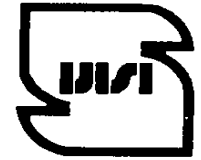




جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی
ایران

Institute of Standards and Industrial Research of Iran



استاندارد ملی
ایران

۷۹۹۳

چاپ اول

ISIRI

7993

1st.edition

کیفیت آب - ارزیابی صافی های غشایی
مورد استفاده برای آزمونهای
میکروبیولوژی

**Water quality –Evaluation of membrane
filters used for microbiological analyses**



دفتر مرکزی : تهران - ضلع جنوبی میدان ونک - صندوق

پستی : ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵

تلفن مؤسسه در کرج : ۰۲۶۱-۲۸۰۶۰۳۱-۸

تلفن مؤسسه در تهران : ۰۲۱-۸۸۷۹۴۶۱-۵

دورنگار: کرج ۰۲۶۱-۲۸۰۸۱۱۴ - تهران ۸۸۸۷۰۸۰-۸۸۸۷۱۰۳ - ۰۲۱

بخش فروش - تلفن: ۰۲۶۱-۲۸۰۷۰۴۵ - دورنگار: ۰۲۶۱-۲۸۰۷۰۴۵

پیام نگار: Standard @ isiri.or.ir

بهاء : ۱۲۵۰ رل

Headquarters :Institute Of Standards And Industrial Research Of IRAN

P.O.Box: 31585-163 Karaj – IRAN

Tel.(Karaj): 0098 (261) 2806031-8

Fax.(Karaj): 0098 (261) 2808114

Central Office : Southern corner of Vanak square , Tehran

P.O.Box: 14155-6139 Tehran - IRAN

Tel.(Tehran): 0098(21)8879461-5

Fax.(Tehran): 0098 (21) 8887080,8887103

Email: Standard @ isiri.or.ir

Price: 1250 "RLS

«بسمه تعالی»

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



ملي 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 "کیفیت آب - ارزیابی صافی های غشایی مورد استفاده برای آزمون های میکروبیولوژی"

رئیس

سمت یانماینده

قائمی، عزت ...

دانشگاه علوم پزشکی گلستان

(دکترای میکروب شناسی)

اعضا

افضلی، سمانه سادات

اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی

(فوق لیسانس میکروبیولوژی)

استان مازندران

جلالی، مریم

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

(لیسانس میکروبیولوژی)

اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو

جهانتاب، سهیلا

شرکت آب و فاضلاب شهر تهران

(فوق لیسانس میکروبیولوژی)

رحیمی فرد، ناهید

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی -

(دکترای میکروب شناسی)

کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو



زندوکیلی، فاطمه
 موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
 (فوق لیسانس علوم بهداشتی در تغذیه)
 سرگزی، مریم
 شرکت آب های شهرها و شهرکهای غرب تهران
 (لیسانس میکروبیولوژی)
 سعادت، شهلا
 وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی –
 (لیسانس تغذیه)
 اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو
 غلامی، میترا
 دانشگاه علوم پزشکی ایران
 (دکترای بهداشت محیط)
 فروش تهرانی، هما
 دانشگاه علوم پزشکی ایران-مرکز تحقیقاتی (دکترای میکروب
 شناسی)
 آموزشی علوم
 آزمایشگاهی
 فیض بخش، خاطره
 وزارت نیرو- مرکز تحقیقات نیرو (متن)
 (لیسانس سلولی و مولکولی)

دبیر

مزیدی، داود
 اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان گلستان
 (لیسانس میکروبیولوژی)

فهرست اعضاء شرکت کننده در هفتاد و دومین اجلاسیه کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی و بیولوژی مورخ ۸۴/۰۲/۲۷

رئیس

سمت یانماینده

مولوی، فاطمه

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

(فوق لیسانس علوم بهداشتی)

اعضاء

ابوعلی، رحیم

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

(فوق لیسانس صنایع غذایی)

افضلی، سمانه سادات

اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی

(فوق لیسانس میکروبیولوژی)

