دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، آزمایشگاه میکروبیولوژی

آزمایشگاه میکروبیولوژی پایه

میکروبیولوژی آب

تهیه کننده : سهیلا عباسی

میکروبیولوژی آب:

- حضور میکروبها در آبهای طبیعی ، دریا، رود، و محیط های آبی ساخته بشر و ... مربوط است. آبهای حاصل از نذورات آسمانی و آبهای فرورفته در اعماق زمین از نظر بار میکروبی کمترین تعداد را دارند.

- تعریف آب سالم: مهم ترین شاخص برای تعیین سلامت آب آشامیدنی، میزان حضور میکروب های بیماریزا در آن است. سنجش میزان سلامت آب از طریق شناسایی میکروبهای معرف انجام می گیرد و این میکروب های معرف کلیفرم و مشخصا ای کلای است. حضور ای کلای در آب در حقیقت نشان دهنده میزان آلودگی آب به مدفوع است.

چگونگی نمونه برداری از انواع آب ها:

- در نمونه برداری از آب های مختلف چند اصل مهم را باید رعایت نمود. این اصول را میتوان بقرار زیر شرح داد.
-
- ظروف مورد استفاده جهت نمونه برداری حتی الامکان درب دار و استریل باشند.
- نمونه برداری در روز انجام آزمایش ها و حداکثر بفاصله چند ساعت تا انجام آزمایش میکروبی صورت گیرد.
- سعی شود، نمونه به طور صحیح و کامل با آزمایشگاه تحویل گردد.
- در هنگام نمونه برداری از آبهای جاری (رودخانه) و ساکن (دریاچه) دقت شود که دهانه ظرف نمونه برداری در زیر سطح آب قرار گیرد تا از نفوذ عوامل سطحی آب جلوگیری شود.
- در نمونه برداری از آب لوله کشی، ابتدا قدری شیر آب را باز نموده تا آب ساکن داخل شیر جریان یابد و سپس بعد از پاک نمودن آلودگی سطحی شیر توسط شعله چراغ (چراغ الکلی) با باز نمودن دوباره شیر و درب ظرف نمونه برداری موجب پر شدن ظرف از آب مورد نظر گردید .

روشهای بررسی حضور کلیفرم ها در آب:

- 1- روش کشت: در این روش از دو نوع محیط برای کشت می توان استفاده کرد:

- (1) استفاده از محیط های انتخابی: یکی از مهم ترین ویژگی های تشخیصی حضور کلیفرم ها در هر چیزی ، نه تنها آب، قدرت تخمیر لاکتوز است. ساده ترین محیطی که لاکتوز دارد ، محیط لاکتوز براث است، محیط به رنگ قرمز است ، چون معرف فنل رد دارد و اگر باکتری لاکتوز را تخمیر کند، pH اسیدی می شود و محیط زرد رنگ می شود. ولی باید به خاطر داشته باشیم که تنها باکتری های کلیفرم محیط را زرد نمی کنند ، حتی استاف هم می تواند لاکتوز را تخمیر کند. بنابراین ، اگر محیط زرد نشد، با اطمینان می توان گفت که کلی فرم وجود ندارد و آب سالم است.

(2)استفاده از محیط های افتراقی:

- محیط EMB (ائوزین متیلن بلو): رنگ اولیه این محیط قرمز مایل به قهوه ای است. معرف موجود در آن ائوزین است. اگر لاکتوز تخمیر شود ، رنگ محیط بنفش می شود.
- محیط Endo : رنگ اولیه این محیط گل بهی است. معرف موجود در آن فوشین است. اگر لاکتوز تخمیر شود ، رنگ محیط صورتی می شود.

- این دو محیط هر دو دارای بازدارنده های رشد گرام مثبت ها هستند و هر دو دارای قند لاکتوز اند. معرف در این دو محیط به صورت ترکیب با سولفید سدیم است. تخمیر در این دو محیط شدت و سرعت بالایی دارد، ترکیبات حاصل از تخمیر قند با سولفید سدیم ترکیب می شوند و در نتیجه معرف آزاد می شود و جانشینی شیمیایی رخ می دهد. معرف اکسید می شود و بسته به شدت و سرعت تخمیر قند لاکتوز ، رنگ سبز با جلای فلزی ایجاد می گردد. علت اصلی ایجاد سبز متالیک تخمیر قند لاکتوز است. منظره سبز متالیک عمدتا در محیط EMB و در مورد ای کلای دیده می شود.

2-روش شمارش تعداد:

- از نمونه آب هم رقت تهیه می کنیم عین روش مربوط به خاک ، با این تفاوت که در اکثر مواقع مجبوریم غلیظ کنیم. مبنای قضاوت تعداد کلیفرم های موجود در 100 cc آب است.

