www.abpsoil.com
ابنیه پایدار سبز

جمهوری اسلامی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شمارهٔ استاندارد ایران

۷۶۱۱

کیفیت آب–مهار رشد سودوموناس پوتیدا–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، صاحبنظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی واقتصادی آگاه ومرتبط با 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 استانداردکیفیت آب–مهار رشد سودوموناس پوتیدا روش آزمون میکروبیولوژی

رئیس	**سمت یا نمایندگی**
قائمی – ناصر(دکترای بیوشیمی)	دانشگاه تهران– دانشکده علوم
اعضاء	
جهانتاب – سهیلا(فوق لیسانس میکروبیولوژی)	شرکت آب و فاضلاب استان تهران
خنافری – آنیتا(دکترای میکروبیولوژی)	دانشگاه آزاد اسلامی
عطاران – ماندانا(فوق لیسانس شیمی)	سازمان حفاظت محیط زیست
فیروزی – فیروزه(فوق لیسانس میکروبیولوژی)	عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
قاهری – محمود(فوق لیسانس شیمی)	عضو هیئت علمی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران
مختاری – فهیمدخت (فوق لیسانس ایمونولوژی)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
هاتفی ، میترا(دکترای میکروبیولوژی)	شرکت داروگر – کف
دبیر	
قبادی دانا – مریم(فوق لیسانس میکروبیولوژی)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

فهرست مندرجات

صفحه

پیشگفتار ..... الف
مقدمه ..... ب
هدف ۱
دامنه کاربرد ۱
مراجع الزامی ۱
اصطلاحات و تعاریف ۲
اساس روش ۳
مواد لازم ٤
وسایل لازم ۷
آماده سازی نمونه ها ۸
روش آزمون ۸
صحه گذاری ۱۲
محاسبه نتایج ۱۲
بیان نتایج ۱۳
گزارش آزمون ۱٤
تفسیر نتایج ۱۵
ویژگیهای روش ۱۵
پیوست الف (اطلاعاتی) ۱٦

پیشگفتار

استاندارد کیفیت آب –مهار رشد سودوموناس پوتیدا – روش آزمون میکروبیولوژی که توسط کمیسیون

های مربوط تهیه و تدوین شده و در شصتمین جلسه کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی مورخ ۸۳/۵/۵ 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 بعنوان استاندارد ملی ایران منتشر میگردد.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفتهای ملی و جهانی در زمینه صنایع و علوم و خدمات استانداردهای ملی ایران در موقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر گونه پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها ارائه شود. درهنگام تجدید نظردر کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین برای مراجعه به استاندارد ایران باید همواره از آخرین چاپ و تجدید نظر 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 ماخذی که برای تهیه این استاندارد به کار رفته به شرح زیر است.

ISO 10712: 1995, Water quality - Pseudomonas putida growth inhibition test

مقدمه

باکتری های متعلق به جنس سودوموناس در زیر گروه گاما پروتوباکتریها قرار دارند که ارگانیسم‌های کموارگانوتروف هوازی، گرم منفی، میله‌ای با تاژه قطبی بوده و تنفس را به متابولیسم تخمیری ترجیح می دهند. تعدادی از گونه های آن قادر به نیتریفیکاسیون بوده و از نیترات به عنوان پذیرنده نهایی الکترون در چرخه تولید انرژی استفاده می نمایند. این باکتری ها نقش مهمی در تجزیه ترکیبات و چرخه های کربن و نیتروژن دارند. سودوموناس پوتیدا باکتری با رشد سریع بوده و از مناطق مختلف نظیر آب، خاک آلوده قابل جداسازی می باشد. این میکروارگانیسم‌های بیماریزا نبوده وسازش متابولیکی مناسب جهت تجزیه مواد ارگانیک آلوده در شرایط هوازی در محیط می باشد.

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد تعیین روشی برای اندازه گیری اثر مهار کنندگی آبهای سطحی زیرزمینی و فاضلاب ها بر سودوموناس پوتیدا می باشد.

این روش آزمون برای سنجش مواد محلول در آب (پیوست الف) نیز مناسب می باشد.

