ریاست جمهوری
سازمان ملی استاندارد ایران

جزوه دوره کارآموزی

میکروبیولوژی آب

شماره مدرک : ۶۲۲/۱۵/ج
تاریخ تصویب : ۱۳۹۸

تاریخ تجدید نظر:

شماره تجدید نظر:

این جزوه آموزشی صرفا برای اهداف آموزشی سازمان ملی استاندارد ایران تهیه شده است و تکثیر و انتشار آن بدون اجازه سازمان ملی استاندارد ایران غیر مجاز می باشد

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استانداردایران به موجب بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفهٔ تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند درکمیته ملی طرح، بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد(ISO)[۱]،کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)[۲] و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی(OIML)[۳] است و به عنوان تنها رابط[۴] کمیسیون کدکس غذایی(CAC)[۵] در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهایملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت میکند. ترویج دستگاه بین المللی یکاها، واسنجی و سایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

۱- International Organization for Standardization

۲- International Electrotechnical Commission

۳- International Organization for Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)

۴-Contact point

۵- Codex Alimentarius Commission

پیشگفتار

یکی از مهمترین وظایف سازمان ملی استاندارد ایران، آموزش‌های اصولی و مدون در زمینه محصولات (کالا / خدمات) مشمول استاندارد اجباری از طریق برگزاری دوره های آموزشی می باشد. بخشی از این آموزش‌ها شامل کارآموزی مدیران کنترل کیفیت و کارشناسان آزمایشگاه‌های همکار سازمان می باشد که برگزاری این دوره ها از طریق استان‌ها، آزمایشگاه‌های همکار و پژوهشگاه استاندارد انجام می‌شود. برای ایجاد وحدت رویه و هماهنگی در نحوه برگزاری این دوره ها در مراکز مختلف به منظور ارتقاء کیفیت آموزش مخاطبین مورد نظر، دفتر آموزش و ترویج استاندارد با همکاری پژوهشگاه استاندارد، در راستای استاندارد سازی فرآیند کارآموزی، اقدام به تدوین برنامه مدونی برای انجام فرآیند کارآموزی در زمینه محصولات مشمول استاندارد اجباری نموده است.

در این راستا، جزوه حاضر جهت یک پارچه نمودن فرآیند کارآموزی و به منظور یکسان سازی محتوای آموزشی دوره‌های کارآموزی در کل کشور تهیه و در اختیار کارآموزان قرار داده شده است.

از مدرسین گرامی و فراگیران محترم تقاضا می گردد، در صورت وجود نقطه نظرات و پیشنهادات در جهت ارتقاء کیفیت آموزشی مربوطه با شماره تلفن ۸۸۸۷۹۴۶۹-۰۲۱ تماس حاصل نموده و یا از طریق پست الکترونیکی isiri.amozesh.qc@gmail.com و آدرس تهران، ضلع جنوب غربی میدان ونک شماره ۲۵۹۲ صندوق پستی ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ اقدام فرمایید. از بذل عنایتی که می فرمایید سپاسگزاریم.

محتوای دوره کارآموزی میکروبیولوژی آب

عنوان دوره کارآموزی:
میکروبیولوژی آب

گروه مخاطب:
کارشناسان ادارات کل استاندارد استان‌ها، مدیران کنترل کیفیت واحدهای تولیدی و کارشناسان آزمایشگاه‌های همکار

هدف از برگزاری دوره کارآموزی:
هدف از برگزاری این دوره کارآموزی آشنایی با آزمون‌های میکروبیولوژی انواع آب بر اساس استاندارد ملی ایران شمارهٔ های۱۰۱۱، ۴۴۰۳ و ۶۲۶۷ می‌باشد و موارد زیر را در بر می‌گیرد:

۱- اطلاع رسانی روش‌های بهینه و جدید آزمایشگاهی
۲- یکسان‌سازی رویه آزمایشگاه میکروبیولوژی آب
۳- اطمینان از عمل‌کرد صحیح آزمایشگاه‌ها و اعتماد به‌نتایج حاصله از آزمون در آزمایشگاه‌ها
۴- ارتقا سطح آگاهی و ایجاد مهارت در زمینه انجام آزمون‌های میکروبیولوژی آب
۵- آشنایی با الزامات فنی آزمایشگاه میکروبیولوژی بر اساس استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹

توانایی های کارآموزان پس از طی دوره:
- روش تهیه و سترون‌سازی محیط کشت‌های مورد نیاز
- روش آماده‌سازی و سترون‌سازی وسایل مورد نیاز
- -روش آلودگی زدایی مواد مصرفی و وسایل
- نحوه استفاده صحیح از تجهیزات مورد نیاز در آزمایشگاه
- روش به‌کارگیری از استانداردهای مرتبط
-روش اجرای آزمون طبق استاندارد
- شناسایی و تعیین هویت باکتری‌ها

پیش نیاز:
ندارد.

رئوس مطالب آموزشی :

ردیف	رئوس مطالب	محتوای آموزشی	مدت آموزش (ساعت)		اجراکننده		منبع/ استانداردها
			تئوری	عملی	مدرس	کارآموز	
۱	آشنایی با روش کشت و گرمخانه‌گذاری و بررسی کشت‌های انجام شده	آشنایی با وسایل مورد نیاز آشنایی با اصول آزمایشگاهی آشنایی با قسمت‌های مختلف آزمایشگاه میکروبیولوژی	۱		*		جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹
۲	آشنایی با روش کشت و گرمخانه‌گذاری و بررسی کشت‌های انجام شده	روش تهیه و اتوکلاو کردن محیط کشت‌ها	۰/۵	۰/۵	*	*	استانداردهای ملی ایران ۱۰۱۱، ۴۴۰۳ ، ۶۲۶۷ و ۹۸۹۹
۳	نحوه تفسیر، بررسی نتایج و گزارش‌دهی	روش آماده‌سازی و سترون‌سازی وسایل مورد نیاز	۰/۵	۰/۵	*	*	استاندارد ملی ایران ۹۸۹۹
۴	آشنایی با استاندارد روش آزمون	هدف و دامنه کاربرد، مواد و دستگاه‌های مورد نیاز جهت انجام آزمون	۱		*		جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۱۰۱۱، ۴۴۰۳ و ۶۲۶۷
۵	آشنایی با سیستم فیلتراسیون	آشنایی با مجموعه فیلتراسیون جهت صاف سازی نمونه آب	۰/۵		*		جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۱۰۱۱، ۴۴۰۳ و ۶۲۶۷
۶	روش آماده‌سازی نمونه در آزمایشگاه	آشنایی با انواع فیلترهای غشایی و استفاده از تجهیزات مربوط به فیلتراسیون نمونه	۰/۵	۰/۵	*	*	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۱۰۱۱، ۴۴۰۳ و ۶۲۶۷
۷	روش شمارش میکروارگانیسم‌های قابل کشت	چگونگی کشت نمونه، دما و زمان مناسب جهت گرمخانه‌گذاری	۰/۵	۰/۵	*	*	جزوه آموزشی و استاندارد ملی ایران ۵۲۷۱
۸	روش جستجو و شناسایی اشریشیا کلی و کلی‌فرم ها	آشنایی با روش کشت و گرمخانه گذاری و بررسی کشت های انجام شده	۰/۵	۰/۵	*		جزوه آموزشی و استانداردهای ملی ایران ۱-۷۷۲۴
۹	روش جستجو و شمارش انتروکوک های روده‌ای	آشنایی با روش کشت و گرمخانه گذاری و بررسی کشت‌های انجام شده	۰/۵	۰/۵	*		جزوه آموزشی و استانداردهای ملی ایران۲-۷۷۲۴

ردیف	رئوس مطالب	محتوای آموزشی	مدت آموزش (ساعت)		اجراکننده		منبع / استانداردها
			تئوری	عملی	مدرس	کارآموز	
۱۰	آشنایی با روش کشت و گرمخانه‌گذاری و بررسی کشت‌های انجام شده	آشنایی با روش کشت و گرمخانه-گذاری و بررسی کشت‌های انجام شده	۰/۵	۱	*		جزوه آموزشی و استانداردهای ملی ایران ۸۸۶۹
۱۱	آشنایی با روش کشت و گرمخانه‌گذاری و بررسی کشت‌های انجام شده	آشنایی با روش کشت و گرمخانه-گذاری و بررسی کشت‌های انجام شده	۰/۵	۰/۵	*	*	جزوه آموزشی و استانداردهای ملی ایران ۵۳۵۳
۱۲	نحوه تفسیر، بررسی نتایج و گزارش‌دهی	نحوه تفسیر، بررسی نتایج و گزارش‌دهی	۰/۵	۰/۵	*	*	جزوه آموزشی و استانداردهای ملی ایران ۱۰۱۱، ۴۴۰۳ و ۶۲۶۷
مدت دوره: دو روز							

سایر استانداردها و منابع:

- **استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۸، کیفیت آب - نمونه‌برداری از آب برای آزمون‌های میکروبیولوژی- آیین کار**

نحوه برگزاری آزمون:

عملی	تئوری
*	*

جزوه دوره کارآموزی میکروبیولوژی آب

تهیه کننده/ تهیه کنندگان:
شهپر مقدمی / مهدی دوچشمه

گروه پژوهشی/ آزمایشگاه:
گروه پژوهشی میکروبیولوژی/آزمایشگاه آب
به‌سفارش دفتر آموزش و ترویج استاندارد

منابع و مآخذ:

۱- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۴۴۱، آب معدنی طبیعی –ویژگی‌ها
۲- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴۲۰۷، کیفیت آب -شمارش میکروارگانیسم‌ها در آب با استفاده از روش کشت - راهنما
۳- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴۴۰۳، میکروبیولوژی آب معدنی طبیعی -ویژگی‌ها و روش‌های آزمون استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵۲۷۱، آب ـ شمارش میکروارگانیسم‌های قابل کشت
۴- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵۳۵۳، آب – جستجو و شمارش اسپورکلستریدیوم‌های احیاءکننده سولفیت با استفاده از صافی غشایی در آب
۵- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲-۷۷۲۴، کیفیت آب - جستجو و شمارش انتروکوک‌های روده ای– قسمت دوم : روش صافی غشایی
۶- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۷۷۲۵، کیفیت آب - جستجو و شناسایی اشریشیاکلی و کلیفرم‌ها-قسمت اول :روش صافی غشایی
۷- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۸۶۹، کیفیت آب-شناسایی و شمارش سودوموناس آئروژینوزا به‌روش صاف کردن غشایی
۸- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹ ، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -راهنمای الزامات کلی برای آزمون
۹- یگانه، مهرداد. استاندارد و استاندارد کردن، چاپ اول، موسسه دانش پارسیان، ۱۳۸۹

فهرست

عنوان **صفحه**

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران ب
پیشگفتار ج
محتوای دوره کارآموزی د
جزوه دوره کارآموزی ز
مقدمه ط
۱ هدف ۱
۲ استانداردهای ملی ایران ۱
۳ اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی ۲
۴ نمونه برداری ۳۴
۵ روش‌های آزمون میکروبیولوژی آب ۳۶
۵-۱ اصول آزمون ۳۷
۶ محیط‌های کشت و رقیق‌کننده‌ها ۳۸
۷ روش اجرای آزمون ۳۹
۸ محاسبه نتایج ۶۷
۹ بیان نتایج ۷۲
پیوست الف- حد تشخیص در روش شمارش(اطلاعاتی) ۷۳
پیوست ب- مقدار MPN در ۱۰۰mL نمونه با سطح اطمینان ٪۹۵ برای سری ۹ لوله‌ای (۳ لوله ۱۰mL، ۳لوله ۱mL ، ۳لوله۰/۱mL) ۷۵
پیوست پ- استانداردهای مرتبط با (GMP) ۷۶
پیوست ت - انواع استاندارد ۷۷
پیوست ح - مفاهیم مورد استفاده در کنترل کیفیت ۷۹
پیوست ج – مدیر کنترل کیفیت و آیین نامه تایید صلاحیت علمی و فنی ۸۰
پیوست چ - نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌های میکروبیولوژی آب طبق استاندارد ملی ایران ۸۳

مقدمه

آب[1] ماده بی‌رنگ و بی‌بو است که در سراسر زمین یافت می‌شود و از میلیاردها مولکول تشکیل شده است. مولکول آب از دو اتم هیدروژن تشکیل شده است، که توسط پیوندهای قوی کوانتال شیمیایی به‌یک اتم اکسیژن ارتباط دارند بیشتر اتم‌های هیدروژن یک هسته دارند و تنها از یک پروتون تشکیل شده‌اند. دو فرم ایزوتوپ آن، دوتریوم و تریتیوم، که در آن هسته اتمی حاوی یک و دو نوترون هستند، به‌میزان کمی در آب یافت می‌شوند از هر بیست میلیون مولکول آب، یک مولکول آب سنگین است. اکسید دوتریو(D_2O)، به‌نام آب سنگین، و در تحقیقات شیمیایی و همچنین در بعضی از راکتورهای هسته‌ای به‌عنوان یک نانو کنترل کننده (رد یاب) استفاده می‌شود.اگرچه فرمول آب (H_2O) به‌نظر ساده می‌رسد، اما دارای خواص شیمیایی و فیزیکی بسیار پیچیده است به‌عنوان مثال، نقطه ذوب آن، ۰°C (۳۲ °F) و نقطه جوش ۱۰۰°C (۲۱۲ °F) بسیار بیشتر از حد انتظار در مقایسه با ترکیبات مشابه مانند: سولفید هیدروژن و آمونیاک است.

یکی دیگر از ویژگی‌های غیر معمول آب این است که، آب یخ در شکل جامد، متراکم‌تر از آب مایع است، مولکول آب آن خطی نیست اما به‌روش خاص خم می‌شود ریشه این ناهنجاری‌ها در ساختار الکترونیکی مولکول آب قرار دارد. اتم‌های هیدروژن در مولکول‌های آب پیوندهای ضعیف هیدروژن تشکیل می‌دهند. این به‌معنی است که اتم‌های هیدروژن در یک مولکول آب به‌جفت الکترون، الکترونی از اتم اکسیژن در مولکول آب مجاور جذب می‌شوند. اعتقاد بر این است که ساختار آب مایع حاوی مولکول‌های مولکولی آب است که به‌طور مداوم شکل می‌گیرد و دوباره شکل می‌گیرد. این امر ویژگی‌های غیر معمول آب، مانند: ویسکوزیته بالا و کشش سطحی، را تولید می‌کند.شکل آب به‌دما بستگی دارد آب در سه نوع مختلف گاز، جامد و مایع در زمین وجود دارد: در سیاره ما آب به‌عنوان مایع در اقیانوس‌ها و رودخانه‌ها، جریان دارد، به‌عنوان یخ در قطب شمال و جنوب، جامد است و به‌صورت گاز (بخار) در جو وجود دارد و از طریق تبخیر، بارش و روان آب، به‌طور مداوم از یک فرم به‌دیگری که، چرخه آب نامیده می‌شود در گردش است.

آب های زیر زمینی

آب‌های زیر زمینی به آب‌هایی گفته می‌شود که در لایه‌های آب‌دار و اشباع زیر زمین تجمع پیدا کرده‌است و به‌اشکال مختلف:

1-H_2O

آب هیگروسکوپی[1]، آب غشایی[2] آب ثقلی[3]، آب مویینگی[4]، وجود دارد. آب‌های زیر زمینی در طی روند نفوذ خود به لایه‌های آبدار[5] بسته به‌نوع خاک و آلاینده‌های موجود در خاک ممکن است حاوی مواد معدنی و آلی شوند. و به‌این ترتیب آب معدنی تشکیل می‌شود. آب معدنی دارای املاح معدنی خاصی است که با عبور از لایه‌های مختلف زمین در آب حل شده و در طول سال ترکیب آن، ثبات جریان آن، ویژگی شیمیایی و میکروبیولوژیکی آن از ثبات نسبی بر خوردار است. این ویژگی‌ها برای هر آب معدنی منحصر به‌فرد است و مشخصات طعم آن را مشخص می‌کند .

مخاطرات آب‌های زیرزمینی

یکی از مخاطرات آب‌های زیر زمینی، به‌دلیل نفوذ و تراوش مواد شیمیایی و آلاینده مضر از مخازن زیرزمینی و از محل‌های دفن زباله یا سیستم‌های فاضلاب به‌درون سفره‌های آب‌های زیرزمینی است آب های زیرزمینی از طریق زهاب حاصله از مزارع کشاورزی کود داده شده و مناطق صنعتی، آلوده می‌شوند. صاحبان خانه‌ها با ریختن مواد شیمیایی به‌داخل فاضلاب یا روی زمین، آب‌های زیرزمینی را آلوده می‌کنند.

شکل۱ – قنات

شکل۲ – چشمه

شکل۳ – چاه

شکل۴ – چاه آرتزین

آب معدنی که از مخازن و منابع زیرزمینی عمیق محافظت شده از خطرات آلودگی استخراج می-شود. نیازی به‌فرایندهای پالایشی ندارد و انجام هیچ گونه فرایند (به جز در موارد محدود مانند: کربناته، حذف اجزاء نا پایدار مانند ترکیبات آهن، منگنز، سولفور و آرسنیک) مجاز نمی‌باشد و

---

۱ - آبی است که به صورت قطره‌های ریز در اطراف دانه‌های رسوب می‌چسبد.

۲ - آبی است که به‌صورت یک قشر نازک، اطراف دانه‌های رسوب را می‌پوشاند.

۳ - آبی است که اطراف و بین دانه‌های رسوب را پر می‌کند و اگر امکان حرکت وجود داشته باشد از محل خود تحت تأثیر نیروی جاذبه زمین یا ثقل، حرکت کرده و جریان می‌یابد.

۴ - بخشی از آب است که بر روی سطح آب زیرزمینی و سوار بر آن، در میان رسوبات دانه ریز قرار می‌گیرد. رسوبات دانه ریز، فضای لوله مانند و پیچ و خم داری ایجاد می‌کنند که تحت تأثیر نیروی موئینگی، بخشی از آب زیرزمینی را در خلاف جهت نیروی ثقل تا ارتفاع ۴

۵- چندین متری به‌بالا می‌کشند. ضخامت آب موئینگی به‌قطر دانه‌های رسوب بستگی داشته و هرچه دانه‌های رسوب ریزتر باشند ضخامت قشر موئینگی نیز بیشتر خواهد بود.

بخشی از آب‌های سطحی که در اثر نیروی جاذبه وارد محیط متخلخل خاک شده و به‌سمت پایین حرکت می‌کند. لایه‌های مختلف زمین از مواد و ترکیبات مختلف خاک شکل گرفته و در زمان‌های مختلف بوجود آمده‌اند. و عواملی نظیر جنس و اندازه دانه‌ها، میزان تخلخل، میزان تراکم، میزان ترک‌خوردگی و ... باعث می‌شود. بخش‌های مختلف فضای زیرزمین ظرفیت‌های متفاوتی برای جذب، ذخیره و انتقال آب داشته باشد. لایه‌هایی از زمین که به‌صورت نسبی ظرفیت بالاتری برای جذب، ذخیره و انتقال آب دارند آب‌خوان نامیده می‌شوند. به‌دلیل نفوذپذیری بیشتر این لایه‌ها، بخش اعظم آب نفوذ کرده در عمق زمین به‌صورت طبیعی جذب آن‌ها می‌شود. بسته به‌شرایط احاطه کننده آن، یک لایه آب‌دار می‌تواند مانند یک مخزن زیرزمینی آب را ذخیره یا مانند: یک رودخانه زیرزمینی آب را به‌لایه‌های مجاور و عمیق‌تر منتقل کند.

تنها از صافی‌های فیزیکی به‌منظور تصفیه و جداسازی مواد جامد آنها استفاده می‌شود. بنابر این آب استخراج شده از منبع طبیعی ثابت مثل انواع چاه[۱]، چشمه[۲]، قنات بدون تغییر در ترکیبات آن، بسته‌بندی می‌شود.

میکروبیولوژی آب

میکروبیولوژی آب رشته علمی است که با بررسی تمام جنبه‌های زیست شناسی میکروارگانیسم‌ها (باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها، انگل‌ها و پروتوزوآها) که در آب وجود دارد، مربوط می‌شود و به عنوان میکروبیولوژی دریایی شناخته می‌شود، که رشته‌ای از میکروبیولوژی زیست محیطی است. حضور میکروب در آب می‌تواند ایجاد بیماری کند، و حتی تهدید کننده باشد به‌عنوان مثال، باکتری‌هایی که در روده انسان و سایر حیوانات خون گرم زندگی می‌کنند، مانند: *اشرشیاکلی*[۳]، سویه O۱۵۷:H۷ ، *سالمونلا*، *شیگلا* و *ویبریو*، پاتوژن‌های روده‌ای می‌باشند و توانایی تولید توکسین را دارند و در صورت آلوده شدن آب با مدفوع، می‌تواند آسیب‌های جدی را بر دستگاه گوارش وارد کند.

- **تک‌یاختگان (پروتوزوآ[۴] یا پروتوزوئرها)**

پروتوزوآ یک اصطلاح غیر رسمی است که برای تک سلولی‌های یوکاریوتی و بدون دیواره سلولی اطلاق می‌شود. برخلاف باکتری‌ها، پروتوزاها دارای بسیاری از اندام‌های مختلف داخل سلولی هستند و دارای سازه‌هایی مشابه‌دهان و دستگاه گوارش هستند و وظایف خاصی را انجام می دهند. پروتوزوئرها در طول دوره زندگی خود، اشکال مورفولوژیکی متفاوت دارند، بسته به‌گونه‌های مختلف اکثر آنها دارای مرحله کیستی[۵] هستند وکپسول‌های کوچک و سخت که در برابر استرس زیست محیطی مقاوم هستند، را تولید می‌کنند. کیست‌ها حالت عفونی داشته و از طریق آلودگی مدفوعی دریافت می‌شوند.گونه‌های بیماری‌زا مانند *انتاموبا هیستولیتیکا*[۶] عامل اسهال خونی آمیبی، و انگل *تریپانوزوم بروسی*[۷] عامل بیماری خواب آفریقایی و *پلاسماودیوم فالسیپاروم*[۸]، عامل مالاریا، می‌توانند در سراسر جهان ویرانگر باشند. اشکال کیست پروتوزوآها در برابر کلر مقاوم بوده و می‌تواند از طریق فیلتر عبور کند. نگلریا فاولری[۹] نیز یکی از آمیب‌های آزادزی آب‌های شیرین

---

۱ - چاه آرتزین چاهی است که آب از دهانه آن با فشار بیرون می‌آید. این چاه با آنکه شباهتی به‌چشمه دارد، ولی در واقع چشمه بشمار نمی‌آید و وقتی که آب باران به‌داخل زمین نفوذ می‌کند و می‌رود تا می‌رسد به‌شن یا سنگ‌های سوراخ سوراخی که در میان دو لایه از سنگ‌های محکم و نفوذناپذیر قرار اند. آنگاه در اطراف چنین آبی فشار جمع می‌شود، و سپس هنگامی که سوراخی به‌مخزن آب بزنند، آب با فشار بیرون می‌جهد. البته چاه آرتزین را می بایست در جایی زد که پایین‌تر از سطح نفوذ آب به‌داخل زمین باشد.

۲ - چشمه وقتی درست می‌شود که آب مجرایی طبیعی برای خود بیابد که پایین‌تر از سطح ایستابی باشد. چون آب چشمه‌ها در داخل زمین از میان سنگ‌ها می‌گذرد، از این‌رو همه آنها مقداری مواد معدنی چون گوگرد و آهک در درون خود دارند. چشمه‌هایی که مواد معدنی بیش از اندازه معمول دارند، چشمه‌های معدنی خوانده می‌شوند.

۳- *Escherichia coli*
٤-Protozoa
٥-Cysts
٦-*Entamoeba histolytica*
۷- *Trypanosoma brucei*
۸- *Plasmodium falciparum*
۹- *Naegleria fowleri*

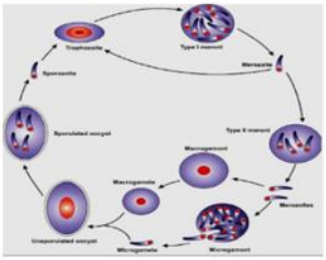
است به‌نظر می‌رسد که در هنگام شنا یا غواصی وارد آب بدن شود و بر روی دستگاه فوقانی بینی قرار می‌گیرد که بر خلاف سایر آمیب‌های آزادزی که افراد با نقص سیستم ایمنی را درگیر می کنند انسان‌ها و حیوانات با سیستم ایمنی سالم را مورد تهاجم قرار داده و موجب بروز بیماری کشنده منینگوانسفالیت آمیبی اولیه در آنها می‌شود. در این بیماری پرده مننژ مغز درگیر و در مدت بسیار کوتاهی افراد مبتلا جان خود را از دست می‌دهند. بیشترین نگرانی از طرف پروتوزوئرهای روده‌ای مانند ژیاردیا[1] و کریپتوسپوریدیوم [2] وجود دارد .

شکل۵- پروتوزوآ

سیکلوسپورا [3]

سیکلوسپورا کایتاننسیس[4] تک یاخته‌ای است متعلق به‌زیر رده کوکسیدیا، که دارای گسترش و پراکندگی جهانی است. *سیکلوسپورا کایتاننسیس* یک آپیکومپلکسان[5] کوکسید کیستی است که باعث اسهال خود محدود کننده می‌شود از لحاظ مورفولوژی، اووسیست‌های کروی و دارای قطر بین ۷/۵µm تا ۱۰µm است که همچنین دارای یک دیوار با ضخامت ۵۰nm با پوشش خارجی نخ مانند هستند فرمول اووسیست O.۲,۲ است زیرا یک اووسیست دارای دو اسپوروسیست است و هر اسپوروسیست دارای دو اسپوروزوآیت است.

شکل۶- سیکلوسپورا



شکل۷- چرخه زندگی سیکلوسپورا

۱- Giardia
۲- Cryptosporidium
۳- Cyclospora
٤- Cayetanensis

۵ -بر اساس Sub kingdom (تحت سلسهٔ) تک یاخته‌های مهم انسانی در چهار شاخه زیر قرار می‌گیرند .

الف- سارکومستیگوفورا: شامل I -آمیب‌ها (سارکودینا) و II -تاژک داران (مستیگوفورا)

ب- سیلیوفورا (مژه‌داران): در این شاخه فقط بالانتیدیوم کلی، تکامل یافته‌ترین تک یاخته است.

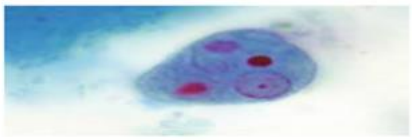
پ- اپیکومپلکسا یا اسپوروزوآ: اپیکومپلکسان یک گروه، ارگانیسم‌های پیچیده‌ای هستند که طیف وسیعی از شکل‌های مورفولوژیکی را بسته به‌جنس و مرحله چرخه حیات خود نشان می‌دهند. انسان برای برخی از آنها میزبان طبیعی و برای برخی دیگر میزبان اتفاقی محسوب می‌شود. شکل‌های مورفولوژیکی را بسته به‌جنس و مرحله چرخه حیات خود نشان می‌دهند .دوره عمر Apicomplexan شامل سه مرحله استsporogony، merogony و gam etogony است.

ت- میکروسپورا :انگل‌های این گروه با ظهور ایدز و هپاتیت و بیماری‌های سرکوب کننده ایمنی (ایمونوساپرس) پدیدار شدند.

پروتوزوآ چرخه زندگی درون سلولی را داخل سلول‌های اپیتلیال میزبان و دستگاه گوارش سپری می‌کند عفونت از طریق مسیر دهانی و خوراکی با بلع اووسیست‌های در مواد غذایی آلوده به‌فاضلاب ایجاد می‌شود. مواد شیمیایی مختلف در دستگاه گوارش میزبان باعث تندش اووسیست‌ها و آزاد شدن اسپوروزوئیت می‌شود. سپس اسپوروزوئیت‌ها سلول‌های اپیتلیالی را مورد حمله قرار می‌دهند و به‌صورت غیر قابل شمارش[1](یک نوع تولید مثل غیرمعمول)، منجر به‌تولید بسیاری از میروزویت می‌شود این سلول‌ها ممکن است سلول‌های میزبان جدید را آلوده کنند. تظاهرات کلینیکی سیکلوسپوریازیس در انسان مشابه کریپتوسپوریدیازیس می‌باشد. سیکلوسپورا یکی از عوامل ایجاد کننده اسهال‌های آبکی طولانی مدت است که هم در مبتلایان به‌سندرم نارسایی سیستم ایمنی و هم در افراد سالم مشاهده می‌شود.

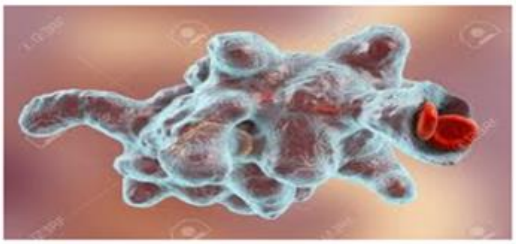
- ***آنتامبا هیستولیتیکا***[2]:

تک یاخته آنتامبا عامل بیماری آمیبیاز روده‌ای و اسهال خونی می‌باشد. فرم فعال آن در روده بزرگ انسان با حمله به‌مخاط روده در آن زخم ایجاد می‌کند.کیست‌های این آمیب از طریق مدفوع فرد مبتلا دفع می‌شود. آلودگی مدفوعی آب آشامیدنی، عامل مهمی برای ایجاد بیماری آمیبیاز است. کیست‌ها ۱۰μm تـــا۲۰μm است.پتانسیل انتقال آلودگی در مناطق گرمسیر بیشتر است.



شکل۸- *آنتامبا هیستولیتیکا*

آنتامبا هیستولیتیکا در فاضلاب به‌تعداد کم L/ (۱کیست تـــا ۵کیست) وجود دارد کیست‌ها می‌توانند (چندین ماه در آب C° صفر) و(d ۳ در آبC° ۳۰) و (min ۳۰ در آبC° ۴۵) و (min ۵ در آبC° ۵۰) زنده بمانند. یکی از ویژگی‌های *آنتامبا هیستولیتیکا* که آن را از سایر آمیب‌ها متمایز می‌کند، بلع گولبول‌های قرمز خون است که در سیتو پلاسم آن مشاهده می‌شود.



شکل۹- *آنتامبا هیستولیتیکا* نوانایی جذب گلبول‌های قرمز خون را دارد و اریترفاژنامیده می‌شود.

۱- Merogony

۲- *Entamoeba histolytica*

جوشاندن آب به‌مدت زمان min ۲ تا min ۳ سبب مرگ آنتامبا می‌شود. این انگل نسبت به‌کلر خیلی مقاوم است. کامل نبودن فرآیند تصفیه آب، نقص در سیستم لوله کشی و ارتباط آب با فاضلاب می‌توانند از عوامل انتقال کیست‌های این تک یاخته باشند. در فرآیند تصفیه آب، استفاده از صافی‌های شنی با اندازه مؤثر و ضریب یکنواختی مناسب، سبب حذف کیست‌ها می‌گردد. و با بسیاری از میکروارگانیسم‌ها در آب شیرین و تازه، شامل باکتری‌ها، سیانو باکتری‌ها[۱]، جلبک‌ها[۲] و حیوانات کوچک مانند روتیفر[۳] همراه است.

- **کریپتوسپوریدیوم:**

تک یاخته انگلی کریپتوسپویدیوم در روده حیوانات اهلی، وحشی و انسان ایجاد بیماری می‌کند. انتقال آلودگی به‌انسان از طریق تماس مستقیم مدفوع انسان و حیوان با آب آشامیدنی انجام می‌گیرد. مصرف آب‌های سطحی آوده به‌این ارگانیسم نیز سبب ایجاد بیماری اسهالی شبه وبا می‌شود. که در افراد با نقص ایمنی سبب بیماری مزمن می‌شود. شیوع کریپتوسپوریدیوم در ارتباط با آب آشامیدنی تصفیه نشده و آب‌هائی که فقط کلرزنی شده‌اند، می‌باشد. اندازه آنها μm ۴ تا μm ۶ است. میزان حذف آنها از طریق فرآیندهای متنوع تصفیه هنوز واضح نیست. حجم نمونه مورد نیاز برای آزمایش L ۳۸۰ تا L ۴۰۰است. این انگل نسبت به‌کلر مقاوم است. اووسیست این انگل در دمای $^{\circ}C$ ۶۰ و بالاتر کشته می‌شوند. موارد شیوع این بیماری به‌وسیله آب نشانگر بی‌تاثیر و ناکار آمد بودن گندزدائی با کلر، که به‌عنوان تنها فرآیند تصفیه برای منابع آب آلوده است، می‌باشد. تصفیه چند مرحله‌ای (گندزدائی، همراه با انعقاد، فیلتراسیون) و حفاظت از منابع آب سطحی و زیرزمینی از آلودگی، و جلوگیری از ورود فاضلاب‌ها به‌منابع آب، بهترین حفاظ در برابر بیماری‌های انگلی پروتوزوایی است.

شکل ۱۰- کریپتوسپوریدیوم

- **ژیاردیا :**

تک یاخته تاژک‌دار است و انگل روده انسان و حیوانات می‌باشد، دارای چرخه زندگی دو مرحله‌ای کیستی و فرم فعال بوده و تعداد کم فرم بالغ این انگل (حتی تا ۱۰) عدد ایجاد عفونت می‌کند. ژیاردیا [۴]عامل ژیاردیاسیس (عامل اسهال)، می‌شود. کیست‌ها پس از ورود به‌روده باریک باز شده و تروفوزوئیت‌ها از آن خارج می‌شوند. تروفوزوئیت‌ها از طریق تقسیم دوتایی شروع به‌زیاد شدن

۱- Cyanobacteria

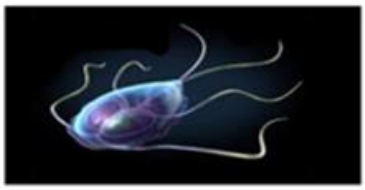
۲- Algae

۳- Rotifer

۴- Giardia

مـی‌کننـد. ژیاردیـا در دوازدهـه بـاقی مانـده و از طریـق خـون منتشـر نمـی‌شـود. آنهـا بـا اسـتفاده از دیسک‌های چسبنده خـود بـه‌جـدار روده مـی‌چسـبند. در برخـی حـالات خـاص بـه‌صـورت کیسـت درآمـده و در مـدفوع دفـع مـی‌شـوند. انـدازه کیسـت‌هـای ژیاردیـاμm ۸ تـــاμm ۱۲[۱] طـول وμm ۷ تـــاμm ۱۰ عرض دارند. در هر گرم از مدفوع فرد آلوده [۶] ۱۰ کیست وجود دارد.

غلظـت کیسـت‌هـا در فاضـلاب خـانگی در حـدود L /۱۰۰۰۰تـــا L /۲۴۰۰۰ فاضـلاب است.کیسـت‌هـا حـدود۲ مـاه در آب آشـامیدنیC° ۸ زنـده مـی‌ماننـد. ژیـاردیـا نسـبت بـه‌روش‌هـای مـعمـول کلـرینـاسیـون مقـاوم بـوده و نسـبت بـه‌کلـیفرم‌هـا مقـاوم‌تـر مـی‌باشد.جوشـاندنmin ۲ تـا min ۳ روش مؤثری در از بین بردن انگـل مـی‌باشـد. شناسـایی و کنتـرل منـابع آلـوده کننـده، بـه‌سـازی، و اصـلاح نواقص سیسـتم تصـفیه و توزیـع آب، از فعالیـت‌هـای مـؤثر در جلـوگیری از آلـودگی ژیاردیـا اسـت. کـاربرد فرآیند صافی شنی تنـد و کنـد بـه‌ویـژه نـوع کنـد در تصـفیه خانـه‌هـا (تـا حـدود٪ ۹۹کیسـت) راهـی مـؤثر برای حذف ژیاردیا است.