- اگر میزان کلیفرم ها کمتر از 1 در 100cc باشد : آب بسیار سالم است.
- اگر میزان کلیفرم ها بین 1 تا 2 در 100cc باشد: آب قابل قبول است.
- اگر میزان کلیفرم ها بین 2 تا 10 در 100cc باشد: آب غیر قابل است.
- اگر میزان کلیفرم ها بیش از 10 در 100cc باشد : اصلا مورد مصرف قرار نمی گیرد.
- 3- روش رنگ آمیزی: در رنگ آمیزی گرام از آب مشکوک به دنبال کوکوباسیلهای گرام مثبت می گردیم.

مرا حل آزمایشات آب از نظر میکروبی

- 1- مرحله احتمالی : در این مرحله از محیط کشت لاکتوز براث با دو رقت ضعیف و قوی استفاده میکنیم بدین ترتیب که سه لوله لاکتوز براث قوی و شش لوله لاکتوز براث ضعیف را به ترتیب در یک جا لوله قرار می دهیم .
- در سه لوله اول که لاکتوز براث قوی است به میزان cc10 از نمونه آب را اضافه می کنیم ، در سه لوله دوم که لاکتوز براث ضعیف است به میزان cc1 و در سه لوله سوم که آن هم لاکتوز براث ضعیف است به میزان cc0.1 از نمونه آب را اضافه می کنیم .
- بعد از آن لوله ها را بهم زده در داخل انکوباتور 35.5 – 37 درجه به مدت 24 -48 ساعت قرار می دهیم.
- در این مرحله احتمال وجود باکتری ها بررسی می شوند و با واحد MPN در هر 100 میلی لیتر گزارش می شود .

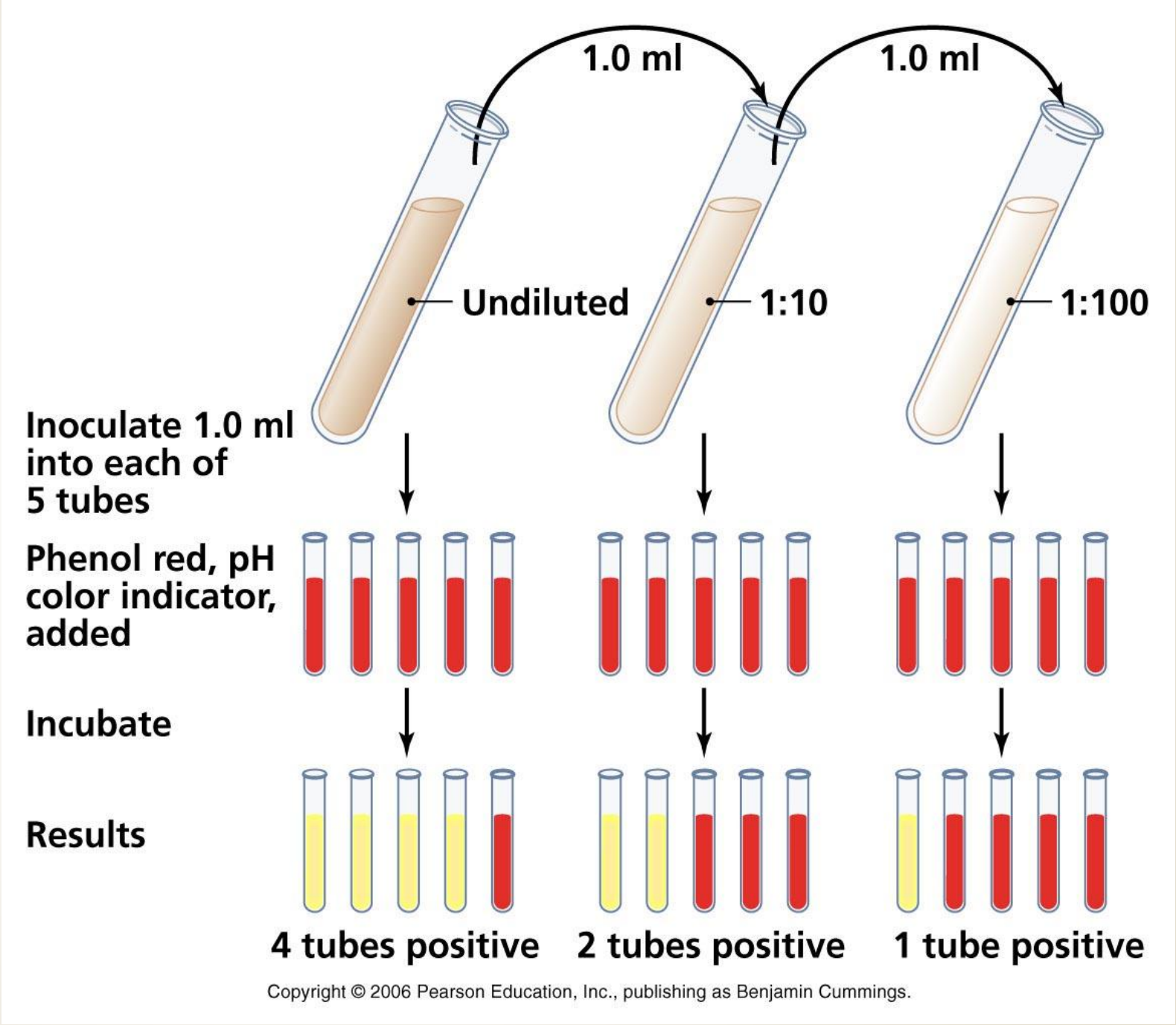
2-مرحله تاییدی :