یادآوری: این روش آزمون برای نمونه های با غلظت رنگ زیاد یا مواد نامحلول و یا مواد فرار و یا موادی که با محلول غذایی واکنش می دهد و یا موادی که در طول آزمون دستخوش تغییراتی مانند رسوب، تجزیه بیوشیمیایی و فتوشیمیایی می شوند، مناسب نمی باشد و ممکن است نتایج کاذب بدهد و یا اثر نامطلوب بر تجدیدپذیری داشته باشد.

۲ مراجع الزامی

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

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است.

۲-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۲۷۴۷ سال ۱۳۸۰: تجدید نظر اول آئین کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی .

۲-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۲۵ سال ۱۳۸۰: آئین کاربرد روشهای عمومی آزمایشهای میکروبیولوژی.

۳ اصطلاحات و تعاریف

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

۳-۱ رشد :

افزایش تعداد سلولها در طول دوره زمانی آزمون.

۳-۲ رابطه اثر غلظت :

وابستگی مهار رشد سلولها و غلظت ماده مورد آزمون.

یادآوری : این ارتباط با نموداری بر حسب مقادیر مهاری در برابر غلظتهای نمونه مشخص می شود.

۳-۳ غلظت موثر *(EC)*

غلظتی از نمونه مورد آزمون که در زمان ۱± ۱٦ ساعت باعث مهار رشد سودوموناس پوتیدا در مقایسه با نمونه های کنترل می شود. مهار رشد یا از طریق محاسبه و یا از درون یابی بدست می آید.[1]

غلظت های*EC10* و *EC50* نمونه های مورد آزمون با استفاده از رابطه اثر غلظت و مهار رشد بترتیب ۱۰ یا ۵۰ درصد مهار در مقایسه با کنترل بدست می آید .

۳-۴ کشت ذخیره

کشت باکتریایی بدست آمده از کلکسیون سویه های آزمایشگاهی که به عنوان ماده تلقیحی برای تهیه پیش کشت در روش آزمون استفاده می شود.

۳-۵ پیش کشت

کشت باکتریایی که به منظور سازگاری باکتری مورد آزمون با شرایط آزمون استفاده می‌شود و به عنوان ماده تلقیحی برای کشت آزمون کاربرد دارد. لازم است تعداد باکتریها تعداد مناسب و در فاز لگاریتمی باشند.

۳-۶ کشت آزمون : محیط کشت مورد آزمون (طبق بند ۳-۹) تلقیح شده.

۳-۷ ماده تلقیحی : سوسپانسیون باکتریایی که برای تلقیح به محلول غذایی استفاده می‌شود.

۳-۸ محلول غذایی : مواد غذایی محلول در آب که برای رشد باکتریایی مورد نیاز می‌باشد.

1-Interpolated

۳-۹ محیط کشت مورد آزمون : مخلوطی از نمونه مورد آزمون به همراه محلول مواد غذایی و آب کافی برای رقیق کردن آن (بدون ماده تلقیحی) می‌باشد.

۳-۱۰ نمونه : آبهای سطحی زیرزمینی و یا فاضلابی که آزمون می شود.

۳-۱۱ آزمونه : نمونه‌ای که بعد از تمام مراحل آماده سازی مانند همگن سازی، تنظیم *pH*، صاف کردن و سانتریفوژ کردن حاصل می‌شود.

۳-۱۲ کنترل : مخلوطی از محلول غذایی و ماده تلقیحی و آب جهت رقیق سازی (بدون نمونه مورد آزمون) می‌باشد.

۳-۱۳ واحد نفلومتری بر حسب فورمازین *(FNU)* : در این روش از واحدهای کدورت، بر حسب فورمازین استفاده می‌گردد و دانسیته نوری سوسپانسیون سلول باکتریایی درλ=٤٣٦ نانومتر اندازه گیری می‌شود.

۴ اساس روش

اثر مهار کنندگی نمونه بر رشد سودوموناس پوتیدا با اندازه‌گیری رشد سلولی به کمک نمونه‌های رقیق شده از آزمونه انجام می‌پذیرد و با اندازه‌گیری رشد سلولی تحت همان شرایط بدون افزودن آزمونه مقایسه می‌گردد.

اندازه گیری تراکم سلولی برحسب دانسیته نوری بعد از دوره زمانی ۱± ١٦ ساعت انجام می پذیرد.

غلظت هایی از آزمونه که در آن رشد سلولی در طول ۱± ١٦ ساعت به میزان ۱۰ درصد و ۵۰ درصد مهار می‌شود، اساس ارزیابی قرار می‌گیرد.

