



جمهوری اسلامی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

شماره استاندارد ایران

5866



آب - جستجو و شناسایی هایفو میست های آبی
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 - شناسایی هایفومیست های آبی - روش آزمون میکروبیولوژی

رئیس	سمت یا نمایندگی
زینی - فریده (دکترای قارچ شناسی پزشکی)	دانشکده بهداشت دانشگاه تهران
اعضاء	
بصیری جهرمی - شهیندخت (فوق لیسانس قارچ شناسی)	انستیتوپاستور ایران
رشید نجفی - فریده (لیسانس بیولوژی)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
جهانتاب - سهیلا (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	شرکت آب و فاضلاب استان تهران
یاسایی - شکوه (فوق لیسانس انگل شناسی)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
دبیر	
قبادی دانا - مریم (لیسانس میکروبیولوژی)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

فهرست مندرجات

صفحه

پیشگفتار.....الف

مقدمهب

۱ هدف و دامنه کاربرد.....۱

۲ مراجع الزامی۱

۳	اصطلاحات و تعاریف	۲
۴	نمونه برداری	۳
۵	مواد لازم	۳
۶	وسایل لازم	۴
۷	روش اجرای آزمون	۴

مقدمه

هایفومیست های آب شیرین ، گروه ویژه ای از قارچهای کنیدیازا هستند ، که معمولاً ر برگهای در حال فساد غوطه ور در آب و گاهی روی چوب ندانگان^۱ وجود دارند . میسلیوم آنها منشعب و واجد دیواره عرضی بوده و در میان بافت برگ ، مخصوصاً در دمبرگ ها و برگبرگهای برگ وارد می شود . معمولاً کنیدیوفورها ، به داخل آب وارد شده و کنیدی های تولید شده ، در درون آب رها می شوند . کنیدی های بالغ ممکن است ، در سطح کف آلود آب رودخانه ها ، جویبارها و استخرها یافت شوند ، کنیدیای اکثر این قارچها شفاف با دیواره نازک یا با تقسیمات چهارگانه شعاعی است ، که بصورت چهار بازوی منشعب یا سیگموتیدی (S شکل) با انحنایی در بیش از یک جهت می باشند . از ویژگی این کنیدی ها این است که اگر برای مدت زمان طولانی بحالت تعلیق در آب باشند ، جوانه نمی زنند ، ولی اگر بر روی یک سطح جامد قرار گیرند در عرض چند ساعت تولید لوله زایا خواهند نمود . در بررسی پلانکتون ها ، این اسپورها بخاطر اندازه و شکل ظاهری^۲ خود ، دارای قابلیت و اهمیت بیشتری نسبت به اسپور سایر قارچ ها می باشند . تحقیقات بوم شناختی^۳ هایفومیست های آب شیرین^۴ در مورد سوبسترا ، زیستگاه ، پراکندگی و نقش آنها در افزایش سوبستراهای برگ ، بعنوان غذای بی مهرگان آبی بوده است .

¹ Angiosperm

² Morphology

³ Echology

⁴ Fresh

موادي که معمولاً بعنوان سوپسترای این ارگانیزمها محسوب می شوند عبارت از برگهای در حال فساد و غوطه ور در آب نماندگان مانند توسکا، بلوط، فندق، نارون قرمز، افرا، شاه بلوط، شاه توت، زبان گنجشک و بید می باشند. برگهای غوطه ور در آب بازدانگان^۵ معمولاً عاری از هایفومیست ها هستند. زیستگاه طبیعی این قارچها آبهای مملو از اکسیژن مثل جویبارهای کوههای آلپ، جوی های موجود در کوهستانها و رودخانه های با جریان سریع، می باشند. در عین حال این قارچها در رودخانه های با جریان کند و آلوده، استخرهای راکد و موقت، برف ذوب شده و بالاخره در خاک هم یافت شده اند. انواع هایفومیستهای آبی در فاصله زمانی بین پاییز تا بهار از نظر تعداد و تنوع گونه افزایش می یابند، ولی کاهش در تعداد آنها از نیمه فروردین تا نیمه خرداد ماه مشاهده می شود.

پیشگفتار

استاندارد آب - جستجو و شناسایی هایفومیست ها - روش آزمون میکروبیولوژی که توسط کمیسیون های فنی مربوطه تهیه و تدوین شده و در چهل و یکمین جلسه کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی مورخ ۸۱/۱۲/۱۰ 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 تجدیدنظر 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.