استان مازندران

جلالی، مریم

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی –

(لیسانس میکروبیولوژی)

اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو

جناب، احسان

دانشگاه تهران – دانشکده کشاورزی

(فوق لیسانس)

جهانتاب، سهیلا

شرکت آب و فاضلاب شهر تهران

(فوق لیسانس میکروبیولوژی)



رحیمی فرد ، ناهید

وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی –

(دکترای میکروبی شناسی)

کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو

زندوکیلی ، فاطمه

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

(فوق لیسانس علوم بهداشتی در تغذیه)

سعادت ، شهلا

وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی –

(لیسانس تغذیه)

اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو

صید ، سیده مریم

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

(دیپلم تجربی)

عباسلو ، عبدالله

کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان کرمان

(فوق لیسانس مهندسی شیمی)

غلامی ، میترا

دانشگاه علوم پزشکی ایران

(دکترای بهداشت محیط)

فلاح پیشه ، حمید رضا

انسیتوت تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور

(فوق لیسانس صنایع غذایی)

فیض بخش ، خاطره

وزارت نیرو- مرکز تحقیقات نیرو (متن)

(لیسانس سلولی و مولکولی)

قائمی ، عزت الله

دانشگاه علوم پزشکی استان گلستان

(دکترای میکروبی شناسی)

مسجدیان ، سهراب

کارشناس کالاهای دارویی

(لیسانس پزشکی)

مزیدی ، داود

اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان گلستان

(لیسانس میکروبیولوژی)

نوروزی ، سعید

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

(دکترای دامپزشکی)

دیر

پیراوی ونک ، زهرا

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

(فوق لیسانس صنایع غذایی)

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
مندرجات	فهرست
.....
.....
.....	الف
.....	پیشگفتار
.....



.....

..... ب
مقدمه

.....

..... پ
۱- هدف

.....

..... ۱
۲- دامنه کاربرد

.....

..... ۱
۳- الزامي مراجع

.....

..... ۱
۴- اصطلاحات وتعريف

.....

..... ۲
۵- روش اساس

.....

..... ۲
۶- مواد لازم

..... ۳
۷- وسايل لازم

.....

..... ۴
۸- آماده سازي نمونه براي انجام آزمو

..... ن
..... ۵



.....
..... ۶

۱۰- بیان نتایج

.....
..... ۸ ..

۱۱- گزارش

.....
..... ۱۰

پیشگفتار

استاندارد ((کیفیت آب - ارزیابی صافی های غشایی مورد استفاده برای آزمون های میکروبیولوژی) که توسط کمیسیون های مربوط تهیه و تدوین شده و در هفتاد و دومین جلسه کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی مورخ ۸۴/۰۲/۲۷ مورد تصویب قرار گرفته است ، اینک به استناد بندیک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین ومقررات موسسه استاندارد وتحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ بعنوان استاندارد ملی ایران منتشر می شود.

برای حفظ همگامی وهماهنگی باتحولات وپیشرفتهای ملی وجهانی در زمینه صنایع، علوم وخدمات، استانداردهای ملی ایران درمواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد وهرگونه پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استاندارد ارائه شود، درهنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط به قرار خواهد گرفت. بنابر این 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 ونیازهای جامعه، در حد امکان بین این استاندارد و استاندارد ملی کشورهای صنعتی وپیشرفته هماهنگی ایجاد شود. منابع و مآخذی که برای تهیه این استاندارد به کار رفته به شرح زیر است:

1- ISO 7704: 1985 Water quality- Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses

مقدمه

صافی های غشایی یکی از ابزارهای اساسی در آزمون های میکروبیولوژی آب است. تحقیقات وبررسی های مقایسه ای که در ارتباط با صافی های غشایی انجام شده است نشان می دهد که بین صافی های غشایی مختلف از نظر توانایی بازیابی باکتری ها از نمونه های آب، تفاوت معنی داری وجود دارد.

بنابراین برای حصول به نتایج ثابت و منطقی، ارزیابی صافی های غشایی و استاندارد نمودن آن بسیار مهم است.