۵ مواد لازم

کلیه مواد و معرف ها باید دارای خلوص آزمایشگاهی باشند و آب مصرفی باید آب بدون یون یا آبی معادل آن از نظر خلوص باشد.

---

1 -Analytical grade

۵-۱ ارگانیسم مورد آزمون

سودوموناس پوتیدا، باکتری گرم منفی هوازی از خانواده سودوموناداسهآ ، متحرک ، میله‌ای به قطر ۱/۱ ـ ۰/۷ میکرومتر و طول ۴/۰ ـ ۲/۰ میکرومتر با تاژه قطبی می‌باشد. این باکتری در همهٔ خاک‌ها و آبهای سطحی وجود دارد. دمای بهینه رشد آن ۳۰-۲۵ درجه سلسیوس می باشد.

یادآوری : دو سویه ***MIGULA Berlin 33/2 Strain(DSM 50026)*** و ***NCIB Strain 9494*** برای این آزمون مناسب می باشندضمنا هر سویه با حساسیت مشابه نیز می‌تواند مناسب باشد.

۵-۲ هیدروکلریک اسید یک مول در لیتر

۵-۳ محلول سدیم هیدروکسید یک مول در لیتر

یادآوری: در صورت نیاز می توان از محلولهای غلیظ‌تر و رقیق‌تراسید و باز برای تنظیم *pH* استفاده نمود.

۵-۴ محلول مغذی

محلولهای ذخیره را مطابق با بندهای ۵-۴-۱ تا ۵-۴-۴ تهیه نمایید و سپس آنها را در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه سترون نمایید.

۵-۴-۱ محلول الف :

ترکیبات	مقدار
سدیم نیترات $(NaNO_3)$	۱۰ گرم
دی پتاسیم هیدروژن فسفات(K_2HPO_4)	۲/۴ گرم
پتاسیم دی هیدروژن فسفات(KH_2PO_4)	۱/۲ گرم
عصاره مخمر	۱/۵ گرم

طرز تهیه : ترکیبات فوق را در آب حل کنید و به حجم ۵۰۰ میلی لیتر برسانید.

۵-۴-۲ محلول ب :

ترکیبات	مقدار
سدیم نیترات $(NaNO_3)$	۱۰ گرم

دی پتاسیم هیدروژن فسفات(K_2HPO_4) ۲/٤ گرم

پتاسیم دی هیدروژن فسفات(KH_2PO_4) ۱/۲ گرم

طرز تهیه : ترکیبات فوق را در آب حل نموده و به حجم ۵۰۰ میلی لیتر برسانید .

۵-۴-۳ محلول پ ، محلول گلوکز :

٤۰ گرم از $D(+)$ ـ گلوکز منوهیدرات $(C_6H_{12}O_6 . H_2O)$ ویژه مصارف بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی را در آب حل نموده و به حجم ۵۰۰ میلی لیتر برسانید.

۵-۴-۴ محلول ت ، محلول منیزیم سولفات ـ آهن *III* سیترات :

ترکیبات	مقدار
منیزیم سولفات با ۷ ملکول آب $(MgSO_4 , 7H_2O)$	٤ گرم
آهن III سیترات گرانوله	۰/۰۱ گرم

طرز تهیه : ترکیبات فوق را در آب حل نموده و به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر برسانید .

یادآوری : به منظور کاهش مراحل کاری مربوط به بندهای ۵-۵ و ۸-۱ وهمچنین بند ۸-۲ می توان بترتیب محلولهای الف و پ رابا هم و محلول های ب و پ رابا هم پس از سترون سازی مخلوط نمود.

۵-۵ محیط کشت ذخیره

۵-۵-۱ محیط کشت غذایی برای کشت ذخیره (آگار شیب دار)

طرز تهیه : ۱۸ گرم آگار (با خلوص بالا برای آزمون های میکروبیولوژی) را در آب ریخته و با کمک حرارت آنرا حل کنید. ۵۰ میلی لیتر از محلول الف (طبق بند ۵-٤-۱)، ۱۲۵ میلی لیتر از محلول پ (طبق بند ۵-٤-۳)، ۱۰۰ میلی لیتر از محلول ت (طبق بند ۵-٤-٤) را به آن اضافه کنید و با آب به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر برسانید. هنگامیکه محیط به صورت مایع است، ۱۰-٦ میلی لیتر از آنرا در لوله های کشت تقسیم کنید. غلظت نهایی ترکیبات در محیط کشت ذخیره، پیش کشت و کشت آزمون در جدول شماره یک آمده است. درب لوله ها را ببندید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس سترون نمایید. لوله ها

را طوری قرار دهید تا محیط به صورت سطح شیب دار جامد شود، آنها را در دمای ٤-٢ درجه سلسیوس نگهداری کنید .

