



جمهوری اسلامی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شماره استاندارد ایران

۷۲۲۵



آب - جستجو و شناسایی کلیفرم ها به روش وجود -
عدم وجود - 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، صاحب نظران 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 - جستجو و شناسایی کلیفرم ها

به روش وجود - عدم وجود - روش آزمون میکروبیولوژی

رئیس	سمت یا نمایندگی
مهوش ، اسکوئی (دکترای میکروب شناسی)	انستیتو پاستور ایران
اعضاء	
اصلائی ، محمد مهدی (دکترای میکروب شناسی)	انستیتو پاستور ایران
افشار ، امیر مسعود (لیسانس میکروب شناسی)	شرکت آب و فاضلاب استان اهواز
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
شقایق ، 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



عابدیان ، زینب (فوق لیسانس میکروب شناسی)	انستیتو پاستور ایران
دبیر	
زرسازی ، گیتا (لیسانس صنایع- استاندارد و کنترل کیفیت)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مقدمه

شناسایی باکتری های نشانگر یکی از بهترین راه ها برای ارزیابی کارایی روشهای تصفیه آب است . باکترهای کلیفرم به دلیل سرعت و سهولت جدا سازی و شناسایی ، شاخص میکروبی مناسبی برای تعیین کیفیت آب آشامیدنی هستند این باکتریها نباید در آب آشامیدنی تصفیه شده وجود داشته باشند . وجود باکتریهای کلیفرم در آب نشانگر فرآیند ناکافی و یا آلودگی پس از تصفیه است . یکی از روش های ساده برای شناسایی کلیفرم ها در آب روش آزمون وجود - عدم وجود کلیفرم^۱ می باشد. این روش امکان آزمون تعداد زیادی از نمونه های آب را به طور همزمان فراهم می کند

پیشگفتار

1- Presence- Absence (P-A) Coliform test .



آب - جستجو و شناسایی کلیفرم ها به روش وجود -
عدم وجود - روش آزمون میکروبیولوژی که توسط کمیسیون
های فنی مربوطه تهیه و تدوین شده و در پنجاه و سومین
جلسه کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی مورخ ۸۲/۳/۱۷
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 استانداردهای 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 , A.W.W.A , A.P.H.A Standard methods for the examination of water and waste water
. 1998 water – Detection and identification presence-Absence (P-A) coliform test.

آب - جستجو و شناسایی کلیفرم ها به روش وجود - عدم وجود - روش آزمون میکروبیولوژی

۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد تعیین روش آزمون وجود و یا عدم وجود کلیفرم ها در آب می باشد .

۲ دامنه کاربرد

این استاندارد در مورد انواع آب های آشامیدنی کاربرد دارد .

۳ مراجع الزامی

مدارك 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 :

۱-۳ استاندارد ملی ایران ۴۲۰۸ : سال ۱۳۷۶ آئین کار

نمونه برداری از آب جهت آزمونهای باکتریولوژی

۲-۳ استاندارد ملی ایران ۲۷۴۷ : سال ۱۳۸۰ آئین کار

در آزمایشگاه میکروبیولوژی

۳-۳ استاندارد ملی ایران ۳۷۵۹ : سال ۱۳۷۵ جستجو و شناسایی کلیفرم ها در آب به روش چند لوله ای

۱

۴ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات و / یا واژه ها با تعاریف زیر به کار می رود :

۱-۴ کلیفرم ها

گروهی از باکتری های هوازی و بی هوازی اختیاری ، گرم منفی ، میله ای شکل و بدون اسپور هستند که قادرند در شرایط هوازی در محیط های کشت انتخابی لاکتوزدار در دمای 35 ± 0.5 درجه سلسیوس در مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت تولید اسید و گاز کنند .

۵ اساس روش

این روش براساس تلقیح حجم معینی از نمونه آب به محیط انتخابی لاکتوز دار و گرمخانه گذاری در دمای 35 ± 0.5 درجه سلسیوس انجام می پذیرد . سپس با استفاده از محیط های کشت انتخابی و تائیدی ، وجود کلیفرم ها تائید می شود .

۶ نمونه برداری

دست کم ۵۰۰ میلی لیتر آب را (طبق استاندارد ملی ۴۲۰۸) سال ۱۳۷۶ آئین کار نمونه برداری از آب جهت آزمونهای باکتریولوژی نمونه برداری کنید .

۷ مواد لازم

۱-۷ محیط های کشت

۱-۱-۷ آبگوشت P-A^۱



مقدار	مقدار (غلظت معمولی)	ترکیبات
		(غلظت سه برابر)
۳ گرم		عصاره گوشت گوساله
		۹ گرم
۵ گرم		پپتون
		۱۵ گرم
	۷/۴۶ گرم	لاکتوز
		۲۲/۳۸ گرم
	۹/۸ گرم	تریپتون
		۲۹ / ۴۹ گرم
	۱/۳۵ گرم	دی پتاسیم هیدروژن فسفات
		۴/۰۵ گرم
	۱/۳۵ گرم	منوپتاسیم هیدروژن فسفات
		۴/۰۵ گرم
	۲/۴۶ گرم	کلرید سدیم
		۷/۳۸ گرم
	۰/۰۵ گرم	لوریل سولفات سدیم
		۰/۱۵ گرم
	۰/۰۰۸۵ گرم	بروموکروزول ارغوانی
		۰/۰۲۵۵ گرم
	۱۰۰۰ میلی لیتر	آب مقطر
		۱۰۰۰ میلی لیتر
		طرز تهیه :



ترکیبات فوق را با جوشاندن در آب مقطر حل نمائید . سپس به حجم های ۵۰ میلی لیتر در ظروف شیشه ای با گنجایش ۲۵۰ میلی لیتری ریخته ، و در اتوکلاو با دمای 1 ± 121 درجه سلسیوس به مدت ۱۲ دقیقه سترون کنید . pH نهایی محیط باید $6/8 \pm 0/2$ باشد.