کیفیت آب- ارزیابی صافی های غشایی مورد استفاده برای آزمون های میکروبیولوژی

۱ هدف:

هدف از تدوین این استاندارد تعیین روش ارزیابی و مقایسه صافی های غشایی مورد استفاده در شمارش میکروارگانیسم های خاص و جمعیت میکروبی مخلوط میباشد .

این روش راهنمای کلی برای آزمون های مقایسه ای بازیابی باکتری ها ، مخمرها و سایر قارچ ها بر روی صافی های غشایی به روش کشت سطحی^۱ و آمیخته^۲ میباشد .

۲ دامنه کاربرد

این استاندارد برای صافی های غشایی مورد استفاده در آزمون های میکروبیولوژی آب با اندازه روزنه^۳ بیش از ۰/۰۱ میکرومتر کاربرد دارد .

یادآوری: برای هر میکروارگانیسم خاص استفاده از محیط کشت مناسب ، گرمخانه گذاری در دما ، زمان و شرایط مناسب و همچنین آزمون شاهد کشت سطحی و یا آمیخته لازم است. نتایج بدست آمده از یک گونه یا گروهی از میکروارگانیسم ها ممکن است برای گروه های دیگر صدق نکند .

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 الزامی دارای تاریخ چاپ و/ یا تجدیدنظر، اصلاحیه ها و تجدیدنظرهای بعدی این مدارک مورد نظر نیست. معهدا بهتراست کاربران ذینفع این استاندارد، امکان کاربرد آخرین اصلاحیه ها و تجدیدنظرهای مدارک الزامی زیر را مورد بررسی قرار دهند. و 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 ۲۷۴۷ : سال ۱۳۸۰ "آیین کار

در آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی

۲-۳ استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵ : سال ۱۳۸۰ " آیین

کاربرد روشهای عمومی آزمایش های میکروبی مواد غذایی

"

۳-۳ استاندارد ملی ایران ۴۲۰۷ : سال ۱۳۷۶ " آیین کار آزمون های

باکتریولوژی آب"

۴ اصطلاح و تعریف:

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

۱-۴ صافی غشایی

صافی غشایی؛ غشایی نازک غیررشته ای است که برای جداسازی میکروارگانیسم ها از مایعات و گازها مورد استفاده قرار می گیرد. اندازه روزنه صافی غشایی بیش از ۰/۰۱ میکرومتر است

1-Surface plate

2-Pour plate

3-Pore Size



که با کاربرد پمپ خلاء یا فشار، ذرات بزرگتر از روزه روی سطح آن باقی می ماند.

۵ اساس روش

روش بر اساس مراحل زیر انجام می شود :
۱-۵ صاف کردن نمونه های آب یا سوسپانسیون های تهیه شده از کشت های خالص میکروبی با صافی غشایی مطابق استاندارد ملی ایران ۴۲۰۷ : سال ۱۳۷۶ .

۲-۵ ارزیابی کارایی هر نوع صافی غشایی با یکی از دوروش زیر:
۱-۲-۵ مقایسه شمارش کلنی های بدست آمده روی محیط کشت غیرانتخابی با استفاده از روش کشت سطحی یا آمیخته با شمارش در روش صافی غشایی روی همان محیط کشت .

۲-۲-۵ مقایسه شمارش کلنی های بدست آمده روی محیط کشت انتخابی برای میکروارگانیسم های اختصاصی با استفاده از روش بند ۱-۲-۵ .

یادآوری ۱ : برای مقایسه آماری باید حداقل نمونه آزمون شود و حداقل ۲۰۰ کلنی شمارش شود.

یادآوری ۲ : تعداد کلنی ها در روش کشت آمیخته ممکن است کمتر از روش کشت سطحی باشد.

۶ مواد لازم

۶-۱ مواد پایه

۶-۱-۱ برای بدست آوردن نتایج هماهنگ، از مواد شیمیایی با کیفیت یکسان و درجه خلوص آزمایشگاهی استفاده کنید.