جدول شماره یک : غلظت نهایی محیط های مختلف

ترکیبات	مقداربه میلی گرم در لیتر در محیط کشت ذخیره	مقدار به میلی گرم در لیتر در پیش کشت	مقدار به میلی گرم در لیتر در کشت آزمون
سدیم نیترات $(NaNO_3)$	١٠٠٠	٥٠٠	٥٠٠
دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4)	٢٤٠	١٢٠	١٢٠
پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH_2PO_4)	١٢٠	٦٠	٦٠
عصاره مخمر	١٠٠	٥٠	-
گلوکز مونوهیدرات $(C_6H_{12}O_6.H_2O)$	١٠٠٠٠	٢٠٠٠	٢٠٠٠
منیزیم سولفات با ٧ ملکول آب $(MgSO_4 , 7H_2O)$	٤٠٠	٢٠٠	٢٠٠
فریک سیترات III	١/٥	٠/٥	٠/٥
آگار	١٨٠٠٠	-	-

٢-٥-٥ انتقال محیط کشت ذخیره

کشت های ذخیرهٔ سویه سودوموناس پوتیدای مورد آزمون را در لوله های کشت به صورت آگار شیب دار نگهداری کنید. برای حفظ سویه مورد آزمون، تجدید کشت را هر هفته یکبار انجام دهید. کشت های ذخیره تلقیح شده را به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٤± ٢٥ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری کنید و در همین دما نگهداری نمایید. تجدید کشت های مکرر از یک سویه ممکن است باعث ایجاد تغییراتی در حساسیت

ارگانیسمهای مورد آزمون شود. به همین خاطر باید کشتی جدید از سویه مورد آزمون مورد استفاده قرار گیرد.

یادآوری : پیگمانی سبز رنگ ممکن است بعد از گرمخانه گذاری به مدت ٢٤ ساعت تولید شود این یک امر طبیعی است و نشانه آلودگی نمی باشد.

۶ وسایل لازم

وسایلی که در طی مراحل آماده سازی محیط کشت یا به هنگام آزمایش در تماس با مواد مورد آزمون می‌باشند، باید از جنس شیشه و یا از مواد شیمیایی بی اثر دیگری ساخته شده باشند. تمام وسایل شیشه‌ای و درپوشهایی که در تماس با محیط های کشت هستند باید قبل از استفاده سترون شوند. در غیر اینصورت با محلولهای غذایی با هم سترون نمایید.

علاوه بر وسایلی که در استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۲۵ سال ۱۳۸۰: آئین کاربرد روشهای عمومی آزمایشهای میکروبیولوژی نوشته شده وسیلهٔ زیرمورد نیاز است:

۶-۱ طیف سنج یا کدورت سنج

مرحله رشد را در محیط کشت می‌توان با روشی متفاوت تعیین نمود. اما روش ارائه شده در این استاندارد به طور کارآمدی حساس می‌باشد، البته هر روش دیگری که بتواند ارتباط و همبستگی را با کدورت سنجی نشان دهد، قابل قبول خواهد بود.

۶-۲ انکوباتور شیکردار

۷ آماده سازی نمونه ها

نمونه ها را در حداقل زمان ممکن پس از نمونه‌برداری و آماده سازی مورد آزمون قرار دهید. اگر انجام آزمون بلافاصله بعد از نمونه‌برداری میسر نمی باشد. نمونه ها را در دمای ٤-۲ درجه سلسیوس حداکثر به مدت ۲ روز و یا در دمای ۱۸- درجه سلسیوس (بصورت منجمد) حداکثر تا ۲ هفته نگهداری کنید. از

آنجائی که سمیت نمونه ها با گذشت زمان تغییر می کند فقط در موارد استثنایی نمونه ها را نگهداری کنید. قبل از تهیه محیط کشت نمونه راکاملا مخلوط و یکنواخت کرده و *pH* نمونه را اندازه بگیرید. عموماً آزمون بدون تنظیم *pH* انجام می گیرد. اگر نشانه هایی از اثر مهاری به دلیل تنظیم نبودن *pH* مشاهده شود. در این صورت لازم است آزمون دیگری با تنظیم *pH* در۷/٤ انجام شود. در این مورد، *pH* نمونه را با اسید هیدروکلریک (طبق بند ٦-٢) یا محلول سدیم هیدروکسید (طبق بند ٦-٣) در ۰/۳± ۷/٤ تنظیم نمایید.