شکل ۱۱- ژیاردیا

- **ویروس‌ها**

بخش روده‌ای پستانداران خونگرم دارای ویروس‌هایی مانند: روتا ویروس[۲]، انترو ویروس[۳] ،کوکساکی[۴] هستند. و از طریق فاظلاب و تخلیه پ ساب خروجی از ت صفیه خانه فا ضلاب به آب‌های سطحی، وارد می شود آب را آلوده و باعث بیماری می‌شـوند . ویروس‌هایی که به‌تعداد نسـبتا زیادی در مدفوع انسـان یافت می‌شـود، به ویروس‌های مدفوعی – دهانی معروف هسـتند اندازه این نوع ویروس‌ها حدودnm۲۰ می‌باشـد و توسـط میکروسـکوپ الکترونی قابل مشـاهده هسـتند و از طریق گوارش منتقل می‌گردند. از صـافی بیولوژیکی عبور می‌کنند ویروس‌هایی که باکتری‌ها را آلوده می‌کنند، باکتریوفاژ یا فاژهای سـاده نامیده می‌شـوند . معمولا دارای تقارن ۲۰ وجهی یا مارپیچی هستند تکثیر و همانند سازی آنها طی یک فعالیت منظم در داخل سلول میزبان صورت می‌گیرد و شامل مراحل: جذب[۵]، نفوذ[۶]، از دست دادن کپسید[۷]، ناپدید شدن ویروس[۸]، ساخت[۹]،

---

۱ - میکرون یا میکرومتر، بر پایه کاربرد اداره بین‌المللی اوزان و مقیاس‌ها، یکی از واحدهای طول متریک برابر با ۱×۱۰^{-۶} است. یک میکرومتر معادلnm ۱۰۰۰ یاmm ۱/۱۰۰۰ است. میکرون را با حرف یونانی مـو μm نشان می‌دهند.

۲- Rotavirus

۳- Enteroviruses

۴- Coxsackievirus

۵-Adsorption

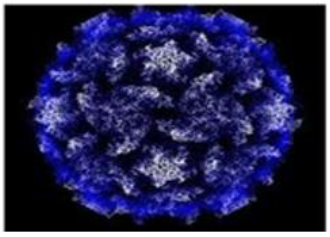
۶- Penteration

۷- Uncoating

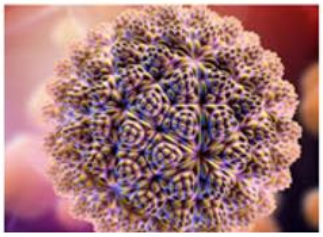
۸- Eclipse

۹- Synthesis

تجمع[۱]، آزاد شـدن[۲] می‌باشـد. فاقد ریزوبیوم، میتوکندری و قابلیت تولید انرژی و سـنتز پروتئین می‌باشـند نسـبت به‌عوامل ضـد باکتری‌یایی مقاوم و قابل کریسـتالیزاسـیون هسـتند دارای DNA یا RNA می‌باشـند. از مشخصات آنها می‌توان به‌موارد: مقاوم بودن به‌اسید و صفرا، تکثیر در روده کوچک، دفع به‌مقدار زیاد از طریق مدفوع، اشـــاره کرد. ویروس‌های آب معمولاً در دســـته آنترو[۳]ویروس‌ها[۴] یا ویروس‌های روده‌ای قرار دارند. انتروویروس‌ها دسته‌ای از ویروس‌های ssRNA (تک رشته‌ای) موسوم به‌پیکورنا ویروس‌ها[۵] که یک گروه بزرگ از انترو ویروس‌ها اسـت شـامل :هپاتیتA، ویروس پولیو[۶]،کوکسـاکی A و B و اکو ویروس اسـت. پایداری این ویروس‌ها به‌آنها امکان می‌دهد که در ح ضور ا سید و گندزداهای ا ستاندارد، زنده و در دمای اتاق چندین روز باقی بمانند. انتروویروس‌ها شـــامل پولیوویروس‌ها[۷]، کوکســـاکی ویروس‌ها[۸]، اکوویروس‌ها[۹] و ویروس‌های تازه کشـف شـده‌ای هسـتند که فعلاً به‌انترویروس‌ها معروف هســتند. که از طریق اپی‌تلیوم لوله گوارش و بافت لنفوئید انســـان‌ها را آلوده می‌کنند. فاکتورهای فیزیکی مانند: دما، نور و تابش نور خورشـــید و فاکتورهای شیمیائی مانند: pH، فلزات سنگین و عوامل اکسید کننده نظیر کلر، ازن، برم و ید در عدم فعالیت ویروس‌ها مؤثر ه ستند. و مواد معلق و کدورت عمر ویروس‌ها را در آب زیادتر می‌کند. تحت شرایط منا سب، ویروس‌ها در فرآیندهای مختلف تصـفیه آب به‌خوبی حذف می‌گردند. عمل کوآگولاسـیون با آلوم و صـافی شـنی آب می‌تواند تا حدود٪۹۰ تا٪ ۹۹ ویروس‌ها را کاهش دهد.



شکل ۱۲- انترو ویروس



شکل ۱۳- پیکورنا ویروس

- **روتیفرها[۱۰]**

روتیفرها برای اولین بار توسط Rev. John Harris در سال ۱۶۹۶ و توسطAntonie van Leeuwenhoek در سال ۱۷۰۳ معرفی شد. در حدود ۰/۱mm تـ ـا۰/۵mm طول دارند. در محیط‌های آب شیرین در سرتاسر جهان وجود دارند.

۱- Assembly

۲- Release

۳- Enterovirus

۴- دستگاه گوارش، انتقال دهانی مدفوعی

۵- Picornavirus

۶- Poliovirus

۷- Poliovirus

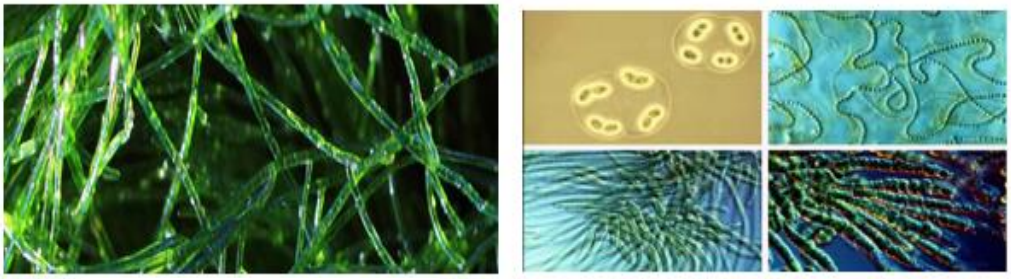
۸- Coxsackievirus

۹- Echovirus

۱۰ -Rotifers

شکل ۱۴- انواع روتیفر

بعضی از روتیفرها شناور و واقعا پلانکتون هستند، با غلطیدن در کنار یک بستر حرکت می‌کنند و بعضی از آنها در داخل توده ژله‌ای قرار دارند که به‌بستر متصل می‌شوند روتیفرها بخش مهمی از زئوپلانکتون آب شیرین و منبع غذای عمده‌ای هستند که در زنجیره غذایی مهم می‌باشند. به‌عنوان مثال، میکروب‌های سیانو باکتریایی می‌توانند انرژی خورشید را به‌انرژی تبدیل کنند.



شکل ۱۵- سیانو باکترها **شکل ۱۶- الگ ها**

تعداد زیادی از این موجودات به‌نوبه خود به‌عنوان مواد غذایی برای زندگی دیگر استفاده می‌شود . جلبک‌هایی که در آب رشد می‌کنند نیز یک منبع غذایی مهم برای دیگر انواع زندگی هستند و بسیاری از گونه‌ها نیز به‌تجزیه مواد آلی خاک کمک می‌کنند.

- **میکروارگانیسم های آب شور**

آب نمک یک محیط متفاوت برای میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. این نوع آب دارای غلظت نمک بالاتر، pHبالاتر و مواد مغذی کمتری نسبت به‌آب شیرین است و برای بسیاری از میکروارگانیسم‌ها کشنده است. اما، باکتری‌های نمک دوست (هالوفیل‌ها) و برخی از باکتری‌های آب شیرین مانند: *سودوموناس* و *ویبریو*[1] نیز، در آب نمک فراوان می‌باشد.

۱ - *ویبریوکلرا*، باکتری گرم منفی و عامل بیماری وبا است و بیشتر از طریق آب منتقل می‌شود با رها کردن آندوتوکسین باعث ایجاد اسهال فراوان و استفراغ تند و سریع می‌شود.

شکل۱۷ – ویبریو

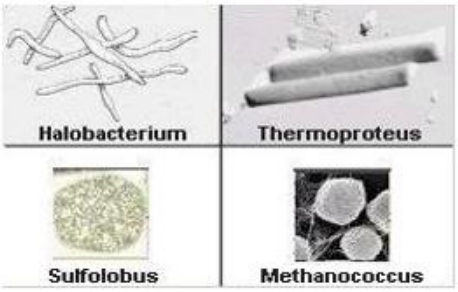
شکل۱۸ – سودوموناس

- **میکروارگانیسم‌های آب شیرین**

معمولا آب در نزدیکی ساحل روشن‌تر، کم عمق و گرم‌تر از سایر نقاط آب است .جلبک‌های فتوسنتز و باکتری‌هایی که از نور به‌عنوان انرژی استفاده می‌کنند، هستند و کمی دورتر از ساحل میکروب‌های فتوسنتز کننده زندگی می‌کنند با افزایش عمق آب و کاهش درجه حرارت و کاهش اکسیژن و نور، باکتری‌های بنفش و سبز گوگرد که می‌توانند بدون اکسیژن رشد کنند، غالب می-شوند.در نهایت، در اعماق پایین‌تر، باکتری‌هایی مانند: باکتری تولید کننده متان، که در غیاب اکسیژن و نور خورشید، می‌توانند زنده بمانند، زندگی می‌کنند

- **آرکی‌باکتری‌ها**

در سال۲۰۰۱، محققان شکل باستانی از زندگی میکروبی آرکی[1] باکترها را یکی از اشکال غالب زندگی در اقیانوس‌ها را معرفی کردند. نقش آرکی‌باکتری‌ها در زنجیره غذایی اقیانوس هنوز شناخته نشده است، اما باید از اهمیت حیاتی برخوردار باشد.



شکل۱۹ – آرکی باکتری‌ها

آرکی‌باکترها، به‌عنوان اولین پروکاریوت (سلول‌های بدون هسته، یعنی باکتری‌ها) شناخته شده‌اند. شواهد مولکولی در حال حاضر نشان می‌دهد جدایی بسیار قدیمی بین باکتری‌ها و آرکی‌باکترها وجود دارد آنها فاقد غشای هسته‌ای هستند و به‌همین دلیل پروکاریوت‌ها[2] هستند، (سلول‌های

۱- Archaebacteria

۲- prokaryote

پروکـاریوتی فاقـد هسـته، میتوکنـدری یـا هـر انـدامک غشـادار دیگـر هسـتند و تمـام اجـزای آن‌هـا از جمله آنزیم‌ها و ریبوزوم‌ها و ماده ژنتیک و... در تماس مستقیم با مایع سیتوپلاسم قرار دارند).

شکل۲۰ – محیط‌های مختلفی را نشان می‌دهد که آرکی‌ها رشد می‌کنند: ۱) دریاچه شور، ۲) شرایط با دمای بالا، ۳) چشمه‌ها گرم گوگردی، ۴) باتلاق ها و تالاب‌ها، ۵) حوضچه‌های اسیدی

از ویژگی‌های قابـل توجـه آرکـی‌بـاکتری‌هـا، توانـایی آنهـا بـرای زنـده مانـدن در شـرایط سـخت، از جملـه محـیط بسـیار شـور، بسـیار اسـیدی و بسـیار گـرم اسـت. (توانـایی زنـده مانـدن در۱۹۰°F ثبـت شـده است.)

در جـدول ۱ مقایسـه و تبـدیل مقیـاس انـدازه‌گیـری در جـدول زیـر مقایسـه و تبـدیل مقیـاس اندازه‌گیری دما، نوشته شده است.

جدول ۱- تبدیل مقیاس اندازه‌گیری دما

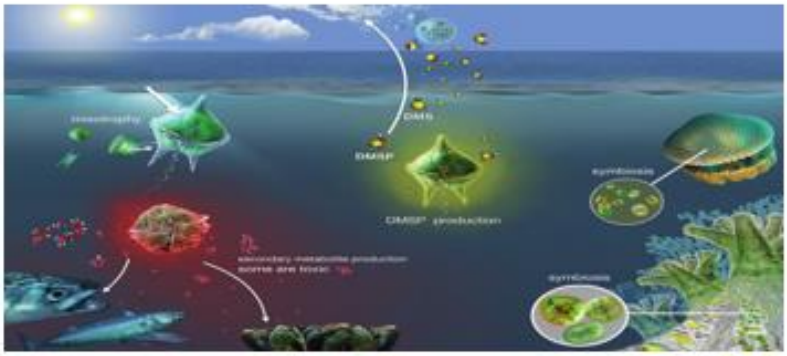
تبدیل از	به	فرمول
سلسیوس	فارنهایت	°F=(°C ×۱٫۸+۳۲)
فارنهایت	سلسیوس	°C=(°F-۳۲) /۱٫۸

- **دینوفلاژله**[۱]

یکـی دیگـر از میکروارگانیسـم‌هـای موجـود در آب شـور، نـوعی جلبـک بـه‌نـام دینوفلاژلـه اسـت. دارای زندگی آزاد و همزیستی در مرجان‌هـا و دیگـر بـی‌مهرگـان هسـتند ایـن موجـودات اغلـب تـاثیر زیـادی بـر محیط اطراف خود دارند. بسـیاری از آنهـا فتوسـنتز مـی‌کننـد، مـواد غـذایی خـود را بـا اسـتفاده از انـرژی از نور خورشـید تولیـد مـی‌کننـد و منبـع غـذایی بـرای موجـودات دیگـر را فـراهم مـی‌کنند.دینوفلاژلـه‌هـا در طول ماه‌های گرم تابستان شـکوفا مـی‌شـوند رشـد سـریع و ناگهـانی دینوفلاژلـه‌هـا موجـب قرمـز رنـگ شـدن آب مـی‌شـود[۲] و همچنـین تولیـد متابولیـت‌هـای سـمی و غیـر سـمی مـی‌کننـد و مـی‌توانـد باعـث مرگ بسیاری از ماهی‌ها شوند.

۱- Dinoflagellelates

۲- "Red tide"



شکل۲۱ – انواع دینوفلاژله

سموم دینوفلاژلدین یکی از قویترین بیوتوکسین‌های شناخته شده می‌باشد .آنها اغلب در بافت-های نرم ماهی‌ها و صدف‌ها جمع می‌شوند. تغذیه انسان‌ها از این ماهی‌ها، باعث بیماری‌هایی مثل مسمومیت (PSP)[۱]، مسمومیت‌های (NSP)[۲]، مسمومیت (DSP)[۳]و سیگواترا [۴] می‌شوند.

- **سیلیندروسپرموپسین [۵](CYN)**

یک سیانو توکسین [۶] تولید شده توسط انواع سیانو باکترهای آب شیرین است. CYN از مشتقات اوراسیل چند حلقه‌ای حاوی گروه‌های گوانیدین و سولفات است و بسیار محلول در آب است. CYN برای بافت کبد و کلیه سمی است. سرطان زا بودن آن مشخص نیست، اما به‌نظر می‌رسد که هیچ فعالیت تومورزایی در موش وجود ندارد. CYN برای اولین بار در جزیره پالم، کوئینزلند و استرالیا کشف شد.

- **میکروارگانیسم‌های قابل کشت (هتروتروف)**

میکروارگانیسم‌های هتروتروف گروهی از میکروارگانیسم‌ها (باکتری‌ها، مخمرها و کپک‌ها) هستند که از کربن آلی یا از ماده آلی کربن‌دار به‌عنوان منبع غذایی استفاده می‌کنند و در هر نوع آب یافت می‌شوند و به‌عنوان یک شاخص مدیریت فرایند تصفیه استفاده می‌شوند. بیشترین جمعیت میکروبی آب را تشکیل می‌دهند میکروارگانیسم‌های هتروتروف در انواع آب‌ها که کربن آلی بیولوژیک در دسترس است وجود دارد. بنابراین، باکتری هتروتروف به‌طور کلی در طول زمان کم و پایدار است .در آب‌های سطحی و آب‌های زیرزمینی، شمارش هتروتروف‌ها متفاوت است و می‌تواند از طریق تیمار مؤثر به‌حداقل برسد. تیمار آب آشامیدنی میکروارگانیسم‌های هتروتروف را حذف یا غیرفعال نمی‌کند. برخی میکروارگانیسم‌های هتروتروف به‌ضد عفونی مقاوم هستند. زیرا آنها به‌فرم اسپوردار، به‌فرم رویشی با یک غشای غیر قابل نفوذ، و یا در صورت تشکیل بیوفیلم و اجتماع در مقابل ضد عفونی کننده محافظت می‌شوند. در نتیجه، این میکروارگانیسم‌ها از

۱- Paralytic shellfish poisoning (PSP)

۲- Neurotoxic shellfish poisoning (NSP)

۳- Diarrheic shellfish poisoning (DSP)

۴- Ciguatera

۵- Cylindrospermosin

۶- Cyanotoxin

طریق سیستم تصفیه به‌سیستم‌های توزیع و/یا لوله کشی منتقل می‌شوند . حضور باکتری‌های مقاوم در برابر ضدعفونی کننده در آب شیرین، مسئول تشکیل بیوفیلم داخل لوله‌ها و مخازن می‌باشد که همراه با حضور باکتری‌های بالقوه بیماری‌زا سودوموناس است . برخی از باکتری‌های موجود در جمعیت هتروتروف، پاتوژن-های فرصت طلب مانند*اسینتوباکتر*[۱]، *آئروموناس*[۲]، *کریزوباکتریوم (فلاووباکتریوم)*[۳]، *کلبسیلا*[۴]، *لژیونلا*[۵]، *مورازلا*[۶]، *مایکوباکتریوم*[۷]، *سراشیا*[۸]، *سودوموناس*[۹]، *آلکالیژنز*[۱۰]، *زانتوموناس*[۱۱] هستند.

درتصفیه آب، اجزای نامطلوب از آب حذف شده و سپس به آسان ترین و مطمئن ترین روش ممکن دفع می-شوند.برای توسعه و انتخاب یک الگوی تصفیه، شناخت صحیح کیفیت آب خام، کیفیت آب تصفیه شده و کارایی واحدهای عملیاتی و فرایندی مختلف ضروری است. عوامل مهم در انتخاب فرایند تصفیه عبارتند از : استانداردهای کیفی آب خام و تصفیه شده، آلاینده‌های مورد نظر، توپوگرافی و زمین شناسی، وضعیت هیدرولیکی سیستم، دفع لجن، انرژی مورد نیاز و اقتصاد واحد.

به‌طور کلی، روش‌های فیزیکی (از جمله پیش اکسیداسیون، انعقاد، لخته سازی، ته نشینی، تبادل یون، گندزدایی و اسمز عکوسRO) همگی روش های تصفیه آب هستند که با توجه به عوامل مذکور فوق یکی یا مجموعه ای از آنها برای رسیدن به کیفیت مد نظر به کار برده می‌شود.

- **سالمونلا**[۱۲] **و شیگلا**[۱۳]:

سالمونلا و شیگلا باسیل‌های گرم منفی بدون اسپور، هوازی و بی‌هوازی اختیاری، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی ه ستند. قرابت نزدیکی با ا شریـ شیاکلی دارند. *سالمونلا*ها از نظر بیو شیمیایی خواص عمومی خانواده آنترو باکتریا سه را دارا ه ستند. pH پائین‌تر از ۴ باعث از بین رفتن میکروارگانیـسم می شود. سالمونلا از نظر آنتی ژنی دارای سه نوع آنتی ژن O ، آنتی ژن H ، آنتی ژن Vi است.این باکتری اندوتوکسین[۱۴] ترشح می‌کند و دارای لیپو پروتئین ساکارید[۱۵] و لیپید A می‌باشد. سندرم‌های بالینی عفونت‌های سالمونلایی به‌چهار صورت، گا سترو انتریت (ا سهال وا ستفراغ)، سپ سمی سمی (آلودگی در خون)، تب تیفوئید (ح صبه با تب روده‌ای) و حاملان بدون علامت (حامل مزمن) بروز می‌کند. شیگلا عامل دیسانتری باکتریایی «اسهال

۱- Acinetobacter

۲- Aeromonas

۳- Chryseobacterium (Flavobacterium)

۴- Klebsiella

۵- Legionella

۶- Moraxella

۷- Mycobacterium

۸- Serratia

۹- Pseudomonas

۱۰- Alcaligenes

۱۱- Xanthomonas

۱۲- *Salmonella*

۱۳- *Shigella*

۱۴ -سمی که بواسطه تخریب دیواره سلولی باکتری گرم منفی ایجاد می‌شود.

۱۵- Lipopolysaccharides(LPS)

باسیلی» است. ازطریق آب آلوده و غذای آلوده منتقل می‌شود. کمتر از ۱۰۰ باکتری برای ایجاد اسهال کافی ا ست .برخی از سویه‌ها، انتروتوک سین و شیگاتوک سین تولید می‌کنند. شیگاتوک سین شبیه وروتوک سین اشریشیاکلی O۱۵۷:H۷ است.

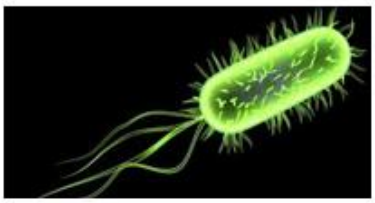
شکل۲۲ - سالمونلا

شکل۲۳ -شیگلا

- **اشریشیاکلی**[۱]:

گونه‌ای از جنس اشریشیا متعلق به خانواده انتروباکتریاسه است که علاوه بر آنزیم بتا¬دی¬گالاکتوزیداز، بتا-دی¬گلوکورونیداز هم تولید می‌کند.که با تخمیر لاکتوز ایجاد گاز کرده و از تریپتوفان اندول تولید می کنند. ویژگی‌های مهم این باکتری عبارت اســت از: بزرگترین عامل عفونت‌های ادراری اســت. (حدود٪ ۸۵)، دومین باکتری از لحاظ فراوانی در روده ا ست. (بعد از باکتروئیدس)، ا شریـ شیاکلی معمولا در محیط های آبی تکثیر نمی‌کند. به همین دلیل وجود آن در آب، نشانگر آلودگی مدفوعی جدید است. در فاضلاب، پساب‌های تصفیه شده و کلیه آب‌های طبیعی و خاک‌هایی که در معرض آلودگی مدفوعی جدید (نا شی از انسان، کشاورزی و حیوانات وحشی و پرندگان) هستند، یافت می‌شود.

اشریشیاکلی شاخص آلودگی آب شهری به فاضلاب است و نشان دهنده وجود میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای گوار شی انسانی و به‌عنوان شاخصی برای وجود سالمونلا ا ست. برخی از سروتیپ‌های *اشریـشیاکلی* مانند O۱۵۷:H۷موجب مسمویت غذایی و اسهال می‌شوند.



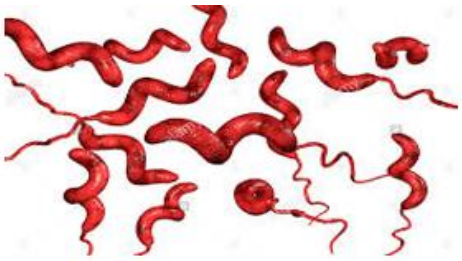
شکل۲۴ -*اشریشیا کلی*

- **کمپیلو باکتر ژژونی**[۲]

باکتری گرم منفی به‌شکل مارپیچ (S)، بدون اسپور و میکروآئروفیلیک، متحرک، اوره‌آز و اکسیداز مثبت است. در دمای ۴۲ °C در مجاورت با CO_2 رشد بهتری دارد. یکی از باکتری‌های شایع روده‌ای است. علت اصلی عفونت‌های منتقله از طریق غذا است و موجب اسهال خونی می‌شود که با دردهای شکمی همراه است.

۱- *Escherichia coli*

۲- *Campylobacter jejuni*



شکل۲۵ -کمپیلوباکتر ژژونی

- **لژیونلا**[1]

باسیل‌های گرم منفی، هوازی، بدون اسپور، دارای شکل‌های مختلف (پلئومورفیک) و دارای یک تاژک هستند. به‌طور وسیعی درآب‌های طبیعی منتشر هستند. در سیستم‌های آب رسانی به‌ویژه در سیستم‌های خنک کننده و گرم کننده وجود دارند. عفونت از طریق تنفسی، در نتیجه ورود آئروسل‌های ریز بخار در هوا در داخل ریه نفوذ کرده و در آلوئل‌ها باقی می‌مانند، ایجاد می‌گردد. درجه مخاطره آمیز بودن به‌عوامل: ۱- ترکم باکتری‌ها در منابع آب، ۲- میزان آئروسل موجود در هوا، ۳- تعداد باکتری‌هایی که از طریق تنفس وارد بدن شده‌اند. و ۴- به‌حساسیت افراد بستگی دارد. پنومونی لژیونلایی بخصوص در افراد بیمار، ضعیف، کودکان و افراد مسن شایعتر است. انتقال لژیونلا به‌انسان از طریق آئروسل، آسپیراسیون، و نفوذ مستقیم به‌درون ریه‌ها طی دست‌کاری‌های مجاری تنفسی صورت می‌گیرد. به طور معمول آزمون‌های جستجو و شناسایی لژیونلا در آب آشامیدنی متداول نیست و بهینه سازی آب شامل مجموعه‌ای از فعالیت‌ها برای از بین بردن یا غیر فعال کردن میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا ناشی از فاضلاب و مدفوع است. تصفیه و ضد عفونی تعداد لژیونلا را کاهش می‌دهد. به‌نظر می‌رسد مونوکلارآمین (در حال حاضر فقط برای سیستم‌های توزیع اصلی در دسترس است) باقی مانده موثر بر علیه لژیونلا در بیوفیلم‌ها باشد و ممکن است کارآمدتر از کلر باشد. هدف اصلی هر استراتژی برای جلوگیری از گسترش لژیونلا در سیستم‌های لوله‌کشی باید به‌حداقل رساندن توسعه بیوفیلم‌ها باشد. تمیز کردن منظم منابع ذخیره و کنترل مواد مغذی در آب منبع باعث کاهش بار مواد مغذی می شود. بنابراین کمک می‌کند تا تشکیل بیوفیلم و رشد کاهش یابد. اندازه گیری درجه حرارت آب، کنترل و ثبت دما در اولویت و بحرانی است و شامل کنترل دمای آب در سیستم‌های آب گرم درگردش، دمای آب خروجی از منبع گرم‌خانه، دمای نگه داری خنک کننده‌های آب است.

۱- *Legionella*

عوامل گسترش لژیونلا در سیستم‌های آب لوله کشی عبارتند از:کیفیت ضعیف آب و ضد عفونی ناکارآمد یا بی‌اثر، مشکلات سیستم توزیع مانند: سکون و سرعت کم جریان آب، طراحی، ساختار و مصالح ساختمانی به‌کار برده شده در سیستم توزیع که به‌رشد میکروبی و تشکیل بیوفیلم کمک می‌کند.

شکل۲۶ – لژیونلا

.

جزوه دوره کارآموزی میکروبیولوژی آب

۱ هدف

هدف از تهیه این جزوه آموزشی آشنایی با روش‌های میکروبیولوژی آب، بر اساس استانداردهای ملی ایران شمارۀهای ۱۰۱۱، ۴۴۰۳ ، ۶۲۶۷ می‌باشد.

یادآوری۱- توصیه می‌شود کارآموزان این دوره با الزامات آزمایشگاهی میکروبیولوژی و نیز استانداردهای ملی ایران شمارۀ ۹۸۹۹ آشنایی داشته باشند.

یادآوری ۲- به‌منظور رعایت نکات ایمنی و سلامت کارکنان آزمایشگاه، توصیه می‌شود آزمون‌ها توسط افراد با تجربه، متخصص و آموزش دیده درخصوص روش‌های میکروبیولوژیکی انجام شود و داشتن مهارت‌های حرفه‌ای میکروبیولوژی در سطح مقدماتی الزامی است.

۲ استانداردهای ملی ایران

استانداردهای ملی ایران مرتبط با آزمون میکروبیولوژی آب آشامیدنی، آب آشامیدنی بسته بندی شده و آب معدنی طبیعی بسته بندی به‌شرح جدول ۲ می‌باشند.

جدول ۲- لیست استانداردهای آب

ردیف	عنوان استاندارد	شمارۀ استاندارد
۱	آب آشامیدنی – ویژگی‌های میکروبیولوژی و روش‌های آزمون	۱۰۱۱
۲	کیفیت آب -شمارش باکتری‌های اشریشیاکلی و کلی فرم -قسمت ۱- روش فیلتراسیون غشایی	۳۷۶۰-۱
۳	میکروبیولوژی آب معدنی طبیعی –ویژگی‌ها و روش‌های آزمون	۴۲۰۷
۴	میکروبیولوژی زنجیره غذایی -روش جامع برای شمارش میکروارگانیسم-ها-قسمت ۱- شمارش کلنی در ۳۰درجه سانتی گراد با استفاده از روش کشت آمیخته	۵۲۷۱
۵	کیفیت آب – شمارش میکروارگانیسم‌ها در آب با استفاده از روش کشت –راهنما	۵۲۷۲-۱
۶	آب – شمارش میکروارگانیسم‌های قابل کشت	۵۳۵۳
۷	کیفیت آب– جستجو و شمارش اسپور کلستریدیوم‌های احیاء کننده سولفیت با استفاده از صافی غشایی	۷۷۲۴-۲
۸	کیفیت آب- جستجو و شمارش انتروکوک‌های روده ای – قسمت دوم : روش صافی غشایی	۷۷۲۵-۱
۹	کیفیت آب- جستجو و شناسایی اشریشیا کلی و کلی‌فرم ها قسمت اول : روش صافی غشایی	۸۶۶۳

ادامه جدول ۲- لیست استانداردهای آب

ردیف	عنوان استاندارد	شمارهٔ استاندارد
۱۰	کیفیت آب- شناسایی و شمارش سودوموناس آئروژینوزا به‌روش صاف کردن غشایی	۸۸۶۹
۱۱	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - آماده سازی آزمایه- سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی- قسمت اول- مقررات کلی برای آماده سازی سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری	۸۹۲۳-۱
۱۲	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه و رقت‌های اعشاری برای آزمون میکروبی- قسمت ۴- مقررات ویژه برای آماده سازی فراورده-ها به‌جز شیر، گوشت، ماهی و فراورده‌های آنها	۸۹۲۳-۴
۱۳	میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام -راهنمای الزامات کلی برای آزمون	۹۸۹۹
۱۴	یخ خوراکی بسته‌بندی شده- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون	۲۱۱۱۳
۱۵	آب آشامیدنی نمک زدایی شده در سامانه‌های صنعتی و خانگی–ویژگی‌های میکروبی	۲۰۷۰۵

۳ اصول اولیه کار در آزمایشگاه میکروبیولوژی

با ورود به‌آزمایشگاه میکروبیولوژی و آغاز کار در این محیط لازم است یکسری اصول اولیه مورد توجه قرار گیرد. بخشی از این اصول و قواعد مربوط به‌ایمنی فرد آزمایش کننده بوده و برخی نیز به‌ایمنی محیط و ابزار آزمایشگاه مربوط می‌باشد.

۳-۱ فضای آزمایشگاه

آزمایشگاه باید دارای سه محل جداگانه برای نمونه‌ها، آزمون و فضای عمومی باشد.

۳-۱- ۱ فضای مربوط به‌نمونه وآزمون

با توجه به‌شرایط خوب آزمایشگاهی داشتن فضاهای جداگانه برای بخش‌های زیرلازم است:

- دریافت و انبارش نمونه‌ها
- آماده‌سازی نمونه‌ها خصوصاً برای مواد خام (مانند : فرآورده‌های پودری حاوی تعداد زیاد میکروارگانیسم‌ها)
- آزمون نمونه‌ها (ازسوسپانسیون اولیه) شامل گرمخانه‌گذاری میکروارگانیسم‌ها
- آزمون میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای احتمالی
- نگهداری سویه مرجع و سایر سویه‌ها
- آماده‌سازی و سترون‌سازی محیط‌های کشت و وسایل

- انبارش محیط‌های کشت و واکنشگرها
- آزمون سترونی مواد غذایی
- آلودگی زدایی
- شستشو و تمیزکردن وسایل شیشه‌ای و سایر تجهیزات
- انبارش موادشیمیایی مخاطره آمیز، ترجیحاً نگهداری درکابینت‌ها، قفسه‌ها، اتاق‌ها

۳-۱-۲ فضای عمومی

فضاهای جداگانه برای موارد زیر توصیه می‌شود:

- ورودی، راهرو، راه پله و آسانسور
- فضای اداری (مانند دبیرخانه، دفترکار و اتاق مستندسازی)
- رختکن و سرویس‌های بهداشتی
- اتاق بایگانی
- انبار
- اتاق استراحت

۳-۲ بهداشت کارکنان

به‌منظور پیشگیری از آلودگی نمونه‌ها، محیط‌های کشت و خطر عفونت کارکنان اقدامات بهداشتی زیر باید انجام شود:

- استفاده از لباس و کفش مخصوص در محیط آزمایشگاه
- ناخن‌ها را تمیز و ترجیحاً کوتاه نگه‌داشتن
- هنگام کار در آزمایشگاه ازصحبت کردن خودداری شود.
- از خوردن و آشامیدن درآزمایشگاه خودداری شود.
- کشیدن پی‌پت با دهان ممنوع می‌باشد.

۳-۳ وسایل و تجهیزات

توصیه می‌شود مطابق باشرایط خوب آزمایشگاهی، کلیهٔ وسایل و تجهیزات تمیز و در محل مناسب نگهداری شوند.

پیش از استفاده بهترا ست و سایل از نظردا شتن شرایط لازم برای کارتصدیق و در صورت لزوم در طی استفاده، عملکرد آن پایش شود.

از وسایل معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی مطابق با استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹ و همچنین وسایل مندرج در جدول ۳ استفاده شود:

جدول ۳- لیست تجهیزات مورد نیاز برای آزمون میکروبیولوژی

ردیف	نام تجهیزات
۱	وسایل و ظروف شیشه‌ای آزمایشگاهی
۲	حمام مایع بادمای ثابت (بن ماری)
۳	فور
۴	میکروسکوپ
۵	ترازوی آزمایشگاهی
۶	pH متر
۷	انکوباتور
۸	اتوکلاو
۹	شمارشگر کلنی
۱۰	سیستم فیلتراسیون تغییر یافته
۱۱	تجهیزات کشت در شرایط اتمسفری
۱۲	سمپلر (میکروپیپت)

وسایل و ظروف شیشه‌ای آزمایشگاهی

شامل انواع پی‌پت، ارلن، ظروف شیشه‌ای درپیچ‌دار، انواع لوله آزمایش، پتری‌دیش و غیره می‌باشد.

شکل ۲۷- وسایل شیشه‌ای

حمام مایع[۱] (بن ماری[۲])بادمای ثابت

این وسیله برای انجام تست‌های سرولوژیک، آگلوتیناسیون، بیوشیمی، تست‌های دارویی، در دمای تثبیت شده کاربرد دارد. حرارت آب دستگاه به‌وسیله یک ترموستات قابل تنظیم است. بهتر است که برای جلوگیری از رسوب املاح بر روی المنت دستگاه از آب مقطر استفاده شود اگر چه در تعداد معدودی از آن‌ها از روغن نیز

۱- Water bath

۲- Bain marie

استفاده می‌شود. داغ شدن بیش ازحد المنت‌ها، به‌علت کم آبی بن ماری، موجب آسیب رساندن به‌دستگاه می‌شود، باید به‌حداقل حجم آب مورد نیاز جهت حفظ کارکرد مطلوب دستگاه توجه گردد.