۶-۱-۲ آب مورد استفاده باید آب مقطر یا آب یون زدایی شده باشد و همچنین آب باید عاری از موادی باشد که تحت شرایط آزمون از رشد میکروارگانیسم ها جلوگیری نماید.

۶-۱-۳ برای بهبود نتایج تکرارپذیری توصیه می شود که آماده سازی محلول های رقیق کننده و محیط های کشت با استفاده از ترکیبات پایه یا محیط های کشت کامل انجام شود درمورد محیط های کشت آماده مصرف و همچنین محیط های کشت کامل مطابق با دستورالعمل سازنده عمل کنید.

۶-۱-۴ محیط های کشت مورد استفاده در هر آزمون باید از یک بهر باشد و در یک زمان تهیه شود.

۶-۱-۵ pH محیط های کشت باید تعیین شود و نتایج آن با ذکر دمای اتاق ثبت شود .

چنانچه محیط های کشت آماده شده بلافاصله مورد استفاده قرار نمی گیرد باید آنها را در تاریکی در دمای 2 ± 4 درجه سلسیوس برای مدت حداکثر یک ماه نگهداری کرد تا تغییری در ترکیبات آنها ایجاد نشود.

۶-۲ محلول های رقیق کننده

محلول های رقیق کننده را مطابق استاندارد ملی ایران ۴۲۰۷ : سال ۱۳۷۶ انتخاب کنید.

یادآوری : استفاده از آب پپتونه ۰/۱ درصد به دلیل به حداقل رساندن میزان شوک وارده بر میکروارگانیسم ها مناسب تر است.

۶-۳ محیط های کشت

۶-۳-۱ محیط کشت غیرانتخابی :

از محیط تریپتون^۱ سویا آگار یا محیط کشت مشابه می توان به عنوان یک محیط کشت غیرانتخابی استفاده نمود .

۶-۳-۱-۱ محیط تریپتون سویا آگار



ترکیبات :

- تریپتیکاز پپتون^۱
- پپتون فیتون^۲
- کلریدسدیم
- آگار
- آب مقطر
- مقدار:
- ۱۵ گرم
- ۵ گرم
- ۱۵ گرم
- ۱۵ گرم
- ۱۰۰۰ میلی لیتر

روش تهیه :

مواد فوق را باجوشاندن در آب مقطر حل کنید و پس از تقسیم در ظروف مناسب در اتوکلاو بادماي 1 ± 121 درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید. pH نهایی محیط کشت باید $7/3 \pm 2$ باشد. سپس با رعایت شرایط سترونی، مقدار مشخصی از محیط کشت را مطابق روش کشت مورد استفاده درون پلیت ها ریخته به گونه ای که عمق آگار در پلیت ها، حداقل سه میلی متر باشد

۶-۳-۲ محیط کشت انتخابی:

محیط کشت مورد استفاده باید برای میکروارگانیسم های موجود در کشت خالص یا کشت مخلوط مناسب باشد. محیط کشت را مطابق با دستورالعمل سازنده آماده سازی کرده و مقدار مشخصی از آن را به پلیت ها یا لوله ها مطابق روش کشت مورد استفاده وارد کنید.

عمق آگار در پلیت ها باید حداقل ۳ میلی متر باشد.

۷ وسایل لازم :

از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروب شناسی طبق استاندارد ملی ایران ۲۷۴۷: سال ۱۳۸۰ و همچنین وسایل زیر استفاده کنید.

۷-۱ دستگاه فیلتراسیون : شامل ارلن تخلیه ، قیف و پمپ خلاء.

۷-۲ مخلوط کن گردابی^۳ برای مخلوط کردن کشت ها

۷-۳ گیره سر صاف

۷-۴ گرمخانه و یا حمام آب با قابلیت حفظ دما در درجه حرارت های مختلف

۷-۵ دستگاه شمارش کلنی با بزرگنمایی سه تا ۱۰ برابر

۷-۶ دستگاه شمارش دستی^۱ (در صورتی که دستگاه شمارش کلنی فاقد شمارش گرباشد).