بهر حال در روش فوق سعی شود حداقل تغییرات در غلظت نمونه آب ایجاد شود.

در صورت لزوم، برای مثال اگر نمونه ها با بار میکروبی زیاد باشد، این نمونه ها می توانند به روش صافی غشایی سترون شوند، اما این روش ممکن است اثرات سمیت نمونه ها را تغییر دهد.

۸ روش اجرای آزمون

۸-۱ تهیه پیش کشت

۸-۱-۱ تهیه محیط پیش کشت

به ۹۰۰ میلی لیتر آب مقطر سترون، ۲۵ میلی لیتر از هر یک از محلولهای الف و پ (طبق بند ٥-٤-١ و ٦-٤-٣) و ٥٠ میلی لیتر از محلول ت (طبق بند ٥-٤-٤) اضافه کنید .

یادآوری : *pH* این محیط باید ۰/۲ ± ۷/۲ باشد.

این محیط کشت را در ظروف کشت تحت شرایط سترون تقسیم نمایید (برای مثال ۹۰ میلی لیتر به ظروفی با گنجایش ۲۵۰ میلی لیتر)

۸-۱-۲ تهیه ماده تلقیحی برای پیش کشت

ماده تلقیحی را برای پیش کشت با استفاده از کشت ذخیره (طبق بند ٥-٥-٢) که حداکثر، ۷ روزه باشد، تهیه نمایید.

با استفاده از حجم مناسبی از محیط کشت سترون آماده شده (طبق بند ۸-۱-۱)، سلولهای سودوموناس پوتیدای موجود در روی آگار شیب دار (طبق بند ٥-٥-١) را شستشو داده و سوسپانسیون سلولی تهیه نمائید و سپس با استفاده از همان محیط آن را تا میزان کدورت *FNU* ۱۰رقیق نمایید.

مثال : اگر حجم نهایی پیش کشت ۱۰۰ میلی لیتر باشد، کدورت سوسپانسیون سلولی باید تا میزان ۱۰۰ *FNU* رقیق شود، زیرا که ۱۰ میلی لیتر از این سوسپانسیون به ۹۰ میلی لیتر محیط کشت (طبق بند ۸-۱-۱) اضافه خواهد شد.

یادآوری ۱: فقط دانسیته های نوری کمتر از ۰/٤ برای کالیبراسیون *FNU* می تواند مورد استفاده قرار گیرد برای دانسیته های نوری بیشتر از۰/٤،سوسپانسیون بایدرقیق شودتا به دانسیته نوری بین ۰/۱ و ۰/٤ برسد.

یادآوری ۲ : بجای اندازه گیری های *FNU* می توان از واحدهای دیگر کدورت استفاده نمود برای مثال:

$A_{۶۱۰}$ = ۰/۰۲ (۱۰ *FNU*)[1]

$A_{۶۱۰}$ = ۰/۲ (۱۰۰ *FNU*)

$A_{۶۱۰}$ = ۰/۱ (۵۰ *FNU*)

۸-۱-۳ گرمخانه گذاری و استفاده از پیش کشت

ماده تلقیحی (طبق بند ۸-۱-۲) را به محیط کشت (طبق بند ۸-۱-۱) اضافه کنید. ظروف کشت را با درپوش سترون ببندید. پیش کشت را در همان دمایی که آزمون انجام می شود(طبق بند ۸-۳) به مدت ۰/۵ ± ۵ ساعت در حالیکه باکتری ها بصورت معلق باشند (مثلا با همزدن) گرمخانه گذاری کنید. از تجمع پیش کشت بر روی دیواره ظرف جلوگیری کنید (مثلا با همزدن) بعد از گرمخانه گذاری، سوسپانسیون باکتریایی را با محیط کشت آزمون (طبق جدول ۱) رقیق کنید تا کدورت محاسبه شده مشخصی مثلا ۵۰ *FNU* بدست آید.