- در این مرحله از محیط کشت برلیانت گرین و ECبراث استفاده می شود . بدین ترتیب که از نمونه های مثبت مرحله اول (لوله های گاز دار) به وسیله آنس یالوپ از محیط کشت لاکتوز براث به این دو محیط انتقال می دهیم . لوله برلیانت را در داخل انکو باتور و ECبراث را در داخل بنماری 44.5 درجه قرار می دهیم . پس از 24 ساعت نتایج را بررسی می کنیم . اگر هر دو لوله منفی بودند یعنی آب مشکلی نداشته و مرحله اول که مثبت شده بود باکتری های دیگری غیر از کلی فرم بوده اند و آب قابل شرب است ولی اگر لوله برلیانت مثبت و لوله EC منفی باشد آب دارای کلی فرم بوده و میزان MPN گزارش می شود ولی از نظر کلی فرم مدفوعی (اشرشیاکلی) منفی است و درصورتی که آب کلرینه شود قابل شرب خواهد بود . در صورتی که هر دو لوله برلیانت و EC هر دو مثبت باشد علاوه برکلیفرم آب دارای E.coli نیز خواهد بود و آب غیر قابل شرب می شود .

- نکته : برای بدست آوردن میزان MPN از جدول مربوط به تعیین میزان آن استفاده می کنند .
-
- نکته : در مناطقی که برای گندزدایی آب از کلر استفاده می شود در این مورد برای نمونه برداری از شیشه های که معمولا حاوی تیوسولفات سدیم است استفاده می شود که برای خنثی سازی کلر آزاد باقیمانده استفاده می شود.

3- آزمایش تکمیلی completed test

- این آزمایش نیز پس از مثبت بودن آزمایش تاییدی انجام می گیرد
- روش آزمایش : از کلیه لوله های مثبت در آزمایش تاییدی به صورت روش خطی بر روی
- محیط کشت E.M.Bکشت داده می شود پس از انجام کشت آن را برای مدت 2+ - 24 ساعت در اتو ۰,۵ + - 35 درجه سانتی گراد قرار داده کلو نی های رشد کرده روی این محیط شکل های 1-مشخص 2- غیر مشخص 3 - منفی تقسیم می شود
- 1- کلنی های مشخص Typical به صورت هسته دار و جلای فلزی یا بدون جلای فلزی می باشد
- 2- کلنی های غیر مشخص بدون هسته با رنگ مات که بعد از 24 ساعت صورتی رنگ می شوند
- 3- سایر کلنی های موجود منفی تلقی می شود در بیان نتایج لا مشاهده کلنی های هسته دار با جلای فلزی گزارش اشیرشیا کلی ودیدن کلنی های صورتی رنگ روی این محیط کلبیسلا گزارش می شود
- برای اطمینان بیشتر از هر جعبه پتری محتوی کشت یک یا چند کلنی مشخص انتخاب کرده در یک لوله محتوی محیط لاکتوز براث حاوی لوله دورهام کشت داده و قسمتی نیز روی محیط کشت Natural Agar پس از مدت 24 تا 48 ساعت در اتو 35 درجه سانتی گراد لوله های حاوی لاکتوز براث دارای گاز در لوله دورهام مثبت تلقی می شود واگر از محیط کشت نوترین آگار فروتی تهیه شود وآن را با رنگ گرم رنگ آمیزی نمائید وجود باسیل های گرم منفی بدون اسپور دلیل بر وجود کلی فرم ها می باشد در این صورت آزمایش تکمیلی مثبت است.