۷-۷ اتوکلاو

۷-۸ آون

۷-۹ میله شیشه ای پخش کننده

۷-۱۰ پلیت سترون در اندازه های ۹۰ تا ۱۰۰ میلی متر

۷-۱۱ پی پت های سترون کالیبره شده با ظرفیت ۱/۰ ، ۱ و ۱۰ میلی لیتر

یادآوری ۱: وسایل شیشه ای مورد استفاده باید در برابر سترون سازی مکرر مقاوم باشد. تمام وسایل شیشه ای و دستگاه فیلتراسیون باید پس از شستشو با ماده شوینده مناسب با آب داغ و سپس آب مقطر آب کشی شود.

یادآوری ۲: برای آگاهی از روش سترون سازی وسایل به استاندارد ملی ایران ۲۷۴۷: سال ۱۳۸۰ مراجعه نمایید.

۸ آماده سازی نمونه برای انجام آزمون

۸-۱ نمونه آب، پساب و یا کشت خالص که برای ارزیابی صافی بکار می رود باید پیش از آزمون برای تعیین رقت مناسب مورد

1-Trypticase peptone
2- Phytone peptone
3-Vortex



بررسی قرارگیری در تمام مراحل، جهت توزیع یکسان میکروارگانیسم ها، نمونه ها باید کاملاً مخلوط شوند.

۲-۸ چنانچه کشت خالص مورد استفاده قرار می گیرد (شوک دیده^۲ و یا شوک ندیده^۳)، باید غلظت میکروارگانیسم مورد آزمون در محیط مناسب را ثابت نگه داشت تا از کاربرد ضریب رقت درست برای شمارش اطمینان حاصل شود.

۳-۸ چنانچه نمونه های بندهای ۸-۱ و ۸-۲ بلافاصله پس از آزمون در یخچال (تا حداکثر ۴۸ ساعت) نگهداری شود، می توانید از آن در آزمون اصلی نیز استفاده نمایید.

یادآوری: صافی های غشایی مورد استفاده باید سترون باشد.

۹ روش اجرای آزمون:

۹-۱ تلقیح و گرمخانه گذاری

قبل از شروع آزمون سطح پلیت های حاوی محیط کشت آگار مغذی غیرانتخابی (طبق بند ۶-۳-۱)

یا آگار اختصاصی برای آزمون میکروارگانیسم ها (طبق بند ۶-۳-۲) را در شرایط کاملاً سترون بایستی از روش های زیر خشک کنید.

الف) پلیت ها را با در بسته، بصورت وارونه در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ تا ۱۷ ساعت قرار دهید.

ب) پلیت ها را با در بسته، بصورت وارونه در دمای ۴۵ تا ۵۰ درجه سلسیوس به مدت دو تا سه ساعت قرار دهید.

پ) پلیت ها را با در باز در اتاق میکروبیولوژی با جریان هوای لایه ای^۱ به مدت یک ساعت قرار دهید رعایت شرایط سترونی در این روش ضروری است.

نمونه های آماده شده (طبق بند ۸) باید به آسانی وبدون تاخیر مورد آزمون قرار گیرد. رقت برداشتی از نمونه جهت آزمون باید در طی انجام آزمون ثابت باشد. حجم برداشتی به علت محدودیت های روش های مورد استفاده باید بین ۰/۱ تا ۰/۵ میلی لیتر باشد.

یادآوری: برای جلوگیری از خطای آزمون در آزمون صافی غشایی و آزمون کشت سطحی شاهد باید از یک نوع محیط کشت استفاده شود. چنانچه چند نوع صافی غشایی با هم مقایسه می شود، کارایی غشاها باید با استفاده از کشت های سطحی یا آمیخته شاهد به طور متناوب ارزیابی شود تا تعداد دفعات تکرار مورد نیاز در یک محیط خاص مشخص شود. تمام محیط های کشت تلقیح شده باید در دما و زمان مناسب با میکروارگانیسم مورد نظر، گرمخانه گذاری شود.

