www.abpsoil.com
ابنیه پایدار سبز

جمهوری اسلامی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شمارهٔ استاندارد ایران

5868

آب شناسايي و شمارش قارچ ها ـ روش هاي آزمون ميكروبيولوژي

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، 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 –شناسایي و شمارش قارچها - روش هاي آزمون ميكروبيولوژي

رئيس	سمت يا نمايندگي
زيني - فريده (دكتراي قارچ شناسي پزشكي)	دانشگاه علوم پزشكي تهران
اعضاء	
بصيري جهرمي - شهيندخت (فوق ليسانس قارچ شناسي)	انستيتوپاستور ايران
رشيد نجفي - فريده (ليسانس بيولوژي)	موسسه استاندارد وتحقيقات صنعتي ايران
جهانتاب - سهيلا (فوق ليسانس ميكروبيولوژي)	سازمان آب و فاضلاب تهران
ياسايي - شكوه(فوق ليسانس انگل شناسي)	موسسه استاندارد وتحقيقات صنعتي ايران
دبير	
قبادي دانا - مريم (ليسانس ميكروبيولوژي)	موسسه استاندارد وتحقيقات صنعتي ايران

پيشگفتار

استاندارد آب – شناسائي و شمارش قارچها روش هاي آزمون ميكروبيولوژي كه توسط كميسيون‌هاي فني مربوطه تهيه و تدوين شده و درچهل وهشتمين جلسه كميته ملي استاندارد ميكروبيولوژي مورخ ۸۲/۵/۲۵ مورد تصويب قرار گرفته است، اينك به استناد بند ۱ ماده ۳ قانون اصلاح قوانين و مقررات موسسه استاندارد و تحقيقات صنعتي ايران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ به عنوان استاندارد ملي ايران منتشر مي شود .

براي حفظ همگامي و هماهنگي با تحولات و پيشرفتهاي ملي و جهاني در زمينه صنايع ، علوم و خدمات استانداردهاي ملي ايران در مواقع لزوم تجديدنظر خواهد شد و هرگونه پيشنهادي كه براي اصلاح يا تكميل اين استانداردها ارائه شود، در هنگام تجديدنظر در كميسيون فني، مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراين براي مراجعه به استانداردهاي ايران بايد همواره از آخرين تجديد نظر آنها استفاده كرد .

در تهيه و تدوين اين استاندارد سعي شده است كه ضمن توجه به شرايط موجود و نيازهاي جامعه، در حد امكان بين اين استاندارد و استاندارد ملي كشورهاي صنعتي و پيشرفته هماهنگي ايجاد شود .

منبع و مآخذي كه براي تهيه اين استاندارد بكار رفته به شرح زير است :

1 - Franson , M.a.h Standard methods for examination of water and waste water .

Ed . 19th Vol.2 , American Public health association 1995 .

فهرست مندرجات	صفحه
پيشگفتار	ب
مقدمه	پ
١ هدف و دامنه كاربرد	١
٢ مراجع الزامي	١
٣ نمونه برداري	٢
٤ مواد لازم	٢
٥ وسايل لازم	٨
٦ روش آزمون - پورپليت	٨
٧ روش آزمون – كشت سطحي	١١
٨ روش آزمون – صافي غشايي	١٣
٩ روش آزمون – شناسايي و شمارش مخمرها	١٤