1.0 ml
1.0 ml
Undiluted
1:10
1:100
Inoculate 1.0 ml into each of 5 tubes
Phenol red, pH color indicator, added
Incubate
Results
4 tubes positive
2 tubes positive
1 tube positive
Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

$$MPN / 100\ ml = \frac{۱۰۰ \times \text{تعدادلوله های مثبت}}{\sqrt{\text{حجم نمونه (ml) در تمام لوله ها} \times \text{حجم نمونه (ml) در لوله های منفی}}}$$

جداول وفرمول هایی را که برای محاسبهmpn در ازمایش کلیفرم

جدول شماره یک

تعداد احتمالی در ۱۰۰ میلی لیتر	۲ لوله هر یک ۰/۱ میلی لیتر	۲ لوله هر یک ۱ میلی لیتر	۲ لوله هر یک ۱۰ میلی لیتر	تعداد احتمالی در ۱۰۰ میلی لیتر	تعداد لوله های واکنش مثبت: ۲ لوله هر یک ۰/۱ میلی لیتر	۲ لوله هر یک ۱ میلی لیتر	۲ لوله هر یک ۱۰ میلی لیتر
	۰/۱	۱	۱۰		۰/۱	۱	۱۰
۰	۰	۰	۴	۹۹	۰	۰	۰
۲	۰	۰	۴	۹۹	۰	۰	۰
۴	۰	۰	۴	۹۹	۰	۰	۰
۶	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۸	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۱۰	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۱۲	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۱۴	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۱۶	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۱۸	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۲۰	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۲۲	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۲۴	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۲۶	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۲۸	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۳۰	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۳۲	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۳۴	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۳۶	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۳۸	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۴۰	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۴۲	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۴۴	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۴۶	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۴۸	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۵۰	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۵۲	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۵۴	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۵۶	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۵۸	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۶۰	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۶۲	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۶۴	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۶۶	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۶۸	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۷۰	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۷۲	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۷۴	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۷۶	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۷۸	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۸۰	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۸۲	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۸۴	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۸۶	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۸۸	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۹۰	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۹۲	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۹۴	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۹۶	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۹۸	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰
۱۰۰	۰	۱	۴	۹۹	۰	۰	۰

جدول بیشترین تعداد احتمالی در ۱۰۰ میلی لیتر آب به روش سه لوله ای

- روش آزمایش میکروبی آب بطور عمده جهت شناخت وضعیت بهداشت آب صورت می گیرند. روش های متداول در آزمایشگاه تعیین کننده میزان حقیقی میکروارگانیسم های آب نیستند. دلیل عمده این امر اینستکه تمام میکروارگانیسم های موجود در آب قادر به استفاده از محیط کشت های مصرفی بعنوان منبع تولید کننده انرژی نمی باشند. همچنین بعلت تعداد کم میکروارگانیسم ها (در آبهای آشامیدنی) شناسایی و جداساختن آنها از آب بسیار مشکل بوده و از روش های معمولی آزمایشگاهی نمی توان وجود همه آنها را پی گیری نمود.

- البته فاضلآبها و آبهای آلوده را که باکتریهای مولد بیماری در آنها یافت میشوند میتوان براحتی مورد آزمایش قرار داده و میکروارگانیسم های آنرا شناسایی و از آب جدا نمود. به طور عمده سه گروه باکتری در صورت راه یافتن به اندامهای گوارشی انسان و حیوانات (از طریق آب) قادر به فعالیت و ایجاد ناراحتی می باشند.

1.کلی فرم ها و باکتریهای وابسته
2.باکتریهای مولد هاگ (اسپور) تخمیر کننده قند لاکتوز
3.استرپتوکوک های مدفوع

- از سه گروه یاد شده در بالا، کلی فرم ها از اهمیت بیشتری نسبت به سایر باکتریها در آب برخوردار بوده و بعنوان شاخص بهداشتی آب بشمار می روند. باین صورت که وجودشان در آب نشانه آلودگی و عدم وجوشان دلیل برپاک و بهداشتی بودن آب می باشد.
- علل عمده این امر اینست که کلی فرم ها ارتباطهای بسیار نزدیکی با باکتریهای بیماریزا گوارشی نظیر باکتریهای مولد مسمومیت های غذائی، اسهال خونی، تیفوئید از نظر هم خانواده بودن با این باکتریها دارند و از طرف دیگر دیده شدن کلی فرم ها در کنار استرپتوکوکهای موجود در مدفوع انسانها و حیوانات نشان دهنده همکاری و ارتباط این باکتریها با استرپتوکوک های مدفوع می باشد. از این نظر اعمالیکه به طور طبیعی و یا مصنوعی در طی ذخیره شدن آب در منابع، رسوب دادن و کلرزدن و سایر کارهائیکه جهت خالص (صاف) کردن و یا بهداشت آب صورت می گیرد، تا اندازه ای روی کلی فرم ها نیز اثر میگذارد. بهر حال به طور کلی میتوان گفت عدم وجود کلی فرم ها در آب، دلیل بر عدم وجود باکتریهای بیماریزا (پاتوژن) روده ای می باشد. کلی فرم ها به دو نوع مشخص اشرشیا) (Escher coliو اروباکتر) (Aerobacterتقسیم می شوند. کلی فرم ها باکتریهایی هستند، باسیلی شکل، هوازی و غیر هوازی اختیاری گرم منفی، مزوفیل و بدون هاگ (اسپور) که قادرند لاکتوز را تخمیر نموده و گاز تولید نمایند.