۹-۱-۱ کشت باروش صافی غشایی

۹-۱-۱-۱ با رعایت شرایط سترونی و با استفاده از گیره سترون، صافی را برداشته و روی پایه نگه دارنده صافی به گونه ای که سطح چهارخانه صافی به طرف بالا باشد، قرار دهید. در صورت لزوم، با استفاده از نگه دارنده، قیف صافی را که روی مجموعه اتصالات قرار دارد ثابت نگه دارید سپس ارلن تخلیه را به پمپ خلاء وصل کنید.

۹-۱-۱-۲ قبل از برقراری جریان خلاء ۲۰ تا ۳۰ میلی لیتر از محلول رقیق کننده سترون را به داخل قیف ریخته و سپس در شرایط سترونی همان حجم از نمونه رقیق شده یکنواخت را که برای روش کشت سطحی نیز استفاده کرده اید به رقیق کننده درون قیف اضافه کنید.



سپس دستگاه پمپ خلا را روشن کنید و تمام محتویات بالای قیف را صاف کنید.

در حالی که پمپ خلاء روشن است با ۲۰ تا ۳۰ میلی لیتر از محلول رقیق کننده سترون، قیف را دو بار شستشو دهید.

پمپ را بلافاصله پس از آخرین مرحله شستشو خاموش کنید. قیف را برداشته و با گیره سترون صافی را از روی پایه بردارید.

۱-۱-۹-۳ صافی را روی سطح محیط کشت غی—رانتخابی (طبق بند ۱-۳-۶) یا محیط کشت انتخابی (طبق بند ۲-۳-۶) به گونه ای قرار دهید که هیچگونه هوایی بین صافی و سطح آگار وجود نداشته باشد. اگرحتی یک حباب هوا مشاهده شود باید صافی را برداشته و دوباره در سطح آگار

به گونه ای قرار دهید تا حباب ایجاد نشود.

۱-۱-۹-۴ تمام پلیت ها را باید در دما و زمان مناسب برای میکروارگانیسم مورد بررسی گرمخانه گذاری نمود.

۲-۱-۹-۲ پلیت های شاهد

۱-۲-۱-۹-۱ کشت سطحی

۱-۱-۲-۱-۹-۱ به پلیت های آماده شده در شرایط سترون از رقت مناسب نمونه، حجمی بین ۱/۱۰ تا ۰/۵ میلی لیتر (طبق بند ۱-۹-۱) اضافه کنید و با استفاده از پخش کننده شیشه ای سترون (طبق بند ۷-۸) آن را در محیط پخش کنید.

پس از تلقیح نمونه در پلیت را گذاشته، صبر کنید تا نمونه کاملاً جذب محیط شود سپس پلیت ها را بصورت وارونه در دما و زمان مناسب برای میکروارگانیسم مورد نظر گرمخانه گذاری کنید.

۲-۱-۹-۲-۲ کشت آمیخته :

۱-۱-۲-۱-۹-۲ در شرایط سترون حجم و رقت (طبق بند ۱-۹-۱) را برداشته و در پلیت سترون پخش کنید. به آن مقدار مشخصی از محیط کشت انتخابی یا غیرانتخابی (بدمای ۴۵ درجه سلسیوس) استفاده شده در روش صافی غشایی را اضافه کنید سپس آن را خوب مخلوط کنید.

۱-۱-۲-۲-۲-۲ بعد از بستن آگار، پلیت را به صورت وارونه در شرایط مناسب میکروارگانیسم گرمخانه گذاری کنید

۱-۱-۲-۲-۲-۳ برای کنترل سترونی محیط کشت مصرفی از پلیت شاهد استفاده کنید.

۲-۹ تفسیر

۱-۲-۹-۱ کشت باروش صافی غشایی

با استفاده از دستگاه کلنی شمار (طبق بندهای ۷-۵ و ۷-۶) تمام کلنی های مشخص (کشت های خالص یا مخلوط) روی سطح غشا را شمارش نمایید. اگر بیش از یک رقت از یک نمونه برای آزمون استفاده شده است، رقتی را انتخاب کنید که تعداد کلنی های موجود در آن بین ۲۵ تا ۱۰۰ عدد باشد. مجموع کلنی های شمارش شده از تکرارها از رقت انتخابی باید حداقل ۲۰۰ عدد باشد.