مقدمه

قارچ ها كه شامل مخمرها و گونه هاي رشته اي يا كپك ها هستند، ارگانيزم هايي هتروتروف وبدون كلروفيل ميباشند كه واجد ديواره سخت وهسته حقيقي[1] بوده و اغلب هوازي و يا ميكروآئروفيل[2] مي‌باشند. قارچها در همه جا پراكنده اند و در هر جايي كه ماده آلي غير زنده وجود دارد يافت مي‌شوند. با توجه به ارتباط بين ميزان توده قارچ و مواد آلي ميتوان قارچها را شاخص خوبي براي آلودگي آب در نظر گرفت ولي متاسفانه هيچ گونه، يا گروهي از قارچها كه از اين نظر حائز اهميت باشند، تاكنون شناخته نشده‌اند. در آب چشمه معمولاً كمترين تعداد اسپور قارچها در قسمت نزديك به سرچشمه مشاهده مي‌شود.
وجود تعداد زيادي قارچ مشابه، نشانه وجود مقدار بيش از حد مواد آلي ميباشد در حاليكه وجود قارچهاي زنده[3] با تنوع بسيار، نشانه سازش جمعيتي قارچها با محيط آبي مي‌باشد. قارچها از آب آشاميدني و نيز از سطح داخلي سيستم لوله هاي توزيع آب جدا شده‌اند. آنها در آب تصفيه شده باقي مانده و يا بعد از فرآيند تصفيه وارد سيستم شده، در هر صورت اسپور قارچها قادرند مدت زمان طولاني زنده باقي بمانند. قارچهاي بيماري‌زا در آب مقطر استريل براي مدت زمان نسبتاً طولاني نگهداري مي‌شوند.
اگر چه مزه و بوي آبهاي آشاميدني مربوط به وجود ارگانيزمهاي پروكاريوت مثل باكتريها اكتنيوميست‌ها و سيانوباكترها است، ولي قارچها نيز باعث تغيير بو و مزه آب مي‌شوند.
در مطالعات انجام شده روش انعقاد شيميايي و گندزدايي براي حذف قارچها از آب بسيار موثرتر از صافي شني و گندزدايي گزارش شده است.

آب – شناسايي و شمارش قارچها -روش هاي آزمون ميكروبيولوژي

1 - Eucaryot
2-Microaerophil
3 - Mycobiota

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوين اين استانداردتعيين روشهايي براي جستجو و شمارش قارچ ها مي باشد.اين استاندارد در مورد آب آشاميدني و سيستم هاي توزيع آن و زيستگاه هاي آبي مختلف (درياچه، استخرهاي طبيعي، رود، جويبار، خور[1]،اقيانوس، سيلابهاي شهري و روستايي وچاه) فاضلاب (پساب، لجن، رسوبات آبي و فاضلاب معادن اسيدي) كاربرد دارد.

۲ مراجع الزامي

مدارك زير حاوي مقرراتي است كه در متن اين استاندارد به آنها ارجاع داده شده است. به اين ترتيب آن مقررات جزئي از اين استاندارد محسوب مي‌شود . در مورد مراجع داراي تاريخ چاپ و/ يا تجديدنظر، اصلاحيه‌ها و تجديدنظرهاي بعدي اين مدارك مورد نظر نيست . معهذا بهتر است كاربران ذينفع اين استاندارد امكان كاربرد آخرين اصلاحيه‌ها و تجديدنظرهاي مدارك الزامي زير را مورد بررسي قرار دهند . در مورد مراجع بدون تاريخ چاپ و / يا تجديد نظر، آخرين چاپ و / يا تجديد نظر آن مدارك الزامي ارجاع داده شده مورد نظر است.

استفاده از مراجع زير براي كاربرد اين استاندارد الزامي است :

۲-۱ استاندارد ملي ايران ۴۲۰۸ : سال ۱۳۷۵ آئين كار نمونه‌برداري از آب جهت آزمونهاي باكتريولوژيكي

۲-۲ استاندارد ملي ايران ۲۷۴۷ سال۱۳۸۰: تجديد نظر اول ميكروبيولوژي - آئين كار در آزمايشگاه ميكروبيولوژي

۳ نمونه برداري

از لوله هاي استوانه اي پلاستيكي درپوش دار سترون استفاده كنيد.براي كاهش احتمال نشتي لوله‌ها، هنگام انتقال، آنها را بصورت عمودي قرار داده و پس از مصرف دور بيندازيد. نمونه‌ها را بيش از ۲۴ ساعت نگهداري نكنيد. اگر آزمون بلافاصله بعد از نمونه برداري انجام نمي گيرد، نمونه را در يخچال نگهداري كنيد. براي اطلاعات بيشتر به استاندارد ملي ايران ۴۲۰۸ «آئين كار نمونه برداري از آب جهت آزمونهاي باكتريولوژيكي» مراجعه نماييد.

۴ مواد لازم

به منظور بدست آوردن نتايج يكنواخت، لازم است از مواد اوليه‌اي با كيفيت و درجه خلوص يكسان استفاده نمود. آب مورد مصرف نيز بايد از نوع تقطير شده با تجهيزات شيشه‌اي بوده و عاري از مواد بازدارنده از رشد ميكروارگانيزمها باشد. در صورتي كه آب مقطر از آب كلرينه شده تهيه مي‌شود بايد قبل از تقطير، كلر آن حذف شود .