تولید گاز در روش آزمایش میکروبی آب :

- در آزمایشهای باکتریولوژی که جهت شناخت کلی فرم ها صورت می گیرد. اولین مرحله تولید گاز در محیط لاکتوزبراث است. تولید گاز تنها احتمال وجود کلی فرم را در آب تقویت میکند، زیرا باکتریهای دیگری نظیر باکتریهای هاگ دارهوازی و غیر هوازی نیز قادر به تولید گاز می باشند. حتی ممکنست در محیط لاکتوز براث کلی فرم ها قندلاکتوز را به قند ساده تری مانند گلوکز تجزیه کننده و باکتریهای دیگر با مصرف و تجزیه گلوکز، گاز تولید نمایند.
- با دانستن مکانی که نمونه آب از آنجا تهیه شده است میتوان تا حد زیادی باکتریهای آنرا شناسایی کرد. چنانکه در فاضلابها و آبهای آلود وجود کلی فرم ها کاملا قطعی است و در آبهای مصرفی، آب استخرها و آبهای کلرزده، وجود باکتریهای هاگ دار بعلت مقاومت زیاد آنها در برابر کلر محتمل تر می باشند. تولید گاز توسط باکتری را معمولا در مدت زمان حداکثر 84ساعت و در حرارت 33 ℃مورد آزمایش و بررسی قرار میدهند.

رشد هوازی روش آزمایش میکروبی آب :

- باکتریهای کلی فرم قادرند در روی محیط کشت های جامد به طور هوازی رشد نمایند. محیط کشت هایی که در این مورد از آنها استفاده می شود عبارتند از: ائوزین متیلن بلو آگار (Eosin Methylene Blue Agar)و همچنین اندوآگار (Endo Agar)

- چون خصوصیات پرگنه های مربوط به کلی فرم ها در این محیط کشت ها مشخص می باشد. چنانچه نحوه کشت به طور صحیح صورت می گیرد در صورت وجود کلی فرم در نمونه آب میتوان وجود آنرا کاملا شناسایی کرد. همچنین در محیط های یاد شده از رشد باکتریهای هاگ دار غیر هوازی جلوگیری می شود. وجود معرف های رنگی از قبیل ائوزین (Yزرد) و متیلن بلو محیط کشت را جهت رشد سایر باکتریهائی که مورد نظر نیستند نامناسب میسازد.

محیط های کشت مورد استفاده

- 1- محیط کشت لاکتوز براث LactoseBroth
- این محیط به منظور استفاده برای تشخیص کلیفرم ها در آب و فاضلاب بکار برده می شود این محیط از نظر شکل فیزیکی مایع بوده که در لوله های آزمایش تقسیم می شود .
- پودر حاضر توسط کارخانه سازنده تهیه شده و به بازار عرضه گردیده است این محیط در دو غلظت ضعیف وقوی (13گرم درلیتر و 26 گرم در لیتر)تهیه و مورد استفاده قرار می گیرد پس از تهیه محیط کشت در غلظت های یاد شده آن رادر لوله های آزمایش بزرگ دورهام دار به مقدار 10 میلی لیتر(قوی)و در لوله های متوسط بقدار 10 میلی لیتر (ضعیف) تقسیم می نمایند و پس از مسدود نمودن درب لوله هاباپنبه ودر پوش آلومینیومی آنها را در ظرف مناسب(سبد سیمی) قرار داده و در اتوکلاو در درجه حرارت 121 درجه سانتیگراد بمدت 15 دقیقه آنهارا استریل نموده پس از سرد شدن در یخچال نگهداری می شود لوله ها ئیکه به این منظور تهیه شده اند باید طوری انتخاب شوند که پس از ریختن محیط کشت درون آنه بمقدار لازم بیش از نصف لوله را اشغال ننماید

2- محیط کشت برلیان گرین بایل براث Brilliant green bile broth 2%

- این محیط کشت نیز جهت آزمایش تائیدی آب و فاضلاب استفاده می شود رنگ این محیط سبز است و به آن محیط کشت سبز درخشان نیز می گویند این پودر توسط کارخانه های سازنده تهی گردیده و در بازار موجود است برای تهیه محیط آماده مقدار 40 گرم پودحاضر را در یک لیتر آب مقطر حل کرده ودر لوله های متوسط دورهام دار بمقدار 10 میلی لیتر پس از پنبه گذاری وغلاف آلومینیومی در حرارت 121 درجه سانتی گراد بمدت 15 دقیقه آن را استریل نموده و در یخچال نگهداری می کنیم این محیط بصورت مایع باشد