۲-۲-۹-۲ کشت سطحی و کشت آمیخته

برای مقایسه قدرت بازیابی صافی ها از همان رقتی که برای شمارش صافی غشایی استفاده شده برای روش های سطحی و آمیخته نیز استفاده کنید. برای آگاهی بیشتر از روش شمارش کلنی ها، به استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵ : سال ۱۳۸۰ مراجعه نمایید.

یادآوری: (تجربه نشان داده است که تحت شرایط آزمون روش فوق، بهترین شمارش بدست آمده از صافی غشایی ۸۰ تا ۹۰ درصد شمارش بدست آمده توسط روش شمارش در پلیت می باشد)

۱۰ بیان نتایج

۱-۱۰ روش محاسبه قدرت بازیابی :

میانگین حسابی تعداد میکروارگانیسم های مورد نظر شمارش شده رادزه بارتکرار یا بیشتر بدست آورید و قدرت بازیابی را با استفاده از فرمول شماره ۱ محاسبه کنید.



فرمول ۱

$$R = \frac{m_m}{m_c} \times 100$$

R : قدرت بازیابی است که بصورت درصد بیان می شود.

m m : میانگین شمارش به روش صافی غشایی.

m c : میانگین شمارش به روش کشت سطحی یا کشت آمیخته.

۱-۱-۱۰ درصد بازیابی ازداده های بدست آمده را از طریق شمارش صافی غشایی و شمارش کشت روی محیط آگار دار غیرانتخابی محاسبه کنید.

۱-۱-۲ درصد بازیابی از داده های بدست آمده را از طریق شمارش صافی غشایی و شمارش کشت روی محیط آگار دار انتخابی محاسبه کنید.

۲-۱۰ تفسیرنتایج

۱-۲-۱۰ چنانچه شمارش حاصل از موارد تکرار در محدوده اطمینان ۹۵ درصد باشد،

صافی های تولید شده در بهره های مختلف توسط یک کارخانه یکسان در نظر گرفته می شود.

محدوده اطمینان ۹۵ درصد با بکاربردن فرمول های زیر بدست

می آید:

۱-۲-۱-۱ : برای شمارش حد بالایی از فرمول شماره دو استفاده کنید
فرمول شماره ۲ :

$$m + 2(\sqrt{m+1} + 1)$$

۲-۱-۲-۱۰ : برای شمارش حد پایینی از فرمول شماره سه استفاده کنید.

فرمول شماره ۳ :

$$m - 2(\sqrt{m+1} - 1)$$

m : میانگین حسابی شمارش باکتری های روی صافی های غشایی بهر کنترل می باشد.

۲-۲-۱۰ چنانچه تعداد کلنی های حاصل از بازیابی در این روش ۸۰ درصد یا بیشتر از کلنی های شمارش شده در پلیت های شاهد باشد صافی های غشایی قابل قبول در نظر گرفته می شود.

۱-۲-۳ چنانچه میانگین کلنی های بازیابی شده (

mm) روی یک صافی حداقل ۲۰ درصد بیشتر از سایر صافی ها باشد می توان آن صافی را به عنوان صافی ارجح معرفی نمود.

یادآوری : اگر از صافی برای شمارش فقط یک میکرواورگانیسم خاص استفاده شود، باید از نتایج محیط انتخابی استفاده شود.

۱۱ - گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی های زیر باشد.

۱-۱۱ مشخصات کامل نمونه

۲-۱۱ روش نمونه برداری و تاریخ آن

۳-۱۱ تاریخ انجام آزمون

۴-۱۱ بیان نتایج طبق بند ۱۰ استاندارد ملی ایران

۵-۱۱ سایر اطلاعات مربوط به روش آزمون که ممکن است روی نتایج تاثیرگذار باشد.

۶-۱۱ روش آزمایش مورداستفاده طبق استاندارد ملی ایران

. ۷-۱۱ نام ، نام خانوادگی و امضاء آزمایش کننده