت های بدن می شود و چنانچه جایگزین سازی مایعات و الکترولیت ها در بدن به سرعت انجام نپذیرد ، خطر مرگ همراه دارد .

یکی از مهمترین راههای انتقال بیماری وبا به انسان ، آب آلوده به آن می باشد که با توجه به اهمیت این میکروارگانیسم در سلامت جامعه ، تدوین روشهای آزمون استاندارد و کنترل آن بویژه در تصفیه خانه ها ضرورت دارد .

آب – جستجو و شناسایی ویبریوکلا- روش آزمون میکروبیولوژی

۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد ، تعیین روش جستجو و شناسایی ویبریوکلا در آب می باشد .

۲ دامنه کاربرد

این استاندارد برای انواع مختلف آب مانند آب آشامیدنی ، آب سطحی ، آب شور و شیرین ، آبهای زیرزمینی و آب شناگاهها کاربرد دارد .

۳ مراجع الزامی

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

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است :

۳-۱ استاندارد ملی ایران ۴۲۰۸ : سال ۱۳۷۶ آئین کار نمونه برداری از آب جهت آزمونهای باکتریولوژیکی

۳-۲ استاندارد ملی ایران ۴۲۰۷ : سال ۱۳۷۶ آئین کار آزمونهای باکتریولوژیکی آب

۳-۳ استاندارد ملی ایران ۲۷۴۷ : سال ۱۳۸۰ آئین کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

۱

۴ اساس روش

این روش بر اساس تغلیظ نمونه های آب با استفاده از صافی غشایی ، غنی سازی نمونه ، کشت بر روی محیط انتخابی و آزمونهای تائیدی آن می باشد .

۵ نمونه برداری

دست کم ۳ تا ۵ لیتر آب را طبق استاندارد ملی ۴۲۰۸ سال ۱۳۷۶ آئین کار نمونه برداری از آب جهت آزمونهای باکتریولوژیکی نمونه برداری کنید .

۶ مواد لازم

۶-۱ محیط های کشت ، معرف ها و رقیق کننده ها

۶-۱-۱ محیط کشت تیوسولفات - سیترات - نمک صفراوی - ساکارز آگار^۱ (TCBS)

ترکیبات	مقدار
پپتون	۱۰ گرم
عصاره مخمر	۵ گرم
تیوسولفات سدیم	۱۰ گرم
سیترات سدیم	۱۰ گرم
پودر صفرای گاوی	۸ گرم
ساکارز	۲۰ گرم
سدیم کلراید	۱۰ گرم
سیترات آهن (۳ ظرفیتی)	۱ گرم
بروموتیمول آبی	۰/۰۴ گرم
آگار	۱۴ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

1 – Thiosulfate-Citrate-Bile salt-Sucrose Agar (TCBS) .

طرز تهیه :

ترکیبات فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل کنید. pH نهایی محیط باید برابر $0/1 \pm 8/8$ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باشد سپس در پلیت های سترون تقسیم نموده، پس از خشک نمودن رطوبت اضافی پلیت ها، در دمای ۴ درجه سلسیوس به صورت وارونه نگه داری کنید. این محیط باید به رنگ آبی متمایل به سبز شفاف باشد.

یاد آوری :

محیط کشت تیوسولفات - سیترات - نمک صفراوی - ساکارز آگار را نباید اتوکلاو کنید.

۲-۱-۶ آب پپتونه نمکدار قلیایی^۱

مقدار	ترکیبات
۳ گرم	عصاره مخمر
۱۰ گرم	پپتون
۱۰ گرم	سدیم کلراید
۱۰۰۰ میلی لیتر	آب مقطر

طرز تهیه :

ترکیبات فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل کنید. pH نهایی محیط باید برابر $0/2 \pm 8/6$ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باشد. سپس در ظروف با گنجایش ۲۵۰ میلی لیتری، تقسیم نموده و در اتوکلاو با دمای ۱ ± 121 درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید.

۳-۱-۶ تریپتیک سوی آگار نمکدار^۱

1 - Alkaline Salted Peptone water .