3-محیط کشت E.M.B(Eosin Methylen Blue Agar)

- این محیط جهت کشت اختصاصی کلیفرمها مناسب است محیطی جامد به رنگ بنفش و کلنی های E-coli روی این محیط به رنگ سبز مایل به بنفش یا جلای فلزی ظاهر می شود که به وضوح قابل رویت است پودر آماده توسط کارخانه های سازنده تهیه شده و به بازار ارائه گردیده است طبق دستور کارخانه سازنده مقدار لازم از پودر مزبور رادر یک لیتر آب مقطر ریخته آن را بخوبی مخلوط نموده سپس آن را حرارت داده تا آگار آن بخوبی حل شود .
- آن را در اتوکلاو بمدت 15 دقیقه و حرارت 121 درجه سانتی گراد استریل کرده پس از سرد شدن تا حدود 45 درجه سانتی گراد بقدار 25 میلی لیتر در پلیت های استریل شده تقسیم نموده پس از خنک شدن و منعقد شدن محیط آن را به صورت وارونه در یخچال نگهداری نمائید از این محیط جهت کشت خطی و تشخیص ای کلی و کلبسیلا استفاده می شود

4- محیط کشت آردوآ آگار R2A.Agar

- این محیط کشت برای روشspread plate وpour plate استفاده می شود. این محیط کشت با مواد مغذی کم شمارش کلنی بیشتری را نسبت به محیط کشت با مواد مغذی زیاد نشان می دهد .
- Ph را با محلول kh2po4یاk2hpo4 جامد قبل از اضافه کردن آگار در حد ۷,۲ تنظیم می کنند. برای حل شدن آگار محیط کشت را حرارت داده و در 121 درجه ی سلسیوس به مدت 15 دقیقه سترون می کنیم .

روش های انجام آزمایشات کنترل کیفی

- شمارش احتمالی کلیفرم ها-M.P.N(most probable number)
- اندیس M.P.Nبا استفاده از روش چند لوله ای : گروه کلیفرمها باکتریهای هوازی و بیهوازی اختیاری- گرم منفی- بدون اسپور و میله ای شکل هستند که قادرند لاکتوز را در فاصله 48 ساعت در حرارت 5/+ - 35 درجه سانتی گراد تخمیر نموده و ایجاد گاز نمایند. آزمایش کلی فرم ها را به دو روش لوله های تخمیری شامل آزمایش های احتمالی – تائیدی- تکمیلی انجام داد و یا با روش ممبران فیلتر که در این صورت کلی باکتری های هوازی و بیهوازی اختیاری گرم منفی بدون اسپور – میله ای شکل که قادرند کلنی های تیره رنگ در فاصله 24 ساعت روی محیط کشت Endo Agarکه لاکتوز اضافه شده تولید نماید.
-

آزمایش استاندارد M.P.N

- 1- تست احتمالی Persumptive.test
- محیط کشت مورد استفاده لاکتوز براث می باشدکه پودر حاضر بصورت تجارتی در بازار وجود دارد آن را برابر دستورالعمل کارخانه سازنده تهیه نموده در لوله های آزمایش تقسیم کرده و در هر لوله یک لوله دورهام بصورت وارونه داخل آن قرار می دهیم و آن را استریل کرده و در یخچال نگهداری می کنند.
- روش آزمایش: انجام آزمایش با روش 9 لوله ای می باشد.
- ابتدا سه لوله از محیط های کشت لاکتوز براث قوی(gr/lit/26) که حاوی 10 میلی لیتر محیط کشت لاکتوزبراث در سمت چپ جا لوله آزمایش قرار می گیرد پس از آن شش لوله دیگر از محیط کشت لاکتوز براث ضعیف (gr/lit/13) هر لوله محتوی 10 میلی لیتر محیط کشت در کنار آنها قرار دارده و از نمونه مورد آزمایش که به صورت استریل تهیه شده و آن را به خوبی مخلوط نموده ایم و به صورت یکنواخت در آمده است با پیپت استریل به ترتیب از چپ به راست در هر یک از سه لوله اول 10 میلی لیتر نمونه اضافه کرده و به هر یک از سه لوله بعدی یک میلی لیتر و به هر یک از سه لوله آخر ۰,۱ میلی لیتر نمونه مورد آزمایش اضافه کرده کلیه این عملیات باید در شرایط استریل و با دقت انجام شود که از آلودگی های ثانوی مبرا باشد. لوله ها کمی به آرامی حرکت داده تا نمونه و محیط مخلوط شود در لوله های دورهام نباید هیچگونه گاز یا حبابی از هوا وجود داشته باشد سپس آن را در اتو ۰,۵+ - 35 درجه سانتیگراد به مدت 24 ساعت قرار می دهیم