کاربرد اصلی این دستگاه در آزمایشگاه میکروبیولوژی به‌شرح زیراست:

الف- گرمخانه‌گذاری محیط کشت تلقیح شده در یک دمای ثابت؛

ب- نگهداری محیط کشت جامد سترون ذوب شده در طی آماده‌سازی محیط کشت؛

پ- تعدیل دمای محیط کشت جامد ذوب شده سترون برای استفاده در روش‌های خاص؛

ت- آماده‌سازی سوسپانسیون‌های اولیه یا محلول‌ها در یک دمای کنترل شده؛

ث- فرآیند حرارتی سوسپانسیون‌های اولیه در یک دمای کنترل شده (مانند پاستوریزاسیون)؛

همچنین به‌منظور گرم کردن معرف‌ها و ذوب کردن نمونه‌ها نیز استفاده می‌شود.

شکل ۲۸-انواع حمام مایع با دمای ثابت

.

شمارشگر کلنی[1]

این دستگاه برای شمارش کلنی باکتری‌ها، به‌صورت دیجیتال کاربرد دارد. معمولا دارای صفحه مدرج برای سهولت در شمارش، عدسی با قدرت بزرگنمایی ۸ برابر و ثبت در حافظه در هنگام قطع برق می‌باشد.

شکل ۲۹- شمارش‌گر کلنی

فور[2] یا آون

فور یا آون دستگاهی است که قابلیت تنظیم در دما ۳۰۰°C را دارد و برای استریل یا خشک کردن وسایل شیشه‌ای و یا فلزی که در محیط‌های آزمایشگاهی کاربرد دارند. عمل استریل و

۱- Colony counter

۲- Oven

خشک کردن وسایل فلزی تمیز شده بر اساس استاندارد در دمای °C(۱۰ ±۱۷۰) (از زمان رسیدن به دمای °C۱۷۰) به وسیلهٔ حرارت خشک به مدت زمان حداقلh۱ انجام می‌شود. با بالا بردن تدریجی دمای داخل آون، رطوبت موجود در وسایل شیشه‌ای تبخیر و در نتیجه سبب حذف هر نوع فعالیت زیستی خواهد شد. پیش از سترون‌سازی، همه وسایل فلزی و شیشه‌ای را تمیزکرده، سپس در آون قرار دهید. پس از سترون‌سازی، به‌منظور پیشگیری از شکستن وسایل شیشه‌ای بهتراست پیش ازخارج کردن از آون، آن‌ها را خنک کنید. توصیه می‌شود:

- از قرار دادن مواد قابل اشتعال و آتش‌زا در داخل و اطراف آون دوری شود.
- از قرار دادن محلول‌های اسیدی و یا ایجاد بخارات خورنده در درون آون جلوگیری شود. این کار سبب از بین رفتن سطح درونی آون خواهد شد.
- به‌دلیل عایق بودن دستگاه، چند ساعت طول می‌کشد تا اشیاء داخل دستگاه آون خنک شود، مگر آن که مجهز به‌فن باشد. پس از سترون‌سازی، به منظور پیشگیری از شکستن وسایل شیشه‌ای درب آون را باز نکنید تا اتاقک، ظروف و مواد داخل آن تا دمای حدود °C ۶۰ خنک شوند. اگر هوای سرد ناگهان وارد دستگاه شود ممکن است ظروف شیشه‌ای ترک بخورند.
- کنترل کیفیت و عملکرد دستگاه آون الزامی است. و با آزمون شیمیایی و آزمون بیولوژیک انجام می‌شود.

آزمون شیمیایی: استفاده از ویال شیشه‌ای Browne و مشاهده تغییر رنگ مناسب از قرمز به سبز. از این ویال در هر سری کاری استفاده می‌شود.

آزمون بیولوژیک: استفاده از نوار کاغذی دارای اسپور باسیلوس *سوبتیلیس*[۱]، واریته نایجر ATCC ۹۳۷۲ و یا اسپور باسیلوس *آتروفئوس*[۲]به طور هفتگی توصیه می‌شود.

شکل۳۰ - فور یا آون

۱- *Bacillus subtilis*

۲ -*Bacillus atrophaeus*

میکروسکوپ [1]

میکروسکوپ یکی از وسایل آزمایشگاهی اصلی در آزمایشگاه زیست شناسی است. از دو واژه یونانی میکرو به معنی کوچک و سکوپ، به‌معنی دیدن، گرفته شده است. اصول کلی در تمامی انواع میکروسکوپ‌ها بر اساس عبور نور با طول موج‌های متفاوت از چندین عـــدسی محدب می‌باشد که هر چقدر طول موج نور به‌کار رفته در میکروسکوپ مزبور کوتاه‌تر باشد قدرت تفکیک و یا جـــداکنندگی آن میکروسکوپ بیشتر است. میکروسکوپ‌ها به‌طور کلی به‌دو دسته میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی تقسیم می‌شوند. میکروسکوپ‌های نوری به‌منظور سنجش و مشاهده سلول‌ها با بزرگنمایی نسبتا کم و میکروسکوپ‌های الکترونی برای مشاهده سلول‌ها و ساختارهای سلولی با بزرگنمایی بسیار زیاد مورد استفاده قرار می‌گیرند. سه تعریف مهم در کاربرد میکروسکوپ وجود دارد.

- **بزرگنمایی :** به‌اندازه تصویر نمونه، به‌اندازه واقعی آن گفته می‌شود. در همه میکروسکوپ‌ها ازعدسی‌ها برای بزرگنمایی تصویر استفاده می‌شود. .
- **قدرت تفکیک :** توانایی تشخیص بین دو شیء نزدیک به‌هم به‌صورت دو شیء متمایز و جدا را قدرت تفکیک می‌گویند. قدرت تفکیک به‌کیفیت عدسی‌ها و طول موج نور تابیده شده بستگی دارد. با کاهش طول موج، قدرت تفکیک افزایش می‌یابد.
- **کنتراست :** به‌تفاوت بین بخش‌های مختلف یک نمونه می‌گویند. مثلا یک اندامک تیره‌تر از اندامک دیگر دیده شود.

انواع مختلفی از میکروسکوپ‌ها شامل: استریو[2]میکروسکوپ، میکروسکوپ اینورت[3]، میکروسکوپ فلورسنت[4]، میکروسکوپ دوچشمی[5] می‌باشند.

شکل۳۱- میکروسکوپ نوری

۱- Microscopes

۲ - دارای بزرگنمایی ۵۰ برابر و قابلیت نصب دوربین می‌باشد و در بررسی اجزا و موجوداتی که دارای بعد و حجم می‌باشند.

۳ -این دستگاه دارای قابلیت فازکنتراست و نصب دوربین عکاسی و فیلمبرداری می‌باشد و در بررسی نحوه حرکت، تولید مثل، شناسایی، شمارش زئو و فیتوپلانکتون‌ها و سایر میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌گردد.

۴ - جهت بررسی و مشاهده اجزا و اندامک‌هایی از سلول و میکروارگانیسم‌هایی که با رنگ فلورسنت رنگ آمیزی شده باشند، استفاده می‌گردد. این دستگاه دارای قابلیت عکس برداری از نمونه‌ها و ثبت اطلاعات نیز می‌باشد.

۵ - این دستگاه میکروسکوپ دوچشمی نوری است دارای عدسی‌های۵، ۱۰، ۲۰،۴۰ و ۱۰۰ و قابلیت فاز کنتراست و نصب دوربین عکسبرداری می‌باشد که برای مشاهده معمولی و نمونه‌هایی که رنگ آمیزی نشده‌اند مورد استفاده قرار می‌گیرد.

ترازوی آزمایشگاهی

دستگاهی است که برای توزین اجسام یا مایعات، با دقت بالا و حساسیت بالا به‌کار می‌رود. آزمایشگاه‌ها با توجه به‌نیازشان از ترازوهایی با دقت ۰/۱ g، ۰/۰۱ g، ۰/۰۰۱ g، ۰/۰۰۰۱ g و ۰/۰۰۰۰۱ g استفاده می‌کنند. ترازوهای آزمایشگاهی دقت۱mg و دقت بالاتر آن نیاز به‌محفظه دارند چون به‌علت حساسیت بالای آن‌ها در توزین جریان هوا نیز روی توزین این ترازوها تاثیر می‌گذارد. تمام دستگاه‌های توزین (مانند: باسکول یا ترازو) باید به‌طور دوره‌ای کالیبره[1] شوند. کالیبره کردن باید در مدت زمان‌های معینی با سنگ کالیبره استاندارد انجام شود، گاهی لازم است چند بار در سال یا گاهی بر اساس ضرورت یک یا دو بار در ماه، انجام گیرد.

شکل۳۲- ترازوی آزمایشگاهی

سیستم فیلتراسیون

برای سترون‌سازی محلول‌هایی که ساختمان شیمیایی آنها به‌حرارت حساس هستند مانند: ویتامین‌ها، آنتی بیوتیک‌ها از فیلتر غشایی استفاده می‌شود. همچنین برای آزمون‌های میکروبیولوژی مایعات با حجم بالا مانند: آب، از صافی غشایی استفاده می‌شود. در آزمایشگاه میکروبیولوژی اغلب از فیلتر غشایی‌های از جنس پلاستیک یا سلولز با منافذ ۰/۴۵mμ و ۰/۲۲ mμ استفاده می‌شود.

شکل ۳۳- سیستم فیلتراسیون

اتوکلاو[2]

اتوکلاو برای استریل کردن ابزار پزشکی و آزمایشگاهی در فشار و دمای بالا و با استفاده از بخار آب کار برد دارد این دستگاه قادر است بخار آب اشباع شده با حرارت ۱۲۱°C را ایجاد کند. این

---

۱ - کالیبره کردن یعنی تنظیم درست ترازو با جسمی تا به‌درست ترین شکل کار کند.

۲- Autoclave

درجه حرارت در شرایط بخار ایجاد شده می‌تواند موجب تخریب ساختمان میکروب‌ها و اسپور آنها شود. بر اساس استاندارد در دمای ۱۲۱°C ابزارآلات باید حداقل به‌مدت زمان min ۱۵، تحت فرآیند استریلیزاسیون قرار گیرند. کل مدت زمان کار دستگاه اتوکلاو از فشار دادن دکمه (شروع کار)[۱] تا پایان کار سیستم، مجموع سه زمان (اولیه)[۲]، (استریلیزاسیون)[۳] و (خشک شدن)[۴] است. بررسی دما و زمان اتوکلاو با اندیکاتورهای شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی انجام می‌شود.

- **اندیکاتورهای شیمیایی** : به صورت نوارهای اتوکلاو (چسب اتو کلاو) TST[۵] که سه عامل زمان، بخار و دما را کنترل می‌کند. یا بسته‌های پزشکی هستند که وقتی به دمای معینی رسیدند تغییر رنگ می‌دهند.
- **اندیکاتور بیولوژی** : شامل اسپور باکتری‌های مقاوم به حرارت، مانند *ژئوباسیلوس استئاروترموفیلوس*[۶] است.
- **اندیکاتور فیزیکی** : از آلیاژهایی تشکیل شده‌اند که در دمای مورد نظر ذوب می‌شوند.

شکل ۳۴- اتوکلاو و تعدادی از اندیکاتورهای شیمیایی ، فیزیکی و بیولوژیکی

انکوباتور[۷](اتو)

اتوکلاو برای استریل کردن ابزار پزشکی و آزمایشگاهی در فشار و دمای بالا و با استفاده از بخار آب کار برد دارد این دستگاه قادر است بخار آب اشباع شده با حرارت ۱۲۱°C را ایجاد کند این درجه حرارت در شرایط بخار ایجاد شده می‌تواند موجب تخریب ساختمان میکروب‌ها و اسپور آنها می‌شود. بر اساس استاندارد در دمای ۱۲۱°C ابزارآلات باید ابزارآلات باید حداقل به مدتmin ۱۵، تحت فرآیند استریلیزاسیون قرار گیرند کل مدت زمان کار دستگاه اتوکلاو از فشار دادن دکمه

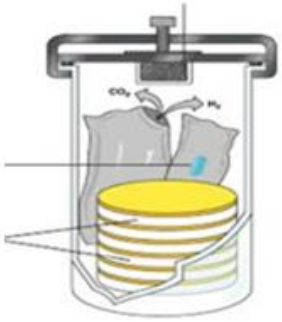
۱- Start
۲- Preheating Time
۳- Sterilization Time
۵- Drying Time
۶- Time, Steam,Tempreture
۷- *Geobacillus stearothermophilus*
۸- Incubator

(شروع کار)[1] تا پایان کار سیستم، مجموع سه زمان (زمان اولیه)[2]، (زمان استریلیزاسیون) و (زمان خشک شدن)[3] است. این دستگاه دارای قابلیت نگهداری دمایی ثابت و توزیع یکنواخت دما است و درجه حرارت مناسب رشد، تکثیر و تشکیل کلنی را فراهم می‌کند انواع انکوباتورهای آزمایشگاهی (معمولی، شیکردار، یخچالدار، و مجهز به‌سیستم تزریق CO_2) در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی و بیولوژی سلولی کاربرد اساسی دارد.

شکل ۳۵- انکوباتور

تجهیزات کشت در شرایط اتمسفری تغییر یافته

این تجهیزات کشت ممکن است یک جار غیر قابل نفوذ یا هر وسیله مناسب دیگری باشد که قادر به‌ایجاد و حفظ شرایط اتمسفری تغییر یافته (مانند: شرایط بی‌هوازی) در طی مدت زمان گرمخانه گذاری محیط کشت، باشد. ترکیب اتمسفر مورد نیاز می‌تواند به‌وسیله افزودن مخلوطی از گاز پس از تخلیه هوای جار به‌وسیله جایگزینی اتمسفر مورد نظر در یک اتاقک یا به‌وسیله هر روش مناسب دیگر مانند: (گاز پک‌های قابل دسترسی از بازار) انجام شود.



شکل ۳۶- تجهیزات کشت در شرایط اتمسفری تغییر یافته

pHمتر[4]

وسیله‌ای الکترونیکی است که جهت سنجش میزانpH (میزان اسیدی یا بازی بودن ماده) به‌کار می‌رود. (اندازه گیری غلظت یون هیدروژنH+ را با استفاده از الکترود حساس به‌یونH+) این ابزار دارای الکترودهای خاصی است که با قرار دادن در محلول، عدد pH را روی صفحه نمایشگر خود

۱- Start

۲- Preheating Time

۳- Drying Time

۴- pH meter

نمـایش مـی‌دهـد. ایـن دسـتگاه متشـکل از دو بخـش اصـلی یعنـی میلـه کاوشـگر [1]و انـدازه‌گیـر[2] اسـت. میله کاوشـگرpH محلـول را تبـدیل بـه‌سـیگنال الکتریکـی کـرده و انـدازه‌گیـر آن را تحلیـل و میـزان pH را نمـایش مـی‌دهـد. انتهـای کاوشـگر از غشـاء شیشـه‌ای و حبـاب ماننـد اسـت کـه نسـبت بـه‌یـون‌هـا حسـاس مـی‌باشـد و رأس الکتـرود داخلـی در داخـل آن قـراردارد. بخـش داخلـی و بیرونـی محفظـه حـاوی KCl و HCl ۰/۱ مـولار(محلـول رفـرانس) اسـت. قبـل از شـروع کـار بـا pH متـر ابتـدا بایـد مطمئن شوید که میله کاوشـگر در محلـول نگهدارنـده یـا محلـول بـاpH=۴ نگهـداری شـده اسـت. در غیـر ایـن صـورت ممکـن اسـتpH متـر در تعیـین pH محلـول مـورد مطالعـه دچـار خطـا شـود. لـذا میلـه کاوشـگر را بـه‌مـدت زمـانh ۲ در آب مقطـر نگهـداری کنیـد و سـپس آن را در محلـول نگهدارنـده قـرار دهید. کاوشـگر را بـه‌وسـیله آب مقطـر بشـویید. بـرای تنظـیم pH متـر، الکتـرود را در محلـولpH=۷ قـرار داده، حداقلsec ۳۰ زمان بدهیـد تـا عـدد ثـابتی را نشـان دهـد. سـپس آن را روی عـدد ۷ تنظـیم کنیـد (pHمتـر عـدد ۷ را نشـان دهـد). دوبـاره الکتـرود را بـا آب مقطـر بشـویید و آن را در محلـولpH =۷ قـرار دهید. اجازه دهید انـدازه‌گیـر عـدد ثـابتی را نشـان دهـد. آن را روی عـدد ۴ تنظـیم کنیـد(pH متـر عـدد ۴ را نشان دهد). حـالا pH متـر شـما تنظـیم شـده و آمـاده انـدازه گیـری pH محلـول‌هـای مـورد آزمـون است قبل از قرار دادن اندازه‌گیر در محلول مورد آزمایش آن را دوباره با آب مقطر بشویید.

شکل ۳۷- pH متر

سمپلر (میکروپیپت)

سـمپلر (میکروپیپـت) ثابـت فقـط حجـم معـین و تعیـین شـده‌ای را جابـه‌جـا مـی‌نمایـد و سـمپلر متغیـر قابل استفاده بر روی حجمی بـین کمتـرین و بیشـترین حجـم تعیـین شـده مـی‌باشـد. حجـم‌هـای تعیـین شـده بـرای سـمپلرهای مختلـف بـینµL ۰/۱ تـاµL ۱۰۰۰۰ مـی باشـد. لازم اسـت درخصـوص نگهـداری و کار با سمپلر به‌نکات زیرتوجه شود.

- نسبت به‌میزان کارکرد و مواد مورد استفاده، سمپلر بصورت دوره‌ای سرویس، روغن‌کاری و کنترل کیفی شود.
- در زمان کار با رک، سمپلر را به‌شدت و با ضربه وارد سرسمپلر نشود و از سفت بودن سرسمپلر روی میکروپیپت اطمینان حاصل شود تا به‌اصلاح سمپلر هوا نکشد.

۱- probe

۲- meter

شکل۳۸- سمپلر

۳-۴ استریلیزاسیون

استریلیزاسیون یا سترون‌سازی به‌معنای از بین بردن تمامی اشکال زنده در یا روی یک محیط آماده است. این اشکال مختلف شامل سلول‌های زنده باکتری‌ها و اسپور قارچ‌ها و... می‌باشد.

روش‌های رایج سترون کردن عبارتند از:

- ✓ **روش حرارتی** : در آزمایشگاه میکروبیولوژی برای استریلیزاسیون محیط‌های کشت و وسایل مورد نیاز روش حرارتی به‌دو صورت خشک (با استفاده از فور) و مرطوب (با استفاده از اتوکلاو) از تاثیر گرما و فشار بخار آب برای کشتن میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود. برای تشخیص بین مواد سترون‌شده و سترون‌نشده می‌توان از نشانگرهای سترون‌سازی استفاده کرد. نشانگرهای بیولوژیک به‌صور مختلف نواری، ویال یا آمپول کوچک موجود هستند. عملکرد سترون‌سازی را می‌توان با استفاده از اندیکاتورهای شیمیایی و اندیکاتورهای بیولوژیک ارزیابی کرد. در پایش بیولوژیک، از اسپورهای *باسیلوس سوبتیلیس*[۱] و *باسیلوس استئاروترموفیلوس*[۲] استفاده می‌شود.
- ✓ **روش شیمیایی** : به‌وسیله مواد ضدعفونی کننده مانند: آب اکسیژنه و انجام واکنش‌های شیمیایی (مانند: رادیکال‌های آزاد) برای سترون کردن استفاده می‌شود.
- ✓ **روش پرتودهی** : به‌وسیله تابش پرتوهای ایکس و گاما نیز می‌توان برای سترون کردن مواد بیولوژیک، داروها، گاز، باند، نخ‌های کات گوت و لوازم یک‌بار مصرف استفاده کرد.
- ✓ **روش فیلتراسیون**: معمولا برای سترون سازی مایعات استفاده می‌شود و شامل عبور دادن مایع از فیلترهای مخصوص می‌باشد.

۳-۵ محیط کشت

کشت و تکثیر میکروارگانیسم‌های قابل کشت، در محیط‌های مصنوعی از مهمترین روش‌های تشخیصی است. برای کشت موفق باید شرایط مناسب برای رشد میکروارگانیسم فراهم گردد. از جمله این شرایط مواد غذایی و مغذی، حرارت، رطوبت کافی، موادآلی و معدنیpH مناسب، حضور یا عدم حضور اکسیژن می‌باشد. بیشتر محیط‌های کشت که در پلیت مصرف می‌شوند، محیط‌های کشت عمومی هستند که برای تهیه مواد غذایی لازم جهت رشد میکروارگانیسم ساخته شده‌اند.

۱-*Bacillus subtilis*

۲- *Bacillus. Stearothermophilus*

محیط‌های کشت عمومی را با اضافه کردن اجزای مغذی که موجب افزایش سریع رشد میکرگانیسم‌های سخت رشد می شوند، غنی می‌کنند. این مواد مغذی بطور سترون، به‌محیط اصلی استریل شده اضافه می-شوند. نمونه‌هایی از این مواد مغذی عبارتند از: شیر بدون چربی، خون گوسفند، زرده تخم مرغ و ....

۳-۵-۱ اجزای تشکیل دهنده محیط کشت

محیط کشت فرمولاسیونی است از مواد، به‌صورت مایع، نیمه جامد یا جامد، که دارای اجزای تشکیل دهنده خاص بوده و به‌منظور تکثیر (همراه با بازدارندگی میکروارگانیسم‌های معین یا بدون باز دارندگی)، شناسایی یا حفظ قابلیت زیستی میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد.

آگار به‌عنوان عامل سفت کننده در محیط کشت‌های جامد و نیمه جامد کاربرد دارد. آگار ترکیبی است پلی ساکاریدی که از دیواره سلولی برخی از گونه‌های جلبک[۱] قرمز (از جنس گراسیلاریا[۲] و جیلیدیوم[۳]) استخراج می‌شود. آگار برای میکروارگانیسم‌ها ارزش غذایی ندارد و هیچ میکروارگانیسمی نمی‌تواند آنرا هضم کند نقطه ذوب آن°C ۹۵ و با رسیدن دمای آن به‌حدود°C ۴۳ شبکه ای ایجاد می‌کند که سبب جامد شدن محیط می‌شود. محیط‌های کشت جامد معمولاً دارای g/Lتا۱۵g/L ۱۳ آگار هستند.

۳-۵-۲ آب

آب قابل استفاده برای آماده‌سازی محیط‌های کشت باید آب مقطر و عاری از مواد تاثیر گذار بر رشد میکروارگانیسم‌ها، در شرایط آزمون مانند: اثر کلراید، اثر آمونیاک و اثر یون‌های فلزات، باشد. آب مقطر به‌روش جوشاندن و تقطیر کردن، عبور آب از روی رزین و تصفیه به‌وسیله فیلترهای اسمز معکوس و نانو فیلتر تولید می‌شود. آب مقطر دارای pH خنثی و در حدود ۷ می‌باشد .دمای جوش آن به‌دلیل خالص بودن پایین‌تر از آب‌های طبیعی بوده و خاصیت خورندگی ندارد و آب مقطر باید در ظروف در دار و ساخته شده از مواد بی اثر مانند: شیشه خنثی، پلی‌اتیلن و غیره نگهداری شود و همچنین توصیه می‌شود، آب مقطر تولید شده هر چه زودتر استفاده شود.

۳-۵-۳ ویژگی محیط کشت

- تمام محیط کشت‌ها باید دارای مواد غذایی ضروری برای رشد میکروب‌ها باشند .
- pH محیط کشت باید در حد معین قبل از استفاده برای کشت تنظیم شود.
- ظروف مورد استفاده برای تهیه محیط‌های کشت باید کاملا تمیز و عاری از مواد خارجی باشند.
- آب مقطر مورد استفاده باید صحیح تهیه شود .

۱-Algae

۲-Gracilari

۳-Gelidium

- درجه حرارت استریل کردن محیط کشت، باید متناسب با نوع مواد مغذی محیط کشت در نظر گرفته شود. درجه‌های بالا باعث از بین رفتن برخی از مواد شیمیایی موجود در محیط کشت می‌شوند.

محیط‌های کشت و معرف‌های مورد استفاده در آزمون باید مناسب برای اهداف آزمون‌های میکروبیولوژی و دارای کیفیت آزمایشگاهی بوده، همچنین باید عاری از مواد سمی یا مهارکننده میکروارگانیسم‌های آزمون باشند. چنانچه محیط‌های کشت به‌صورت آماده در بازار در دسترس باشند، آنها را مطابق با دستورالعمل سازنده تهیه کنید. برای هر محیط کشت و معرف، بهتر است یک محدودیت زمانی برای استفاده تعیین شود. برای کنترل عمل‌کرد و تضمین کیفیت محیط‌های کشت به‌استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۶۶۳ مراجعه کنید.

۳-۵-۴ طبقه بندی محیط کشت

محیط کشت را از جنبه‌های مختلف طبقه بندی می‌کنند:

۳-۵-۴-۱ طبقه بندی محیط کشت بر اساس ترکیبات

۳-۵-۴-۲ طبقه بندی محیط کشت بر اساس قوام فیزیکی

۳-۵-۴-۲-۱ محیط کشت مایع یا آبگوشتی [۱]

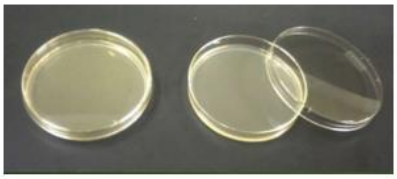
محیط‌های مایع به‌علت نداشتن آگار در ترکیب خود به‌صورت جامد در نیامده و متناسب با نوع میکروارگانیسم و آزمایش‌های مورد نظر می‌توان آنها را در لوله‌های آزمایش، ارلن مایر و یا ظروف دیگر مورد استفاده قرار داد.

یادآوری۱- در بعضی موارد ذرات جامد به‌محیط کشت مایع اضافه می‌شود، مانند محیط کشت "کوکد میت"

یادآوری۲- محیط کشت مایع در لوله‌ها، ارلن‌ها، یا بطری‌ها به‌طور معمول "براث" نامیده می‌شوند.

۳-۵-۴-۲-۲ محیط کشت جامد [۲]

محیط‌های جامد به‌علت دارا بودن آگار در ترکیب خود به‌صورت جامد بوده و در لوله، پتری دیش (پلیت) و یا ظروف دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرد. تشکیل کلنی، تولید پیگمانت، خصوصیات خاص هر کلنی، تشخیص انواع باکتری‌ها، دیدن منطقه همولیز، دلیل به‌کارگیری محیط جامد است.کشت در محیط جامد به‌سه صورت و برای اهداف خاص انجام می‌گیرد :



شکل۳۹ -محیط کشت آگاردار

۱- Liquid or broth media

۲- Solid media

الف کشت در داخل محیط جامد[1]

به‌لوله‌های آزمایش محتوی محیط کشت آگاردار جامد با دمای C° ۴۵، باکتری مورد نظر را تلقیح کرده و لوله را بین دست‌ها تکان می‌دهند تا باکتری‌ها کاملاً با محیط کشت مخلوط شوند، سپس لوله آزمایش را به‌طور عمودی قرار می‌دهند تا محیط بسته شود.

ب کشت‌های عمقی[2]

با این روش می‌توان میکروارگانیسم را بطور عمودی توسط سوزن کشت (آنس) در عمق محیط جامد کشت داد.

پ کشت شیب دار[3]

برای کشت میکروارگانیسم‌ها، سوزن کشت (آنس) در عمق و سطح و/ یا به‌وسیله فیلدوپلاتین حلقه‌ای (لوپ) در سطح شیب‌دار کشت می‌دهند.

شکل۴۰-محیط کشت شیبدار

۳-۵-۴-۲-۳ محیط کشت نیمه جامد[4]

محیط‌های نیمه جامد.که میزان آگار آن نسبت به‌محیط‌های جامد کمتر است ٪۰/۲تا٪۰/۵.

برای مشاهده حرکت باکتری‌ها استفاده می‌شود. مانند:"SIM" چنانچه این نوع محیط کشت هنگام جامد شدن، به‌حالت شیبدار جامد شوند "اسلنت" گفته می‌شود. و اگر محیط کشت در ته ظروف ریخته شود به‌آن "بات" گفته می‌شود.

شکل۴۱- کشت نیمه جامد

۱- Shake Cultures

۲- Stab Cultures

۳- Slant media

۴- Semi Solid media

۳-۵-۴-۳ طبقه بندی محیط کشت بر اساس کاربرد آنها

۳-۵-۴-۳-۱ محیط کشت انتقالی[۱]

محیط کشتی است که به‌منظور نگهداری و حفظ قابلیت زیستی میکروارگانیسم‌ها در ضمن به‌حداقل رساندن تغییر در شمارش در دوره زمانی بین جمع آوری نمونه و کار آزمایشگاهی بر روی آن، طراحی شده است. مانند: "محیط کشت استوارت یا آمیس[۲] "

۳-۵-۴-۳-۲ محیط کشت نگه‌داری کننده [۳]

محیط کشتی است که به‌منظور نگهداری و حفظ قابلیت زیستی میکروارگانیسم‌ها در یک دوره زمانی طولانی طراحی شده، تا از آنها در برابر اثرات نامطلوبی که ممکن است در طی ذخیره‌سازی طولانی مدت به‌وجود آید محافظت کرده و پس از این مدت، به‌آنها قدرت بازیابی دهد.

مانند: "محیط کشت دورستاگ[۴]"، اسلوپ‌های"نوترینت آگار [۵]"

۳-۵-۴-۳-۳ محیط کشت بازیابی [۶]

محیط کشتی است که به‌میکروارگانیسم‌های آسیب دیده و تحت تنش امکان ترمیم و بازیابی می‌دهد تا رشد طبیعی را به‌دست آورند، ولی لزوما باعث تکثیر آنها نمی‌شوند.

مانند" آب پپتونه بافری[۷]"

یادآوری- محیط کشت بازیابی می‌تواند به‌عنوان یک محیط پیش غنی کننده نیز به‌کار رود برای مثال" آب پپتونه بافری"

۳-۵-۴-۳-۴ محیط کشت پیش غنی کننده[۸] و غنی کننده [۹]

به‌طور کلی محیط کشت مایع به‌دلیل ترکیبات تشکیل دهنده آن، شرایط مطلوب خاصی برای رشد و تکثیر میکروارگانیسم را فراهم می‌کند. مانند:"تریپتون سوی براث"

۳-۵-۴-۳-۱ محیط کشت غنی کننده انتخابی[۱۰]

۱- Transport medium

۲- Stuart or amies transport medium

۳- Preservation medium

۴- Dorset agar medium

۵- Nutrient medium

۶- Resuscitation medium

۷- Buffered peptone water

۸- Pre-enrichmen medium

۹- Enrichmen medium

۱۰- Selective enrichment medium

محیط کشت غنی کننده‌ای است که به‌میکروارگانیسم‌های خاص امکان رشد می‌دهد و به‌واسطه یک ماده مهار کننده، رشد تمام میکروارگانیسم‌ها به‌جز میکروارگانیسم مورد نظر را کاملاً یا تا حدودی مهار می‌کنند. مانند: محیط کشت "پپتون سوی راپاپورت- واسیلادیس[۱] "

۳-۵-۴-۳-۴-۲ محیط کشت غنی کننده غیر انتخابی[۲]

این محیط به‌طیف وسیعی از میکرو ارگانیسم‌ها امکان رشد می‌دهد. مانند:"برین هارت اینفیوژن براث"

۳-۵-۴-۳-۴-۳ محیط کشت جداکننده[۳]

محیط کشت جامد یا نیمه جامدی است که به‌میکرو ارگانیسم‌ها امکان رشد می‌دهد.

۳-۵-۴-۳-۴-۴ محیط کشت جداکننده انتخابی [۴]

محیط کشتی که به‌میکرو ارگانیسم خاص و هدف امکان رشد می‌دهد و از رشد سایر میکروارگانیسم‌ها به‌طور کامل یا قسمتی جلوگیری می‌کند مانند:"XLD آگار"

۳-۵-۴-۳-۴-۵ محیط کشت جداکننده غیر انتخابی [۵]

محیط کشتی که در آن میکروارگانیسم به‌صورت انتخابی، مهار نمی‌شوند. مانند:"نوترینت آگار"

۳-۵-۴-۳-۴-۶ محیط کشت انتخابی کروموژنیک [۶]/ فلوروژنیک [۷]

محیط کشت کروموژنیک / فلوروژنیک دارای ترکیبات انتخابی است که همه یا بخشی از فلور همراه با میکرو ارگانیسم های هدف در نمونه را مهار می‌کند و منجر به‌تقویت و رد یابی دقیق می‌شود مانند: "TBX آگار"،"MUG/EC"

۳-۵-۴-۳-۴-۷ محیط کشت افتراقی[۸]

محیط کشتی است که مشخصات و خصوصیت فیزیولوژیک یا بیو شیمیایی میکروارگانیسم‌ها را به‌منظور شناسایی فراهم می‌کند. مانند: "ترجیتول۷"و"TTC، TBX"

۳-۵-۴-۳-۴-۸ محیط کشت شناسایی [۹]

محیط کشت با قدرت تشخیصی بالا برای ایجاد یک واکنش تشخیصی خاص که نیاز به‌استفاده از محیط کشت‌های تاییدی ندارد. مانند: "بایل اسکولین آزاید[۱۰] "

۳-۵-۴-۳-۴-۹ محیط کشت شمارش [۱۱]

۱- Rappaport-Vassiliadis (RV)

۲- Non- selective enrichment medium

۳- Selective isolation medium

۴- Selective enrichment medium

۵- Non-selective isolation medium

۶- Chromogenic selective culture medium

۷- Fluorogenic selective culture medium

۸- Differential medium

۹- Identification medum

۱۰- Bile Esculin Azide Agar (Enterococcus Selective Agar)

۱۱- Enumeration medium

محیط کشـــت انتخابی یا غیر انتخابی که برای شـــمارش میکروارگانیســـم‌ها به‌کار می‌رود. مانند:"برد پارکر[۱] "یست اکسترکت آگار [۲]"

یادآوری-محیط کشت شمارش می‌تواند خصوصیات محیط کشت بازیابی و/یا محیط کشت غنی کننده را داشته باشد.

۳-۵-۴-۳-۴-۱۰ محیط کشت تاییدی [۳]

محیط کشتی است که برای شناسایی یا تعیین هویت مشخصات میکروارگانیسم‌ها پس از یک مرحله بازیابی مقدماتی و/یا غنی سازی و/یا جداسازی، به‌کار گرفته می‌شود. مانند:"کلینگر آیرون آگار[۴]"

۳-۵-۴-۳-۴-۱۱ محیط کشت دارای ترکیبات خنثی کننده [۵]

محیط کشت انتقالی، محیط کشت رقیق کننده یا محیط کشت دارای ترکیبات خنثی کننده‌ای است که برای غیرفعال کردن عوامل در سطح و/ یا ضد عفونی کننده یا سایر عوامل میکروب‌کش به‌کار می‌رود.

۳-۵-۴-۳-۴-۱۲ محیط کشت با موارد استفاده متعدد

محیط کشتی است که در دسته بندی‌های متعدد قرار می‌گیرد. مانند: "بلاد آگار[۶]"که یک محیط بازیابی است، می‌تواند به‌عنوان محیط کشت جداکننده و همچنین محیط کشت افتراقی برای ردیابی همولیز به‌کار رود. و یا "بافر پپتون واتر" که یک رقیق کننده است می‌تواند یک محیط کشت پیش غنی کننده نیز باشد.