یادآوری : ماده تلقیحی باید از فاز رشد لگاریتمی پیش کشت بدست آید. توجه کنید که باکتریها نباید به شکل زنجیره باشند. این مسئله را می توان با مشاهده میکروسکوپی کنترل نمود. اگر تاژه های باکتری دیده شوند، باید کشت جدیدی تهیه نمود.

۸-۲ تهیه کشت های آزمون

۱- $A_{۶۱۰}$ = جذب در ۶۱۰ نانومتر می باشد.

مراحل رقیق سازی را انتخاب کنید (برای مثال طبق جدول ۲)و با نمونه مورد آزمون (طبق بند ۳-۱۱) و آب دیونیزه یک سری رقت تهیه کنید.

جدول شماره ۲ - مثالی از یک سری آزمون

سری‌های رقت $F=۲$	آب رقیق کننده اضافه شده در مرحله **اول**(میلی لیتر)	نمونه مورد آزمون میلی لیتر	محلول ذخیره			مایع تلقیحی ۵۰FNU نانومتر ۴۳۶ = λ میلی لیتر	حجم نهایی میلی لیتر
			II میلی لیتر	*III* میلی لیتر	*IV* میلی لیتر		
کنترل	۸۰	۰	۲/۵	۲/۵	۵	۱۰	۱۰۰
۲	۳۰	۵۰	۲/۵	۲/۵	۵	۱۰	۱۰۰
٤	۵۵	۲۵	۲/۵	۲/۵	۵	۱۰	۱۰۰
۸	٦۷/۵	۱۲/۵	۲/۵	۲/۵	۵	۱۰	۱۰۰
۱٦	۷۳/۷	٦/۳	۲/۵	۲/۵	۵	۱۰	۱۰۰
۳۲	۷٦/۹	۳/۱	۲/۵	۲/۵	۵	۱۰	۱۰۰
٦٤	۷۸/۵	۱/۵	۲/۵	۲/۵	۵	۱۰	۱۰۰

حجم نهایی مورد نیاز را مطابق با ظروفی که برای آزمون کشت بکار می رود، مرتب کنید. به طور مثال حجم نهایی ۱۰۰ میلی لیتر را برای ظروف کشت ۲۵۰ میلی لیتری در نظر بگیرید. در مثال بعدی با حجم نهایی ۱۰۰ میلی لیتر کشت آزمون شامل حجم‌های مشخص بر حسب میلی لیتر خواهد بود. محلولهای ب و پ و ت و آب رقیق سازی و نمونه مورد آزمون را در ظروف کشت تقسیم نمایید. سپس ماده تلقیحی با تراکم سلولی مشخص را به آن افزوده تا کدورت ۵ FNU در کشت آزمون ایجاد کند. درب ظروف را با پنبه سترون یا درپوش آلومینیومی ببندید .

بالاترین تراکمی را که می توان استفاده نمود کشت آزمونی است که حاوی ۸۰ درصد از نمونه مورد آزمون باشد. در صورت امکان، هر مرحله رقت باید شامل سه گروه موازی [1] باشد.

[1] -Triplicate

تعداد گروههای موازی بستگی به معنی دار بودن نتایج، سطح اطمینان مورد نیاز و واریانس هر اندازه‌گیری دارد.

اگر مواد مورد آزمون رنگی و یا کدر است، باید سری رقتی بدون ماده تلقیحی تهیه شود. به این منظور ماده تلقیحی با حجم مشابهی از محیط کشت پیش کشت جایگزین می شود.

۸-۳ گرمخانه گذاری

کشت های کنترل و آزمون را در دمای ثابت ۱±۲۳ درجه سلسیوس به مدت ۱±۱۶ ساعت در تاریکی گرمخانه گذاری کنید. تغییرات دمایی در طول آزمون نباید بیشتر از یک درجه سلسیوس باشد. بوسیله هم زدن باکتریها را به حالت سوسپانسیون نگهدارید و از رسوب باکتریها به دیواره ظروف جلوگیری نمایید.

۸-۴ اندازه گیری

بعد از زمان گرمخانه گذاری، فوراً بوسیله همزدن، همگن سازی نموده و کدورت را اندازه‌گیری کنید.