⁵ Gymnosperm

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

1- *Franson , M.a.hStandard Methods for Examination of Water and Waste water .*

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

2- *Ronald M. Atlas LawRence C. Parks , Hand book of Microbiological Media second
Edition , CRC press Boca Rato NewYork London Tokyo 1997 .*

۳- دكتور حسن زارع ، يوان مباني قارچ شناسي - چاپ اول انتشارات
فرهنگ جامع ۱۳۷۰ .

آب- جستجو و شناسايي هاي فوميست هاي آبي - روش آزمون ميكروبيولوژي

۱ هدف

هدف از تدوين اين استاندارد جستجو و شناسايي
هاي فوميست هادر آب مي باشد .

۲ دامنه كاربرد

اين استاندارد براي آزمون انواع آب شيرين كاربرد دارد .

۳ مراجع الزامي

مدارك زير حاوي مقرراتي است كه در متن اين استاندارد به
آنها ارجاع داده شده است . به اين ترتيب آن مقرارت جزئي
از اين استاندارد محسوب مي شود . در مورد مراجع داراي
تاريخ چاپ و/يا تجديد نظر ، اصلاحيه ها و تجديد نظر هاي
بعدي اين مدارك مورد نظر نيست . مع هذا بهتر است کاربران
ذينفع اين استاندارد امكان كاربرد آخرين اصلاحيه ها و
تجديد نظر هاي 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 :

۱-۳ استاندارد ملی ایران ۲۷۴۷ سال ۱۳۸۰ : تجدیدنظر
اول میکروبیولوژی - آئین کار در آزمایشگاه
میکروبیولوژی

۲-۳ استاندارد ملی ایران ۲۳۲۵ سال ۱۳۸۰ : آئین کاربرد روش
های عمومی آزمایشهای میکروبیولوژی

۴ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات / واژه ها با تعاریف
زیر بکار برده می شوند .

۱-۴ هایف^۱

به ساختمانهای لوله ای شکل قار^۱ ته می شود (جمع آن هایفی^۲ می
باشد) که ممکن است با تیغه میانی و یا بدون آن باشند و توسط طویل
شدن رأس آن و یا شاخه شاخه شدن رشد نمایند .

۲-۴ میسلیوم^۳

به توده ای از هایفی گفته می شود که تشکیل دهنده پرگنه می باشند و
به انواع رویشی، هوایی و زایشی مشاهده می شوند .

۳-۴ لوله زایا

به هایف اولیه ای گفته می شود که از کنیدی یا اسپور و یا
مخمر جوانه زن ایجاد میگردد .

۴-۴ کنیدی

سلول حاصل از تکثیر غیرجنسی قارچ را گویند . این سلول به آسانی
از کنیدیوفور و یا فیالاید جدا شده و می تواند در شرایط مناسب رشد
نموده و پرگنه جدیدی را تولید کند .

۵-۴ کنیدیوفور

هایف خاصی است که سلول کنیدیازا در رأس آن سلول کنیدی زا به
اشکال مختلفی نظیر فیالاید ایجاد می شود .

۶-۴ هایفومیستها

قارچهایی هستند که هنوز تولید مثل جنسی در آنها شناسایی نشده
و به روش غیرجنسی تولید مثل می کنند . این قارچهها ممکن است واجد
رنگدانه باشند .

۵ نمونه برداری و نگهداری نمونه ها

1-Hypha

2- Hyphae

3- Mycelium

برای نمونه برداری از آبهای شیرین ، بایستی کف (حباب های ریز روی آب) یا برگهای نهاندانگان در حال فساد و غوطه ور در آب را ، در بطری های سترون جمع آوری نمایید . نمونه ها را تا زمان انجام آزمون در یخچال نگهداری کنید .

۶ مواد لازم

۱-۶ لاکتوفنل کاتن بلو^۱ یا لاکتوفنل فوشین^۲

<u>ترکیبات</u>	<u>مقدار</u>
کریستال فنل	۲۰ گرم
اسید لاکتیک	۲۰ میلی لیتر
گلیسرین	۴۰ میلی لیتر
آب مقطر	۲۰ میلی لیتر
کاتن بلو (یا فوشین اسیدی)	۵۰ میلی گرم (۰/۰۵ گرم)

طرز تهیه :

ابتدا فنل را به آب مقطر اضافه نموده و حرارت دهید تا کاملاً حل شود . سپس اسید لاکتیک و گلیسرین را به محلول فوق افزوده و بخوبی هم بزنید . آنگاه پودر کاتن بلو (یافوشین اسیدی) را در حالیکه هنوز محلول گرم است بدان اضافه کنید و هم بزنید تا کاملاً حل شود . در صورتی که کاتن بلو رسوب کند ، بایستی محلول را با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف کرده و سپس استفاده کنید .