۳-۵-۴-۳-۴-۱۳ محیط کشت مرجع

محیط کشـــت غیر انتخابی مانند:"تریپتون ســـوی آگار[۷]"که برای ارزیابی مقایســـه‌ای کنترل عمل‌کرد محیط کشت به‌کار می‌رود.

۳-۵-۴-۴ طبقه بندی محیط کشت بر اساس آماده سازی

۳-۵-۴-۴-۱ محیط کشت آماده مصرف

محیط کشت مایع، جامد یا نیمه جامدی است که درپلیت‌ها، به‌بطری‌ها، لوله‌ها، یا ظروف دیگر، به‌شکل آماده مصرف، یا به‌شکل آماده مصرف پس از ذوب کردن یا به‌شکل آماده مصرف پس از ذوب کردن مجدد و افزودن مکمل به‌کار می‌رود.

۳-۵-۴-۴-۲ محیط کشت کامل شده

محیط کشتی است که برای تلقیح آماده باشد.

۱- Baird-Parker Agar

۲- Yeast Extract Agar

۳- Confirmation medium

۴- Kligler Iron Agar (KIA)

۵- Medium containing nutralisers

۶- Blood agar

۷- Tryptic Soy Agar(TSA)

۳-۵-۴-۴-۳ محیط کشت آماده مصرف بعد از ذوب مجدد

محیط کشت ذوب مجدد شده‌ای است که برای استفاده در روش کشت آمیخته یا برای ریختن در پلیت‌ها به کار می‌رود.

۳-۵-۴-۴-۴ محیط کشت آماده مصرف بعد از ذوب مجدد و افزودن مکمل

محیط کشتی است که باید قبل از استفاده (محیط کشت آماده مصرف کامل نشده) ذوب مجدد شده، مکمل افزوده و توزیع شود.

مانند"تریپتوز سولفیت سیکلو سرین (TSC)آگار" ، "برد پارکر آگار" یا "رابیت پلاسما فیبرینوژن (RFP)آگار"

۳-۵-۴-۴-۵ محیط کشت آماده شده از فرمولاسیون‌های بدون آب تجارتی

محیط کشتی است که به‌صورت خشک موجود است، و لازم است قبل از مصرف، به‌آن آب افزوده شده و فراوری گردد.

۳-۵-۴-۴-۶ محیط کشت آماده شده از اجزای مجزا

محیط کشتی است که به‌وسیله آزمایشگاه میکروبیولوژی کاملاً از ترکیبات مجزای خود تهیه می‌شود.

۳-۶ آماده سازی و استریلیزاسیون محیط‌های کشت در آزمایشگاه

۳-۶-۱ آماده سازی صحیح محیط کشت یکی از مراحل اصلی برای تضمین کیفیت نتایج آزمون میکروبیولوژی است که باید با دقت خاصی انجام شود.

با رعایت دستور العمل تولید کننده، و با توجه به‌نشانه گذاری آن، مقدار لازم از محیط کشت (پودر خشک) با دقت توزین می‌شود. و با آب خالص (مقطر)، آب بدون املاح یا آب یون زدایی شده با استفاده از اسمز معکوس یا کیفیتی معادل آن، در داخل ارلن مخلوط کنید سپس در صورت لزوم همراه با گرم کردن، سریعاً یکنواخت کنید. و به‌حجم برسانید.

آلودگی میکروبی از 10^2 *cfu*/mL بیشتر نباشد و طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵۲۷۱ پایش شود.

هدایت الکتریکی[1] آب استفاده شده برای تهیه محیط کشت نباید بیشتر از ۲۵ میکروزیمنس[2] باشد و طبق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۰۹۷ پایش شود.

۳-۶-۲ pH

pH محیط کشت را با استفاده از pH متر اندازه گیری کنید. در صورت لزوم، قبل از سترون‌سازی pH تنظیم شود، به‌این ترتیب که pH محیط کشت پس از سترون‌سازی و رسیدن دما به $25\ ^{\circ}C$، باید در محدوده مورد نظر ۰/۲± واحد اندازه گیری باشد، مگر اینکه مقادیر دیگری توصیه شده باشد.pH معمولاً با استفاده از محلول سدیم هیدروکسید با غلظت تقریبی: ۴۰g/L یا هیدروکلریک

۱ - هدایت الکتریکی آب نشان دهنده میزان املاح هادی موجود در آب می‌باشد. واحد هدایت الکتریکی که آن را با EC نیز نمایش می‌دهند.

۲ - میکروزیمنس بر سانتیمتر واحد هدایت الکتریکی ویژه آب می‌باشد که در سیستم SI با µSiemens/cm نشان داده می‌شود.

اسید انجام می‌شود. اگر تنظیم pH پس از سترن‌سازی انجام شود، باید از محلول‌های سترون استفاده شود.

۳-۶-۳ توزیع

محیط کشت را در ظروف مناسب توزیع کنید بطوری که مطمئن شوید فضای کافی مناسب برای جلوگیری از سر رفتن محیط در طی فرآیند سترون سازی وجود ندارد.

۳-۶-۴ سترون سازی

محیط‌های کشت تهیه شده را در روز آماده سازی سترون کنید. سترون سازی محیط‌های کشت و معرف‌ها معمولاً با استفاده از حرارت مرطوب با استفاده از اتوکلاو یا فیلترا سیون انجام می شود. بعضی از محیط‌های کشت به‌سترون‌سازی با اتوکلاو نیاز ندارند، ولی می‌توان آنها را با دمای جوش سترون نمود. برای مثال: محیط‌های کشت آنتروباکتریاسه‌ها که حاوی برلیانت گرین بوده و بخصوص به‌حرارت و نور حساس هستند و بهتر است به سرعت پس از جوشیدن سرد شده و در برابر نور شدید محافظت شوند. همچنین، بعضی از معرف‌ها را نیز می‌توان بدون سترون‌سازی مورد استفاده قرار داد. در همه موارد طبق دستورالعمل‌های تولیدکننده یا استانداردهای مناسب انجام دهید. پس از سترون کردن، محیط‌ها را در شرایطی که از تغییر ترکیبات جلوگیری کند، نگهداری کنید برای مثال: از نور و خشک شدن محافظت کنید. اگر محیط کشت بلافاصله استفاده نشوده یا شرایط دیگری در استاندارد خاصی مشخص نشده باشد، و در یخچال در دمای ۵ °C ±۳°C نگهداری کنید. اگر محیط‌های کشت در یخچال نگهداری شود معمولاً توصیه می‌شود مدت زمان نگهداری برای پلیت‌ها از دو تا چهار هفته و برای بطری‌های بسته شده و لوله‌ها سه تا شش ماه بیشتر نشود.
برای ذوب مجدد، محیط‌های کشت را به‌وسیله قرار دادن آن در حمام آب جوش و یا هر فرآیند دیگری که همان نتیجه را دهد، ذوب کنید (مانند: قرار دادن در بخار اتوکلاو) محیط کشت ذوب شده، در حمام آب گرم با دمای تنظیم شده، با دمای ۴۷°C تا ۵۰°C، خنک کنید.

۳-۶-۵ افزودن مکمل‌ها

مکمل‌هایی که حساس به‌حرارت هستند، باید بعد از اینکه دمای محیط به‌کمتر از ۵۰°C رسید، به‌محیط اضافه شوند. مکمل سترون شده باید قبل از افزودن به‌محیط آگاردار به‌دمای اتاق برسد. افزودن مکمل‌های مایع سرد ممکن است سبب بسته شدن آگار یا تشکیل پرک‌های شفاف شود و از توزیع مناسب جلوگیری کند. مکمل‌ها را در محیط کشت به‌آرامی و کامل مخلوط کرده و به‌سرعت در ظروف نهایی تقسیم کنید. در هر صورت طبق دستورالعمل تولیدکننده عمل کنید.

۳-۶-۶ آماده سازی محیط‌های کشت جامد در پلیت‌ها

محیط کشت آگاردار ذوب شده را در پلیت‌ها بریزید تا حداقل ضخامت آن۳mm گردد. برای مثال: در ظروف با قطر ۲۰mm، معمولا ۱۸mLتا۲۰mL محیط کشت آگاردار کافی است یا مقداری که در استانداردهای

مربوط بیان شـــده اســـت.اگر پلیت‌ها باید نگهداری شـــوند، یا زمان گرمخانه‌گذاری آنها بیش از۷۲h به‌طول می‌انجامد، یا دمای گرمخانه‌گذاری بیش از ۴۰ °C است، محیط کشت بیشتری ممکن است در پلیت‌ها ریخته شود. پلیت‌ها را به‌صورت در بسته روی یک سطح افقی و خنک قرار دهید تا آگار سرد شده و ببندد.

۳-۶-۷ نگهداری و مدت زمان نگه داری محیط کشت آماده شده

شـــرایط نگه‌داری، تاریخ انقضـــاء و توصـــیه‌های دیگر مربوط به‌محیط کشـــت و پلیت‌های آگاردار آماده شـــده تجارتی بهتر است طبق دستورالعمل تولیدکننده باشد.

۳-۷ آماده سازی نمونه

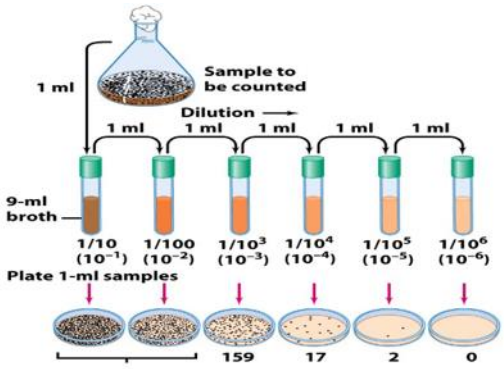
برای دســـتیابی به‌توزیع یکنواخت میکروارگانیســـم‌ها، پیش از انجام آزمون، نمونه‌ها را با تکان دادن شـــدید کاملا مخلوط کنید. و بسته به‌ماهیت نمونه و میزان آلودگی مورد انتظار، رقت‌های لازم را تهیه کنید.

برای آزمون شمارش، رقت‌های دهدهی را با رعایت شرایط اسپتیک تهیه کنید. برای رقت‌های۱۰برابر، ۹mL یا ۹۰mL از محلول‌های رقیق کننده را به‌ارلن یا لوله‌های سترون اضافه کنید با انتقال یک حجم نمونه به ۹ حجم محلول رقیق کننده، رقت‌های۱۰ برابر را تهیه کنید.

یادآوری۱-توصیه می‌شود، دمای محلول رقیق کننده‌ها تقریبا برابر با دمای محیط آزمایشگاه باشد.

یادآوری۲-برای شمارش اسپورها، بلافاصله پس از تهیه سوسپانسیون اولیه باید شوک حرارتی دهید، سپس به‌سرعت خنک کنید.

برای تهیـه رقـت‌هـای دهـدهی بعـدی، ۱mL از سوسپانسـیون اولیـه را، بـا اسـتفاده از پـی‌پـت سـترون بـه ۹mL محلول رقیق کننـده سـترون کـه دمـای مناسـبی دارنـد، منتقـل کنیـد و بـا اسـتفاده از یـک همـزن مکانیکی به‌مدت زمـان۵sec تـا ۳sec مخلـوط کنیـد. رقـت بدسـت آمـده$^{۲-}$۱۰ مـی‌باشـد. در صـورت لـزوم، بـه‌همـین ترتیـب و رقـت‌هـای بعـدی ($^{۳-}$۱۰ ،$^{\cdots}$) را تهیـه کنیـد تـا حـدی کـه بـرای شـمارش میکروارگانیسم‌ها مناسب باشـند. مراقـب باشـید، پـی‌پـت را بـیش از۱cm داخـل سوسپانسـیون اولیـه فـرو نکنید و از تماس پـی پـت حـاوی سوسپانسـیون اولیـه بـا محلـول رقیـق کننـدۀ سـترون جلـوگیری کنیـد. هنگـام آمـاده سـازی رقیـق کننـده سوسپانسـیون اولیـه و رقـت‌هـای اعشـاری بعـدی، زمـان بـین پایـان آماده سـازی تـا لحظـه تمـاس مـاده تلقیحـی بـا محـیط کشـت یـا آبگوشـت غنـی کننـده نبایـد بـیش از ۴۵ min باشد.



شکل ۴۲- سوسپانسیون اولیه و رقت ها اعشاری بعدی

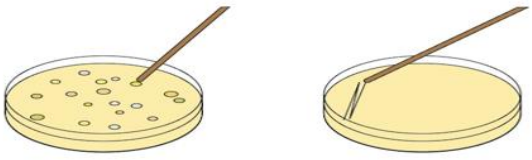
۳-۷-۱ روش‌های کشت در میکروبیولوژی

کشت در پلیت به‌سه روش قابل انجام است.

- کشت خطی[۱]
- کشت سطحی[۲]
- کشت آمیخته یا پور پلیت[۳]
- روش صافی غشایی

۳-۷-۱-۱ کشت خطی

در این روش از محیط پیش ریخته استفاده می‌شود. به‌این ترتیب که ابتدا به‌وسیله یک حلقه کشت سترون شده مقداری از کلنی باکتری را برداشته و آن را روی سطح محیط پیش ریخته به‌صورت خط‌های موازی و در چند جهت‌کشیده می‌شود. در کشت‌های خطی برای به‌دست آوردن کلنی‌های تک، پلیت را به ۴ قسمت تقسیم می‌شود و با نوک حلقه کشت که محتوی کلنی باکتری است، به‌صورت خط‌های موازی کشیده و بعد خطوط را در منطقه دوم از انتهای خط انتهایی منطقه اول در جهت دیگر ادامه داده و در منطقه سوم و چهارم هم به‌همین صورت عمل می‌شود. خصوصیت این روش این است که وقتی خطوط موازی را روی سطح محیط می‌کشید به‌ترتیب از تراکم باکتری‌ها کاسته می‌شود و در انتهای خط، تراکم باکتری بسیار کمتر خواهد بود تا جایی که در منطقه چهارم دسترسی به‌کلنی‌های تک وجود خواهد داشت. که کلنی خالص نامیده می‌شود.



شکل ۴۳- کشت خطی

۱- Surface plate
۲- Streak plate
۳- Pour plate

در مورد محیط‌های کشت باکتریایی که بصورت مایع می‌باشند برای انجام کشت خطی روی محیط پیش ریخته فقط یکبار حلقه کشت از سوسپانسیون میکروبی برداشته، روی محیط کشت از پیش ریخته قرار داده و به‌صورت خطوط موازی در چند جهت کشیده می‌شود.

۳-۷-۱-۲ کشت سطحی

این روش کشت اغلب برای شمارش میکروارگانیسم‌های فرآورده‌های مورد مصرف انسان و خوراک دام، نمونه های محیطی و همچنین در مورد فرآورده‌هایی که دارای میکروارگانیسم‌های حساس به‌گرما[۱] هستند و احتمال دارد قسمت معنی داری از فلور کل را تشکیل دهند (مانند: ارگانیسم‌های سرماگرا[۲])کاربرد دارد.

همچنین در غذاهای خشک شده، غذاهای یخزده و منجمد، که ممکن است دارای میکروارگانیسم‌های حساس به‌گرما باشند یا فرآورده‌هایی که دارای باکتری‌های هوازی اجباری هستند که احتمال دارد قست معنی‌داری از فلور کل را تشکیل دهند (مانند:گونه‌های پسودوموناس[۳]) و فرآوردهایی که داری ذرات کوچکی هستند که تشخیص آنها از کلنی‌های تشکیل شده در کشت آمیخته به‌سختی انجام می‌شود، همچنین فرآورده‌هایی که رنگ شدید آنها باعث جلوگیری از تشخیص کلنی در کشت آمیخته می شود، فرآورده‌هایی که برای تشخیص بین انواع مختلف کلنی به‌عنوان قسمتی از ارزیابی کمیت غذا مورد نیاز است و بالاخره برای کشت میکروارگانیسم‌هایی است که قابلیت رشد و تشکیل کلنی در سطح محیط کشت جامد را دارند، به‌کار برده می‌شود. در این نوع کشت، از محیط پیش ریخته استفاده می‌شود. در روش سطحی، برای پلیت‌هائی با قطر ۹۰mm تا ۱۰۰mm، حجم آزمونه و یا رقتی از آن باید بین ۰/۱ mL تا ۰/۵ mL باشد. رقت را باید به‌گونه‌ای انتخاب کرد که در آن تعداد مورد انتظار کلنی‌های تشکیل شده بین ۱۰ تا ۱۵۰ کلنی تیپیک باشد. تعداد کل کلنی‌های تیپیک و غیر تیپیک روی پلیت باید کمتر از ۲۰۰ کلنی باشد.

یاد آوری – تعداد کل کلنی‌های قابل شمارش، به‌اندازه کلنی‌ها بستگی دارد و برای کلنی‌های بزرگتر تعداد کلنی‌ها ممکن است کاهش یابد.

پلیت‌های دارای حدود ۱۵ mL محیط کشت را آماده و نشانه گذاری کنید و در صورت لزوم سطح محیط کشت پیش از استفاده خشک می‌شود. معمولا ۰/۱ mL از آزمایه (فرآورده‌های مایع) و یا ۰/۱ mL از سوسپانسیون اولیه (سایر فرآورده‌ها) در سطح محیط جامد از پیش ریخته تلقیح شده و توسط میله پخش کننده یا وسایل مکانیکی سترون روی سطح پخش می‌شود. و بعد از جذب ماده تلقیحی، پلیت‌ها گرمخانه‌گذاری می‌شود.

یادآوری-توجه داشته باشید که هنگام انجام کشت سطحی باید سطح محیط خشک باشد.

۱- Heat-sensitive organisms

۲- Psychrotrophic

۳- Pseudomonas spp.

شکل ۴۴ -کشت سطحی

هنگام تهیه محیط کشت به صورت پیش ریخته، ممکن است بخار آب روی درب پلیت و سطح محیط جمع شود برای خشک کردن پلیت‌ها توجه به‌نکات زیر مهم است.

الف- میزان رطوبت مهم است زیرا رشد بهینه باکتری‌ها به‌شرایط رطوبت درون و سطح محیط کشت بستگی دارد. از دست دادن رطوبت زیاد ممکن است منجر به‌افزایش غلظت مواد باز دارنده در محیط‌های کشت انتخابی و کاهش فعالیت آب در سطح محیط کشت شود.

ب- در مورد باکتری‌هایی که کلنی آنها به‌سرعت روی محیط کشت پخش نمی‌شود و سطح محیط کشت در پلیت‌ها خشک به‌نظر می‌رسد، خشک کردن سطح پلیت ضرورت ندارد. در این موارد می‌توانید خشک کردن سطح پلیت را حذف کنید. زیرا باعث افزایش احتمال آلودگی و از دست دادن بی‌مورد رطوبت می‌شود.

پ- درجه حرارت و زمان خشک شدن را به‌گونه‌ای انتخاب کنید که احتمال آلودگی تا حد ممکن پایین نگه داشته شود و درجه حرارت اثر سوئی روی کیفیت محیط کشت نداشته باشد. زمان خشک شدن به‌میزان بخار آب سطح محیط کشت درون پلیت‌ها بستگی دارد.

ت- چنانچه برای خشک شدن کردن پلیت‌ها از اتاقک با جریان هوای لایه‌ای[1] استفاده نمی‌کنید، برای پیشگیری از آلودگی پلیت‌ها، سطح محیط کشت را پایین قرار دهید.

ث- در عمل پلیت‌ها را با قرار دادن در دمای ۲۵ °C تا ۵۰ °C به‌گونه‌ای که سطح آگار پلیت‌ها به طرف پایین باشد و در پلیت نیمه باز باشد، خشک می‌شود.

خشک کردن پلیت را تا زمان ناپدید شدن قطرات در سطح آگار یا روی در پلیت ادامه دهید بیش از آن خشک کردن را ادامه ندهید همچنین می‌توانید پلیت‌ها را در اتاقک ایمنی با جریان هوای لایه‌ای در دمای محیط برای مدت ۳۰ min تا ۶۰ min، یا به‌مدت یک شب به‌صورت در بسته در درجه حرارت محیط خشک کنید. همچنین می‌توانید پس از ریختن محیط کشت در پلیت در صورت تجمع حباب هوا، آنها را با شعله دادن سطح محیط حذف کنید. اینکار باعث سترون شدن سطح محیط کشت هم می‌شود.

۳-۷-۱-۳ کشت آمیخته یا پورپلیت

در روش کشت آمیخته، حجم آزمونه و یا رقتی از نمونه بسته به‌اندازه پلیت و حجم محیط کشت مورد استفاده بین ۰/۱ mL تا ۵ mL است. رقت را باید به‌گونه‌ای انتخاب کرد که تعداد مورد انتظار کلنی‌های تیپیک تشکیل شده روی پلیت‌هایی با قطر ۹۰ mm تا ۱۰۰ mm بین ۱۰ تا ۱۵۰ کلنی باشد. تعداد کل کلنی‌های تیپیک و غیر تیپیک روی پلیت باید کمتر از ۳۰۰ کلنی باشد.

۱- Laminsr-flow safety cabinet

یادآوری – تعداد کل کلنی‌های قابل شمارش، به‌اندازه کلنی‌ها بستگی دارد و برای کلنی‌های بزرگتر تعداد کلنی‌ها ممکن است کاهش یابد.

محیط کشت مورد استفاده را در حمام آب جوش ذوب کنید از سایر فرآیندهای مناسب مانند: قرار دادن در جریان بخار آزاد اتوکلاو و یا ماکروویو و سایر فرآیندهای مناسب که ترکیب دما و زمان آن برای آماده سازی محیط کشت، صحه‌گذاری شده است نیز می‌توانید استفاده کنید از حرارت دادن زیاد محیط کشت خودداری کنید و آن را به‌محض ذوب شدن از حمام خارج کنید و محیط کشت ذوب شده را در حمام آب با دمای ۴۵ °C قرار داده تا دمای آن به ۴۵ °C برسد پس از تهیه و آماده سازی پلیت‌ها و دقت‌های لازم، آزمونه را کاملا مخلوط و در پلیت‌ها تقسیم کنید.

یادآوری۱–محیط‌های کشت را برای مدت زمان بیشتر از۴h به‌صورت ذوب شده نگه داری نکنید

یادآوری ۲- محیط‌های کشت آگاردار را بیشتر از یکبار ذوب نکنید.

ارلن دارای محیط کشت را از حمام آب خارج کنید پس از خشک کردن قسمت بیرونی آن، گردن ظرف را از روی شعله عبور دهید. محیط کشت را بدون تاخیر به‌پلیت‌ها به‌گونه‌ای بیافزایید که ایجاد شوک حرارتی به‌حداقل برسد.

به طور کلی برای یک ۱ml تا ۲ml آزمونه مقدار ۱۵ mm تا ۲۰mm محیط کشت سترون که حرارت آن به‌حدود۴۵°Cرسیده، استفاده می‌شود. برای حجم‌های بیشتر آزمونه، مقدار محیط کشت را بر همین اساس تنظیم کنید. سپس با حرکات دورانی به صورت۸ کاملا مخلوط می‌شود. و تا سرد شدن، روی سطح افقی قرار گرفته و محیط جامد می‌شود. پس از جامد شدن آگار، پلیت‌ها بدون تاخیر در گرمخانه قرار می‌گیرد.

شکل۴۵-کشت پورپلیت

۳-۷-۱-۳-۱ کشت‌های دو لایه

در کشت دو لایه، پس از تلقیح و کشت آمیخته یا پور پلیت در صورت لزوم سطح محیط کشت با باکتری، مجددا با یک لایه نازکی از همان محیط کشت پوشانده می‌شود در این حالت به‌آن کشت دو لایه هم گفته می‌شود. پس از بسته شدن محیط، پلیت‌ها را به‌طور واژگون در گرمخانه قرار می‌دهند تا از ریختن قطرات آب درسطح محیط جلوگیری گردد.

۳-۷-۱-۴ صافی غشایی

در ایـن روش آزمونـه از صـافی غشـایی عبـور داده مـی‌شـود و میکروارگانیسـم‌هـای مـورد جسـتجو روی سطح صافی باقی می‌ماننـد سـپس صـافی روی محـیط کشـت آگـار یـا پـد جـاذب اشـباع شـده از محـیط کشـت قـرار داده مـی‌شـوند پـس از گرمخانـه‌گـذاری، کلنـی‌هـا روی سـطح صـافی تشـکیل مـی‌شـوند همچنین برای میکروارگانیسم‌هـای خـاص ماننـد بـاکتری‌هـای بـی‌هـوازی، صـافی را مـی‌تـوان بـه‌گونـه‌ای در پلیت قرار داد که سطح آن به‌طـرف پـایین باشـد و بـا لایـه دیگـری از محـیط کشـت آگـاردار پوشـانده شود.

یادآوری ۱- انتخاب اندازه منافذ فیلتر غشایی بستگی به‌میزان کدورت نمونه دارد .

یادآوری ۲- فیلترهای غ شایی باید بدون خ صو صیات مهارکنندگی یا تحریک ر شد باکتری با شند و مرکب مورد ا ستفاده در چاپ خطوط شطرنجی نباید بر رشد باکتری‌ها اثر بگذارد. هر بهر فیلتر غشایی باید مطابق استاندارد ملی ایران به‌شماره ۷۹۹۳ آزمون شود، به‌ویژه وقتی که استفاده از برندهای مختلف فیلتر غشایی باعث نتیجه متفاوت در بازیافت و ایجاد رنگ شود.

۳-۷-۱-۴-۱ روش صافی غشایی

۳-۷-۱-۴-۱-۱ آزمونه

حـداکثر حجـم آزمـون بـه‌قابلیـت صـاف شـدن نمونـه آب و صـافی غشـایی مـورد اسـتفاده بسـتگی دارد. ایـن روش بـرای آب‌هـایی کـه ماننـد آب آشـامیدنی کـه دارای مقـادیر کمـی از ذرات کلوئیـدی (ماننـد آهن) به‌صورت معلق هستند، کـار بـرد دارد بـا صـافی‌هـای بـا انـدازه روزنـه ۰/۴۵ µm امکـان صـاف کـردن چنـدین لیتـر از چنـین آب‌هـایی بـا اسـتفاده از یـک صـافی و در نتیجـه دسـتیابی بـه‌حساسـیت بـالای آزمـون وجـود دارد. اگـر چـه بـرای برخـی از میکروارگانیسـم‌هـا (ماننـد: اسـپور میکـرو ارگانیسـم‌هـا و لژیونلا) استفاده از صـافی‌هـایی بـا انـدازه روزنـه ۰/۲ µm لازم اسـت.حجم نمونـه مـورد آزمـون و یـا رقتـی از آن باید بـه‌گونـه‌ای انتخـاب شـود کـه تعـداد مـورد انتظـار کلنـی تیپیـک تشـکیل شـده روی صـافی بـا قطر ۴۷mL تا ۵۰mL حـدود ۱۰ تـا ۱۰۰ کلنـی باشـد تعـداد کـل کلنـی‌هـای تیپیـک و غیـر تیپیـک روی صافی باید کمتر از ۲۰۰ کلنی باشد.

یاد آوری۳ – توجه داشته باشید که تعداد کل کلنی‌های قابل شمارش به‌اندازه کلنی بستگی دارد و تعداد با بزرگ شده کلنی کاهش می‌یابد.

۳-۷-۱-۴-۱-۲ صاف کردن

دستگاه‌های صافی سترون را به‌منبع خلاء وصل کنید. روی صفحهٔ متخلخل پایهٔ صافی یک صافی غشائی سترون را که سطح چهارخانهٔ آن به‌طرف بالا باشد، قرار دهید. قسمت بیرونی صافی غشائی را با استفاده از گیرهٔ سر پهن محکم کنید. قیف سترون را روی پایهٔ صافی قرار دهید. درحالی که پمپ خلاء خاموش است یکی از آزمونه‌های زیر را درون قیف بریزید.

الف–حجم مشخصی از نمونه و یا رقتی از آن که کاملاً مخلوط شده باشد (حداقل۱۰mL)

ب–محتوای ظرف حاوی آزمونه و مقدار کافی محلول رقیق کننده برای رساندن حجم کل به‌حداقل ۱۰mL

پ-چنانچه آزمونه با پی‌پت اندازه گرفته می‌شود حداقل ۱۰mL محلول رقیق کننده را مستقیما به‌آن بیافزایید و با پی‌پت مخلوط کنید.

پمپ خلاء را روشن کنید تا خلاء برقرار شود.(حدود[1] ۷۰ kPa) نمونه را از صافی عبور دهید. به‌محض صاف شدن نمونه، پمپ خلاء را خاموش کنید. بهتر است دیواره‌های قیف را در حالی‌که صافی هنوز در جای خود قرار دارد، با استفاده از mL ۱۰ تا mL ۳۰ محلول رقیق کنندهٔ سترون، شستشو دهید.

یادآوری۱- برای آزمون اسپورباکتری‌ها مانند اسپ.ر کلستریدیوم‌های احیأ کننده سولفیت، از صافی غشایی با اندازه روزنه µm ۰/۲۲ استفاده کنید.

۳-۷-۱-۴-۱-۳ انتقال صافی

پس از اطمینان از خاموش بودن پمپ خلاء، قیف را بردارید و صافی را با گیره سترون به‌یکی از موارد زیر انتقال دهید.

الف- به‌پلیت حاوی محیط کشت آگاردار

ب- به‌پد جاذب که از پیش با محیط کشت مایع اشباع شده است و یا پد جاذب دارای دارای محیط کشت بدون آب که آب مقطر به‌آن اضافه می‌شود، برای پیشگیری از تداخل کلنی، پیش از قرار دادن صافی روی پد جاذب، محیط کشت اضافی آن بیرون ریخته شود.

پ- به‌پلیت دارای مقدار کمی محیط آگاردار و سپس افزودن لایه دیگر از محیط کشت با دمای ۴۵°C±۱°C روی صافی غشایی هنگام انتقال صافی‌ها، از نبودن حباب هوا بین صافی و محیط کشت اطمینان یابید.

یادآوری۲- برای حجم‌های مختلف یک نمونه، در صورتی که کمترین و رقیق‌ترین نمونه را ابتدا صاف کنید، می‌توانید قیف را بدون گندزدایی، برای رقت‌های پایین‌تر همان نمونه استفاده کنید برای صاف کردن نمونه دیگر از وسایل سترون جدید استفاده کنید.

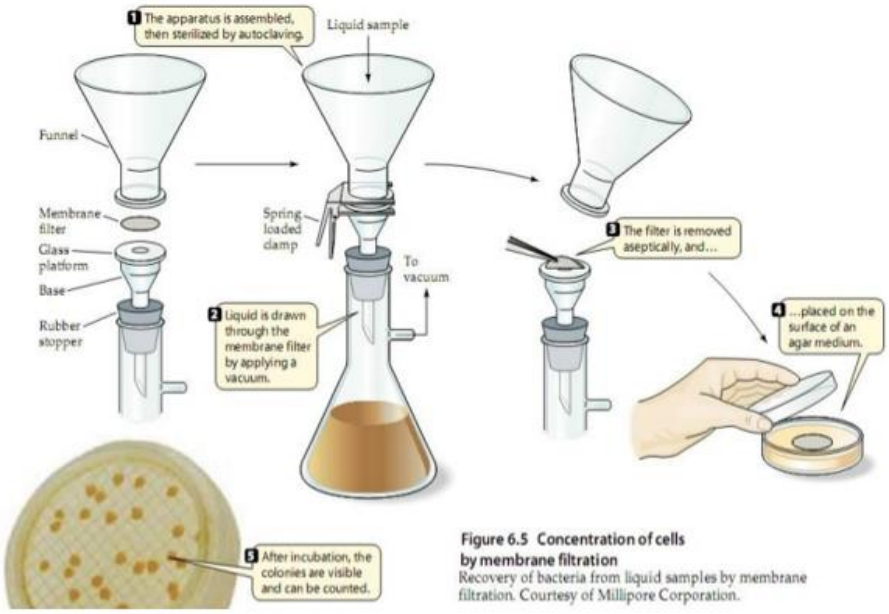
۳-۷-۲ انتخاب روش آزمون

انتخاب روش به‌عوامل مختلف بستگی دارد. این عوامل شامل ویزگی‌های فیزیکی و شیمیایی آب، ماهیت میکروارگانیسم های مورد جستجو، غلظت احتمالی آنها، باز یافت موثر میکرو ارگانیسم‌های آسیب دیده و تحت تنش، دقت آزمون و حساسیت لازم می‌باشد الزامات هر روش در بندهای ۳-۷-۱-۱، ۳-۷-۱-۳ و ۳-۷-۱-۴ ارائه شده است.

---

۱ - پاسکال با علامت اختصاری (Pa) در فیزیک، واحد فشار است و برابر است با فشار یک نیوتن بر متر مربع. یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های فشار مایعات این می‌باشد که اگر مقداری مایع را درون ظرفی محصور تحت فشار قرار دهیم یا به‌عبارتی دیگر به‌آن فشار وارد کنیم فشار وارده از سوی ما بدون هیچ گونه ضعیف شدن یا کم و کاستی به‌تمام نقاط آن می‌رسد و حتی به‌دیواره‌های ظرف هم منتقل می‌شود که به‌آن اصل پاسکال گفته می‌شود. و به‌این شکل تعریف می‌شود P=F/A

Pفشار مساوی است با F نیروی وارد بر سطح و A مساحت سطحی است که F بر آن تأثیر می‌کند . بدیهی است که با در نظر گرفتن یکای نیوتن برای نیرو و متر مربع برای مساحت، یکای فشار به‌صورت نیوتن بر متر مربع تعریف خواهد شد. این یکا جهت احترام به‌دانشمند فیزیک‌دان فرانسوی، به‌نام پاسکال نامگذاری شد.



شکل ۴۶-مراحل آزمون فیلتراسیون با صافی غشایی

۳-۷-۳ گرمخانه گذاری

پلیت‌های تلقیح شده را وارونه کنید و آنها را در گرمخانه و یا حمام آب (پس ازقرار دادن در شرایط و ظروف غیر قابل نفوذ به‌آب) قرار دهید. در صورت لزوم پلیت‌ها رابرای پیشگیری از خشک شدن در یک کیسه پلاستیکی قرار دهید. مانند مواردی که از گرمخانه دارای تهویه استفاده می‌کنید. پلیت‌هایی که دارای صافی روی پد جاذب هستند را برای پیشگیری ازخشک شدن در ظروف مقاوم به‌نفوذ هوا و آب در گرمخانه روی هم قرار دهید. بیش از ۶ پلیت را در گرمخانه روی هم قرار ندهید. زمان و درجه حرارت گرمخانه گذاری را با استفاده از استانداردهای خاص مربوط به‌میکرو ازگانیسم‌های خاص انتخاب کنید. گرمخانه گذاری می‌تواند در دو مرحله به شرح زیر انجام شود. برای احیا میکروارگانیسم‌های تحت تنش می‌توانید پلیت‌ها را در زمان‌های مختلف برای مثال۲h تا ۴h در درجه حرارت کمتر مانند ۲۵ºC تا ۴۰ºC و متعاقب آن برای مدت زمان بیشتر در درجه حرارت معمول برای میکروارگانیسم مورد جستجو، پیش گرمخانه گذاری کنید.

تغییرات دما ممکن است با انتقال به‌گرمخانه و یا حمام آب دیگر و یا با استفاده از دستگاه‌هایی که درجه حرارت آنها به‌طور خودکار پس از زمان معین تغییر می‌یابد، تحت تاثیر قرار گیرد بهتر است تمام پلیت‌ها را به‌طور معمول هم زمان در گرمخانه یا حمام آب قرار دهید.

همچنین می‌توانید صافی‌ها را برای مدت کوتاهی (مانند ۲h تا ۴h) در محیط کشتی که سبب احیاء میکروارگانیسم‌ها می‌شود قرار دهید وسپس برای گرمخانه گذاری بیشتر به‌محیط دیگر (معمولا محیط انتخابی) منتقل کنید.