---

۱ - *دهانه رودخانه بزرگ كه تشكيل خليج مي‌دهد*

٤-١ نئوپپتون گلوكز رزبنگال اورئومايسين آگار[1]

الف) تركيبات :

نئوپپتون	٥ گرم
گلوكز	١٠ گرم
محلول يك درصد رزبنگال در آب	٣/٥ ميلي ليتر
آگار	٢٠ گرم
آب مقطر	١٠٠٠ ميلي ليتر

ب) طرز تهيه :

تركيبات فوق را به ١٠٠٠ ميلي ليتر آب اضافه كنيد. محيط را با اتوكلاو سترون كنيد. pH نهايي بايد حدود ٦/٥ باشد. بطور جداگانه محلولي از كلروتتراسيكلين يا تتراسيكلين (يك گرم آنتي بيوتيك محلول در ١٥٠ ميلي ليتر آب مقطر) آماده نموده و در يخچال قرار دهيد. قبل از استفاده آنرا بوسيله صافي غشايي سترون نماييد. ٥ ميلي ليتر از آنرا به محيط كشت پايه ذوب شده با حرارت ٤٥ درجه سلسيوس اضافه نماييد.

يادآوري - اگر چه اين محيط براي جدا سازي طيف وسيعي از گونه‌هاي قارچهاي رشته اي مفيد است ولي معمولاً براي شمارش آنها مورد استفاده قرار مي‌گيرد.

٤-٢ چاپكس آگار[2]

الف) تركيبات :

ساكارز	٣٠ گرم
سديم نيترات	٣ گرم
دي پتاسيم هيدروژن فسفات[3]	١ گرم
منيزيم سولفات [4]	٠/٥ گرم

---

1 - Neopeptone – glucose – rose bengal – aureomycine agar(cooke's rose bengal agar)
اين محيط بصورت تجارتي موجود نميباشد ولي ميتوان محيط تجارتي را بجاي آن استفاده نمود.

2- Czapek agar (or Czapek – Dox agar)

3- K_2HPO_4

4- $MgSO_4$

پتاسيم كلرايد [1]	۰/۵ گرم
فروسولفات [2]	۰/۰۱ گرم
آگار	۱۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ ميلي ليتر

ب) طرز تهيه:

تركيبات فوق را به ۱۰۰۰ ميلي ليتر آب مقطر اضافه نموده ودر دماي ۱۲۱ درجه سلسيوس به مدت ۱۵ دقيقه سترون نماييد.pH نهايي بايد ۰/۱±۷/۳باشد.

يـــــاد آوري - اين محيط براي جداسازي قارچ هاي رشته اي متعلق به گونه هاي آسپرژيلوس[3]، پني‌سيليوم[4]، پاسيلومايسس[5] و قارچهاي با نيازمنديهاي فيزيولوژيك مشابه آنها بكار مي‌رود.

۳-٤ عصاره مخمر مالت گلوكز آگار

الف) تركيبات :

عصاره مخمر	۳ گرم
عصاره مالت	۳ گرم
نئوپپتون	۵ گرم
گلوكز	۱۰ گرم
آگار	۲۰ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ ميلي ليتر

ب) طرز تهيه:

1- Kcl

2- $FeSO_4$

1-Aspergillus
2-Penicillium
3-paecilomyces

تركيبات فوق را به ۱۰۰۰ ميلي ليتر آب بيافزائيد و توسط اتوكلاو سترون نماييد. تنظيم pH ضروري نمي‌باشد.

يادآوري - اين محيط براي جدا سازي مخمرها مورد استفاده مي‌باشد.

٤-٤ سابورودكستروز آگار

الف) تركيبات :

نئوپپتون	٥ گرم
گلوكز	۱۰ گرم
آگار	۲۰ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ ميلي ليتر

ب) طرز تهيه :

تركيبات فوق را در آب مقطر حل نموده و محيط را توسط اتوكلاو با دماي ۱۲۱ درجه سلسيوس سترون نماييد.

pH محيط بعد از سترون شدن بايد حدود ۰/۱± ٦/٥ باشد.