ترکیبات

تریپتون	۱۵ گرم
پپتون	۵ گرم
سدیم کلراید	۱۰ گرم
آگار	۱۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

ترکیبات فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل کنید. پس از تقسیم در لوله های مناسب کشت ، در اتوکلاو با دمای 1 ± 121 درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون نمائید. سپس بر روی سطح شیبدار قرار دهید تا جامد شوند pH نهایی محیط پس از سترون شدن باید برابر 0.2 ± 7.3 در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باشد .

۴-۱-۶ محیط کشت آزمون حرکت^۲

ترکیبات

پودر عصاره گوشت	۳ گرم
پپتون	۱۰ گرم
کلرید سدیم	۵ گرم
آگار	۴ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

1 – Tryptic Soy Salted Agar .
2 - Motility test .

طرز تهیه :

ترکیبات فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل کنید. سپس در لوله های مناسب کشت به حجم های ۸ میلی لیتری تقسیم نموده و در اتوکلاو با دمای 1 ± 121 درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید . pH محیط پس از سترون شدن باید برابر 0.1 ± 7.4 در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باشد .

۶-۱-۵ معرف کواکس^۱

ترکیبات	مقدار
پارادی متیل آمینوبنز آلدئید	۵ گرم
اسید هیدروکلریدریک	۲۵ میلی لیتر
آمیل الکل	۷۵ میلی لیتر

طرز تهیه :

بنز آلدئید را در آمیل الکل حل نموده ، سپس اسید را با احتیاط به آن اضافه کنید. این محلول باید در دمای ۴ درجه سلسیوس و دور از نور نگه داری شود .

۶-۱-۶ معرف اکسیداز^۲

ترکیب	مقدار
تترامتیل پارافنیل دی آمین - هیدروکلراید	۰/۱ گرم
آب مقطر	۱۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

ترکیب فوق را در آب مقطر حل کنید . محلول بدست آمده را می توانید تا یک هفته در دمای ۴ درجه سلسیوس نگه داری نمائید .

-
- 1- Kovacs reagent .
 - 2- Oxidase reagent

۵

۶-۱-۷ آبگوشت تریپتون - تریپتوفان^۱

ترکیبات	مقدار
تریپتون	۱۰ گرم
کلرید سدیم	۵ گرم
تریپتوفان	۱ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

ترکیبات فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل کنید. سپس در لوله های مناسب کشت به حجم های ۵ میلی لیتری تقسیم نموده و در اتوکلاو با دمای 1 ± 121 درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید. pH محیط باید پس از سترون شدن برابر 0.1 ± 7.5 در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باشد.

یاد آوری :

چنانچه محیط های کشت مورد استفاده به صورت تجارتي در دسترس باشد ، طبق دستورالعمل سازنده انجام دهید .

۷ وسایل لازم

از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروبی شناسی طبق استاندارد ملی ۲۷۴۷ سال ۱۳۸۰ آئین کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی استفاده کنید .

۸ روش اجرای آزمون

۱-۸ تخلیظ به روش صافی غشایی

۳ تا ۵ لیتر نمونه بند ۵ آب را توسط صافی غشایی با اندازه روزنه 0.45 میکرون طبق استاندارد ملی ۴۲۰۷ صاف کنید .

1- Tryptone-Tryptophane broth .

۶

۲-۸ غنی سازی نمونه

صافی غشایی بند ۱-۸ را با رعایت شرایط سترونی ، در محیط آب پیتونه نمکدار قلیایی بند ۶-۱-۲ ، غوطه ور کنید ، سپس در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۶ تا ۱۸ ساعت گرمخانه گذاری نمائید .

۳-۸ کشت بر روی محیط انتقابی

با استفاده از حلقه کشت سترون ، از محیط کشت بند ۲-۸ برداشت نموده و بر روی محیط کشت تیوسولفات - سترات - نمک صفراوی - ساکارز - آگار بند ۶-۱-۱ به صورت خطی کشت دهید . سپس پلیت ها را در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری نمائید .

۴-۸ بررسی پلیت ها

پس از پایان مدت گرمخانه گذاری ، پلیت ها را بررسی کنید . ایجاد کلنی های زرد رنگ نشانگر تخمیر ساکارز و وجود ویبریوکرای فرضی می باشد که برای تائید آن باید آزمون های تائیدی انجام شود .