۲-۶ مالت اکسترکت آگار ۲%

<u>ترکیبات</u>	<u>مقدار</u>
پپتون	۱ گرم
گلوکز	۲۰ گرم
عصاره جو	۲۰ گرم
آگار	۲۰ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

طرز تهیه :

مواد فوق را در آب مقطر حل کرده و بمدت ۱۵ دقیقه توسط اتوکلاو سترون نمایید .
PH محیط را در $5/5 \pm 0/2$ در ۲۵ درجه سلسیوس تنظیم نموده و در پلیت ها تقسیم نمایید .

۳-۶ لاک ناخن بی رنگ

1- Lacto phenol caton blue
2- Lacto phenol fushin

۷ وسایل لازم

۱-۷ میکروسکوپ تشریحی ^۱	۷-۱
لام	۷-۲
لامل	۷-۳
سوزن تشریح ^۲	۷-۴
میکروپیت	۷-۵

۸ روش آزمون

نمونه های برگ را در آب مقطر سترون بشویید و یک یا سه تا از برگها را در پلیت سترون حاوی آب سترون دریاچه ، رودخانه یا استخر به ارتفاع حدود یک سانتیمتر ، قرار داده و سپس در دمای اطاق نگهداری نمایید . پس از یک یا دو روز میسلیم و کنیدی ها رشد می کند ، با استفاده از میکروسکوپ تشریحی می توان کنیدی ها و کنیدیوفورها را مشاهده نمود . کنیدیوفورها و کنیدی ها در سطوح مختلف برگ مخصوصاً در دمبرگها و رگبرگها دیده می شوند .

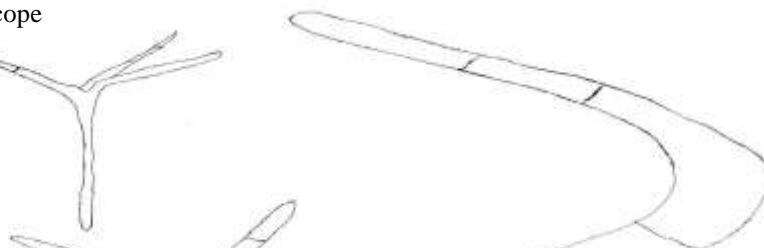
کنیدی ها پس از رها شدن ، یا بصورت سوسپانسیون در آب باقی می مانند و یا در ته ظرف ته نشین می شوند . با استفاده از میکروسکوپ تشریحی و با میکروپیت یک کنیدی واحد را بردارید و روی لام دارای یک قطره آب بگذارید و روی آن را با لامل بپوشانید و برای تشخیص زیر میکروسکوپ ببینید . برای تشکیل پرگنه ، کنیدی را با یک سوزن تشریح سترون به پلیت حاوی مالت اکسترکت آگار دو درصد منتقل نمائید و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بمدت دو تا ده روز نگهداری کنید .

در نمونه های کف (حباب) نیز با استفاده از میکروسکوپ تشریحی کنیدی را جستجو و تشخیص دهید .

توده میسلیمی حاصل از کشت ایزوله ذخیره هایفومیستهای آبی را درون پلیت حاوی آب استخر اتوکلاو شده غوطه ورنمایید معمولاً کنیدی زایی در مدت بین ۲ تا ۱۰ روز انجام خواهد گرفت .

کنیدی ها را می توانید در تمام مراحل رشد ، با قراردادن در محلول ثابت کننده لاکتوفنل که کاتن بلو یا فوشین اسیدی در آن حل شده باشد و نیز قراردادن لامل بر روی آن و پوشاندن اطراف آن با لاک ناخن بی رنگ نگهداری نمایید . برای اینکه لاک ناخن بخوبی بچسبد از ریختن بیش از اندازه محلول ثابت کننده خودداری کنید . کنیدی هایفومیستها ، شفاف با دیواره نازک و به اشکال مختلف شاخه ای یا

1- Dissecting Microscope
1- Needle



سیگموئییدی شکل در زیر میکروسکوپ مشاهده خواهد شد. (به شکل ۱ رجوع شود).

شکل ۱- ساختمان هایفومیست ها



ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN

Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI NUMBER

_5866



_ Water- Detection and identification

Of hyphomycets - Microbiological Test method

1st. Revision