يادآوري - اين محيط براي نگهداري كشت‌هاي ذخيره مفيد مي‌باشد. محيط فوق همانند محيط طبق بند ٤-۱ بوده ولي فاقد رزبنگال و آنتي‌بيوتيك مي‌باشد.

٤-٥ ارئومايسين رزبنگال گلوكز پپتون آگار:

الف) تركيبات :

گلوكز	۱۰ گرم
پپتون	٥ گرم
پتاسيم دي هيدروژن فسفات	۱ گرم
منيزيم سولفات	۰/٥ گرم
رزبنگال (۳/٥ ميلي ليتر از محلول ۱ گرم درصد)	۰/۰۳٥ گرم
آگار	۲۰ گرم

اورئومایسین هیدرو کلراید	۷۰ میلي گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ گرم

ب) طرز تهیه :

مواد فوق را بجز اورئومایسین هیدروکلراید در ۸۰ میلي لیتر آب مقطر حل نموده و اتوکلاو نمائید. ۷۰ میلي گرم ارئومایسین هیدروکلراید را در ۲۰۰ میلي لیتر آب حل نموده و با صافي سترون نموده و به محیط پایه آگار دار خنك شده (۴۵-۴۲ درجه سلسیوس) اضافه نمائید.pH محیط باید۵/۴ باشد. محیط حاصل را در حجم هاي۲۵ میلي لیتري در پلیت هاي (۱۵×۱۰۰ mm) سترون تقسیم نموده و صبر کنید تا محیط بصورت جامد درآید. پلیت‌هاي حاوي محیط را مي‌توان در دماي ٤ درجه سلسیوس تا ٤ هفته نگهداري نمود.

یادآوري: این محیط کشت براي کشت سطحي و صافي غشایي قارچ ها بکار مي رود.بهتر است براي روش صافي غشایي از محیط اصلاح شده ارئومایسین رزبنگال گلوکز پپتون آگار استفاده شود ترکیبات این محیط اصلاح شده مانند محیط کشت ارئومایسین رزبنگال گلوکز پپتون آگار میباشد فقط میزان آنتي بیوتیك ارئومایسین هیدروکلراید از ۱۰میلي گرم به ۲۰۰ میلي گرم در لیتر افزایش مي یابد.

٤-٦ استرپتومایسین - ترامایسین مالت اکستراکت آگار[1] :

الف) ترکیبات :

مالت اکستراکت	۳۰ گرم
پپتون	۵ گرم
آگار	۱۵ گرم
استرپتومایسین	۷۰ میلي گرم
ترامایسین	۷۰ میلي گرم
آب	۱۰۰۰ میلي لیتر

ب) طرز تهیه :

1 - Streptomycin – terramycin – malt extract agar

مواد فوق را به استثناء استرپتومایسین در ۸۰۰ میلي ليتر آب مقطر حل نموده و با اتوکلاو سترون نماييد. ۷۰ ميلي گرم از استرپتومايسين را در ۱۰۰ ميلي‌ليتر آب مقطر و نيز ۷۰ ميلي گرم از ترامايسين را در ۱۰۰ميلي ليتر آب مقطر ديگر حل نموده و با صافي سترون نماييد و به محيط پايه آگار دار خنك شده (۴۵-۴۲ درجه سلسيوس) اضافه نماييد. pH محيط بايد ۵/۴ باشد. محيط كشت را در حجم‌هاي حدود ۲۰ ميلي ليتر در ظروف پتري سترون بريزيد و بگذاريد تا محيط بصورت جامد درآيد. پليت‌هاي حاوي محيط را مي‌توان بمدت چهار هفته در دماي ۴ درجه سلسيوس نگهداري نمود.

يـا د آ و ري : اين محيط كشت براي كشت سطحي و صافي غشايي قارچ ها بكار مي رود.بهتر است براي روش صافي غشايي از محيط اصلاح شده استرپتومايسين ـ ترامايسين مالت اكستراكت آگاراستفاده شود تركيبات اين محيط اصلاح شده مانند محيط كشت استرپتومايسين ـ ترامايسين مالت اكستراكت آگارميباشد فقط ميزان آنتي بيوتيك استرپتومايسين وترامايسين از ۷۰ميلي گرم به ۲۰۰ ميلي گرم در ليتر افزايش مي يابد

۴-۷ محيط مايع پايه ازت - مخمر[1] گلوكز:

الف) تركيبات :