۳-۸ روش شمارش

پلیت‌های صافی‌ها را بلافاصله پس از پایان گرمخانه گذاری بررسی کنید. در مواردی که این کار امکان ندارد می‌توانید آن را برای مدت کوتاهی (برای مثال چند روز) در دمای ۵ ºC تا ۳ ºC در صورت نداشتن اثرات

سـوء بر تعداد و ظاهر میکروارگانیسـم‌ها و همچنین آزمون‌های تاییدی قرار دهید. در صـورتی که پلیت‌ها یا صافی‌ها را نگهداری می‌کنید، مدت زمان قابل قبول را با توجه به‌نوع نمونه و روش آزمون، صحه گذاری کنید.

۳-۸-۱ شمارش و تایید کلنی

برای شمارش روی محیط غیر انتخابی، تمام کلنی‌ها را شمارش کنید. در محیط‌های انتخابی و افتراقی، فقط کلنی‌هایی را که ظاهر مختص میکرارگانیسـم مورد جسـتجو را نشـان می‌دهند شـمارش کنید. برای تعیین ویژگی‌های دقیق‌تر، آزمون‌های تاییدی باید انجام شـود اگر چه هنگامی که تعداد کلنی‌ها زیاد اسـت، نایید مشـخصـات همه آنها عملی نیسـت. در چنین مواردی تمام کلنی‌های تیپیک از قسـمت‌های حاشـیه پلیت با صافی را مورد بررسی قرار دهید.

۳-۹ شمارش پس از تلقیح آزمونه در محیط کشت مایع

۳-۹-۱ اصول آزمون

آزمونه نمونه آب به‌محیط کشت مایع تلقـیح مـی‌شـود تـا از رشـد میکروارگانیسـم‌هـای خـاص یـا گروهـی از میکروارگانیسـم‌هـا اطمینـان حاصـل شـود بیشـترین تعـداد احتمـالی (MPN) میکروارگانیسـم‌هـای موجـود در نمونـه اصـلی و دقـت تخمـین، را مـی‌تـوان بـر اسـاس تعـداد آزمـون‌هـای مثبـت و منفـی مشاهده شده پس از گرمخانه گذاری، با استفاده از روش‌های آماری تخمین زد.

۳-۹-۲ کاربرد روش

۳-۹-۲-۱ تخمین بیشترین تعداد احتمالی(MPN)

ا ساس روش MPN، در بیشتر موارد ، تلقیح آزمون‌های متعدد از یک نمونه ویا رقت‌های آن به‌لوله‌های دارای محیط کشت مایع ا ست. پس از گرمخانه گذاری لوله‌های تلقیح شده که دارای یک میکروارگانیسم یا بیشتر با شد، علائم ر شد را ن شان خواهد داد که با یا بدون تغییرات م شخص در محیط ک شت م شاهده می شود بر اسـاس نتایج مثبت یا منفی در برخی از لوله‌ها، بیشـترین تعداد احتمالی میکروارگانیسـم در حجم معین از نمونه را می‌توان از تعداد و توزیع لوله‌هایی که واکنش مثبت داشته‌اند تخمین زد.

درمیان ترکیب‌های مختلف MPN با توجه به‌تعداد مورد انتظار میکروار گانیسـم‌ها در نمونه مورد آزمون، الزامات قانونی و دقت لازم است. دقت به‌تعداد آزمونه مثبت مشاهده شده در روش تقریبا مشابه بستگی دارد همان‌طور که دقت شمارش کلنی‌ها به‌تعداد کلنی‌ها بستگی دارد . دقت به‌صورت تابعی از جذر تعداد لوله‌های استفاده شده افزایش می‌یابد برای دو برابر شدن دقت، تعداد لوله‌ها باید چها برابر شود در روش‌هایی که فقط از تعداد کمی لوله‌های چند تایی اسـتفاده می‌کنند، دقت کم اسـت. از طرف دیگر، این روش‌ها در عمل، از حساسیت کافی (که به‌حجم کل نمونه آزمون شده بستگی دارد) برخوردار هستند. تفسیر ساده نتایج مثبت، مزیت مشخص و متمایز بیشتر روش‌های MPN است .

یادآوری۱- افزودن آزمونه نباید سبب تغییر محیط کشت شود و برای ر شد میکروارگانیسم‌های مورد نظر مزاحمت ایجاد کند به‌طور معمول، آزمایه‌های کمتر از ۱mL به‌مقدار ۵ برابر یا بیشتر از محیط کشت با غلظت معمولی اضافه می‌شود. به‌طور معمول

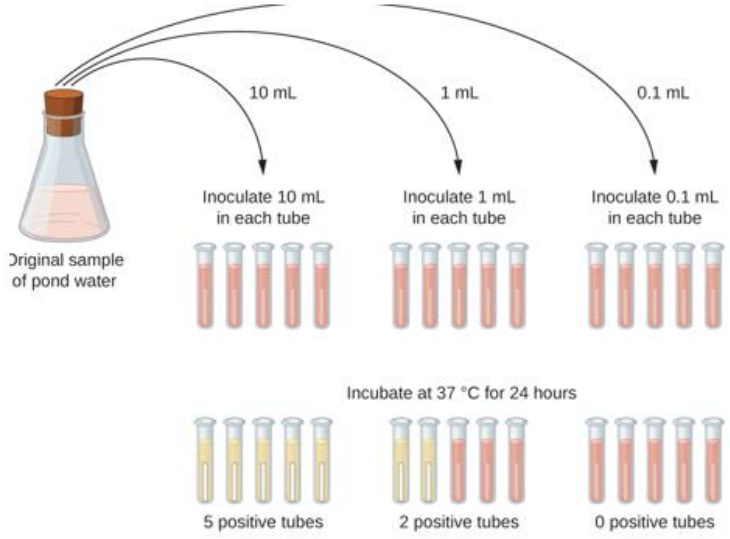
آزمایه‌های بین ۱mL تا ۱۰۰mL به‌حجم‌های مساوی از محیط کشت با غلظت دو برابر اضافه می‌شود . اگر نمونه دارای مقادیر زیاد نمک‌های معدنی، مواد سمی یا مغذی که روی رشد باکتری‌ها اثر می‌گذارد، نباشد. روش‌های کشت مایع معمولا مقادیر زیاد مواد جامد معلق را تحمل می‌کنند.

یادآوری۲- برای از بین بردن زیان‌های ناشی از وجود مقادیر زیاد مواد سمی بر جداسازی میکروارگانیسم‌ها از نمونه آب، می‌توانید از روش صافی غشایی، و در صورت کدر بودن نمونه از مواد کمک صافی سترون مانند خاک دیاتومه یا سوسپانسیون اکساید استفاده کنید.

یادآوری۳- همراه با رسوب مواد کمک صافی، میکروارگانیسم‌ها نیز با آن رسوب می‌کنند. پس از تکمیل فرآیند جداسازی با استفاده از سانتریفوژ یا صافی، خاک دیاتومه، اکسید آلومینیوم یا صافی غشایی در محیط کشت مایع قرار داده می‌شود.

۳-۹-۳ انتخاب روش تلقیح

معمول‌ترین روش MPN که مورد استفاده قرار می‌گیرد استفاده از روش ۳ لوله‌ای یا ۵ لوله‌ای برای هر رقت است (به‌ویژه ۳ لوله‌ای) دقت کمی دارد. از کار برد روش سه لوله‌ای (به‌دلیل کم بودن دقت آن) برای غلظت‌های بالای میکروارگانیسم‌ها خودداری کنید برای افزایش دقت روش توصیه می‌شود از روش ۵ لوله‌ای یا بیشتر استفاده کنید.



شکل ۴۷ -مراحل آزمون MPN

۳-۹-۳-۱ تلقیح در محیط کشت مایع

با رعایت شرایط سترون، حجم معینی از نمونه آب یا رقتی از آن را با توجه به‌روش انتخاب شده به‌لوله یا ارلن تلقیح کنید.

۳-۹-۳-۲ آزمون وجود یا عدم وجود میکروارگانیسم‌ها

پس از تلقیح و گرمخانه گذاری یک آزمونه منفرد از نمونه در یک لوله دارای محیط کشت مایع و ایجاد علائم ظاهری ر شد یک میکروارگانیسم مورد نظر در آن، تنها می‌توان به‌وجود و یا عدم وجود میکروارگانیسم مورد نظر در حجم نمونه آزمون، پی برد.

در صورت نمونه‌برداری لحظه‌ای، نتیجه را به‌صورت "وجود" یا "عدم وجود میکروارگانیسم مورد نظر در میلی لیتر" بیان کنید. با این روش هم نمی‌توان: وجود" یا "عدم وجود" میکروارگانیسم در آزمونه دیگر و غلظت میکروارگانیسم مورد نظر را تخمین زد و هم امکان شمارش و تعیین غلظت میکروارگانیسم‌ها وجود ندارد

۳-۹-۳-۳ گرمخانه گذاری

لوله‌های تلقیح شده را در گرمخانه و یا حمام آب قرار دهید با توجه به‌ا ستاندارد خاص هر میکروارگانیسم از درجه حرارت و زمان خاص استفاده کنید. برای برخی از میکروارگانیسم‌ها روش گرمخانه گذاری دو مرحله‌ای لازم است. به‌زیر بند ۳-۷-۳ این جزوه آموزشی مراجعه کنید.

۳-۹-۴ تفسیر نتایج

پس از گرمخانه گذاری، تعداد نتایج مثبت را برای هر سری لوله گزارش کنید. خصوصیات تشخیص واکنش مثبت و یا منفی برای هر میکروارگانیسم و یا گروهی از میکروارگانیسم‌ها و همچنین محیط کشت مورد استفاده متفاوت است. مثبت شدن نتایج آزمون همیشه دلیل بر وجود میکروارگانیسم مورد جستجو نیست و ممکن است انجام آزمون‌های تاییدی با استفاده از یکی از روش‌های زیرلازم باشد.

الف- کشت مجدد روی محیط کشت جدا کننده انتخابی و متعاقب آن آزمون‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی برای تعیین کلنی‌های مشکوک

ب- کشت مجدد در محیط مایع دیگر و متعاقب آن آزمون مستقیم که گاهی باعث تایید با درجه قابل قبول احتمال می‌شود و یا باعث جداسازی میکروارگانیسم و متعاقب آن انجام ازمون برای شناسایی می‌شود.

پ- کشت مجدد روی محیط کشت جدا کننده غیر انتخابی برای به‌دست آوردن کلنی‌های خالص و منفرد، که در مراحل بعدی شناسایی می‌شوند.

آزمون‌های تاییدی فوق باعث تعیین نتایج مثبت واقعی می‌شود. و برای تعیین مقادیر MPN استفاده می‌شود. ردیابی نتایج آزمون‌های تاییدی تا لوله‌های مثبت فرضی (حداقل تا سطح رقت) باید انجام شود.

۳-۱۰ رنگ آمیزی

۳-۱۰-۱ رنگ آمیزی گرم

۳-۱۰-۱-۱ تهیه گسترش روی لام:

ابتدا از نمونه باکتری یک گسترش روی لام تهیه شود.

۳-۱۰-۱-۲ رنگ آمیزی با کریستال ویوله:

در این مرحله مقداری از رنگ کریستال ویوله را با قطره چکان به‌روی سطح گسترش میکروبی روی لام بریزید و به‌مدت زمان۱min، صبر کنید تا رنگ در دیواره سلولی میکروب‌ها نفوذ کند.

۳-۱۰-۱-۳ مرحله شستشو:

پس از سپری شدن مدت زمان۱min، رنگ اضافی روی لام را خالی کرده، در حالی‌که لام را به‌صورت مایل نگهداشته شده است با استفاده از آب مقطر به‌آرامی به‌مدت چند ثانیه سطح روی گسترش را شستشو شود.

۳-۱۰-۱-۴ مرحله اضافه کردن محلول ید:

با چند قطره از محلول ید[1] روی گسترش را پوشانیده و به‌مدت زمان۱minصبر کنید.

۳-۱۰-۱-۵ مرحله شستشو:

پس از سپری شدن مدت زمان۱min، در حالی که لام را به‌صورت مایل نگهداشته‌اید با استفاده از آب مقطر به‌آرامی به‌مدت چند ثانیه سطح روی گسترش را شستشو دهید.

۳-۱۰-۱-۶ مرحله رنگ بری با استفاده از استن – الکل:

در حالی‌که لام را با زاویه ۴۵ درجه نگهدارید بعد با استفاده از محلول رنگ بر الکل – استن بسرعت آن را بی‌رنگ کنید. دقت کنید مرحله بی‌رنگ سازی بیش از اندازه نباشد. بعد از آن لام را بسرعت بشوئید. این عمل، بی‌رنگ شدن را متوقف خواهد کرد.

۳-۱۰-۱-۷ رنگ آمیزی با محلول سافرانین:

در این مرحله سطح لام را با محلول سافرانین را با رنگ ثانویه یعنی سافرانین، به‌مدت ۱۰sec بپوشانید سپس رنگ اضافی را خالی کرده و با آب مقطر لام را شستشو دهید.

۳-۱۰-۱-۸ خشک کردن لام:

لام رنگ آمیزی شده را آهسته روی کاغذ خشک کن قرار دهید ولی کاغذ را روی گسترش نکشید.

۳-۱۰-۱-۹ مشاهده و تفسیر

در مشاهده لام زیر میکروسکوپ دارای عدسی روغنی با بزرگنمایی بالا، ظاهر باکتری‌ها در ۵ گروه تقسیم بندی می‌شوند:

۱-میله ای (باسیل) گرم مثبت ۲- میله‌ای گرم منفی ۳- کوکوس (گرد) گرم مثبت ۴- کوکوس گرم منفی ۵- باکتری‌های بدون واکنش به‌رنگ‌آمیزی گرم.

۱- Iodine

شکل۴۸- مراحل روش رنگ آمیزی

یادآوری نکات مهم:

حرارت بیش از اندازه هنگام تثبیت گسترش باعث پاره شدن دیواره سلولی باکتری شده بنابر این باکتری گرم مثبت رنگ اولیه (کریســـتال ویوله) را هنگام رنگ‌بری از دســـت می‌دهد و رنگ ثانویه را جذب می‌کند و در نتیجه باکتری گرم مثبت، به‌صورت گرم منفی دیده می‌شود.

- اگـر گسـترش ضـخیم باشـد هنگـام مرحلـه بـی‌رنـگ شـدن، ممکـن اسـت ماننـد یـک گسـترش معمولی رنگ نشود و این مسـئله باعـث خطـا در تشـخیص شـما در گـرم منفـی یـا مثبـت بـودن باکتری خواهد شد.
- غلظت درست و تازه بودن رنگ‌ها هم در رنگ آمیزی موثر است .
- رنگ‌بری بـیش از حـد ممکـن اسـت باعـث پـاره شـدن جـدار بـاکتری‌هـای گـرم مثبـت شـده در نتیجه این باکتری‌هـا رنـگ کریسـتال ویولـه خـود را از دسـت داده و رنـگ ثانویـه را جـذب مـی-کنند و به‌صورت گرم منفی دیده می‌شود.
- دقـت شـود هنگـام تهیـه گسـترش روی لام از محـیط کشـت، سـن کشـت بـاکتری بایـد۲۴h یـا کمتـر باشـد. بنـابر ایـن در محـیط کشـت‌هـایی کـه از عمـر آنهـا گذشـته و کهنـه شـده‌انـد، در قابلیت نفوذ دیواره سلولی باکتری‌هـا تغییراتـی حاصـل مـی‌شـود کـه خاصـیت گـرم مثبـت بـودن را از دست می‌دهد.

۳-۱۰-۲ رنگ آمیزی شفر- بولتون

رنـگ آمیـزی شـفر- بولتـون یـک رنـگ آمیـزی افتراقـی اسـت کـه بـرای مشـاهده آندوسـپور و سـلول رویشـی ابـداع شـده اسـت. بـا اسـتفاده از ایـن روش، اسـپور رنـگ مـی‌گیـرد و اسـپورهای آزاد بـه‌آسـانی قابـل مشـاهده خواهنـد بـود. در ایـن روش بـرای نفـوذ رنـگ اولیـه (مالاشـیت گـرین) بـه‌داخـل پوشـش اسپور از حرارت استفاده می‌شود . همـان خصوصـیاتی کـه رنـگ آمیـزی اسـپور را مشـکل مـی‌کنـد، رنـگ را پس از نفوذ آن بـه‌داخـل اسـپور بـه‌خـوبی حفـظ مـی‌کنـد. مالاشـیت گـرین بـه‌آسـانی از بـاکتری‌هـای مولد شسته می‌شود زیـرا دیـواره سـلولی بـاکتری‌هـای بـدون اسـپور بـر اثـر حـرارت آسـیب دیـده و پـاره شده است بنابراین سلول رویشی رنگ دوم، یعنی سافرانین را جذب می‌کند.

۳-۱۰-۲-۱ تهیه گسترش روی لام:

ابتدا از نمونه باکتری یک گسترش روی لام تهیه کنید و با حرارت ثابت کنید.

۳-۱۰-۲-۲ رنگ آمیزی با مالاشیت گرین

مقداری از رنگ مالاشیت گرین را با قطره چکان به‌روی سطح گسترش میکروبی روی لام بریزید.
لام آغشته به‌رنگ را حرارت دهید تا رنگ بخار شود. این عمل را با وارونه کردن شعله گاز بر روی لام و عبور شعله به‌تناوب از روی رنگ انجام دهید. وقتی که رنگ شروع به بخار شدن کرد شعله را کنار ببرید همین که تبخیر متوقف شد دوباره کار را تکرار کنید و نگذارید رنگ بجوشد.
مدت۳ min تا ۵ min به‌ترتیب ذکر شده عمل کنید و اگر مالاشیت گرین کاملا از روی لام تبخیر شد دوباره مقداری رنگ به‌لام اضافه کنید. بگذارید لام سرد شود تا از شکستن آن جلوگیری شود. به‌موازات سرد شدن لام به‌اضافه کردن رنگ ادامه دهید زیرا رنگ هنوز در حال تبخیر است.

۳-۱۰-۲-۳ مرحله شستشو:

رنگ اضافی روی لام را خالی کرده در حالی که لام را به‌صورت مایل نگهداشته‌اید با استفاده از آب مقطر به‌آرامی به‌مدت زمان۳۰sec سطح روی گسترش را شستشو دهید.

۳-۱۰-۲-۴ رنگ آمیزی با سافرانین:

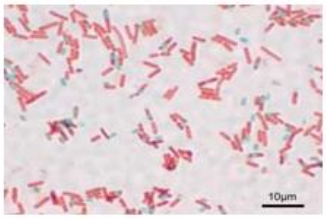
سطح گسترش میکروبی را با رنگ سافرانین. به‌مدت زمان۱minبپوشانید.

۳-۱۰-۲-۵ مرحله شستشو:

رنگ اضافی روی لام را خالی کرده. در حالی‌که مایل نگهداشته‌اید با استفاده از آب مقطر به‌آرامی به‌مدت زمان۳۰sec سطح روی گسترش را شستشو دهید.

۳-۱۰-۲-۶ مشاهده و تفسیر:

در مشاهده میکروسکوپی لام رنگ آمیزی شده، اسپورها گرد بیضی به‌رنگ سبز مشاهده می‌شوند و سلول‌های رویشی، قرمز دیده می‌شوند. چون اسپور پوشش مقاومی است که در برابر نفوذ رنگ مقاومت می‌کند بنابر این در رنگ آمیزی معمولی می‌توان اسپورها را به‌صورت ناحیه رنگ نشده در داخل سلول رویشی (باکتری مولد) م شاهده نمود. اگر تعداد ا سپورها موجود کم با شد و یا اگر از داخل باکتری مولد خارج شده و در گ ستره به‌صورت پراکنده باشند، اغلب توسط رنگ آمیزی ساده و یا گرم قابل مشاهده نخواهند بود.



شکل ۴۹- اسپور

۴ نمونه برداری

نمونه‌هایی که به‌آزمای شگاه ار سال می شود، باید نماینده واقعی کل کالا بوده و در طی حمل، جابجائی و نگه داری آن صدمه ندیده و یا تغییرات فیزیکی و شیمیایی در آن ایجاد نشده باشد. نمونه‌ها باید در شرایطی نگه داری شوند که امکان ر شد میکروارگانی سم‌ها در آن وجود ندا شته با شد. همچنین، در صورت عدم مطابقت

نمونه با مندرجات نامه، نقص در بسته بندی، کافی نبودن مقدار نمونه، مشاهده آثار ظاهری رشد میکروبی، شرایط نامناسب حمل به‌آزمایشگاه، نامناسب بودن درجه حرارت نمونه‌ها، سپری شدن تاریخ مصرف، عدم وجود استاندارد میکروبی، قابلیت انجام آزمون میکروبیولوژی را دارا نبوده و به‌ارسال کننده عودت داده می‌شود.برای کسب آگاهی‌های بیش‌تر از شرایط کلی نمونه برداری و نگه‌داری نمونه، به‌منظور انجام آزمون‌های میکروبیولوژی، به‌استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۰۸۳۴، مراجعه کنید.

۵ روش‌های آزمون میکروبیولوژی انواع آب

روش‌های آزمون میکروبیولوژی انوع آب در جدول۴ آورده شده است:

جدول ۴- ویژگی‌های میکروبیولوژیکی آب آشامیدنی تصفیه شده در ابتدا و انتهای سیستم توزیع[1]

ردیف	نوع میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	کلیفرم‌های گرماپای و یا *اشریشیاکلی*	استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۷۲۲۵ و۴۲۰۷
۲	*کلستریدیوم پرفرنژنس*	استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۹۲۶۵
۳	باکتری‌های هتروتروف میکروارگانیسم‌های قابل کشت در ۳۶ °C ±۲ °C	استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵۲۷۱
۴	باکتری‌های هتروتروف میکروارگانیسم‌های قابل کشت در ۲۲ °C ±۲ °C	استاندارد ملی ایران شمارهٔ۵۲۷۱
۱- منظور آب آشامیدنی است که در سامانه توزیع در جریان است و آبی را که به مدت طولانی در مخازن (غیر از سامانه توزیع) ساکن بوده، را شامل نمی‌شود.		

جدول ۵- ویژگی‌های میکروبیولوژیکی انواع آب آشامیدنی بسته بندی پس از شروع بسته‌بندی

ردیف	نوع میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	کلیفرم و اشریشیاکلی	استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۳۷۶۰
۲	انتروکوک	استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲-۷۷۲۴
۳	پسودوموناس‌آئروژینوزا	استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۸۶۹

جدول ۶- ویژگی‌های میکروبیولوژیکی آب آشامیدنی بسته بندی شده حداکثر تا h ۱۲ پس از شروع بسته بندی[1]

ردیف	نوع میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	کلیفرم و اشریشیاکلی	استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۳۷۶۰
۲	پسودوموناس‌آئروژینوزا	استاندارد ملی ایران شمارهٔ۸۸۶۹۴
۳	شمارش میکروارگانیسم‌های قابل کشت در ۳۶ °C ±۲ °C	استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵۲۷۱
۴	شمارش میکروارگانیسم‌های قابل کشت در ۲۲ °C ±۲ °C	استاندارد ملی ایران شمارهٔ۵۲۷۱
۱- شمارش میکروارگانیسم‌های قابل کشت (هتروتروف)، بعد از ۱۲ h پس از بسته‌بندی ارزش داوری ندارد.		

جدول ۷- روش های آزمون میکروبیولوژی آب معدنی طبیعی

ردیف	نوع میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	شمارش میکروارگانیسم‌های قابل کشت	استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵۲۷۱
۲	کلیفرم و اشریشیاکلی	استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۳۷۶۰
۳	انتروکوک	استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲-۷۷۲۴
۴	کلستریدیوم‌های احیا کننده سولفیت	استاندارد ملی ایران شمارهٔ۵۳۵۳
۵	پسودوموناس آئروژینوزا	استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۸۶۹

جدول ۸- روش های آزمون میکروبیولوژی یخ خوراکی بسته‌بندی مورد مصرف مستقیم و یخ خوراکی بسته‌بندی مورد مصرف در صنایع

ردیف	نوع میکروارگانیسم	روش مرجع
۱	شمارش میکروارگانیسم‌های قابل کشت(*Cfu/mL*)	استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵۲۷۱
۲	کلی‌فرم	استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۷۷۲۵
۳	اشریشیاکلی [الف]	استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۱۱۱۳
۴	انتروکوک	استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲-۷۷۲۴
۵	کلستریدیوم‌های احیا کننده سولفیت	استاندارد ملی ایران شمارهٔ۵۳۵۳
۶	پسودوموناس آئروژینوزا	استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۸۶۹
الف آزمون جستجو و شناسایی *اشریشیاکلی* دراستاندارد ملی ایران شماره ۲۱۱۱۳، یخ خوراکی بسته‌بندی شده –ویژگی‌ها و روش‌های آزمون شرح داده شده است		

یادآوری۱- در مواردی که نمونه از نظر کلیفرم مثبت است، آزمون جستجوی *اشرشیا کلی* مطابق پیوست الف (اطلاعاتی) شاخص دقیق‌تری برای تأیید منبع آلودگی مدفوعی می‌باشد.

یادآوری۲- در هیچ زمانی کدورت آب نباید بیش از ۴ واحد کدورت نفلومتری[۱] باشد، در آب‌های صاف‌سازی شده، کدورت نباید بیش از یک واحد کدورت نفلومتری و میزان pH بین ۶/۵ تا ۹ و همچنین میزان کلر آزاد باقیمانده، پس از حداقل ۰/۵ h زمان تماس در شرایط عادی (در انتهای شبکه توزیع)، باید بین ۰/۵ mg/L تا ۰/۸ mg/L و در شرایط همه‌گیری بیماری‌های روده‌ای، ۱ mg/L باشد.

۵-۱ اصول آزمون

الف- شمارش

برای ارزیابی کیفیت میکروبی و/ یا ایمنی فرآورده تنها شناخت میکروارگانیسم‌های موجود در آنها کافی نیست و در بیشتر موارد،کمیت میکروارگانیسم‌ها هم به‌همان اندازه حائز اهمیت است که باعث ضرورت شمارش میکروارگانیسم‌ها می‌شود. شمارش میکروارگانیسم‌ها به‌روش‌های مختلف

۱- Nephelometric turbidity unit (NTU)

انجام می‌شود. اگر چه در این فرآورده‌ها فقط روش شمارش با استفاده از محیط آگار غیرانتخابی و با استفاده از روش کشت آمیخته یا پورپلیت انجام می‌شود. شمارش در محیط کشت جامد بر اساس توانایی برخی میکروارگانیسم‌ها در تشکیل کلنی روی محیط کشت جامد یا داخل آن می باشد که با چشم مسلح یا با کمک وسایل بزرگنمایی ساده قابل تشخیص است.

ب- روش جستجو (روش کیفی)

این روش وجود یا عدم وجود میکروارگانیسم‌های خاص را در مقدار معین از فرآورده تعیین می‌کند.

ب-۱ اساس روش جستجو

برای تسهیل در احیا میکروارگانیسم‌های تحت تنش قرار گرفته در فرآورده، مراحل زیر انجام می‌گردد:

ب-۱-۱ مرحله I: نمونه‌ها معمولا در یک محیط آبگوشت غنی‌کننده منتقل می‌شوند. به‌این ترتیب، تعداد میکروارگانیسم‌ها، بدون خطر ممانعت از رشد و تکثیر بوسیلهٔ ترکیبات انتخابی موجود در محیط کشت انتخابی/ افتراقی افزایش می‌یابد.

ب-۱-۲ مرحله II: برای جداسازی روی محیط کشت جامد انتخابی/ افتراقی کشت داده می‌شود. از کلنی‌های به‌دست آمده روی سطح محیط کشت جامد برای انجام آزمون‌های تاییدی مناسب برای شناسایی استفاده می‌شوند.

۶ محیط‌های کشت و رقیق‌کننده‌ها

دستورالعمل‌های کلی برای تهیه محلول‌های رقیق‌کننده و محیط‌های کشت در استانداردهای ملی ایران به شماره‌های ۱-۸۹۲۳، ۲-۸۹۲۳، ۳-۸۹۲۳، ۴-۸۹۲۳، ۵- ۸۹۲۳ و ۹۸۹۹ تعیین شده است. لیست رقیق کننده‌ها، آنتی بیوتیک‌ها، محیط کشت‌ها و معرف‌ها در جدول ۹ آورده شده است.

جدول ۹-۱ – لیست رقیق‌کننده‌ها و شناساگرها

ردیف	نام مواد
۱	Indole Reagent(Kovac,s Reagent) Oxidas Reagen Hydrogen peroxide solution, ۳٪ Gram stain kit
۲	Formazan Aesculin Nalidixic Acid Nanamycin
۳	Saline peptone diluents Ringer's_solution Peptone solution Phosphate-buffered saline (PBS): KH_2PO_4 Triphenyl tetra zolium chloride (T. T. C)

جدول ۹-۲-لیست محیط‌های کشت

ردیف	نام مواد
۱	Plate Count Agar (PCA)
۲	Lactose TTC Agar with sodium heptadecylsulfate Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) Sodium heptadecyl sulfate solution (Tergitol ۷) Tryptone soy agar (TSA) Tryptone Bile Agar (TBA) Tryptophane Broth Nutrient agare
۳	Slanetz and Bartley medium (S & B) Bile – aesculin azide agar
۴	Pseudomonas (C.N.A) Cetyltrimethylammonium bromide Mpac Nutrient agare Acetamide brath
۵	Sulfite Iron Agar Tryptise sulfite Agar

۷ روش اجرای آزمون

۷-۱ آماده سازی آزمایه

به‌طورکلی روش آماده سازی آزمایه بر اساس استانداردهای ملی ایران به‌شماره‌های ۱- ۸۹۲۳، ۲- ۸۹۲۳، ۳- ۸۹۲۳، ۴- ۸۹۲۳ و ۵ -۸۹۲۳ می‌باشد. برای جلوگیری از آلودگی میکروبی نمونه‌ها با منابع خارجی، تمام مراحل آماده سازی و دست‌کاری نمونه باید رعایت شرایط اسپتیک و تجهیزات سترون انجام شود. برای اطلاع از نمونه‌برداری و آماده سازی نمونه آب، به‌زیر بند ۳-۷ این جزوه آموزشی مراجعه کنید .

یادآوری۱- برای شمارش اسپورها، بلافاصله پس از تهیه سوسپانسیون اولیه باید شوک حرارتی دهید، سپس به‌سرعت خنک کنید.

یادآوری۲- محتویات بطری در بسته را به‌وسیله تکان دادن و وارونه کردن آن به‌طور کامل مخلوط کنید.

۷-۱-۱ کشت میکروبی

تلقیح و کشت میکروبی را مطابق زیر بند ۳-۷-۱ این جزوه آموزشی انجام دهید.

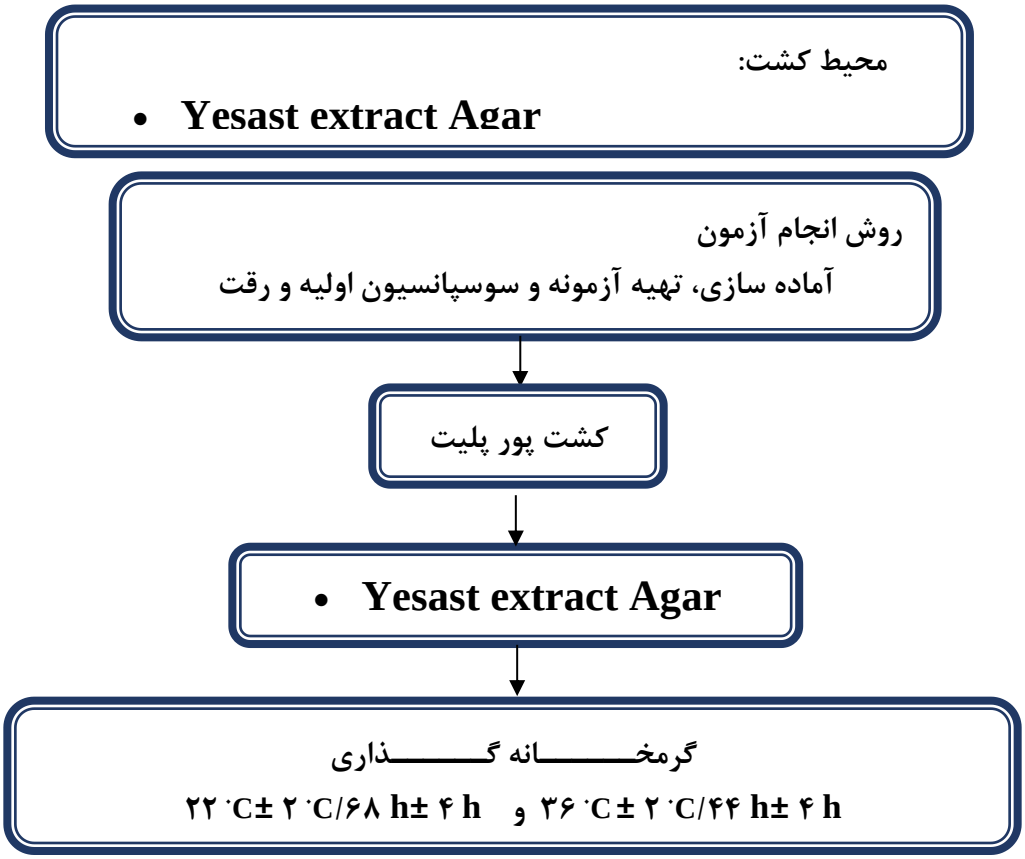
۷-۱-۲ گرمخانه گذاری

بسته به‌نوع میکروارگانیسم مورد بررسی دمای گرمخانه و مدت زمان گرمخانه‌گذاری متفاوت است که در ادامه، برای هریک از میکروارگانیسم‌ها که در این فرآورده آزمون می‌شوند، نوشته شده است.

۲-۷ میکروارگانیسم‌های قابل کشت (هتروتروف)

۱-۲-۷ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵۲۷۱، شمارش میکروارگانیسم‌های قابل کشت

میکروارگانیسم‌های هتروتروف‌ها گروهی از میکروارگانیسم‌ها (باکتری‌ها، مخمرها و کپک‌ها) هستند که از کربن آلی یا از ماده آلی کربن‌دار به‌عنوان منبع غذایی استفاده می‌کنند. برخی از باکتری‌های موجود در جمعیت هتروتروف، پاتوژن‌های فرصت طلب، مانند: *اسنیتوباکتر*[۱]، *آئروموناس*[۲]، *کریزوباکتریوم (فلاووباکتریوم)*[۳]، *کلبسیلا*[۴]، *لژیونلا*[۵]، *موراز‌لا*[۶]، *مایکوباکتریوم*[۷]، *سراشیا*[۸]، *سودوموناس*[۹]، *آلکالیژنز*[۱۰]، *زانتوموناس*[۱۱] می‌باشند.



۱- Acinetobacter
۲- Aeromonas
۳- Chryseobacterium (Flavobacterium)
۴- Klebsiella
۵- Legionella
۶- Moraxella
۷- Mycobacterium
۸- Serratia
۹- Pseudomonas
۱۰- Alcaligenes
۱۱- Xanthomonas

شمارش کلنی‌ها

تعداد CFU باکتری را در هر میلی لیتر نمونه را، مطابق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹ محاسبه کنید .

۷-۳ شناسایی و شمارش کلی فرم‌ها

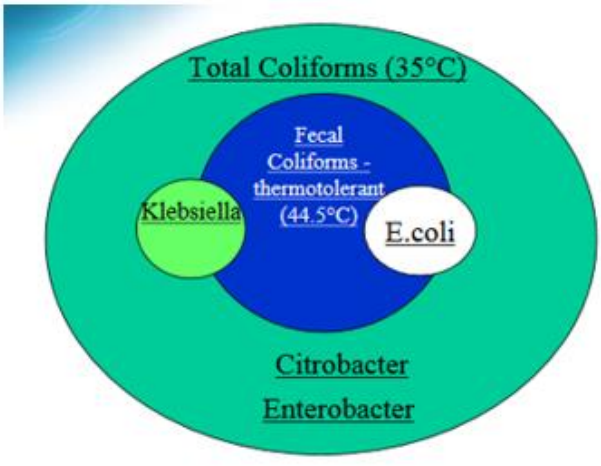
۷-۳-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ۱-۳۷۶۰، کیفیت آب -شمارش باکتری های اشریشیاکلی و کلی فرم -قسمت ۱- روش فیلتراسیون غشایی

اصطلاح کلی‌فرم به‌گروهی از باکتری‌های خانواده آنتروباکتریاسه گفته می‌شود که ساکن رودهٔ بزرگ انسان و حیوان هستند. باسیل‌های گرم منفی، بدون اسپور، هوازی و بی‌هوازی اختیاری هستند. این باکتری‌های لاکتوز مثبت قادرند در شرایط هوازی و در مجاورت املاح صفراوی تولید اسید و گاز کنند. باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *سیترو باکتر*، *آنترو باکتر* و *کلبسیلا* در این گروه قرار دارند.

باکتری کلی‌فرم در محیط آبی، خاک و پوشش گیاهی پیدا می‌شوند. به تعداد زیادی در مدفوع جانوران خون‌گرم وجود دارند. به‌طور معمول خود کلی‌فرم‌ها بیماری جدی ایجاد نمی‌کنند، حضور آن‌ها شاخصی برای تعیین دیگر میکروارگانیسم‌های بیماریزا است که ممکن است منشأ آن‌ها مدفوع باشد.

کلی فرم‌هایی که علاوه بر آنزیم بتا-دی-گالاکتوزیداز، بتا-دی-گلوکرونیداز هم تولید کنند، *اشریشیا کلی* هستند.

کلی‌فرم‌ها شاخص کیفیت بهداشتی در آب و برخی از مواد غذائی است بسیاری از آن‌ها به‌جز *اشریشیا کلی* قادر به‌زنده ماندن و تکثیر در محیط‌های طبیعی مانند: آب هستند.



شکل ۵۰- کل کلیفرم‌ها، کلیفرم‌های گرماپای و *اشریشیا کلی*

این روش آزمون برای آب‌های دارای تعداد کم باکتری که بر روی محیط کروموژنیک کلی‌فرم آگار (CCA) کمتر از ۱۰۰ کلنی داشته باشد مناسب است و این روش آزمون برای آب آشامیدنی، آب استخر گندزدایی شده یا آب نهایی حاصل از تصفیه خانه‌های آب آشامیدنی می‌باشد و برای آب‌های سطحی و آب چاه‌های با عمق کم کاربرد ندارد.

تهیه محیط کشت:

- **محیط کشت کروموژنیک آگار**

محیط کشت کروموژنیک آگار را طبق دستورالعمل سازنده آماده کنید.

محیط کشت را در حمام گرم با جریان بخار آزاد با هم زدن مکرر به‌هم کامل حل کنید. محیط کشت را اتوکلاو نکنید. محیط کشت را دوبار گرم نکنید. pH محیط را به‌گونه‌ای تنظیم کنید که پس از تیمار حرارتی، برابر با ۰/۲± ۶/۸ شود. محیط کشت را، به‌ضخامت حداقل mm ۴، در پلیت‌های سترون تقسیم نمایید .

↓

روش انجام آزمـــــون

↓

آماده سازی و فیلتراسیون را مطابق بند۳-۷-۲-۱، روش صافی غشایی انجام

با استفاده از گیره سر صاف سترون، صافی تهیه شده را بر روی سطح محیط کشت کروموژنیک کلی فرم (CCA) از پیش ریخته قرار دهید.

Chromogenic Coliform Agar (CCA)

یادآوری - pH محیط لوریل سولفات مایع را به‌گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون شدن، برابر ۰/۱± ۷/۲ شود.

گرمخـــــــانه گـــــــذاری

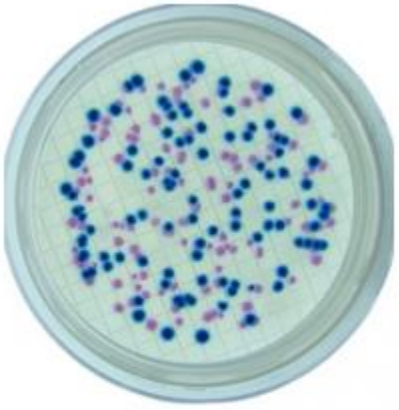
۲۱±۳h / (۳۶± ۲)°C

- ✓ فیلترهای غشـــایی را بررســـی کنید .

خصوصیات کلنی کلی‌فرم‌ها در محیط:

Chromogenic Coliform Agar (CCA)

- ✓ کلیه کلنـی‌هـای دارای واکـنش مثبـت بتـا دی‌گالاکتوزیـداز (صـورتی تـا قرمـز) را بـه‌عنـوان کلیفـرم احتمالی که *اشریشیاکلی* نیستند، را شمارش کنید.
- ✓ کلیـه کلنـی‌هـای دارای واکـنش مثبـت بتـا دی‌گالاکتوزیـداز و بتـادی‌گلوکورونیـداز (آبـی تیـره تـا بنفش) را به‌عنوان باکتری‌های *اشریشیاکلی* شمارش کنید.



شکل۵۱-کلنـــی‌هـــای باکتـــری هـــای
(-β-D-galactosidase)+ و (- β-glucuronidase)+

آزمـــون تـــاییـــدی

- ✓ بـرای تاییـد کلنـی‌هـای کلـی فـرم احتمـالی کـه *اشریشـیاکلی* نیسـتند، آزمـون اکسـیداز را انجـام دهید.
- ✓ ترجیحا برای تمـام کلنـی‌هـا یـا حـداقل ۱۰ کلنـی صـورتی تـا قرمـز آزمـون اکسـیداز را انجـام دهیـد. برای این تایید، معرف‌های اکسیداز تجاری می‌توانید به‌کار ببرید .

آزمون اکسیـــداز

اکسـیدازها آنـزیم‌هـایی هسـتند کـه واکـنش‌هـای اکسیداسـیون را کاتـالیز (تسـهیل) مـی‌کننـد. در زیسـت‌شـیمی یـک اکسـیدورداکتاز آنزیمـی اسـت کـه انتقـال الکتـرون را از یـک مولکـول (احیاکننـده) به‌مولکول دیگر (اکسیدان) کاتالیز می‌کند $A^- + B \rightarrow A + B^-$

باکتری‌ها اصولاً به‌دو روش انـرژی تولیـد مـی‌کننـد یـا بـا تخمیـر یـا بـا اکسیداسـیون مـواد آلـی کـه ایـن گروه از بـاکتری‌هـا آنـزیم اکسـیداز دارنـد و اصـطلاحاً اکسـیداز مثبـت هسـتند. اگـر بـاکتری دارای آنـزیم سـیتوکروم اکسـیداز باشـد (ماننـد: پسـودوموناس یـا گونوکـوک) در صـورت مجـاورت بـا رنـگ‌هـای احیـا شونده مانند تترامتیل‌پی‌فنیلـین‌دی‌آمـین آن را احیـا نمـوده بـه‌رنـگ بـنفش تغییـر رنـگ مـی‌دهـد و اگـر اکسیداز منفی باشد (مانند: آسینتوباکتر) تغییر رنگ مشاهده نمی‌شود.

انجام آزمون اکسیـــداز

- برای انجام آزمون اکسیداز، با استفاده از لوپ، قسمتی از کلنی را برداشته و بر روی یک کاغذ صافی آغشته به‌معرف اکسیداز قرار دهید

یادآوری- در صورت لزوم و بسیار کوچک بودن کلنی‌های آزمون، کشت فرعی تهیه کنید. کشت فرعی را بر روی آگار غیر انتخابی(TSA) تهیه کنید و در دمای ۳۶ °C ±۲ °C به‌مدت زمان ۲۱ h ± ۳ h گرمخانه‌گذاری کنید.

- واکنش مثبت در مدت زمان۱۰sec تا مدت زمان۳۰ sec به‌صورت ایجاد رنگ آبی تیره مشاهده می-گردد.
- **تفسیر نتایج : کلیفرم‌ها اکسیداز منفی هستند .**

- **خصوصیات کلنی:**

- کلنـی‌هـای صـورتی تـا قرمـز اکسـیداز منفـــی و کلنـی‌هـای آبـی تیـره تـا بفـش بـاکتری‌هـای کلـــــی‌فرم و مجموع کلنی‌های آبی تا بنفش به‌عنوان *اشریشیاکلـــی* شمارش شوند

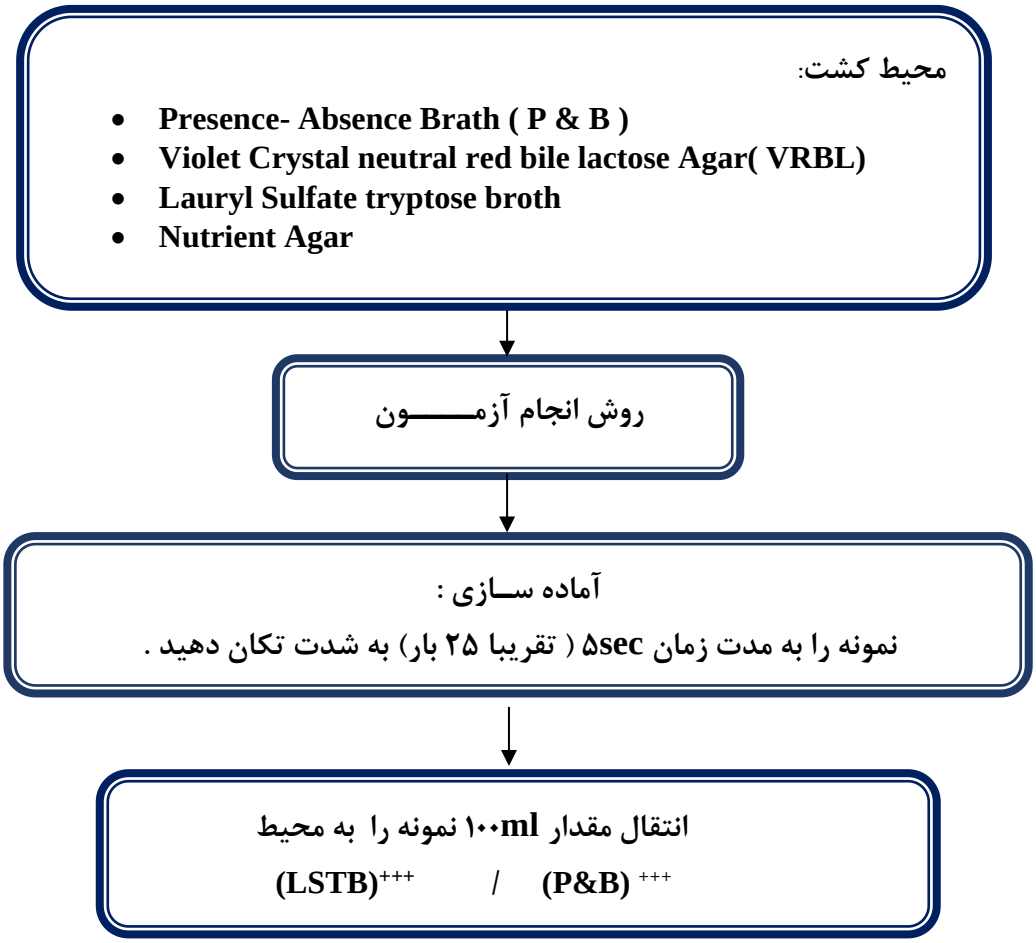
شمارش کلنی‌ها

تعداد CFU باکتری را، مطابق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹ محاسبه نمایید .

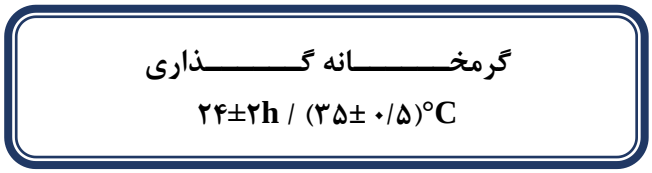
۷- ۴ جستجو و شناسایی کلی‌فرم‌ها

۷-۴-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۷۲۲۵، آب – جستجو وشناسایی کلی‌فرم به روش وجود – عدم وجود

این روش آزمون برای آب آشامیدنی، (آب آشامیدنی بسته‌بندی شده، آب آشامیدنی بسته‌بندی نشده) نمونه های آب برداشته ازسطح توزیع آب و نمونه‌های آب در کارخانه‌های تصفیه‌آب کاربرد دارد. این روش برای آب استخرهای شنا کاربرد ندارد.



یادآوری – می‌توان به‌جای محیط کشت P-A براث از محیط کشت Lauryl Sulfate tryptose broth استفاده کرد.



در صورت عدم مشاهده گاز یا کدورت، گرمخانه‌گذاری را به‌مدت زمان ۴۸h±۳h ادامه دهید.

- **محیط کشت را بررسی کنید :**

ایجاد رنگ زرد مشخص، نشان دهنده تولید اسید دراثر تخمیر لاکتوز می‌باشد چنانچه گاز نیز تولید شده باشد سبب ایجاد کف می‌شود.

شکل ۵۲- $(P\&B)^{+++}$ / $(LSTB)^{+++}$

گرمخانه گذاری

۲۴±۲h / (۳۵± ۰/۵)°C

تولید هر مقدار گاز و/ اسید نشان‌دهند وجود کلیفرم احتمالی است، که باید تایید شود.

آزمون تاییدی

↓

انتقال یک حلقه کشت به محیط

Brillian green lactose bile broth (BGLB)

شکل ۵۳- گاز در لوله درهام

گرمخـــــــــانه گـــــــذاری

۳۵ ˚C / ۴۸ h تا ۲۴h

- **محیط کشت را بررسی کنید :**

در صـورت تشـکیل گـاز در لولـه درهـام، بـا اسـتفاده از حلقـه کشـت سـترون مقـداری از آن را بـرروی محیط کشت از پیش ریخته VRBL Agar تلقیح کنید.

Violet Crystal neutral red bile lactose Agar(VRBL)

↓

گرمخـــــــــانه گـــــــذاری

۳۵ ˚C / ۲۴± ۲ h

- **محیط کشت را بررسی کنید .**

- **کلنی رشد نکرده بود:** کلیفرم در نمونه وجود ندارد. جستجوی کلیفرم در نمونه " (منفی) "
- **کلنی رشد کرده بود:** وجود کلیفرم در نمونه احتمال دارد. وجود کلیفرم باید تایید شود.

بـا اسـتفاده از حلقـه کشـت سـترون مقـداری از کلنـی مشـکوک را بـه لولـه کشـت **Nutrient Agar** شیبدار ولوله‌های کشت **(LSTB)** تلقیح کنید.

Nutrient Agar

↓

گرمخـــــــــانه گـــــــذاری

۳۵ ˚C / ۲۴ h تا ۱۸h

Lauryl Sulfate tryptose broth (LSTB)

↓

گرمخـــــــــانه گـــــــذاری

۳۵ ˚C / ۲۴± ۲ h تا ۴۸± ۳ h تا

- **بررسی محیط کشت Lauryl Sulfate tryptose broth (LSTB) :**

گاز در لوله مشاهده نشد:کلیفرم در نمونه وجود ندارد . جستجوی کلیفرم در نمونه "(منفی)"

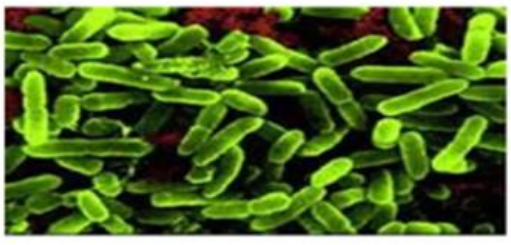
گاز در لوله (LSTB) تشکیل شد و کلنی مشکوک در محیط Nutrient Agar مشاهده شد.

شکل ۵۴ – گاز در لوله (LSTB)

شکل ۵۵–کلنی مشکوک در Nutrient Agar

- **مشاهده میکروسکوپی:**
  - وجود باسیل میله‌ای شکل گرم مثبت و مشاهده اسپور" کلیفرم در نمونه وجود ندارد. (منفی)"
  - وجود باسیل میله‌ای شکل گرم منفی و عدم مشاهده اسپور"کلیفرم در نمونه وجود دارد. (مثبت)"
  - وجود باسیل میله‌ای شکل گرم مثبت و گرم منفی با هم در لام میکروسکوپی، آزمون باید دوباره تکرار شود.

- **تفسیر و بیان نتایج :**
  - "کلیفرم در ۱۰۰ml نمونه آب وجود دارد (مثبت) "
  - "کلیفرم در ۱۰۰ml نمونه آب وجود ندارد (منفی) "



شکل ۵۶- کلیفرم

۷-۵ جستجـــــوی و شناسایی *اشریشیـا کلـــی*

۷-۵-۱ استاندارد ملی ایران شماره۲۱۱۱۳، یخ خوراکی بسته‌بندی شده –ویژگی‌ها و روش‌های آزمون میکروبیولوژی

روش آزمـــــون
صافـی غشـایـــی و غنی سازی

↓

آماده سازی و فیلتراسیون را مطابق بند۳-۷-۲-۱، روش صافی غشایی انجام دهید.

بـه‌منظـور جسـتجو و شناسـایی *اشریشـا کلـی* احتمـالی، پـس از عبـور دادن نمونـه آب از صـافی‌غشـایی، پمپ ایجادکننده خلا را خاموش کـرده و بـا اسـتفاده از پـنس سـترون صـافی‌غشـایی را در داخـل لولـه‌هـا یـا بطـری‌هـای آزمـایش بـا انـدازه۱۶۰ mm × ۱۶ mm دارای لوریـل‌سـولفات LS (محـیط کشـت غنـی کننده انتخابی) غوطه‌ور کنید.

یادآوری - pH محیط لوریل سولفات مایع را به‌گونه‌ای تنظیم کنید که پس از سترون شدن، برابر۰/۱± ۷/۲ شود

Lauryl Sulfate tryptose broth

↓

گرمخـــــــانه گـــــذاری
۳۰ ˚C / ۲۴± ۲ h یا ۳۷ ˚C / ۲۴± ۲ h

اگـر در ایـن مرحلـه گـاز یـا کـدورت مشـاهده نشـد، گرمخانـه‌گـذاری را تـا h ۴۸ دیگـر ادامـه دهیـد. در صورت مشاهده کدورت در محیط کشت، آزمون تاییدی را انجام دهید.

EC brath

شکل ۵۷- ECbrath

گرمخانه گذاری

۴۴ °C ±۰/۵ °C / ۲۴h ± ۲h

چنانچه در این مرحله هیچ گازی در محیط کشت EC ایجاد نشد، گرمخانه‌گذاری را تا مدت زمان ۴۸h ± ۲h ادامه دهید.

بررسی در آب تریپتونه

از لوله‌های گرمخانه‌گذاری شده که تشکیل گاز داده اند به‌وسیله حلقه کشت، در آب تریپتونه‌ای که قبلا در حمام آب گرم تا °C ۴۴ گرم شده است، کشت دهید سپس ماده کشت داده شده را مخلوط کنید در هنگام مخلوط کردن هوا وارد لوله دورهام نشود.

انتقال

یک حلقه کشت از لوله‌های حاوی گاز به

↓

۱۰ ml آب تریپتونه (بدون اندول)

Tryptophane Broth

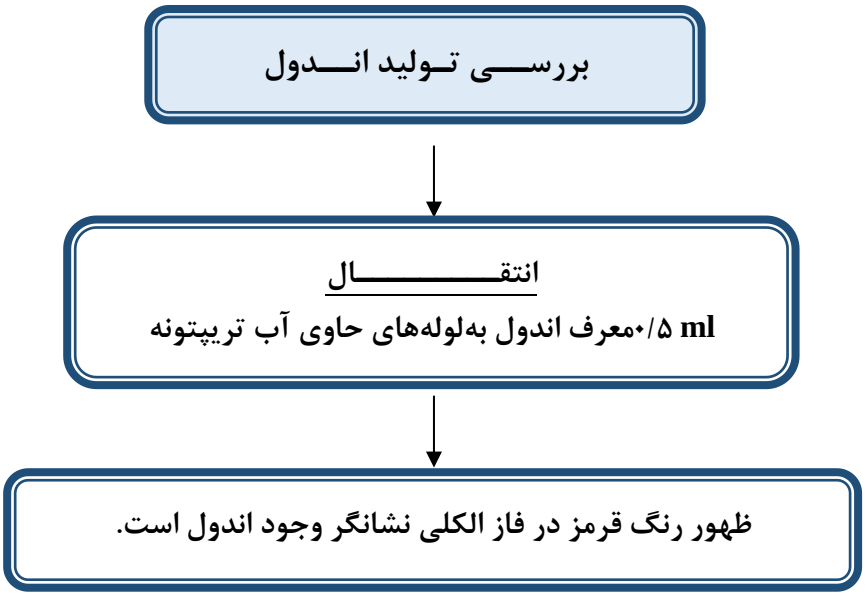
↓

گرمخانه گذاری

۴۴ °C ±۰/۵ °C / ۲۱ h± ۳h

شکل ۵۸- TW

آب تریپتونه غنی از اسید آمینه تریپتوفان است و توسط بعضی از میکروارگانیسم‌های معین به‌عنوان منبع کربن و نیتروژن و انرژی مورد استفاده قرار می‌گیرد. و اندول تولید می‌شود. همه باکتری‌ها و حتی همه باکتری‌های روده‌ای گرم منفی قادر به‌مصرف تریپتوفان و تولید اندول با این روش نیستند. بنابر این تولید ایندول می‌تواند یک روش تشخیصی است .



شکل ۵۹-واکنش اندول

- **تفسیر نتایج :**

تشکیل حلقه اندول در محیط آب تریپتونه، دلیل بر وجود *اشریشیاکلی* احتمالی مثبت است.

۷-۶ انتروکوک‌ها

۷-۶-۱ استاندارد ملی ایران شمارۀ۲-۷۷۲۴، شمارش جستجوی انتروکوک‌ها به‌روش صافی غشایی

انتروکوک‌ها، بی‌هوازی اختیاری هستند و اسپور تولید نمی‌کنند. باکتری‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی، کوکوئیدی و اغلب به‌صورت جفت به‌صورت تکی، یا زنجیرکوتاه مشاهده می‌شوند آن‌ها گستره بزرگی از شرایط محیطی مانند دمای ۱۰ °C تا ۴۰ °C، از pH =۴ تا pH=۱۰ و غلظت‌های بالای کلرید سدیم را تحمل می‌کنند.انتروکوک‌ها بر روی آگار خوندار گوسفندی، همولیز گاما ایجاد می‌کنند. تمایز انتروکوک‌ها از استرپتوکوک‌ها از روی ویژگی‌های ظاهری، بسیار مشکل است. دو گونه مهم همزیست از انتروکوک در روده انسان (مدفوع) عبارتند از :*انتروکوک فکالیس* (۹۰٪ تا ۹۵٪) و *انتروکوک فاسیوم* (۵٪ تا ۱۰٪). انتروکوک‌ها قادر به‌احیاء ترکیب ۲ و ۳ و ۵-تری‌فنیل‌تترازولیوم‌کلراید و تبدیل آن به‌فرمازان[۲] هستند و همچنین در دمای ۴۴ °C اسکولین موجود در محیط کشت‌های اسلنتز و بارتلی و صفرا-اسکولین‌آزاید آگار را هیدرولیز می‌کنند. *انتروکوک فکالیس*[۲] و *انتروکوک فسیوم*[۳] دو گونه کامنسال مشترک در روده انسان هستند و به‌دلیل ساکن بودن در روده بزرگ انسان وحیوانات، حضور آنها در آب حتی در غیاب *اشریشیاکلی* نشانگر آلودگی مدفوعی است .

محیط کشت:

- **Slanetz and Bartley medium (S & B)**
- **Bile Esculin Azide Agar**

- **تهیه محیط کشت:**

- **محیط کشت اسلنتز و بارتلی**[۱]

محیط کشت پایه (تریپتوز،عصاره مخمر،گلوکز، هیدروژن فسفات دی‌پتاسیم، سدیم آزاید) را طبق دستورالعمل سازنده آماده کنید. و با جوشاندن در آب مقطر حل نموده، و برای مدت min ۵ دیگر، آن را در حمام آب جوش قرار دهید. سپس محیط را تا دمای ۵۰ °C تا ۶۰ °C سرد کنید .

- **محلول TTC**

معرف فوق را در آب مقطر ریخته، با تکان دادن حل کنید. سپس آن را توسط صافی غشایی با اندازه منافذ ۰/۲۲ µm سترون نمایید .

- **محیط کامل**

محلول TTC را به‌محیط کشت پایه که تا دمای ۵۰ °C تا ۶۰ °C سرد شده است، اضافه کنید. سپس به‌ضخامت ۳mm تا ۵ mm در پلیت‌های سترون شده ریخته، در سطحی صاف قرار دهید تا بصورت جامد درآید. پلیت‌های تهیه شده حداکثر دو هفته در دمای ۳±۵ °C و تاریکی نگه‌داری می‌شود. pH نهایی محیط باید در دمای ۲۵ °C برابر ۷/۲±۰/۱ باشد .برای تنظیم pH محیط کشت از محلول‌های هیدروکسید سدیم ۴۰ g/L یا اسید هیدروکلریک ۳۶/۵ g/L استفاده کنید .

- **تهیه محیط کشت**:

- **محیط کشت صفرا- اسکولین آزاید آگار**

محیط کشت محیط کشت صفرا- اسکولین آزاید آگار را طبق دستورالعمل سازنده آماده کنید.

نیمه عمر محیط‌های کشت حاوی سدیم‌آزاید کوتاه بوده و با گذشت زمان تجزیه می‌شوند، لذا ضروری است تاریخ انقضای محیط‌های کشت فوق مورد توجه قرار گیرد.

آماده سازی و فیلتراسیون را مطابق بند۳-۷-۲-۱، روش صافی غشایی انجام دهید.

روش آزمون

با استفاده از گیره سر صاف سترون، صافی تهیه شده را به‌گونه‌ای بر روی محیط کشت قرار دهید تا حباب هوا در زیر آن تشکیل نشود.

Slanetz and Bartley medium (S & B)

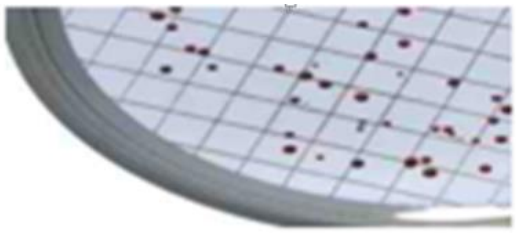
↓

گرمخانه گذاری

(۳۶°C ± ۲ °C / ۴۴h ± ۴h)

- **خصوصیات کلنی در محیط کشت Slanetz and Bartley**
- کلنی‌های برجسته بر روی صافی غشایی به‌رنگ قرمز، صورتی و آلبالویی(در مرکز و یا تمام آن‌ها)
- مدور
- محدب
- گنبدی شکل سفید و دارای سطح مات یا براق با هاله‌ای قهوه‌ای تیره تا سیاه ناشی از هیدرولیز اسکولین

- **تفسیر**
- انتروکوک‌های روده‌ای با احیاء ۲ و ۳ و ۵- تری‌فنیل‌تترازولیوم‌کلراید و تبدیل آن به فرمازان، به‌رنگ قرمز، آلبالویی یا صورتی دیده می‌شوند .



شکل ۶۰- کلنی انتروکوک

آزمون تأییدی

با استفاده از گیره سر صاف سترون صافی غشایی را به‌گونه‌ای که سطح چهارخانهٔ آن به‌طرف بالا باشد، بر روی محیط کشت از پیش ریخته قرار دهید.

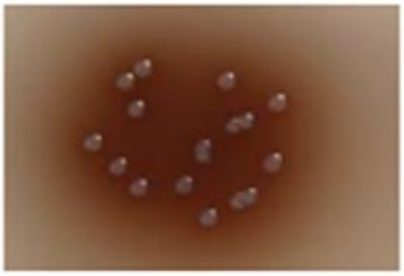
Bile –aesculin azide agar

↓

گرمخانه گذاری

۴۴°C ±۰/۵ °C / ۲h

- **خصوصیات مرفولوژی انتروکوک‌ها**
- کرم و مات
- مدور
- محدب گنبدی شکل
- سفید و دارای سطح مات یا براق با هاله‌ای قهوه‌ای تیره تا سیاه



شکل۶۱ – انتروکوک پس از احیا اسکولین

- **تفسیر:**
- *انتروکوک‌های* روده‌ای اسکولین را در مدت ۲ h هیدرولیز نموده، تولید ترکیب ۶ و ۷- دی هیدروکسی کومارین می‌کنند، که با یون آهن سه ظرفیتی ترکیب شده و ایجاد رنگ قهوه ای روشن تا سیاه می‌کند.

بیان نتایج

برای محاسبه نتایج، با توجه به‌اینکه هر کلنی از یک میکروارگانیسم منشا گرفته است، نتایج را به صورت تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی در حجم معین نمونه با استفاده از فرمول یک محاسبه کنید

$$C_S = \frac{N}{(n_1 v_1 f_1) + (n_2 v_2 f_2) + \dots}$$

C_s تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی در حجم اولیه Vs

N تمام کلنی‌های شمارش شده بر روی صافی‌ها و یا پلیت‌ها در رقت‌های مختلف

n_1 و n_2 تعداد پلیت‌های شمارش شده به‌ترتیب برای رقت‌های f_1 و f_2

v_1 و v_2 حجم نمونه مورد آزمون به‌ترتیب برای رقت‌های f_1 و f_2

f_1 و f_2 رقت‌های مورد استفاده به‌ترتیب برای حجم‌های v_1 و v_2 و در مورد نمونهٔ رقیق نشده، f=۱ می‌باشد .

Vs حجم اولیه برای بیان تعداد میکروارگانیسم‌ها در نمونه

۷-۷ *پسودوموناس آئروژینوزا*

۷-۷-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۸۶۹، کیفیت آب- شناسایی و شمارش *پسودوموناس آئروژینوزا* به-روش صاف کردن غشایی

پسودوموناس آئروژینوزا گونه‌ای مهم از باکتری‌های هوازی، گرم منفی، میله‌ای شکل، کاتالاز مثبت و اکسیداز مثبت است. دمای بهینه برای رشد آن°C ۳۷ تا °C ۴۲ می‌باشد ولی در درجهٔ حرارت یخچال رشد نمی‌کند. در pH=۸ تا pH=۵/۸ بخوبی رشد می‌کند. باکتری بیماری‌زای فرصت‌طلب است که بطور گسترده‌ای در همه جا وجود دارد. این میکروارگانیسم تولید پیگنان‌های پیوسین[۱]،

۱- pyocin

فلورسین[۱]، پیو ملانین[۲] و پیوروبین[۳] می‌کند. روی محیط کشت انتخابی حاوی ستریماید[۴] رشد کرده و غالباً با تولید پیوسیانین، ایجاد فلورسنس[۵] زیر پرتوی فرابنفش می‌کند. همچنین قادر به تولید گاز آمونیاک از استامید است.

محیط کشت‌ها

- **Pseudomonas(C.N. A)**
- **Cetyltrimethylammonium bromide**
- **Mpac**
- **Nutrient agare**
- **Nalidixic Acid, Nanamycin, Acetamide brath**
- **Oxidas Reagen**

تهیه محیط کشت آگاردار از پیش ریخته

- **محیط کشت Pseudomonas(C.N. A)**

محیط کشت (C.N. A) آگار را طبق دستورالعمل سازنده آماده کنید.

مکمل محیط کشت(C.N. A)

هگزادسیل‌تری‌متیل‌آمونیوم‌بروماید (ستریماید) و نالیدیکسیک اسید را با استفاده از صافی سترون کنید. و به‌محیط پایه اضافه کنید. و پس از مخلوط کردن درپلیت‌های سترون تقسیم کنید عمق محیط کشت در هر پلیت حداقل ۵mm است. برای تهیه مکمل، ۸mg کانامایسین و ۰/۳۷g نالیدیکسیک اسید را به۱۰ml آب مقطر سترون با دمای°C ۳۷ اضافه کنید و به‌مدت زمان ۳۰min تکان دهید. محلول را به ۹۹۰ml محیط کشت ذوب شده اضافه کنید .

- **محیط کشت *Neutrient agar***

محیط کشت را طبق دستورالعمل سازنده آماده کنید.

- **محیط کشت *Cetyltrimethylammonium bromide***

محیط کشت را طبق دستورالعمل سازنده آماده کنید.

۱- fluroscein

۲- pyomelanin

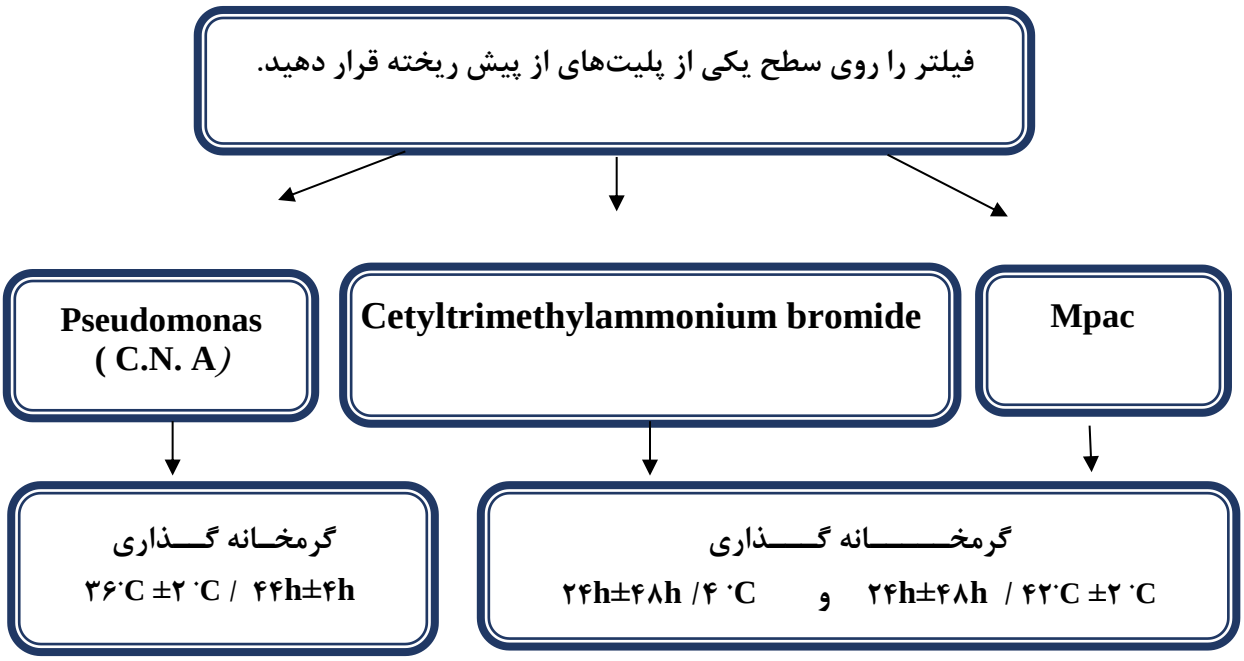
۳- Pyorubin

۴- Cetrimide

۵-Fluorescence

- **محیط کشت (Mpac)**
- محیط کشت پایه Mpac را طبق دستورالعمل سازنده آماده کنید. و کانامایسین و نالیدیکسیک اسید را قبل از ریختن در پلیت‌های سترون، به‌محیط پایه اضافه کنید. پلیت‌های از پیش ریخته خشک تا دو هفته در یخچال قابل نگه‌داری هستند. در صورت نگهداری در یخچال، دمای پلیت‌ها را ۳۰min پیش از استفاده، به‌دمای اتاق برسانید و مکمل را به‌محیط کشت ذوب شده، اضافه کنید.