یادآوری : اگر طی تکثیر سلولی تغییر رنگ ایجاد شود، نشانه انجام واکنش با نمونه مورد آزمون است، که این مسئله باید رفع شود. در این صورت، یا باید طول موج دیگری برای اندازه گیری انتخاب نموده و یا اینکه کشت مورد آزمون را صاف نمایید که می‌تواند به عنوان شاهد باشد. اگر با انتخاب طول موج دیگری اندازه گیری میسر نمی باشد، اندازه گیری کشت آزمون را مطابق با مرحله رقیق سازی بوسیله فیلتر(صاف کردن) شفاف کنید که می تواند بعنوان شاهد باشد. در زمان استفاده از اندازه‌گیری تک پرتو. عدد اندازه‌گیری شده برای شاهد باید از مقدار اندازه‌گیری شده برای نمونه کاسته شود.

۹ صحه گذاری

مواردی که باید آزمون صحه گذاری شودعبارتند از:

۹-۱ وقتی که مایع تلقیحی مورد استفاده در کنترل (۵ *FNU*) در زمان انجام آزمون با فاکتور حداقل ۶۰تکثیر شده باشد.

۹-۲ وقتی که *EC50* ماده مرجع ۳ و ۵ دی کلروفنل، بین ۱۰ تا ۳۰ میلی گرم در لیتر باشد.

یادآوری : اعمال فاکتور ۶۰ مربوط به ۵ یا ۶ مرحله تقسیم دوتایی باکتریها می‌باشد.

۱۰ محاسبه نتایج

در پایان دورهٔ آزمون مقادیر کدورت حاصل از توده زیستی تولید شده، مربوط به رقت های مجزا را گردآوری نمایید.(بعنوان مثال جدول ۳ را ملاحظه نمایید)

جدول ۳- مثالی از نتایج آزمون

مراحل رقیق سازی (f = ۲)	اندازه گیری ها FNU (۴۳۶ nm) ۱	۲	۳	میانگین FNU (۴۳۶ nm)
۱ در ۲	۲۳	۲۵	۲٤	۲٤
۱ در ٤	۵۸	٦٤	٦٤	٦۲
۱ در ۸	۱۲۸	۱۳۱	۱۳۹	۱۳۳
۱ در ۱٦	۲۹۰	۲۷۹	۲۸۲	۲۸٤
۱ در ۳۲	٤۲٦	٤۲٦	٤۰۳	٤۱۸
۱ در ٦٤	٤۵۵	٤٦۰	٤۵۰	٤۵۵
کنترل ها: FNU ٤٤۰ و FNU ٤٤۸/۸ و FNU ٤۳۹ وFNU ٤٦۰ و FNU ٤۵۵ و FNU ٤۵۰ (٤۳٦ نانومتر)				

با استفاده از فرمول زیر درصد مهار تکثیر سلولی (I) را برای هر غلظت آزمون شده بدست آورید.

$$I = \frac{B_c - B_n}{B_c - B_o} \times ۱۰۰$$

که در این فرمول:

I : مهار تکثیر سلولی است که بصورت درصد بیان شده است.

B_n : کدورت توده زیستی در پایان زمان آزمون برای n امین غلظت نمونه مورد آزمون است .

B_c : کدورت توده زیستی کنترل در پایان دوره آزمون .

B_o : کدورت اولیه توده زیستی کنترل در زمان t_o .

مقادیر مهاری محاسبه شده برای هر رقت را بر حسب ضریب رقت مربوطه رسم کنید .

مقادیر مورد انتظار *EC10* و *EC50* در محل تقاطع خطوط عمودی با محور مختصات در مقادیر۱۰ و ۵۰ درصد، قرار دارد .

یادآوری : این ارزیابی همچنین می تواند با استفاده از مدل رگرسیون مناسب توسط رایانه انجام شود.

۱۱ بیان نتایج

اثر غلظت ماده مورد آزمون را بصورت جدول یا نمودار نشان دهید.مثالی از بیان نتایج آزمون را در جدول شماره ٤ مشاهده می کنید.