محيط پايه ازت ـ مخمر	۱۳/۴ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ ميلي ليتر

ب) طرز تهيه :

تركيبات فوق را در آب حل نموده و بوسيله صافي، صاف كنيد. ۵۰۰ ميلي ليتر از محلول ۲% و ۴۰ درصد گلوكز تهيه كرده و آنها را جداگانه صاف كنيد. ۲۵ ميلي ليتر محيط پايه ازت مخمر و ۲۵ ميلي ليتر از محلول ۲% يا ۴۰% گلوكز را در يك ارلن ۲۵۰ ميلي ليتر سترون ريخته تا غلظت نهايي گلوكز ۱% يا۲۰% باشد ارلن حاوي محيط كشت را با گاز و پنبه مسدود كرده و آنرا تا زمان استفاده، نگهداري كنيد.

يـا د آ و ري : اين محيط كشت به منظور غني سازي مخمرها بكار مي رود.

1- Yeast nitrogen base glucose broth

٥ وسايل لازم

٥-١ علاوه بر وسايل لازم براي آزمايشهاي ميكروبيولوژي بر اساس استاندارد ملي ايران به شماره ٢٧٤٧ سال ١٣٨٠ تجديد نظراول ميكروبيولوژي – آيين كار در آزمايشگاه ميكروبيولوژي، وسايل زير مورد نياز مي‌باشد.

٥-٢ ميكروسكوپ (ترجيحاً فازكنتراست).

٥-٣ ميكروسكوپ تشريحي مجهز به منبع نور خارجي

٥-٤ وسايل مربوط به صافي غشايي (نگهدارنده، لوله‌ها، پمپ خلاء، ارلن).

٥-٥ صافي‌هاي غشايي سترون به قطر ٧٥ ميليمتر داراي منافذي به قطر ١/٢ ميكرومتر

يادآوري - اگر چه بعلت كدورت و ذرات قابل توجه آبهاي طبيعي و نيز غلظت كم مخمرها درمقايسه با باكتريها، صافي‌هاي غشائي با منافذ بزرگتر (١/٢) مورد استفاده قرار مي‌گيرد، تا بتوان حجم بيشتري از آب را (تا٥٠٠ ميلي ليتر) را صاف نمود، ولي از صافي با منافذ ٠/٤٥ ميكرومتر نيز بدليل كارايي كافي، مي‌توان بهره‌مند شد.

٦ روش آزمون - پورپليت

اگرچه حداقل با تعداد ٢٠ نمونه ميتوان شمارش مطلوبي بدست آورد، ولي بهتر است هربار با ٤٠ نمونه طبق روش زير بررسي را انجام داد.

٦-١ آماده كردن آزمونه

در يك ارلن‌مايرِ ٢٥٠ ميلي ليتري سترون، ١٣٥ ميلي ليتر آب مقطر سترون و ١٥ ميلي ليتر از نمونه را اضافه كنيد تا رقت ١:١٠ بدست آيد. از استوانه مدرج سترون براي هر يك از نمونه‌ها استفاده كنيد و يا پس از هر بار استفاده آنرا با آب مقطر سترون شستشو دهيد. قبل از برداشتن ١٥ ميلي ليتر نمونه ، بايستي آنرا بخوبي هم بزنيد. ارلن حاوي نمونه را روي همزن[1] با ١٥٠-١٢٠ دور در دقيقه بمدت نيم ساعت قرار دهيد و يا محتويات آنرا به يك مخلوط كن[2]

1- Shaker
2 Blender

منتقل کرده و در پوش مخلوط کن را گذاشته و با سرعت کم بمدت يك دقيقه يا با سرعت زياد بمدت ۳۰ ثانيه مخلوط كنيد. مخلوط كن بايد براي هر نمونه ترجيحاً سترون باشد و يا ظرف را قبل از استفاده براي هر يك از نمونه‌ها با آب مقطر سترون شستشو دهيد. رقت‌هاي بيشتر را مي‌توان با افزودن حدود ٥ ميلي ليتر از سوسپاسيون با رقت ۱:۱۰ به ٤٥ ميلي ليتر آب مقطر سترون، تهيه نمود براي نمونه آب چشمه معمولاً رقت ۱:۱۰ كافي است در حالي كه براي نمونه هايي كه حاوي مقدار زيادي مواد آلي مانند مواد رسوبي باشند رقت‌هاي ۱:۱۰۰ يا ۱:۱۰۰۰ تهيه كنيد. نمونه‌هاي آب‌كنار رودخانه ياآب پشت سد را به نسبت ۱:۱۰۰۰ يا ۱:۱۰۰۰۰ رقيق كنيد.