۵-۸ آزمون های تأییدی

۱-۵-۸ جهت انجام آزمون های تأییدی لازم است ابتدا کشت جوان (تازه) تهیه نمایید . برای این منظور پنج کلنی زرد رنگ از بند ۸-۴ انتخاب کنید. اندازه کلنی ها بهتر است بین یک تا سه میلی متر باشد. سپس توسط حلقه کشت سترون بر روی محیط کشت غیر انتخابی مانند تریپتیک سوی آگار نمکدار بند ۶-۳ بصورت خطی کشت دهید . پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت ، آزمون های تأییدی را انجام دهید.

۱-۱-۵-۸ آزمون حرکت

توسط حلقه کشت سترون از کلنی بند ۸-۵-۱ برداشت نموده و بصورت مستقیم تا عمق ۵ میلی متری آگار محیط کشت آزمون حرکت بند ۶-۱-۴ وارد کنید. سپس در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری نمایید . پس از پایان این مدت ، چنانچه واکنش مثبت باشد علائم رشد را در اطراف سوزن کشت می توانید مشاهده کنید.

آزمون حرکت ویبریوکلا 01 مثبت است .

یادآوری :

چنانچه در مدت فوق رشدی مشاهده نگردید ، گرمخانه گذاری را تا پنج روز دیگر در دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سلسیوس ادامه دهید .

۲-۱-۵-۸ آزمون ایندول^۱

توسط حلقه کشت سترون از کلنی بند ۸-۵-۱ برداشت نموده و به لوله حاوی آبگوشت تریپتون- تریپتوفان بند ۶-۱-۷ تلقیح کنید . سپس لوله ها را در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری نمایید .

پس از پایان مدت گرمخانه گذاری ، به لوله های فوق مقدار ۰/۲ تا ۰/۳ میلی لیتر از معرف کواکس بند ۶-۱-۵ فزوده و مخلوط کنید.تشکیل حلقه قرمز رنگ نشان دهنده واکنش مثبت می باشد .

آزمون ایندول ویبریوکلا 01 مثبت است .

۳-۱-۵-۸ آزمون اکسیداز

۲ تا ۳ قطره معرف اکسیداز بند ۶-۱-۶ بر روی کاغذ صافی بریزید . سپس توسط حلقه کشت سترون از کلنی بند ۸-۵-۱ برداشت نموده و به کاغذ آغشته به معرف اکسیداز اضافه کنید. ظهور رنگ ارغوانی مایل به آبی تیره در مدت ۱۰ ثانیه را ، به عنوان واکنش مثبت در نظر بگیرید .

1- indol Test .

آزمون اکسیداز ویبریوکلا 01 مثبت است .

۸-۱-۴ آزمون میکروسکوپی

توسط حلقه کشت از کلنی بند ۸-۵-۱ برداشت نموده و بر روی یک لام تمیز گستره تهیه کنید . پس از ثابت نمودن لام ، به روش گرم^۱ رنگ آمیزی نموده و توسط میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰۰ برابر و استفاده از روغن سدر بررسی کنید .
ویبریوکلا 01 با سیل های گرم منفی خمیده شکل هستند .

یادآوری :

توصیه می شود برای شناسایی زیر گروه های ویبریوکلا 01 از روشهای سرولوژیکی معتبر استفاده کنید.

۹ بیان نتایج

با توجه به آزمون های تأییدی (طبق بند ۸-۵) این استاندارد نتایج را به صورت "ویبریوکلا 01 در ۳ تا ۵ میلی لیتر نمونه آب مشاهده گردید" و یا "ویبریوکلا 01 در ۳ تا ۵ میلی لیتر نمونه آب مشاهده نگردید" بیان کنید.

۱۰ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی های زیر باشد :

۱-۱۰ مشخصات کامل نمونه مانند نوع نمونه ، تاریخ و محل نمونه برداری ، تاریخ ارسال نمونه به آزمایشگاه

۲-۱۰ روش آزمون طبق استاندارد ملی..... .

۳-۱۰ بیان نتایج طبق بند ۹ این استاندارد

۴-۱۰ سایر اطلاعات که مرتبط با روش آزمون باشد .

1- Gram .



ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI NUMBER

7223



**Water –Detection and identification of vibrio cholera-
Microbiological test method**

1st. Revision