جدول ۴ – مثالی از بیان نتایج بصورت جدول

ضریب رقت	درصد مهار رشد
۲	۹۵
٤	۸٦
۸	۷۰
۱٦	۳۷
۳۲	۸
٦٤	۰

۱۲ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید شامل اطلاعات زیر باشد:

۱-۱۲ ارجاع به استاندارد ملی ایران

۲-۱۲ مشخصات نمونه : منبع و تاریخ / و طول مدت زمان نمونه برداری و غیره

۳-۱۲ آماده سازی نمونه (اگر عملی باشد)شامل : جزئیات همگن سازی، تثبیت، تنظیم *pH* ، صاف کردن، سانتریفوژ کردن و غیره .

[1] -regression

۱۲-۴ ارگانیسم مورد آزمون : تیپ و شماره سویه

۱۲-۵ شرایط آزمون :

- تاریخ آزمون
- وسایل آزمون
- دمای گرمخانه گذاری
- pH در ابتدا و پایان آزمون
- غلظت ماده تلقیحی

۱۲-۶ روش اندازه گیری :

تعیین کدورت یا دانسیته نوری (بیان طول موج در اندازه گیری فتومتریک)

۱۲-۷ بیان نتایج

- گردآوری اندازه گیری های کدورت بصورت جدول (بصورت مجزا / یا میانگین) برای هر مرحله غلظت.
- نمایش مقادیر مهاری برای هر مرحله غلظت بصورت جدول یا نمودار.
- مقادیر $EC10$ و $EC50$.
- مقدار EC ماده مرجع.

۱۲-۸ هر تغییری که در روش آزمون ایجاد شود. ممکن است بر نتیجه آزمون تاثیر بگذارد بطور مثال : رشد آلوده کننده‌های میکروبی.

۱۳ فسیر نتایج

مقادیر گزارش شده ویژگیهای سم شناختی است که تحت شرایط مشخص آزمایشگاهی بدست آمده است. با وجود اینکه تاثیر زیان آور تعیین شده در این روش، تغییرات نامطلوب موجود در مخازن آب را توجیه می‌کند، نباید در تمام موارد از وجود تاثیرات در آب به نتیجه گیری مستقیم برسیم .

۱۴ شخصات روش

دریک آزمون بین آزمایشگاهی بین المللی که در سال ۱۹۸۹ در ۲۱ آزمایشگاه انجام شد، برای ۳ و ۵ دی کلروفنل با استفاده از این روش آزمون مقادیر *EC10* و *EC50* بترتیب ۱۳/۷ و ۲۱/٤ میلی گرم در لیتر تعیین شد . ضرایب انحراف از تجدید پذیری *(VCR)* به ترتیب ۳۱/۸ درصد و ۲۳ درصد بود.

پیوست الف

روش برای آزمون مواد محلول در آب

(اطلاعاتی)

جهت آزمون مواد محلول در آب بترتیب زیر عمل کنید:

محلول ذخیره‌ای از ماده شیمیایی مورد آزمون تهیه کنید.

حجم نهایی مورد نیاز را مطابق با ظروف مورد استفاده در آزمون تهیه کنید.

رقت های مناسب را انتخاب کنید.

با استفاده از محلول ذخیره ماده مورد آزمون و آب دیونیزه، مطابق با مثالی که در جدول ۲ آمده سری رقتها را آماده کنید.

غلظت های مناسب ماده مورد آزمون را برای تضمین اینکه پایین‌ترین غلظت ماده مورد آزمون هیچ اثر مهارکنندگی قابل مشاهده ای را نشان نمی دهد و بالاترین غلظت حداقل۵۰ درصد اثر مهارکنندگی را نشان دهد *(EC۵۰)* مورد آزمون قرار دهید .

اثر تراکم توده کل مواد را بصورت نمودار یا جدول نمایش دهید.

برای هر غلظت ارزش مهاری*(I)* محاسبه شده بر حسب غلظت مواد مورد آزمون را ترسیم کنید.

EC۵۰ را بصورت میلی گرم در لیتر ارزیابی کنید (با استفاده از آنالیز رگرسیون یا بصورت چشمی)

www.abpsoil.com

ابنیه پایدار سبز

گزارش آزمون باید شامل جزئیات زیر در مورد مواد مورد آزمون باشد.

- مشخصات ماده مورد آزمون:

- فرمول:

- خلوص:

- شماره بهر:

ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI NUMBER

7611

Water quality - Pseudomonas putida growth inhibition – Microbiological test method

1st. Revision