- در صورتیکه در تمام لوله های دورهام گاز تولید شده باشد آن را مثبت تلقی کرده و اگر تعدادی یا همه آنها فاقد گاز بودند آن را برای مدت 24 ساعت دیگر در اتو باقی می گذاریم پس از انقضا مدت مجدداً لوله ها را بازدید کرده و موارد مثبت یا منفی را یادداشت می نمایند وجود گاز پس از 48 ساعت دلیل بر مثبت بودن آزمایش است و اگر در هیچیک گازی مشاهده نشد آزمایش احتمالی منفی است در مورد تخمین تعداد کلیفرم در صورت مثبت بودن برای 100 میلی لیتر نمونه آب به جدول مربوطه مراجعه نموده و تعداد احتمالی کلیفرم را تعیین می نمائیم باید توجه داشت زمانی آزمایش مثبت از اطمینان بیشتر برخوردار است که در اکثر لوله ها گاز تولید شده باشد.
- نحوه گزارش: پس از استخراج عدد m.p.n از جدول مراتب عیناً گزارش می گردد. بطور مثال اندیس p.n .m در نمونه مثلاً A برابر است با 11 که معنی و مفهوم آن این است که محتمل ترین تعداد در 100 میلی متر نمونه 11 باکتری می باشد. چنانچه جدول در اختیار نداشته باشیم و یا شمارش مثبت ها با جدول مطابقت نکند (در جدول نگنجد) می توان از این رابطه مقدار M.P.N را محاسبه نمود:
- تعداد لوله های مثبت ضربدر 100 تقسیم بر رادیکال ضرب مجموع میلی لیتر نمونه در لوله های منفی و مجموع میلی لیتر نمونه در تمامی لوله ها
- 2- روش آزمایش تاییدی : در این روش از محیط کشت Brelliantgreen BileBroth استفاده می شود این محیط را نیز طبق دستور کارخانه سازنده در لوله های آزمایش حاوی دورهام و محیط کشت مزبور که قبلاً تهیه و استریل گردیده استفاده می شود . انجام آزمایش تاییدی منوط به مثبت بودن آزمایش M.P.N است که در مقابل هر لوله مثبت لاکتوز براث حاوی گاز در لوله دورهام آن یک لوله برلیان گرین در مقابل آن قرار داده و در شرایط استریل و با دقت یک تا دو قطره از محیط لاکتوز براث مثبت به محیط کشت برلیان گرین بیل براث اضافه نموده آن را در دمای ۰.۵ +-35 به مدت 48 ساعت در انکو باتور قرار داده در صورت ایجاد گاز در لوله های دور هام محیط کشت برلیان گرین آزمایش مثبت تلقی شده یعنی مراحل قبلی تا ئید می گردد

آزمایش HPC (شمارش میکرو ارگانیسم های هترو تروف)

- شمارش میکرو ارگانیسم ها ی هتروتروف که پیش از این تحت عنوان شمارش پلیت استاندارد شناخته می شد – روشی است که توسط آن تعداد باکتری های هتروتروف زنده در آب اندازه گیری شده و جزء تغییرات کیفی به هنگام تصفیه و توزیع آب و یا کیفیت آب استخرهای شنا بررسی می گردد . کلنی های مورد مطالعه با این روش می توانند به صورت دوتایی – زنجیره ای- خوشه ای و یا منفرد تشکیل شوندکه همه انواع آن تحت عنوان واحد های تشکیل دهنده کلنی (CFU) نامیده می شوند .شمارش نهایی به مقدار موثر انتشار کلنی بستگی دارد از این رو روش کار و محیط کشت به گونه ای باید انتخاب شود که بتواند بیشترین تعداد کلنی را در مدت معینی از گرماگذاری تولید کند در حال حاض سه روش و 4 محیط کشت وجود دارد که بیان می گردد:
- روش های 1- پور پلیت 2- کشت سطحی یا اسپرید پلیت 3- صافی غشایی یا ممبران فیلتر
- محیط های کشت : Plate count agar-1 2-m HPC Agar 3-R2A Agar 4- NWRI (Agar(HPCA

- روش پورپلیت : مقدار۰,۱ تا 1 میلی لیتر از نمونه یا نمونه ای رقیق شده که به وسیله ی پیپت به پلیت سترون اضافه و سپس محیط کشت آگار مذاب را می افزاییم و پس از مخلوط شدن باید سرد و منجمدگردد سپس گرماگذاری شده و شمارش کلنی انجام می گردد.
- روش کشت سطحی : مقدار ۰,۱ یا۰,۵میلی لیتر از نمونه یا ۰,۱ یا ۰,۵ میلی لیتر از رقت مناسب نمونه به محیط کشت حاوی آگار جامد شده موجود در پلیت اضافه می شود . نمونه ی تلقیح شده بر روی سطح محیط کشت را با یک میله شیشه ای سترون به صورت یکنواخت پخش می گردد.در این روش همه کلنی ها بر روی سطح محیط کشت به وجود آمده و مانع از نفوذ کلنی ها به داخل آگار مذاب می شود . پس از گرماگذاری در دما زمان مناسب – کلنی های باکتری ها را بر روی سطح آگار شمارش می نمایند
- روش صافی غشایی : این روش در مورد نمونه های آب با حجم زیاد و کدورت کم و معمولاً برای آب هایی با احتمال شمارش کلنی (کمتر از 1 -10 Cfu/ml) به کار می رود این روش شوک گرمائی ایجاد نمی کند و هزینه های آن برای تهیه صافی های غشایی بیشتر از دو روش دیگر برشمرده می شود
-