۳

۲-۱-۷ آبگوشت لاکتوز - صفرا - سبز درخشان^۱ (BGLB)

ترکیبات	مقدار
پپتون	۱۰ گرم
لاکتوز	۱۰ گرم
پودر صفراي گاوي	۲۰ گرم
سبز درخشان	۱۳ میلی لیتر
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

پپتون را در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید . سپس ۲۰ گرم صفراي گاوي را که در ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر جداگانه حل نموده اید ، به آن اضافه کنید . pH این محلول باید برابر $7 \pm 0/5$ باشد.حجم محلول فوق را با آب مقطر به ۹۷۵ میلی لیتر رسانده و پس از افزودن لاکتوز به آن ، pH را برابر $7/4$ تنظیم کنید . محلول سبز درخشان را به آن افزوده و با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر برسانید . سپس در لوله های حاوي دورهام به حجم های ۵ میلی لیتری

1- Brilliant green Lactose bile broth (BGLB)

ریخته و در اتوکلاو با دمای ۱۱۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه سترون کنید .

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

۳-۱-۷ آبگوشت لوریل تریپتوز^۱ (باغلظت مضاعف)

تریپتوز	۴۰ گرم
لاکتوز	۱۰ گرم
کلرید سدیم	۱۰ گرم
دی پتاسیم هیدروژن فسفات	
۵/۵ گرم	
پتاسیم دی هیدروژن فسفات	۵/۵ گرم
لوریل سولفات سدیم	۰/۲ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

تریپتوز ، لاکتوز ، کلرید سدیم و دی پتاسیم هیدروژن فسفات را به آب مقطر اضافه کرده و حرارت دهید تا حل شوند . سپس لوریل سولفات سدیم را به آن افزوده و به آرامی تکان دهید به گونه ای که کف نکند . pH را برابر ۰/۲ ± ۶/۸ تنظیم نمایید و در حجم های ۱۰ و ۵۰ میلی لیتری در لوله های حاوی دورهام تقسیم نموده و در اتوکلاو با دمای ۱۱۵ ± ۳ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه سترون کنید.

۸ وسایل لازم

از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروب شناسی (طبق استاندارد ملی ۲۷۴۷) سال ۱۳۸۰ آئین کار در آزمایشگاه میکروب شناسی استفاده کنید .

1- Lauryl Triptose (lactose) broth

۹ روش اجرای آزمون

۱-۹ تلقیح نمونه

نمونه مورد آزمون را به مدت ۵ ثانیه بشدت تکان دهید. سپس ۱۰۰ میلی لیتر از آن را به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت آبگوشت P-A بند ۱-۱-۷ با غلظت سه برابر تلقیح نموده و پس از یکنواخت شدن ، در دمای $35 \pm 0/5$ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری نمائید .

۲-۹ بررسی نمونه

نمونه تلقیح شده بند ۱-۹ را پس از پایان زمان گرمخانه گذاری بررسی کنید . مشاهده رنگ زرد در محیط کشت آبگوشت P-A نشانگر تخمیر لاکتوز و تولید اسید و گاز همچنین حباب گاز

است. که با تکان دادن ظرف به آرامی حباب گاز و کف را می توانید در سطح آن مشاهده کنید. تولید اسید و گاز نشانگر وجود احتمالی کلیفرم ها در نمونه مورد آزمون می باشد که برای تائید آن باید آزمون تائیدی انجام پذیرد .

۳-۹ آزمون تائیدی

برای تائید وجود کلیفرم ها ، با استفاده از حلقه کشت سترون ، از کشت بند ۲-۹ که تولید اسید و گاز نموده اند ، برداشت نموده و به محیط کشت آبگوشت لاکتوز - صفرا - سبز درخشان بند

۲-۱-۷ انتقال داده و در دمای $35 \pm 0/5$ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری نمائید. مشاهده گاز و



کف در محیط فوق ، نشانگر وجود باکتری های کلیفرم در نمونه مورد آزمون می باشد .

۱۰ بیان نتایج

نتایج را بصورت " کلیفرم ها در ۱۰۰ میلی لیتر نمونه آب وجود دارد " و یا " کلیفرم ها در ۱۰۰ میلی لیتر نمونه آب وجود ندارد " بیان کنید .

۶

۱۱ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی های زیر باشد :

۱-۱۱ مشخصات کامل نمونه مانند (نوع نمونه ، تاریخ و

محل نمونه برداری ، تاریخ ارسال نمونه به آزمایشگاه)

۲-۱۱ روش آزمون طبق استاندارد ملی

.

۳-۱۱ بیان نتایج طبق بند ۱۰ این استاندارد

۴-۱۱ سایر اطلاعات که مرتبط با روش آزمون



ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI NUMBER

7225



**Water –Detection and identification presence- Absence (P-A
) of coliform - Microbiological test method**

1st. Revision