پس از صاف نمودن، صافی غشائی را توسط انبرک سترون بردارید. به‌طوری که طرف چهارخانه آن را به طرف بالا باشد، روی پلیت از پیش ریخته قرار دهید، و دقت نمائید تا حباب هوا در ته صافی تشکیل نگردد.



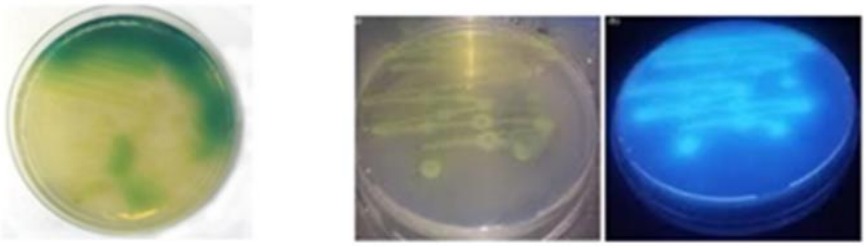
- **بررسی رشد در دماهای** C° (۴۲) و C° (۴)
- *پسودوموناس آئروژینوزا* در دمای C° ۴۲ رشد می‌کند.
- *پسودوموناس آئروژینوزا* در دمای C° ۴ رشد نمی‌کند.

- **بررسی صافی‌ها**
- پس ازپایان زمان گرمخانه‌گذاری، پلیت‌ها را زیر پرتوی فرابنفش بررسی کنید.کلنی‌های مشخص *پسودوموناس آئرو ژینوزا* با قطر ۰/۸ µm تا ۲/۲ µm هریک از محیط‌های کشت دارای خصوصیات تشخیصی خاص، هستند.
- **خصوصیات کلنی *پسودوموناس آئروژینوزا* در محیط کشت‌های:**

-Pseudomonas(C.N. A)

-Cetyltrimethylammonium bromide

- مشاهده کلنی‌های سبز/ آبی ایجاد کننده فلور سنس زیر پرتوفرا بنفش (*پسودو موناس آئروژینوزای* تایید شده)
- مشاهده کلنی‌های غیر سبز / آبی ایجاد کننده فلورسنس زیر پرتوفرا بنفش (*پسودو موناس آئروژینوزای فرضی*)
- مشاهده کلنی‌های قهوه‌ای مایل به‌قرمز ایجاد کننده فلورسنس زیر پرتوفرا بنفش (*پسودوموناس آئروژینوزای* فرضی)



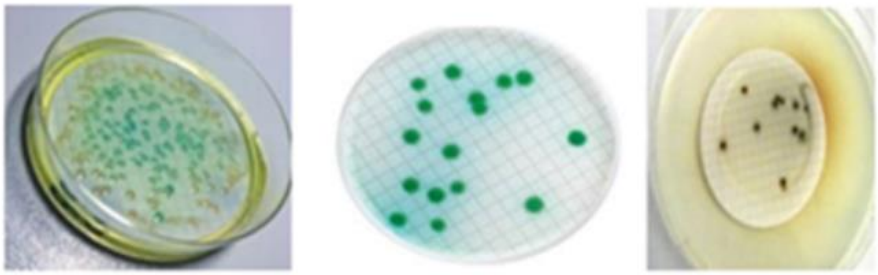
شکل ۶۲- کلنی *پسودوموناس آئروژینوزازیر* پرتو فرابنفش

یادآوری- کلنی‌های سبز–زرد فلورسنس *پسودوموناس* زیر پرتوفرا بنفش به‌واسطه پیگمان پیووردین است.

- **خصوصیات کلنی *پسودوموناس آئروژینوزا* در محیط کشت:**

-(Mpac)

- مشاهده کلنی‌های قهوه‌ای با مرکز سیاه مایل به‌سبز و هاله روشن در اطراف (*پسودوموناس آئروژینوزای* فرضی)

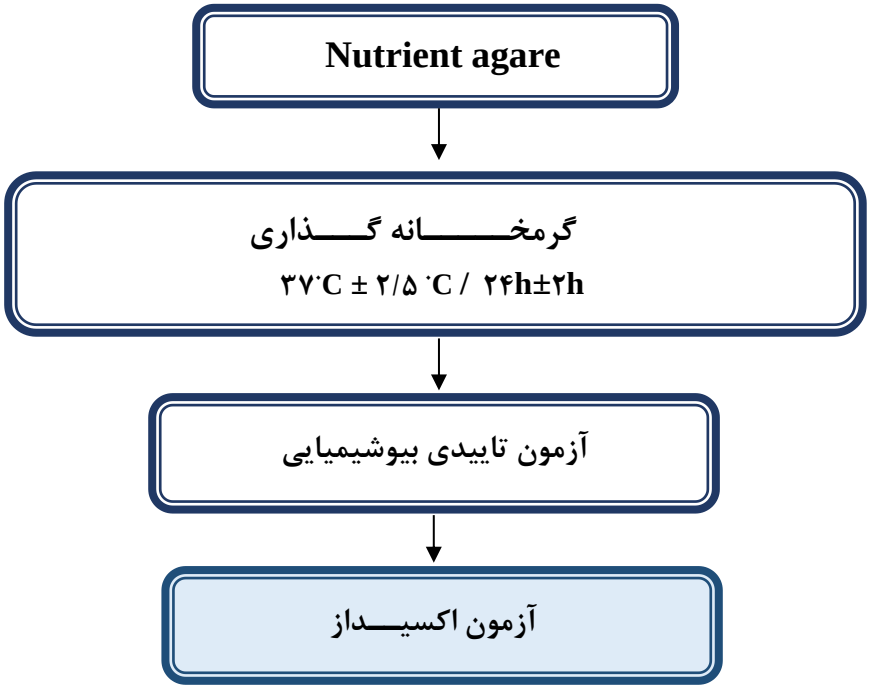


شکل ۶۳- کلنی *پسودوموناس آئروژینوزا*

یادآوری- رنگ سبز –آبی کلنی *پسودوموناس* برای شناسایی گونه مورد استفاده قرار می‌گیرد.

آزمون‌های تاییدی

کلنی‌های انتخاب شده برای انجام آمون‌های تاییدی بیوشیمیایی را بر روی محیط کشت آگار مغذی کشت خطی دهید.



اکسیدازها آنزیم‌هایی هستند که واکنش‌های اکسیداسیون را کاتالیز (تسهیل) می‌کنند. در زیست‌شیمی یک اکسیدورداکتاز آنزیمی است که انتقال الکترون را از یک مولکول (احیاکننده) به‌مولکول دیگر (اکسیدان) کاتالیز می‌کند $A^- + B \rightarrow A + B^-$

باکتری‌ها اصولاً به‌دو روش انرژی تولید می‌کنند یا با تخمیر یا با اکسیداسیون مواد آلی که این گروه از باکتری‌ها آنزیم اکسیداز دارند و اصطلاحاً اکسیداز مثبت هستند. اگر باکتری دارای آنزیم سیتوکروم اکسیداز باشد (مانند: پسودوموناس یا گونوکوک) در صورت مجاورت با رنگ‌های احیا شونده مانند تترامتیل‌پی‌فنیلین‌دی‌آمین آن را احیا نموده به‌رنگ بنفش تغییر رنگ می‌دهد و اگر اکسیداز منفی باشد (مانند: آسینتوباکتر) تغییر رنگ مشاهده نمی‌شود.

انجام آزمون اکسیـــداز

- برای انجام آزمون اکسیداز، با استفاده از لوپ، قسمتی از کلنی را برداشته و بر روی یک کاغذ صافی آغشته به‌معرف اکسیداز قرار دهید واکنش مثبت در مدت زمان۱۰sec به‌صورت ایجاد رنگ آبی تیره مشاهده می‌گردد.

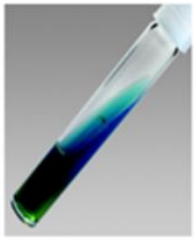
آزمون استـــامیـــد

- بـرای انجـام آزمـون اسـتامید، از محـیط افتراقـی اسـتامید آگـار اسـتفاده مـی شـود. ایـن محـیط دارای استامید به‌عنوان تنهـا منبـع کـربن و معـرف بروموتیمـول بلـو (BTB) اسـت ایـن معـرف در pH خنثـی بـه‌رنـگ سـبز و در pH قلیـایی بـه‌رنـگ آبـی دیـده مـی‌شـود. بـا اسـتفاده از لـوپ، قسـمتی از کلنـی را برداشـته و بـه‌لولـه حـاوی محـیط کشـت اسـتامید آگار(شـیبدار) منتقـل کنید.

انتقال یک کلنـــی به‌محیـط
Acetamide

↓

گرمخـــــــــــــانه گـــــــــــــــذاری
۳۷ ˚C / ۲۴h±۳۶h



شکل۶۴-آزمون استامید

هشـــدار – اسـتامید مـاده ای سـرطان‌زا و تحریـک کننـده اسـت. بنـابراین هنگـام وزن کـردن، آمـاده سـازی و دفـع محیط کشت باید دقت لازم به‌عمل آید.

- **تفسیر :**
  - *پسودوموناس آئروژینوزا*، استامید مثبت است و تولید آمونیاک می‌کند. تولید گاز آمونیاک با ایجاد رنگ آبی پر رنگ مشخص می‌شود.
- **مشاهده میکروسکوپی:**
  - پسودوموناس به‌اشکال میله‌ای می‌باشد.

شکل ۶۵-پسودو موناس

شمارش کلنی‌ها

تعداد CFU باکتری را، مطابق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹ محاسبه نمایید .

۷-۸ اسپورکلستریدیوم‌های احیأکننده سولفیت

۷-۸-۱ ا ستاندار ملی ایران شمارهٔ ۵۳۵۳، آب - ج ستجو و شمارش ا سپورکلا ستریدیوم‌های احیأکننده سولفیت با استفاده از صافی غشایی

این باکتری‌ها گروهی ناهمگون از نظر تاکسونومی هستند به‌این معنا که در انواع اشکال و اندازه در بین اعضای این گروه دیده می‌شوند. برخی از این باکتری‌ها کوکسی و برخی باسیل‌اند. برخی توانایی تولید اندوسپور دارند درحالی‌که بسیاری چنین توانایی را ندارند. در واقع هر باکتری که بتواند فرآیند احیای گوگرد اکسید شده به‌انواع احیا شده را انجام دهد بدون درنظر گرفتن قرابت تاکسونومیکی (یعنی اینکه به‌چه خانواده یا جنس باکتریایی تعلق دارد) در این گروه بررسی می‌شود. این باکتری‌ها به‌اشکال خمیده، بیضی، کروی، رشته ای با ۱ µm تا ۵ µm و عرض ۰/۵ µm تا ۲ µm بوده و اغلب دارای تاژه و متحرک هستند. اکسیژن برای این باکتری‌ها مضر است، اگرچه آنها را از بین نمی‌برد اما غیر فعال می‌کند. فرق بین انواع آنها (دی سولفو ویبریو، کلستریدیوم و توماکولم) مربوط به‌چگونگی احیاء مواد آلی است. اسپور این میکروارگانیسم‌ها بطور وسیعی در محیط پراکنده هستند و نسبت به‌مواد شیمیایی و عوامل فیزیکی مقاوم بوده و به‌مدت طولانی به‌خصوص در آب باقی می‌مانند، این میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان شاخص آلودگی متناوب آب معرفی می‌شوند و حضور آنها در آب تصفیه شده، نشانه وجود نقص در فرآیند تصفیه آب در تصفیه خانه‌ها محسوب شوند.

محیط کشت

- **Iron Sulphite Agar (ISA)**
- **Tryptise sulfite Agar**
- **Nutrient Agare**
- **Tryptose Sulfite Cycloserine Agar (TSC)**

روش آزمون

برای آب‌های آشامیدنی، چشمه، آب‌چاه، آب‌معدنی، آب دریا و آب‌های سطحی که آلودگی‌شان به کلستریدیوم‌ها کمتر می‌باشد mL ۱۰۰، و برای آب‌هایی که دارای آلودگی بیشتری می‌باشند، حجم کمتری را صاف کنید. برای آزمایش نمونه‌های کمتر از mL ۱۰، بایستی آنها را با mL ۱۰ تا mL ۱۰۰ از آب سترون یا محلول رقیق‌کننده مخلوط کنید.

شوک حرارتی در بن ماری ۵ ±۷۵°C به مدت ۱۵ min

قبل از انجام آزمایش، نمونه باید در بن ماری ۵ ± ۷۵°C به‌مدت زمان ۱۵ min حرارت داده شود. برای کنترل درجه حرارت مقداری آب معمولی را به‌یک ظرف مشابه‌ریخته، و یک دماسنج را در آن قرار دهید.، و ظرف را در کنار نمونه مورد آزمون در بن‌ماری بگذارید. از زمانی‌که دماسنج حرارت ۷۵°C را نشان می‌دهد، زمان را یادداشت نموده، و بعد از زمان ۱۵ min نمونه مورد آزمون را از بن‌ماری خارج نمائید.

آماده سازی و فیلتراسیون را مطابق بند ۳-۷-۲-۱، روش صافی غشایی انجام دهید.

یادآوری- برای آزمون اسپورکلستریدیوم‌های احیاکننده سولفیت، از صافی غشایی با اندازه روزنه ۰/۲۲ µm استفاده کنید.

نمونه را طوری رقیق کنید تا پرگنه‌های سیاه به طور مجزا تشکیل شوند، و به آسانی قابل شمارش باشند. پس از صاف نمودن، صافی غشائی را توسط انبرک سترون بردارید. به‌طوری که طرف چهارخانه آن را به‌طرف بالا باشد، روی پلیت از پیش ریخته قرار دهید و دقت نمائید تا حباب هوا در ته صافی تشکیل نگردد.

شمارش اسپور

Iron Sulphite Agar (SIA)
(دو لایه‌ی)

یا

Tryptise sulfite Agar
(دو لایه‌ای)

پس از قرار دادن فیلتر در سطح یکی از پلیت‌های از پیش ریخته، mL ۱۸ از محیط کشت کامل و ذوب شده با درجه حرارت ذوب شده با درجه حرارت حدود ۵۰°C ± ۲°C را بر روی صافی بریزید. صبر کنید تا محیط جامد شود.

گرمخـــــــانه گـــــذاری بـــی‌هـــوازی

۲۴ hتا۴۸h / ۳۷ °C ± ۱ °C

↓

شمارش کلنی‌ها

تعداد CFU باکتری را، مطابق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹ محاسبه نمایید .

- **خصوصیات کلنی:**
  - مشاهده کلنی‌های سیاه دارای هاله سیاه
  - مشـــاهده کلنی‌های ســـیاه که احتمالا دارای هاله ســـیاه در محیط کشـــت هســـتند، نشـــان دهنده باکتری‌های بی‌هوازی احیاء کننده سولفیت می‌باشند.

چنانچـه از ایـن روش اسـتاندارد بـرای شـمارش *کلسـتریدیوم پرفرنـژنس* اسـتفاده مـی‌شـود لازم اسـت بعد از به‌دست آوردن کلنـی‌هـای شـاخص، تعـداد ۵ کلنـی شـاخص از هـر کـدام از پلیـت‌هـا را انتخـاب و آزمون‌های تاییدی برای شناسایی جنس *کلستریدیوم پرفرنژنس* انجام گیرد

یـادآوری۱- بـرای غیـر فعـال کـردن فـرم رویشـی بـاکتری، نمونـه در دمـای ۲°C±۶۰°C توسـط شـوک حرارتـی تیمـار شود.

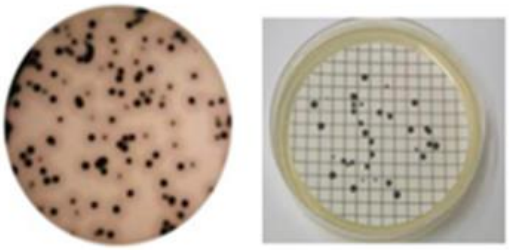
یادآوری۲- محیط دارای سیکلوسرین، به‌عنوان عامل انتخابی برای جلوگیری از رشد گونه‌های باسیلوس است.

یـادآوری۳- گرمخانـه گـذاری در دمـای ۴۴°C، قابلیـت انتخـابی آزمـون را بـرای *کلسـتریدیوم پرفرنـژنس* افـزایش مـی‌دهد.

بـرای اطلاعـات بیشـتر بـه‌اسـتاندارد ملـی ایـران شـمارهٔ ۱۹۲۶۵، کیفیـت آب- شـمارش *کلسـتریدیوم پرفرنژنس*- با استفاده از روش صافی غشایی مراجعه کنید.

- **مشاهده میکروسکوپی:**
  - میله‌ای با اندواسپور انتهایی

شکل ۶۶-شکل میکروسکوپی
کلستریدیوم



شکل ۶۷-کلنی های
کلستریدیوم

۷-۹ کلستریدیوم‌پرفرنژنس

۷-۸-۱ استاندار ملی ایران شمارهٔ ۱۹۲۶۵، کیفیت آب - شمارش کلستریدیوم پرفرنژنس - با استفاده از صافی غشایی

کلستریدیوم پرفرنژنس[۱] باسیل ولشای گونه‌ای از جنس کلستریدیوم است و شاخص ارزشمند برای آلودگی مدفوعی شناخته شده است. حضور این باکتری در آب بیانگر آلودگی متناوب و جزئی است این باکتری میله‌ای شکل گرم مثبت بی هوازی، بدون حرکت و دارای یک اسپور بیضی شکل مرکزی یا نزدیک به‌انتها است که باعث تورم سلول نمی‌شود .عامل اصلی بیماری گاز گانگرن است.

چنانچه از این روش استاندارد برای شمارش *کلستریدیوم پرفرنژنس* استفاده می‌شود لازم است بعد از به‌دست آوردن کلنی‌های شاخص، تعداد ۵ کلنی شاخص از هر کدام از پلیت‌ها را انتخاب و آزمون‌های تاییدی برای شناسایی جنس *کلستریدیوم پرفرنژنس* انجام گیرد. *کلستریدیوم پرفرنژنس* پس از گرمخانه‌گذاری بی‌هوازی در دمای ۴۴°C±۱°C به‌مدت زمان ۲۱h ± ۳h، کلنی‌های سیاه یا خاکستری تا زرد متمایل به‌قهوه‌ای را روی محیط کشت تریپتوزسولفیت‌سیکلو سرین آگار، حتی کم‌رنگ ایجاد می‌کند. این کلنی‌ها دارای آنزیم فسفاتاز اسیدی هستند. کلنی های روی صافی غشایی بر خلاف کلنی‌های توسعه یافته در محیط کشت آگار، سیاهی واضحی ندارد بنابر این کلنی‌های کم-رنگ نیز باید شمارش شوند.

محیط کشت

- **Tryptose Sulfite Cycloserine agar (TSC)**
- **D-C ycloserine**
- **Blood agare /Columbia agare / Tryptone soya agar**
- **Acid Phosphatase reagent**

روش آزمون

۱- *Clostridium perfringens*

شوک حرارتی

قبل از انجام آزمایش، نمونه باید در بن ماری۶۰ °C ± ۲ °C به‌مدت زمان ۱۵ min ±۱ min حرارت داده شود. برای کنترل درجه حرارت مقداری آب معمولی را به‌یک ظرف مشابه‌ریخته، و یک دماسنج را در آن قرار دهید و ظرف را در کنار نمونه مورد آزمون در بن‌ماری بگذارید. از زمانی‌که دماسنج حرارت۶۰ °C را نشان می‌دهد، زمان را یادداشت نموده، و بعد از زمان ۱۵ min ±۱ min نمونه مورد آزمون را از بن‌ماری خارج کنید.

رقیق سازی

حجم یا رقت مورد آزمون باید طوری انتخاب شود که در صورت امکان، تعداد ۱۰ تا ۸۰ کلنی سیاه به طور مجزا بر روی صافی غشایی تشکیل شوند، و به آسانی قابل شمارش باشند.

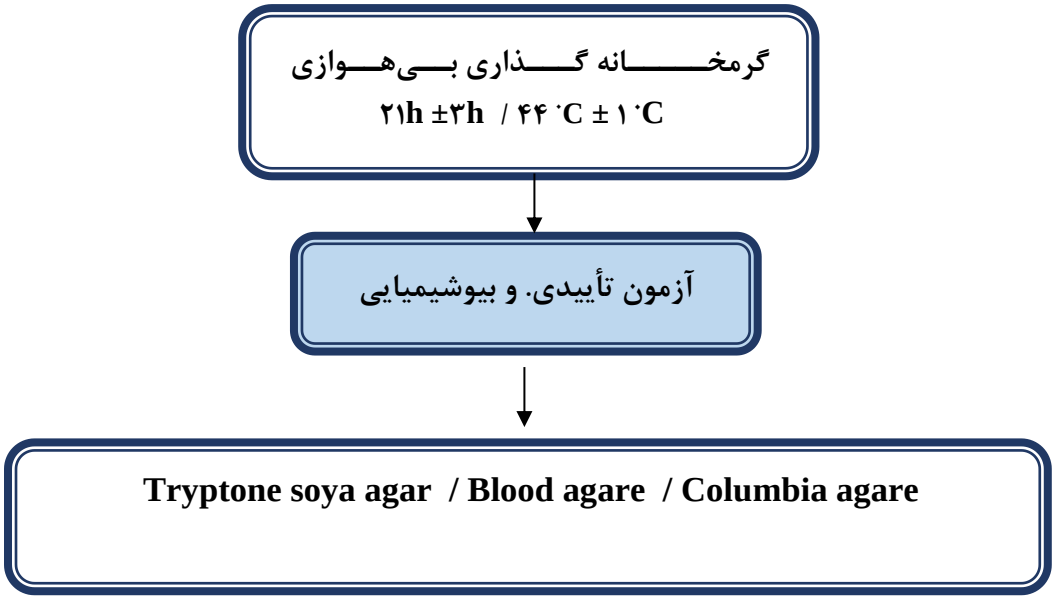
آماده سازی و فیلتراسیون را مطابق بند۳-۷-۲-۱، روش صافی غشایی انجام دهید.

یادآوری- برای آزمون اسپورکلستریدیوم پرفرژنس، از صافی غشایی با اندازه روزنه۰/۲۲ µm استفاده کنید.

پس از صاف نمودن، صافی غشائی را توسط انبرک سترون بردارید. به‌طوری که طرف چهار خانه آن را به‌طرف بالا باشد، روی پلیت از پیش ریخته قرار دهید و دقت نمائید تا حباب هوا در ته صافی تشکیل نگردد.

Tryptise sulfite Agar

پس از قرار دادن فیلتر در سطح پلیت از پیش ریخته، ۱۸mL از محیط کشت کامل و ذوب شده با درجه حرارت ذوب شده با درجه حرارت حدود ۵۰ °C ± ۲ °C را بر روی صافی بریزید. صبر کنید تا محیط جامد شود.



پیشنهاد می‌شود آزمون‌های تایید. MNLG[۱] (حرکت، کاهش نیترات، تخمیر لاکتوز و مایع‌سازی ژلاتین) برای کلنی مشکوک انجام شود.

آزمون فسفاتاز

برای انجام آزمون فسفاتاز، با استفاده از لوپ، قسمتی از کلنی که در شرایط بی‌هوازی در آگار خوندار یا کلمبیا و یات تریپتون سوی آگار رشد کرده‌اند را برداشته و بر روی یک کاغذ صافی آغشته به‌معرف فسفاتاز قرار دهید واکنش مثبت در مدت زمان۳minتا۴min به‌صورت ایجاد رنگ ارغوانی مشاهده می‌گردد.

- **خصوصیات کلنی:**

به‌دلیل اینکه سیاهی کلنی ها سریعا محو و سرانجام ناپدید می‌شوند، پلیت‌ها باید در طول ۳۰min پس از اتمام گرمخانه‌گذاری بی‌هوازی شمارش شده باشند. اگر تعداد جارهای بی‌هوازی زیاد باشد پلیت‌ها باید به‌صورت جاربه‌جار یا اگر گرمخانه‌گذاری در یک گرمخانه بی‌هوازی انجام شده باشد، باید قسمت‌به‌قسمت بررسی شوند.

- مشاهده کلنی‌های سیاه یا خاکستری تا زرد متمایل به قهوه‌ای دارای هاله سیاه (حتی کم‌رنگ)

شمارش کلنی‌ها

تعداد CFU باکتری را، مطابق استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹ محاسبه نمایید .

۱- MNLG: (testing for motility, nitrate reduction, lactose fermentation and gelatin liquefaction).

۸ محاسبه نتایج (راهنما)

روش محاسبه نتایج، هنگامی که تعداد کل کلنی روی پلیت بین ۱۰ تا ۲۰۰ کلنی (در روش کشت سطحی و صافی غشایی) یا بین ۱۰ تا ۳۰۰ کلنی (در روش کشت آمیخته) یا هنگامی که تعداد کلنی‌های تیپیک بین ۱۰ کلنی تا ۱۵۰ کلنی (در روش کشت سطحی و آمیخته) یا بین ۱۰ کلنی تا ۱۰۰کلنی است (در روش کشت آمیخته) به‌کار برده می‌شود.

به‌دلیل اینکه فرض بر این است که هر کلنی از یک میکروارگانیسم یا از یک تجمع منفردی میکروارگانیسم‌ها منشا گرفته است، نتایج به‌صورت تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی (cfu) یا ذرات تشکیل دهنده کلنی(cfu) در حجم معینی از نمونه (معمولا ۱۰۰mL یا ۱mL) با استفاده از فرمول(۱) به‌دست می‌آید.

(۱)

$$Cs = \frac{z}{Vtot} \times Vs$$

که در آن :

Cs تخمین تعداد cfu در حجم مرجع V_s است

z جمع کلنی‌های شمارش شده روی پلیت‌ها یا صافی‌ها بدست آمده از رقت‌های d_n یا حاصل از حجم‌های جداگانه آزمونه (نمونه یا رقت)

V_s حجم مرجع انتخاب شده برای بیان غلظت میکروارگانیسم‌ها در نمونه

V_{tot} کل حجم مرجع محاسبه شده نمونه اصلی شامل پلیت‌های شمارش شده است. همچنین جمع حجم‌های جداگانه از آزمونه (نمونه یا رقت) یا محاسبه شده با استفاده از فرمول ۲ است.

(۲)

$$V_{tot} = (n_1 V_1 d_1) + (n_2 V_2 d_2) + \ldots (n_i V_i d_i)$$

که در آن

V_{tot} حجم کل محاسبه شده نمونه اصلی شامل پلیت‌های شمارش شده

$n_1, n_2 \ldots n_i$ تعداد پلیت‌های شمارش شده برای رقت $d_1, d_2 \ldots d_i$

$V_1, V_2 \ldots V_i$ حجم آزمون استفاده شده برای رقت $d_1, d_2 \ldots d_i$

$d_1, d_2 \ldots d_i$ رقت مورد استفاده برای حجم آزمونه $V_1, V_2 \ldots V_i$

برای نمونه رقیق نشده $d=1$ و برای رقت ۱۰ برابر $d=0/1$ است.

یاد آوری – بنابراین نتایج نهایی به‌صورت تابعی از میانگین ارزیابی شده[1] شمارش هر پلیت می‌باشد.

نتایج محاسبه شده را تا دو رقم معنی‌دار گرد کنید، اگر رقم سوم بزرگتر یا برابر ۵ است عدد پیش از آن را به‌اندازه یک واحد افزایش دهید.

بهتر است نتایج را به‌صورت عددی بین ۱ و ۹/۹ ضرب در توان مناسبی از ۱۰، یا تعداد کل با دو رقم معنی‌دار بیان کنید.

یادآوری – در استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۷، یک مثال برای محاسبه روش های کشت آمیخته و سطحی (شمارش دوتایی) نوشته شده است.

---

۱ -Weighted average

۸-۱ موارد پس از شناسایی یا تایید

در مواردی که روش استفاده شده نیاز به شناسایی و تایید دارد، تمام کلنی‌های مشکوک فرضی را باید از هر پلیتی که برای شمارش نگهداری شده است، تلقیح کنید. در مواردی که این کار عملی نیست، تمام کلنی تیپیک (n) باید از حاشیه پلیت یا صافی غشایی مورد ازمون قرار گیرد (n ممکن است از یک پلیت به‌پلیت دیگر متفاوت باشد) میانگین تعداد حداقل و کافی کلنی‌ها، حدود ۵ کلنی در هر پلیت است.

نتایج تایید شده را به‌صورت نسبت کلنی‌های فرضی که با معیارهای تایید و شناسایی مطابقت دارند با استفاده از فرمول(۳)محاسبه کنید.

(۳)

$$X=\frac{k}{n}\times z$$

که در آن :

x تعداد تخمینی کلنی‌های تایی شده در هر پلیت است.

k تعداد کلنی‌ها در میان کلنی‌های تلقیح شده است که با معیارهای شناسایی مطابقت دارد.

n تعداد کلنی‌های مثبت فرضی است که از یک پلیت برای تایید، تلقیح می‌شود.

z تعداد کل کلنی‌های مثبت فرضی است که روی پلیت شمارش می‌شود.

ازگرد کردن نتایج آزمون x که تایید کامل نشده‌اند خود داری کنید.

تعداد C_s میکرو ارگانیسم‌های تایید شده یا شناسایی شده موجود در آزمایه را با جایگزینی z با x (جمع x) با استفاده از فرمول (۱) محاسبه کنید نتایج را گرد کنید و به‌صورت عددی بین ۱ و ۹/۹ ضرب در توان مناسبی از ۱۰، یا تعداد کل با دو رقم معنی دادار بیان کنید.

یادآوری – در استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۷، یک مثال برای محاسبه کلنی‌های تایید شده نوشته شده است.

۸-۲ موارد خاص

۸-۲-۱ تمام پلیت‌های کمتر از ۱۰ کلنی

شمارش‌های از ۲۰ تا حد بالایی هر روش، در محدوده دقت بهینه است. برای شمارش‌های بین ۱۰ تا ۲۰، دقت همچنان قابل قبول است. با کاهش تعداد کلنی‌ها به کمتر از ۱۰، دقت به سرعت کاهش می‌یابد. بسته به هدف آزمون، حد پایین‌تر تعیین، در شمارش‌های کمتر از ۱۰ تعریف می‌شود.

حد تعیین، کمترین میانگین غلظت ذره x در آزمونه تعریف شده است، چنانچه عدم قطعیت استاندارد نسبی برابر با مقدار تعیین شده $(RSD)^n$[۱] باشد.

۱ -Relative standard deviation

RSD انحراف معیار نسبی است که از تقسیم انحراف معیار تخمینی S جمعیتی از یک نمونه به میانگین نمونه $\bar{x}$ بدست می‌آید برای محاسبه انحراف معیار نسبی از w استفاده می‌شود بنابر این $w=\frac{s}{\bar{x}}$ در موارد توزیع پواسون، x از فرمول ۴ محاسبه می‌شود.

(۴)

$x=1/w^2$

اگر w برابر ۰/۵۰ (۵٪) باشد به دلیل حد دقت نسبی قابل قبول (که در میکروبیولوژی منطقی به‌نظر می‌رسد)، حد پایینی تعیین به‌صورت زیر به‌دست می‌آید .

$x=1/0.5^2$

بنابر این نتایجی که بر اساس شمارش کمتر از ۴ می‌باشد باید فقط به‌صورت تشخیص وجود میکروارگانیسم بیان شود.

اگر تمام پلیت‌های دارای کمتر از ۱۰ کلنی باشد، ولی تعداد کل کلنی‌ها در تمام پلیت‌های در دسترس با هم ۴ یا بیشتر باشد. اگر تعداد کل از ۳ تا ۱ باشد، دقت به حدی کم است که نتایج به‌صورت"میکرو ارگانیسم در حجم آزمون شده وجود دارد" گزارش شود.

۸-۲-۲ پلیت های بدون کلنی

درصورتی که پلیت‌ها هیچ کلنی نداشته باشد، نتایج را به‌صورت زیر بیان کنید.

تعداد میکرو ارگانیسم‌ها کمتر از $\frac{1}{Vtot}$ cfu در حجم مورد آزمون است.

در مواردی که V_{tot} حجم کل محاسبه شده نمونه اصلی در پلیت‌های شمارش شده است، به‌زیر بند ۳-۹ این جزوه آموزشی، مراجعه کنید همچنین می‌توانید نتایج را به‌صورت "میکروارگانیسم در حجم مورد آزمون قابل شناسایی نیست" گزارش کنید.

۸-۲-۳ بیش از ۲۰۰ تا ۳۰۰ کلنی با کلنی‌های تیپیک یا تایید شده قابل مشاهده

در صورتی که تعداد تمام کلنی‌های تیپیک و غیر تیپیک برای تمام پلیت‌ها در رقت اول d_1 بیش از ۲۰۰ کلنی (در مورد کشت سطحی و صافی غشایی) یا بیشتر از ۳۰۰ کلنی (برای روش کشت آمیخته) با کلنی‌های تیپیک قابل مشاهده با تایید شده باشد و اگر برای تمام پلیت‌ها در رقت بعدی d_2 که کمتر از ۲۰۰ کلنی (برای روش های کشت سطحی و صافی غشایی) با کمتر از ۳۰۰ کلنی (برای کشت آمیخته) داشته باشد، هیچ کلنی تایید شده یا تیپیک شمارش نشد، نتایج را به‌صورت زیر بیان کنید.

-کمتراز $1/d_2$ واحد با تشکیل دهنده کلنی در حجم نمونه و بیش از $1/d_1$ واحد تشکیل دهنده کلنی در حجم نمونه که $1/d_1$ و $1/d_2$ ضریب رقت مربوط به‌رقت های d_1 و d_2 است.

که در آن $1/d_2$ ضریب رقت مربوط به‌رقت d_2 است.

و بیش از $۱/d_۲$ واحد یا ذره تشکیل دهنده کلنی در حجم نمونه که $\frac{۱}{d_۱}$ و $\frac{۱}{d_۲}$ ضریب رقت مربوط به‌رقت‌های $d_۱$ و $d_۲$ است.

یادآوری – در استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۷، یک مثال برای محاسبه بیش از ۲۰۰ تا ۳۰۰ کلنی با کلنی‌های تیپیک یا تایید شده قابل مشاهده نوشته شده است.

۸-۲-۴ بیش از ۲۰۰ تا ۳۰۰ کلنی بدون کلنی تایید شده یا تیپیک قابل مشاهده

اگر تعداد تمام کلنی‌های تیپیک و غیر تیپیک برای تمام پلیت‌ها در رقت اول $d_۱$ بیش از ۲۰۰ کلنی (در مورد کشت سطحی و صافی غشایی) یا بیشتر از ۳۰۰ کلنی (برای روش کشت آمیخته) بدون کلنی‌های تیپیک قابل مشاهده با تایید شده باشد و اگر برای تمام پلیت‌ها در رقت‌های متوالی $d_۲$ کمتر از ۲۰۰ کلنی (برای روش‌های کشت سطحی و صافی غشایی) یا کمتر از ۳۰۰ کلنی (برای کشت آمیخته)، هیچ کلنی تایید شده‌ای شمارش نشد، نتایج را به‌صورت زیر بیان کنید .

کمتراز $۱/d_۲$ واحد با تشکیل دهنده کلنی در حجم نمونه که $۱/d_۲$ ضریب رقت مربوط به‌رقت $d_۲$ است.

- کمتراز $\frac{۱}{d_۲}$ واحد با ذره تشکیل دهنده کلنی در حجم نمونه که در آن $\frac{۱}{d_۱}$ ضریب رقت مربوط به‌رقت واحد یا ذره تشکیل دهنده کلنی در حجم نمونه که $\frac{۱}{d_۱}$ و $\frac{۱}{d_۲}$ ضریب رقت مربوط به‌رقت $d_۲$ است.