يـا د آ و ري - رقتي را كه حدود ۱۵۰-۲۰ پرگنه ايجاد مي‌كند، انتخاب كنيد.

٦-۲ تـلـقـيـح:

پنج پليت سترون براي هر رقت مورد آزمايش تهيه كرده و ۱۰ ميلي ليتر از محيط بند ٤-۱ با دماي ٤٥ درجه سلسيوس را در پليت با قطر ۹ سانتي متر بريزيد. سپس يك ميلي ليتر از نمونه رقيق شده را به آن منتقل كنيد و با حركات دوراني پليت را در جهات مختلف بچرخانيد تا كاملاً مخلوط شوند به اين محيط ۰/۰۵ ميلي ليتر محلول آنتي بيوتيك نيز اضافه كنيد و بعداً بگذاريد تا محيط جامد شود. يا اينكه به يك پليت يك ميلي ليتر از نمونه، ۰/۰۵ ميلي ليتر از محلول آنتي بيوتيك و ۱۰ ميلي ليتر از آگار ذوب شده با دماي ٤٥-٤٣ درجه سلسيوس اضافه كنيد بلافاصله محيط آگار را بگذاريد تا جامد گردد.

يـا د آ و ري - براي جلوگيري از خشك شدن محيط حين گرمخانه گذاري بهتر است مقدار بيشتري محيط در پليت ريخته شود.

٦-۳ گـرمـخـانـه گـذاري

پليت‌ها را در دماي محيط (٢٤-٢٠ درجه سلسيوس) قرار دهيد و از تابش مستقيم نور خورشيد جلوگيري نمائيد. بعد از مدت ۳ الي ۷ روز پرگنه‌ها را شمارش كنيد.

٦-٤ شـمـارش و بـررسي

شمارش قارچها مانند شمارش باكتريهاي تك سلولي نمي باشد زيرا كه يك كلني قارچي ممكن است از يك سلول، اسپور، توده سلولي (خوشه اي از اسپورها يا از يك اسپور چند سلولي)، يك ميسيليوم و يا از قطعات ميسيليوم كاذب (شامل بيش از يك سلول زنده) تشكيل شود. بنظر مي رسد كه هر كلني قارچي در محيط كشت آزمايشگاهي از يك واحد تشكيل دهنده كلني منشاء مي‌گيرد كه آن واحد تشكيل دهنده كلني ممكن است تنها يك سلول و يا بيش از آن باشد.

شمارش پرگنه‌هاي قارچ در پليت،بر پايه و اساس مقايسه كمي بوده و بررسي حداقل در مورد گونه يا جنس‌هاي قابل تشخيص حائز اهميت مي‌باشد.در تهيه پليت‌ها نمونه‌اي را بكار بريد كه حدود۶۰-۵۰ پرگنه را روي پليت ايجاد كند. اين حجم را توسط آزمون و خطا تعيين كنيد. حداقل دو نمونه از رقت‌ها را در آزمون پليت محيط جديد بيازماييد اگر چه حدود ۳۰۰ پرگنه قابل شمارش مي‌باشد ولي بايد چنين پليت‌هاي حاوي پرگنه‌هاي زياد را دور بريزيد.

محيطي كه حاوي رزبنگال مي‌باشد پرگنه‌هاي مجزا توليد كرده و اجازه رشد به ارگانيزمهاي كند رشد را مي‌دهد.

بررسي شامل شناسائي مستقيم قارچها بر اساس مشخصات پرگنه‌ها و شمارش پرگنه‌هاي خاص هر نوع قارچ است اگر شناسائي پرگنه‌ها اهميت داشته باشد و نتوان پرگنه‌هاي مجزا را شناسايي نمود بايد از سيم نازك نيكروم كه سر آن به شكل L خميده باشد استفاده كرده و هر يك از پرگنه‌هاي انتخابي را به محيط نئوپپتون گلوكز آگار بروش خطي انتقال داد. اگر ۵ پليت براي هر نمونه بكار مي‌بريد، تعداد پرگنه‌هاي موجود در يك ميلي ليتر از نمونه اصلي با استفاده از فرمول زير بدست مي‌آيد.