روش کشت سطحی (Spread Plate):

- 1- پلیت ها را به ترتیب چیده و علامت گذاری می نمائیم .پلیت شاهد – دو سری پلیت برای هر نمونه مورد آزمایش و نمونه کنترل مثبت برای یک سری از نمونه ها تهیه می کنیم. برای کنترل شرایط سترون از ۰,۱ میلی لیتر آب رقیق سازی سترون استفاده می گردد.این کار برای اطمینان از سترون بودن پیپت – آگار ورقیق سازی انجام می گیرد
- 2- نمونه ها را رقیق سازی می نمائیم
- 3- براساس نمونه ها و رقت ها پلیت ها را مرتب می نمائیم
- 4- نمونه هاو رقت ها را قبل از اینکه با استفاده از پیپت به داخل پلیت منتقل کنیم بایستی به شدت تکان داد
- 5- در حالی که پلیت را می چرخانید نمونه یا حجم رقیق شده (۰,۱ یا۰,۵ میلی لیتر رابا استفاده از پیپت روی سطح محیط آگار جامد می ر یزیم

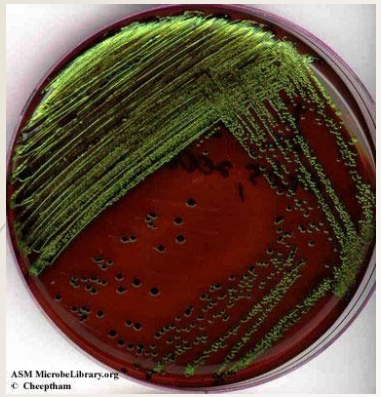
ادامه:

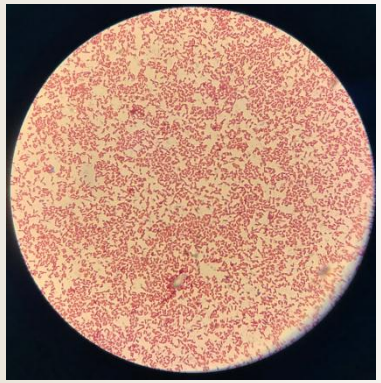
- 6- نمونه تلقیح شده را روی سطح محیط کشت با استفاده از میله شیشه ای سترون به طور یکنواخت پخش کنید این کار با ثابت نگه داشتن میله شیشه ای بر روی سطح آگار و حرکت دادن پلیت و یا با حرکت دادن میله شیشه ای بر روی سطح محیط کشت انجام می شود در این روش همه کلنی ها بر روی سطح محیط کشت شکل می گیرند
- 7- قبل از گرماگذاری اجازه می دهیم تا نمونه تلقیح شده بطور کامل در محیط کشت جذب شود
- 8- وقتی سطح محیط کشت آگار خشک شد درب پلیت ها را بسته آنها را بطور وارونه برای انجام آزمایش های اختصاصی به مدت 48 ساعت در حرارت 35 درجه سلسیوس قرار می دهیم پس از گرماگذاری در دما و مدت زمان مناسب کلنی های مجزا بر روی سطح محیط کشت پدیدار می شوند

محاسبه و گزارش نتیجه ی آزمایش:

- برای محاسبه ی شمارش پلیت – کل کلنی های شمارش شده و یا میانگین آن ها(در موردپلیت های دوتائی از یک ضریب رقت یکسان) در هر پلیت در عکس ضریب رقت ضرب می شود. بهتر است ابتدا تا دو رقم معنی دار (دو رقم سمت چپ) گرد شده سپس بصورت Cfu/ml گزارش شود.

نتیجه





- نمونه آب ۱ تست شد.
- لوله BGLBکدر و دورهام داری حباب گاز.
- آگار EMBدارای کلنی هایی با جلای سبز فلزی.
- در لام نمونه کوکوباسیل گرم – مشاهده شد.
- تمامی شواهد وجود E.Coliدر نمونه آب را تایید می کند.
- آب آلوده به کلی فرم ها است. پس غیرقابل شرب است.

با تشکر از حسن توجه شما