یادآوری – در استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۷، یک مثال برای محاسبه بیش از ۲۰۰ تا ۳۰۰ کلنی بدون کلنی‌های تایید شده یا تیپیک قابل مشاهده نوشته شده است.

۸-۲-۵ بیش از ۲۰۰ تا ۳۰۰ کلنی با کلنی های تیپیک یا مشکوک در تمام رقت ها

در صورتی که تعداد تمام کلنی‌های شمارش شده در هر یک از پلیت‌ها برای تمام رقت‌های تلقیح شده بیش از ۲۰۰ کلنی (برای روش کشت سطحی و صافی غشایی) یا بیشتر از ۳۰۰ کلنی (برای روش کشت آمیخته) و اگر تعداد کلنی‌های تیپیک یا مشکوک بیش از ۱۵۰ کلنی (برای روش‌های کشت سطحی و آمیخته) یا بیش از۱۰۰کلنی (برای روش صافی غشایی) باشد، نتایج را به‌صورت زیر بیان کنید .

صافی غشایی: تعداد کل کلنی‌ها بیش از $\frac{۲۰۰}{d}$ واحد تشکیل دهنده کلنی (cfu) در حجم نمونه و تعداد کلنی‌های تیپیک بیش از $\frac{۱}{d} \times \frac{k}{n} \times ۱۰۰$ واحد تشکیل دهنده کلنی (cfu) در حجم نمونه

کشت آمیخته: تعداد کل کلنی‌ها بیش از $\frac{۳۰۰}{d}$ واحد تشکیل دهنده کلنی (cfu) در حجم نمونه و تعداد کلنی های تیپیک بیش از $\frac{۱}{d} \times \frac{k}{n} \times ۱۵۰$ واحد تشکیل دهنده کلنی (cfu) در حجم نمونه

کشت سطحی: تعداد کل کلنی‌ها بیش از $\frac{۲۰۰}{d}$ واحد تشکیل دهنده کلنی (cfu) در حجم نمونه و تعداد کلنی های تیپیک بیش از $\frac{۱}{d} \times \frac{k}{n} \times ۱۵۰$ واحد تشکیل دهنده کلنی (cfu) در حجم نمونه

که در آن $\frac{۱}{d}$ ضریب رقت برای آخرین رقت تلقیح شده

K تعداد کلنی‌هایی است که در میان کلنی‌های مشکوک فرضی تلقیح شده (n) با معیارهای شناسایی و تایید مطابقت دارد.

۸-۳ تخمین بیشترین تعداد احتمالی (MPN)

۸-۳-۱ اساس روش MPN ، در بیشتر موارد، تلقیح آزمونه‌های متعدد از یک نمونه و یا رقتی‌های آن به لوله های دارای محیط کشت مایع است.

سه روش اصلی برای تعیین مقادیر MPN وجود دارد:

۸-۳-۱-۱ فرمول ریاضی

برای تخمین میکروارگانیسم‌ها در ۱۰۰ mL نمونه و یا به‌عبارت دیگر برای تعیین بیشترین تعداد احتمالی MPN در ۱۰۰ mL، می‌توان از فرمول زیر استفاده کرد:

$$MPN/۱۰۰ml = \frac{npos \times Vs}{\sqrt{Vneg} \times Vtot}$$

npos تعداد لوله‌های دارای واکنش مثبت

Vs حجم نمونه مرجع در نمونه اصلی به‌میلی‌لیتر (معمولادر ۱۰۰mL)

Vneg حجم کل در تمام لوله‌های دارای واکنش منفی به mL

Vtot حجم کل نمونه در تمام لوله‌ها به mL

۸-۳-۱-۲ جدول MPN

برای تخمین میکروارگانیسم‌ها در۱۰۰ mL نمونه و یا به‌عبارت دیگر برای تعیین بیشترین تعداد احتمالی MPN در۱۰۰ mL نمونه از جدول شماره ۹، مطابق جدول پیوست الزامی الف این جزوه آموزشی استفاده کنید.

۸-۳-۱-۳ برنامه کامپیوتری

در روش MPN که در آن محیط کشت با غلظت مضاعف یا چند برابر یا محیط کشت حل شده در نمونه استفاده می‌شود ممکن است مقدار مواد ممانعت کننده بیشتر باشد. صافی غشایی که میکروارگانیسم‌ها را از نمونه جدا می‌کند ممکن است به‌دلیل این که مواد ممانعت کننده روی صافی باقی نمی‌ماند این مشکل را نداشته باشد. همچنین اجزای بیولوژیکی مانند فلور میکروبی همراه ممکن است از طریق رقابت بیولوژیکی با رشد میکروارگانیسم‌های مورد جستجو تداخل داشته باشد این اثر به‌ویژه در محیط کشت مایع اتفاق می‌افتد در سایر روش‌های آزمون که میکرو ارگانیسم کلنی‌های جداگانه ایجاد می‌کند این رقابت بیولوژیکی به‌علت عدم گسترش و یا رشد زیاد کلنی‌ها روی پلیت، محدود می‌شود.

توزیع تصادفی میکروارگانیسم در نمونه باعث عدم دقت در نتایج می‌شود این مشکل را می‌توان با کار برد روش تلقیح مناسب کاهش داد.

در روش MPN دقت، با افزایش تعداد لوله‌های تلقیح شده چند تایی در هر سری حجم آزمایه افزایش می‌یابد.

دقت نسبی به‌الگوی نتایج مثبت بدست آمده بستگی دارد.
در روش شمارش کلنی، دقت به‌تعداد کل کلنی‌ها بستگی دارد و نتیجه با افزایش تعداد پلیت‌ها صافی‌های کشت داده شده، افزایش می‌یابد و دقت همچنین با افزایش تعداد کلنی‌ها تا حداکثد حدود ۱۵۰ کلنی (تیپیک) در هر پلیت برای روش شمارش و حدود ۱۰۰ کلنی (تیپیک) در هر پلیت برای روش صافی غشایی افزایش می‌یابد.

۹ بیان نتایج

نتایج آزمون را مطابق بند گزارش آزمون استانداردهای به‌کار گرفته شده بیان کنید. همچنین به‌استاندارد ملی ایران شماره۴۲۰۷، کیفیت آب-شمارش میکروارگانیسم‌ها در آب با استفاده از روش کشت-راهنما مراجعه کنید

پیوست الف
اطلاعاتی

۱-حد تشخیص در روش شمارش

حد تشخیص به‌رشد یک کلنی در آزمون و در نتیجه به‌حجم نمونه تلقیح شده بستگی دارد. اگرچه محدودهای ایجاد شده به وسیله میکروارگانیسم‌های همراه در نمونه که در همان شرایط آزمون که میکروارانیسم‌ها شمارش می‌شوند قادر به‌رشد هستند نیز وجود دارد برای مثال تشکیل حداکثر حدود ۱۰۰ کلنی روی صافی می‌تواند پذیرفته شود در صورتی که تعداد میکروارگانیسم-های همراه بیش از ۱۰۰ برابر بیشتر از تعداد کلنی‌های قبل جستجو باشد حد تشخیص کاهش می‌یابد در چنین مواردی و در موارد عدم وجود محیط کشت انتخابی مناسب، کار برد روش MPN ارجهیت دارد.

در عمل، حد تشخیص به‌صورت زیر می‌باشد.

الف- در روش صافی غشایی، امکان صاف کردن حجم‌های زیادی نمونه آب تمیز، بدون مشکل وجود دارد بنابر این حد تشخیص، یک میکروارگانیسم در حجم صاف شده تعیین می‌شود

ب- در روش کشت آمیخته، امکان تلقیح حداکثر mL ۵ نمونه وجود دارد بنابر این حد شناسایی یک میکرو ارگانیسم در mL ۵ تعیین می‌شود حد تشخیص با افزایش تعداد آزمونه مورد استفاده بیشتر می‌شود ولی در عمل تلقیح بیش از۵ پلیت عملی نیست و حد تشخیص یک میکروارگانیسم درmL ۲۵ تعیین می‌شود.

پ- در روش کشت سطحی، حداکثر حجم نمونه که معمولا استفاده می‌شود mL ۰/۲ برای هر پلیت است و چون حد اکثر ۵ پلیت تلقیح می‌شود، بنابر این حد تشخیص، یک میکروارگانیسم در mL ۱ است در مورد محیط‌های کشت دارای سطح خشک، می‌توان از حجم‌های ازمونه mL ۵/ ۰برای هر پلیت استفاده کرد بنابر این در صورت تلقیح به ۵ پلیت، حد تشخیص برای یک میکروارگانیسم درmL ۲/۵ تعیین نمی‌شود.

۲-حد تشخیص در روشMPN

حد تشخیص در واقع به‌حجم نمونه آزمون شده بستگی دارد افزایش حجم کل شده باعث افزایش حد تشخیص می شود در روش MPN با افزایش تعداد لوله‌ها در هر رقت با افزایش حجم آزمایه برای هر لوله یا با تغلیظ نمونه به‌وسیله صافی غشایی، می‌توان حد تشیص را افزایش داد.

۳-الزامات مربوط به‌ماهیت نمونه

علاوه بر ماهیت میکرو ارگانیسم‌های مورد جستجو، رشد میکروارگانیسم‌های در همان محیط کشت نیز انتخاب روش را تحت تاثیر قرار می‌دهد

برای مثال میکرو ارگانیسم‌های هوازی مطلق با استفاده از روش کشت سطحی یا صافی غشایی آزمون می‌شود برای میکروارگانیسم‌هایی که شرایط بی‌هوازی را ترجیح می‌دهند و یا تحمل کنند، استفاده از روش کشت آمیخته ارجهیت دارد اگر شرایط بی‌هوازی بیشتر مورد نیاز باشد، ممکن است، برای حذف اکسیژن و در نتیجه حذف میکروارگانیسم‌های هوازی مطلق، از روش کشت عمقی در لوله استفاده شود.
برخی از میکروارگانیسم‌ها مانند بسیاری از میکروارگانیسم‌های موجود در دریاچه و سایر آب‌های سطحی که قادر به‌تحمل شوک حرارتی ایجاد شده بوسیله محیط کشت ذوب شده در دمای ۴۵ $^{o}C\pm1$ ^{o}C نیستند و نباید برای شمارش آنها از روش کشت آمیخته استفاده کرد اگر چه، برای جدا سازی میکروارگانیسم‌هایی که در درجه حرارت بالاتر در چنین آب‌هایی زندگی می‌کنند و مقاوت حرارتی بیشتری دارند، استفاده از روش کشت آمیخته دارای مزایای بیشتری است .

۴-ترکیبات آب

مواد معلق به‌ویژه در روش صافی غشایی، با مسدود کردن صافی‌ها و اختلال در عمل صاف کردن باعث محدود کردن حساسیت روش می‌شود گاهی انسداد نسبی صافی‌ها مورد شک قرار نمی‌گیرد و می‌تواند با کاهش تبادل مواد مغذی، از تشکیل کلنی روی صافی پیشگیری کند این انسداد ممکن است گاهی به‌وسیله موجودات زنده مانند میکروپلانکتون یا حتی باکتری‌هایی که در روزنه‌های صافی تکثیر می‌یابند، ایجاد شود . گاهی در روش کشت آمیخته، ذرات بزرگ ممکن است با کلنی اشتباه گرفته شوند.
برای آب‌های خیلی کدر، کار برد روش کشت سطحی حساسیت کافی را ندارد و استفاده از روش MPN تنها روش قابل استفاده باشد.
مواد محلول ممکن است با تغییر ترکیب محیط‌های کشت انتخابی یا به‌دلیل سمیت، در رشد میکرو ارگانیسم‌ها اختلال ایجادکند این تداخل به‌ویژه در مواردی که حجم نمونه نسبت به‌حجم محیط کشت زیاد است، ایجاد می‌شود.
گاهی برخی از مواد در نمونه، به‌دلیل واکنش با ترکیبات محیط کشت، واکنش‌های خاص میکروارگانیسم مورد جستجو را بدون تداخل با رشد میکرو ارگانیسم‌ها از طریق تشکیل قندهای قابل تخمیر که در محیط اصلی وجود ندارد و تغییر pH ناشی ازتخمیر این قندها، تحت تاثیر قرار می‌دهند. در این موارد کاربرد روش صافی غشایی به‌سایر روش‌ها ارجحیت دارد.

۵-الزامات مالی

مقایسه هزینه روش‌های مختلف نسبتا ممکن است گاهی به شرایط منطقه‌ای بستگی دارد اگر چه آگاهی از عوامل موثر بر هزینه‌ها، انتخاب روش را تسهیل می‌کند.

پیوست ب

جدول ۹- مقدار MPN در ۱۰۰mL نمونه با سطح اطمینان ٪۹۵ برای سری ۹ لوله‌ای

(۳ لوله ۱۰mL، ۳لوله ۱mL ، ۳لوله۰/۱mL)

تعداد لوله‌های دارای واکنش مثبت			MPN (در۱۰۰mL)	حد اطمینان ٪۹۵	
۳ لوله ۱۰mL	۳لوله ۱mL	۳لوله۰/۱mL		حد پایینی	حد بالایی
۰	۰	۱	۳	<۱	۹
۰	۱	۰	۳	<۱	۱۳
۱	۰	۰	۴	<۱	۲۰
۱	۰	۱	۷	۱	۲۱
۱	۱	۰	۷	۱	۲۳
۱	۱	۱	۱۱	۳	۳۶
۱	۲	۰	۱۱	۳	۳۶
۲	۰	۰	۹	۱	۳۶
۲	۰	۱	۱۴	۳	۳۷
۲	۱	۰	۱۵	۳	۴۴
۲	۱	۱	۲۰	۷	۸۹
۲	۲	۰	۲۱	۴	۴۷
۲	۲	۱	۲۸	۱۰	۱۴۹
۳	۰	۰	۲۳	۴	۱۲۰
۳	۰	۱	۲۹	۷	۱۳۰
۳	۰	۲	۶۴	۱۵	۳۷۹
۳	۱	۰	۴۳	۷	۲۱۰
۳	۱	۱	۷۵	۱۴	۲۳۰
۳	۱	۲	۱۲۰	۳۰	۳۸۰
۳	۲	۰	۹۳	۱۵	۳۸۰
۳	۲	۱	۱۵۰	۳۰	۴۴۰
۳	۲	۲	۲۱۰	۳۵	۴۷۰
۳	۳	۰	۲۴۰	۳۶	۱۳۰۰
۳	۳	۱	۴۶۰	۷۱	۲۴۰۰
۳	۳	۲	۱۱۰۰	۱۵۰	۴۸۰۰

پیوست پ

استانداردهای مرتبط با (GMP)

پ ۱ - استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۹۸۹۹، راهنمای کلی برای آزمون‌های میکروبیولوژی

این استاندارد به‌حصول اطمینان از یکسان بودن روش‌های کلی برای انجام آزمون‌های میکروبیولوژی در آزمایشگاه‌هایی که استانداردها را پذیرفته‌اند کمک می‌کند. کاربرد این استاندارد، دستیابی به‌نتایج هماهنگ در آزمایشگاه‌های مختلف را تسهیل کرده و با پیشگیری از خطر عفونت، باعث حفظ سلامت کارکنان آزمایشگاه می‌شود. هنگام انجام آزمون های میکروبیولوژی مواد غذایی توجه به‌نکات زیر حائز اهمیت است:

- فقط میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه جداسازی یا شمارش شوند؛
- میکروارگانیسم‌های فوق باعث آلودگی محیط نشوند.

به‌منظور دستیابی به‌موارد فوق باید تا حد امکان به‌بهداشت فردی توجه شود و روش‌هایی که از آلودگی‌های خارجی پیشگیری می‌کند به‌کار رود.

در این استاندارد برای اقدامات احتیاطی در طول آزمون، مثال‌های کمّی ارائه می‌شود. بنابر این داشتن اطلاعات کلی در زمینه روش‌های میکروبیولوژی و میکروارگانیسم‌ها ضروری است. همچنین انجام آزمون‌ها و شمارش میکروارگانیسم‌ها به‌روش صحیح داری اهمیت است.

از آن جایی که دستکاری نمونه‌ها هنگام آزمون، ممکن است به‌طور ناخواسته سبب آلودگی متقاطع شود، آزمون کننده باید صحت نتایج روش‌های خود را تصدیق کند. انجام اقدامات احتیاطی خاص نه تنها به‌دلائل بهداشتی بلکه برای حصول اطمینان از تجدیدی پذیری خوب نتایج ضروری است. تعیین اقدامات احتیاطی در همه شرایط امکان پذیر نیست، ولی این استاندارد حداقل اقدامات اصلی را که باید هنگام آماده سازی، سترون سازی و انبارش محیط‌های کشت و تجهیزات در نظر گرفته شود، تعیین می‌کند.

پ ۲ - استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴۲۰۷، کیفیت آب-شمارش میکروارگانیسم ها در آب با استفاده از روش کشت-راهنما

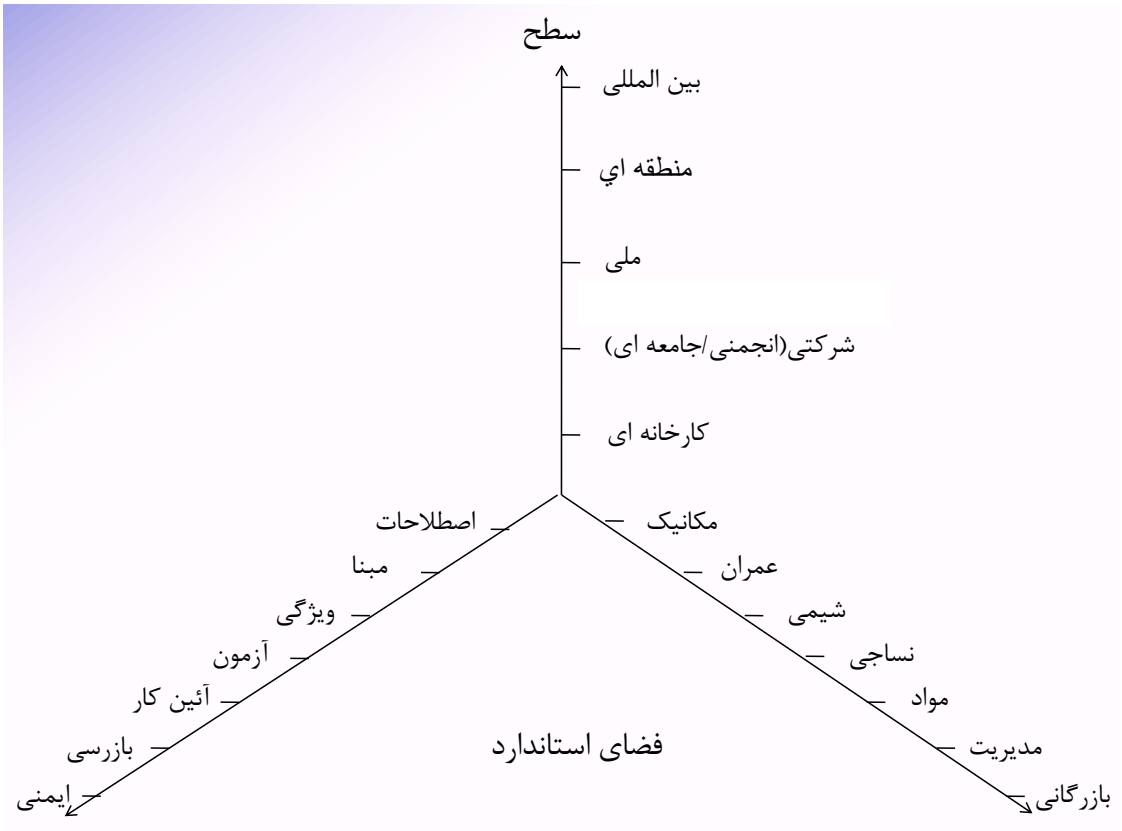
این استاندارد تعیین راهنما برای انجام روش‌های معمول آزمون میکروبیولوژی آ ب، به‌ویژه آماده سازی نمونه‌ها و محیط کشت است و علاوه بر شرح روش، معیارهایی را نیز برای انتخاب یک روش خاص ارائه می‌دهد.

پ۳ - استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴۲۰۸، کیفیت آب-نمونه برداری از آب برای آزمون‌های میکروبیولوژی -آئین کار

این استاندارد تعیین راهنمای روش‌های نمونه برداری آب برای آزمون‌های میکروبیولوژی، حمل ونقل، جابجایی و نگه داری نمونه تا زمان شروع آزمون است .

پیوست ت
انواع استاندارد

ت-۱ استانداردها با موضوعات مختلف در زمینه‌ها و سطوح متفاوت تهیه می‌شوند. ارتباط بین جنبه، رشته و سطح استاندارد در نمودار زیر نمایش داده شده است.



ت-۲ سطح استاندارد

استانداردها دارای سه سطح کلی می‌باشند که می‌توان آن ها را به‌صورت زیر تقسیم بندی کرد:

الف- استانداردهای کارخانه ای، این گونه استانداردها توسط کارخانجات و به‌منظور استفاده در همان واحد تدوین می‌شود. در تدوین استاندارد کارخانه ای ضمن بررسی شرایط داخلی کارخانه باید شرایط و عوامل خارجی از قبیل مواد اولیه و منابع تهیه آن، چگونگی تهیه تجهیزات، بازاریابی و رقابت، نیاز مشتری و امثال آن باید مورد توجه قرار گیرد.

ب- استانداردهای ملی (مانند ISIRI, BS, BIS ASTM , و ...)، این گونه استانداردها به‌وسیله سازمان استاندارد در یک کشور که به‌عنوان مقام ذی صلاحی برای این کار شناخته شده است، تهیه می‌شود در تدوین این

استانداردها تمامی افراد ذی نفع از قبیل تولید کنندگان، مصرف کنندگان، اعضای مراکز علمی و فنی، مراکز تجاری کارشناسان مرتبط از سازمان ها یا مراکز دولتی و امثال آن شرکت دارند.

پ- استانداردهای منطقه ای (مانند استانداردهای اتحادیه اروپا CEN)، عواملی نظیر موقعیت جغرافیایی، فرهنگ، سیاست، شکل تولید و مصرف و امثال آن برخی از کشورها را بر آن داشته تا مشترکا مبادرت به‌تدوین استانداردهای منطقه ای نمایند.

ت- استانداردهای بین المللی (ISO)، هدف از تدوین استانداردهای بین المللی حفظ و نگهداری پیشرفت های فنی در یک سطح معین در تمام دنیا و طرح و ارائه تکنولوژی‌های پیشرفته در این استانداردها و انتقال آن به‌استانداردهای ملی با توجه به‌نیاز و موقعیت زمانی کشورها از نظر توسعه فنی و صنعتی می‌باشد.

ت-۳- جنبه استاندارد

در راستای رشد و تکامل دانش بشری جنبه‌های مختلف استاندارد نیز گسترش یافته و می تواند موضوعات مختلفی را شامل شود.

الف- استاندارد های ویژگی

ب- استاندارد های روش آزمون

پ- استانداردهای آیین کار

ت- استانداردهای ایمنی

ث- واژه نامه

ت- سایر استانداردها (شامل طبقه بندی، بازرسی و نمونه برداری، بسته بندی، حمل و نگهداری، راهنما و ...)

ت-۴- اجرای استاندارد

استانداردهای ملی از نظر اجرایی به‌دو دسته زیر تقسیم بندی می‌شوند:

الف- استاندارد های اجباری، شامل استانداردهایی می‌باشد که در رابطه مستقیم با ایمنی و بهداشت، محیط زیست و یا تجارت خارجی (صادرات و واردات) بوده و به‌صورت قانونی از نظر اجرا اجباری اعلام می‌شوند.

ب- استاندارد های تشویقی، شامل استانداردهایی است که تولید کننده با توجه به‌توان بالای تولید و هم چنین علاقمندی و موافقت خود، داوطلبانه تمایل به اجرای آن دارد.

متن کامل استانداردهای ملی ایران از طریق سایت سازمان ملی استاندارد ایران به‌آدرس زیر و لینک «استانداردهای ملی» در دسترس می‌باشد.

www.isiri.gov.ir

پیوست ث

مفاهیم مورد استفاده در کنترل کیفیت

ث-۱- نمونه (Sample)

یک یا چندین قلم، قطعه یا واحد که از یک جامعه یا مجموعه یا محموله انتخاب می شوند را نمونه گویند.

ث-۲-حجم نمونه (Sample Size)

مقدار مواد یا تعداد اقلام یا واحدهای تشکیل دهنده یک نمونه را، حجم نمونه گویند.

ث-۳- نمونه برداری (Sampling)

رویه ای است که بر طبق آن از جامعه یا محموله مورد بررسی بخش یا بخش های کوچکی انتخاب می شود تا بر اساس نتایج حاصل از بازرسی آن‌ها بتوان در مورد کل جامعه یا محموله قضاوت کرد.

ث-۴- بازرسی (Inspection)

مجموع بررسی ها، اندازه گیری و آزمون‌هایی است که جهت مقایسه مشخصات مواد محصولات نیمه ساخته و محصولات تمام شده با مشخصات فنی یا استانداردها انجام می گیرد.

ث-۵-درستی (Accuracy)

نزدیکی نتیجه اندازه گیری یک کمیت با مقدار واقعی آن کمیت است.

ث-۶- دقت (Precision)

نزدیکی بین جواب‌های تکراری حاصل از چند آزمایش بر روی یک نمونه است.

ث-۷- تجدید پذیری (Reproducibility)

نزدیکی میزان مقادیر بدست آمده از آزمون‌ها بر روی یک نمونه است در شرایطی که روش، آزمایش کننده، تجهیزات، محل و شرایط و زمان متفاوت باشد.

ث-۸- تکرار پذیری (Repeatability)

نزدیکی مقدار نتایج اصل از یک آزمایش در شرایطی است که شرایط اندازه گیری، تجهیزات، آزمایش کننده و محل همگی یکسان باشد.

ث-۹- رواداری (Tolerance)

حداکثر میزان انحراف قابل قبول برای یک کالا از اندازه خود (حداکثر خطای قابل قبول در یک اندازه‌گیری)

پیوست ج
(اطلاعاتی)

ج-۱ مدیر کنترل کیفیت و آیین نامه تایید صلاحیت علمی و فنی

مدیرکنترل کیفیت در واحد های تولیدی فردی است که صلاحیت وی طبق آیین نامه تایید صلاحیت علمی و فنی مدیران کنترل کیفیت، مورد بررسی قرار گرفته و پس از تایید سازمان ملی استاندارد و یا اداره کل استاندارد استان ، پروانه تایید صلاحیت دریافت می نماید.

مدیرکنترل کیفیت واحد تولیدی طبق آیین نامه مذکور،علاوه بر انجام وظایف خود از جمله حضور تمام وقت در یک نوبت کاری و بازرسی ،کنترل و نظارت کامل بر مواد اولیه، شرایط فرآورده حین ساخت ، محصول نهایی و شرایط نگهداری درکلیه مراحل تولید و یا خدمت و سایر وظایف و موارد ذکر شده، موظف است نتایج آزمون نمونه های تولید شده در کارخانه را روزانه ثبت نموده و به صورت کتبی ماهیانه (حداکثر تا پایان هفته اول ماه بعد) به اداره کل استاندارد استان (با امضاء مدیر کنترل کیفیت و مدیر عامل کارخانه) ارسال نماید.

عدم انجام هر یک از وظایف مدیر کنترل کیفیت و تخطی شغلی و قانونی او طبق آیین نامه ذکر شده می تواند منجر به اعمال تنبیهاتی به ترتیب شامل: تذکر شفاهی به عنوان کمترین و **ابطال دایم پروانه** به عنوان بیشترین، برای مدیر کنترل کیفی اجرا شود.

یادآوری می گردد در صورت تعلیق یا لغو پروانه تایید صلاحیت مدیر کنترل کیفیت واحد مربوطه ، موظف است ظرف مدت یک هفته نسبت به معرفی فرد جایگزین اقدام و اداره کل نیز موظف است نسبت به احراز شرایط فرد معرفی شده و تأیید صلاحیت وی اقدام نماید.

برای اطلاع از وظایف ، قوانین، تخلفات ، تنبیهات و سایر موارد مهم، به آخرین و جدیدترین"آیین نامه تایید صلاحیت علمی و فنی مدیران کنترل کیفیت" موجود در سایت سازمان ملی استاندارد www.isiri.gov.ir ، مراجعه شود.

ج-۲ خلاصه ای از دستورالعمل نحوه تذکر، اخطار، تعلیق و ابطال پروانه کاربرد علامت استاندارد ایران به علت عدم تداوم انطباق فرآورده با استاندارد مربوطه

ج-۲-۱ درجه بندی نواقص موجود در کالاهای تولیدی

بر اساس دستورالعمل نحوه تذکر، اخطار، تعلیق و ابطال پروانه کاربرد علامت استاندارد ایران به علت عدم تداوم انطباق فرآورده با استاندارد مربوطه (مدرک شمارهٔ ۱۱۹/۵۰/د)، نواقص موجود در کالاهای تولید شده به سه دسته به شرح زیر تقسیم می گردند:

ج-۲-۱-۱ نقص بحرانی:

نقص موجود در یک محصول است که برای افرادی که از آن استفاده یا نگهداری می کنند، خطرناک بوده و یا وضعیت ناامنی را به وجود آورد.

ج-۲-۱-۲ نقص عمده:

نقصی است متفاوت با نقص بحرانی که فقدانی را به وجود آورده یا به نحو قابل ملاحظه ای امکان استفاده از کالای مورد نظر را برای منظور خاص، کاهش می دهد.

ج-۲-۱-۳ نقص جزئی:

نقصی است جدا از نقایص بحرانی و عمده که امکان استفاده از محصول مورد نظر را برای منظور خاص کاهش نمی دهد یا آنکه اختلاف آن با مشخصات فنی به میزانی است که کارآیی آن کالا را چندان کاهش نمی دهد. نقایص بحرانی ،عمده و جزئی آزمون ها به پیوست می باشد.

ج-۳ نحوه برخورد کالاهای تولید شده نامنطبق با استاندارد مربوطه

در صورتی که در نتایج آزمون فرآورده نمونه برداری شده ، هریک از نواقص فوق مشاهده شوند، امتیاز منفی به شرح جدول زیر (جدول ۱) به واحد تولیدی تعلق گرفته و ادارات کل استاندارد استان بر اساس جمع امتیازات منفی در طول یک دوره (از هنگام صدور و یا تمدید پروانه کاربرد علامت استانداردبرای هر محصول و هر واحد تولیدی مورد نظر در مدت اعتبار تعیین شده) تصمیماتی را به شرح مندرج در جدول ۲ اتخاذ می نمایند.

جدول ۱- امتیازات منفی نواقص موجود در فرآورده

نوع نقص	امتیاز منفی
بحرانی	۳۰
عمده	۱۵
جزئی	۵

جدول ۲- اقدامات اجرایی بر اساس جمع امتیازات منفی در طول یک دوره

جمع امتیاز منفی	اقدام اجرایی
۱۵	تذکر کتبی در خصوص الزام رفع نقص یا نواقص
۳۰	اخطارکتبی در خصوص الزام رفع نقص یا نواقص
۶۰	مطابق بند ۲-۱
۹۰	مطابق بند ۲-۲
۱۲۰	مطابق بند ۲-۳

ج-۳-۱ در صورتیکه جمع امتیاز منفی یک گزارش نتیجه آزمون یا جمع امتیازات منفی نتایج چند آزمون به ۶۰ رسید، اداره کل استاندارد استان مربوط به واحد بصورت کتبی اخطار داده و در مورد واحدهای مشمول استاندارد اجباری برای جمع آوری کالای مغایر با استاندارد ملی با شمارهٔ سری ساخت مربوط موضوع را به کمیسیون ماده ۱۹ ضوابط اجرایی استانداردهای اجباری و تشویقی و طرز به کار بستن علایم آنها ارجاع می دهد.

ج-۳-۲ در صورتیکه جمع امتیاز منفی گزارش نتیجه یک آزمون یا جمع امتیازات منفی نتایج چند آزمون به ۹۰ رسید، اداره کل استاندارد استان مربوط، علاوه بر اخطار کتبی، در مورد واحدهای مشمول استاندارد اجباری برای جمع آوری کالای مغایر با استاندارد ملی با شمارهٔ سری ساخت مربوط موضوع را به کمیسیون ماده ۱۹ ارجاع می نماید. همچنین در صورتیکه امتیاز منفی مذکور ناشی از حداقل نتایج آزمون دو نمونه برداری مختلف بوده و حداقل ۳۰ امتیاز از جمع امتیازات منفی گزارش نتیجه آزمون آخر به واسطه نقایص عمده و بحرانی باشد، نسبت به تشکیل کمیته علائم برای تعلیق پروانه کاربرد علامت استاندارد اجباری و یا ابطال پروانه کاربرد علامت استاندارد تشویقی اقدام می کند. در صورت تعلیق یا ابطال پروانه، آن اداره کل واحد مربوط را ملزم به عدم تولید (در ارتباط با استانداردهای اجباری) و یا عدم عرضه کالا با علامت استاندارد ایران (در ارتباط با استانداردهای تشویقی) نموده و مراتب را به ادارات کل استاندارد سایر استانها منعکس می کند.

ج-۳-۳ در مورد کالاهای مشمول استاندارد اجباری، در صورتیکه امتیاز منفی یک گزارش نتیجه آزمون و یا جمع امتیازات منفی نتایج چند آزمون به ۱۲۰ رسید، اداره کل استاندارد استان مربوط، علاوه بر اخطار کتبی، برای جمع آوری کالای مغایر با استاندارد ملی با شمارهٔ سری ساخت مربوط موضوع را به کمیسیون ماده ۱۹ ارجاع می نماید. همچنین در صورتیکه امتیاز منفی مذکور ناشی از حداقل نتایج آزمون سه نمونه برداری مختلف بوده و حداقل ۳۰ امتیاز از جمع امتیازات منفی گزارش نتیجه آزمون آخر به واسطه نقایص عمده و بحرانی باشد، نسبت به تشکیل کمیته علایم برای ابطال پروانه کاربرد علامت استاندارد اجباری اقدام نموده و در صورت ابطال پروانه، موضوع را از طریق روابط عمومی به اطلاع عموم می رساند.

یادآوری۱- رفع تعلیق و تجدید پروانه کاربرد علامت استاندارد ایران، در صورت رفع کلیه نقایص و انطباق با موازین استاندارد ملی مربوط و احراز کلیه شرایط مندرج در دستورالعملهای مرتبط صورت می گیرد.

یادآوری ۲- انجام هریک از اقدامات ذکر شده در جدول ۲ ، نافی و مانع یکدیگر نمی باشد و تنها ملاک هر یک از اقدامات رسیدن به حد نصاب امتیاز منفی ذکر شده در بندهای مذکور است.

منبع: دستورالعمل نحوه تذکر، اخطار، تعلیق و ابطال پروانه کاربرد علامت استاندارد ایران به علت عدم تداوم انطباق فرآورده با استاندارد مربوطه (مدرک شمارهٔ ۱۱۹/۵۰/د)

پیوست چ

نقایص بحرانی، عمده و جزئی آزمون‌های میکروبیولوژی انواع آب

طبق استاندارد ملی ایران شماره‌های ۱۰۱۱، ۴۴۰۳ و ۶۲۶۷ می‌باشد.

ردیف	شرح آزمون	درجه اهمیت
۱	شمـــارش کلـــی میکـــروارگانیســـم‌هـــای هوازی	عمده
۲	کلـــی فـــرم	بحرانی
۳	اشریشیاکلی	بحرانی
۴	انتروکوک	بحرانی
۵	پسودوموناس آئروژینوزا	بحرانی
۶	اسپورکلستریدیوم‌های احیاکننده سولفیت	بحرانی