ضريب رقت × ميانگين تعداد پرگنه‌ها در ۵ پليت = تعداد پرگنه

براي نمونه‌هاي جامد و نيمه جامد لازم است پس از احتساب ميزان آب موجود، پرگنه‌هاي قارچ را بر حسب وزن خشك در يك گرم گزارش نماييد. تعيين ميزان آب موجود بوسيله خشك كردن دو نمونه ۱۵ ميلي ليتري از نمونه اصلي در دماي ۱۰۰ درجه سلسيوس بمدت ۱۵-۱۲ ساعت صورت مي‌گيرد اختلاف بين وزن مرطوب و وزن خشك، مقدار آب از دست رفته نمونه مي‌باشد.

۷ روش‌آزمون - كشت سطحي :

۱-۷ آماده كردن آزمونه

آماده كردن آزمونه را مانند بند ۱-٦ انجام دهيد.

۲-۷ تلقيح :

پليت هاي حاوي محيط كشت بند ٤- ۱ يا ٤-۲ يا ٤-٥ يا ٤-٦ را به مدت ۱/٥-۱ ساعت زير هود[1] بصورت در باز قرار دهيد تا رطوبت آنها گرفته شود. سپس يك ميلي ليتر از نمونه يا از رقت تهيه شده را توسط پيپت سترون به محيط انتقال داده وبا لوله هاي شيشه اي L شكل[2] سترون بطور يكنواخت روي محيط كشت پخش كنيد.

۳-۷ گرمخانه گذاري:

بعد ازتلقيح بگذاريد محيط كشت خشك شود، سپس آنها را بطور وارونه در دماي ۲۰ درجه سلسيوس و رطوبت هواي بالا (۹٥%- ۹۰%) به مدت ۷-٥ روز قرار دهيد. قارچ‌هاي كند رشد ممكن است در عرض ٦-۷ روز پرگنه ايجاد نكنند.

٤-۷ شمارش و گزارش :

از شمارشگر پرگنه استفاده كنيد و تمام پرگنه‌ها را بشماريد اگر شمارش پرگنه‌ها را بلافاصله بعد از گرمخانه‌گذاري انجام نمي‌دهيد، آنها در يخچال (٤ درجه سلسيوس) حداكثر بمدت ۲٤ ساعت قراردهيد. بر اساس اندازه پرگنه در هر پليت تا ۱٥۰ پرگنه را هم مي‌توان شمرد، اما تعداد مناسب پرگنه ۱۰۰ عدد خواهد بود. تعداد پرگنه‌ها نشان دهنده واحدهاي تشكيل دهنده پرگنه در ۱۰۰ ميلي‌ليتر از نمونه اوليه خواهد بود. در نمونه‌هاي جامد و نيمه جامد بايد بصورت واحد تشكيل دهنده پرگنه در يك گرم مرطوب يا خشك (ترجيحاً خشك) گزارش كنيد. اگر سه يا تعداد بيشتري پليت براي هر نمونه داشته باشيد، تعداد متوسط پرگنه‌ها را بدست آوريد و در ضريب رقت ضرب كنيد. اگر در هيچ كدام از پليت‌ها پرگنه رشد نكند، تعداد آنها را در رقيق‌ترين نمونه، كمتر از يك گزارش كنيد و اگر تعداد آنها

1- Laminar flow head
2-L Shaped glass rod or spreader

بیش از ۱۵۰ بود، باید بصورت بیشمار[1] گزارش کرده و در عین حال نشان دهید که تعدادپرگنه بیش از ۱۵۰ درون رقت مناسب بوده است. اگر پرگنه‌ها روي هم افتاده باشند، بصورت غیر قابل مشاهده[2] ثبت کرده و آزمایش را تکرار کنید. این بار رقت را بیشتر کرده و یا مدت کمتري در گرمخانه قرار دهید.

۸ روش آزمون - صافي غشايي

۸-۱ آماده کردن آزمونه

آماده کردن آزمونه را مانند بند ٦-۱ انجام دهید.

۸-۲ تلقیح

حجم‌هاي مناسبي از نمونه رقیق شده یا نمونه‌اي که بخوبي هم زده شده است و یا رقت مناسب نمونه را از صافي‌هاي غشايي با منافذي به قطر ۰/٤٥ میکرون یا ۰/۸ میکرون عبور دهید و تحت شرایط سترون، صافي را طوري به محیط بند ٤-٥ یا ٤-٦منتقل کنید که سطح چهارخانه دار صافي به طرف بالا قرار گیرد.

۸-۳ گرمخانه گذاري

محیط کشت را پس از تلقیح بوسیله صافي در دماي ۱۵ درجه سلسیوس بمدت ٥ روز در هواي مرطوب و یا در ۲۰ درجه سلسیوس بمدت ۳ روز یا بیشتر بسته به نوع قارچ قرار دهید.

۸-٤ شمارش و گزارش

از میکروسکوپ تشریحي[3] با بزرگنمایي ۱۰ برابر استفاده نمایید و تمام پرگنه‌هاي موجود در هر یك از پلیت‌هاي انتخاب شده را شمارش کنید. اگر مجبورید که شمارش را با تاخیر انجام دهید، پلیت‌ها را با

3- Too numerouse to count
1- Obscurd
2- Binocular dissecting microscope

قرار دادن در دماي ٤ درجه سلسيوس فقط مي‌توانيد حداكثر تا ٢٤ ساعت نگهداري كنيد. پليت‌هاي مطلوب حدود ٢٠ تا ٨٠ پرگنه در هر صافي غشايي دارند.

٩ روش آزمون - شناسايي و شمارش مخمرها

٩-١ آماده كردن آزمونه

آماده كردن آزمونه را مانند بند ٦-١ انجام دهيد.

٩-٢ غني سازي

در مورد مخمرها مرحله غني سازي قبل از تلقيح وجود دارد. به اين ترتيب كه دو ارلن ماير ٢٥٠ ميلي‌ليتري انتخاب كرده بترتيب در هر يك از آنها محيط پايه ازت مخمر حاوي ١% و نيز ٢٠% گلوكز بريزيد. به هر يك از اين محيطها يك ميلي‌ليتر از رقت مناسب نمونه اضافه كرده و به مدت ٦٤ ساعت روي همزن با دور ١٢٠ تا ١٥٠ دور در دقيقه در دماي اتاق قرار دهيد. همزن از رشد بيش از حد قارچ‌هاي رشته‌اي جلوگيري مي‌نمايد.

٩-٣ جداسازي

پس از اين مدت ارلن‌ها را از روي همزن برداشته و ٤ تا ٥ ساعت به حال خود بگذاريد. در صورتي كه سلول‌هاي مخمري در محيط وجود داشته باشند، رسوب مي‌كنند، اما باكتري‌ها و قارچهاي رشته‌اي شناور باقي مي‌مانند و يا به سطوح شيشه‌اي يا لبه‌هاي ارلن مي‌چسبند. بوسيله يك حلقه كشت از جنس نيكروم به اندازه يك حلقه پر از رسوب را برداشته و روي محيط عصاره مخمر مالت گلوكزآگار بروش خطي كشت دهيد. براي هر يك از ارلن‌ها سه پليت استفاده كنيد و در دماي اتاق و دور از نور مستقيم آفتاب به مدت ٢ تا ٣ روز نگهداري كنيد. وارونه كردن پليت‌ها ضرورتي ندارد. براي تهيه كشت خالص از پرگنه‌هاي بخوبي ايزوله شده، برداشت كرده و روي همان محيط و يا پليت‌هاي ديامالت آگار، كشت خطي بدهيد. از هر يك از پرگنه‌هاي گوناگون جدا شده تا حد امكان كشت خالص تهيه كنيد.

٩-٤ شمارش

. شمارش معني دار بعد از چنين غني‌سازي غير ممكن است. اگر فرض بر اين باشد كه بعد از غني‌سازي، يك سلول از نمونه اصلي ايجاد يك و يا بيش از يك پرگنه روي پليت بنمايد، مي‌توان گفت كه علت توليد كم مخمر ها يا انواع ويژه‌اي از مخمرها مربوط به بالاترين رقت مثبت مي‌باشد. منظور كردن ضريب اين رقت نشانگر تعداد مخمر موجود در نمونه مي‌باشد.

ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI NUMBER

_5868

Water - Detection and enumeration Of fungi - microbiological test method

1st. Revision