

سازمان حفاظت محیط زیست ایران

دفترپایش فراگیر آلودگی محیط زیست

روش کار: سنجش کلیفرم ها به روش تخمین محتمل ترین
تعداد (M.P.N)

تهیه کنندگان:

شبیم ملاکرمی - سودابه هزار خانی - صغری اسکندی - نرجس قوامی

گروه پایش پارامترهای بیولوژی

آخرین ویرایش

۱۳۹۵

کلیفرم ها

کلیفرمها: منظور از کلیفرمها باسیلهای گرم منفی، بدون اسپور، هوازی و هوازی اختیاری است که قادر به تخمیر قند لاکتوز و تولید اسید و گاز در دمای ۳۵-۳۷ درجه می باشند.

کلیفرمهای گوارشی: آندسته از کلیفرمها هستند که در روده بزرگ انسان و حیوانات خون گرم هستند و قادر به تخمیر قند لاکتوز تولید اسید و گاز در دمای ۴۴ تا ۴۵ درجه سلسیوس نیز می باشند.

وجود این باکتریها در آب نشاندهنده نا کافی بودن فرآیند تصفیه و همچنین آلودگی متناوب آب با مدفوع انسان و حیوان است.

تجهیزات

انکوباتور، بن ماری، آون، اتوکلاو، هود لامینار، ترازو

آزمون برای شمارش کلیفرمها با روش تخمین محتمل ترین تعداد (M.P.N)

روش بر اساس نظریه احتمالات بوده و فرض بر این است که میکروارگانیزم با یک توزیع یکنواخت در نمونه پخش شده اند. پس از تلقیح حجم های مختلف نمونه به لوله های حاوی محیط مایع و گرمخانه گذاری، تغییرات ویژه ای ناشی از رشد باکتریها مانند کدورت، تولید گاز، تغییر pH ظاهر خواهد شد. با در نظر گرفتن تعداد لوله های مثبت از نظر تولید گاز در لوله های دورهام و با استفاده از جداول آماری می توان بیشترین تعداد احتمالی باکتری را تخمین زد.

محیط کشت: برای آماده سازی محیط های کشت دستورالعمل سازنده باید به طور دقیق رعایت شود. بسیاری از محیط های کشت را می توان پس از سترون شدن به صورت کاملاً دربسته در دمای ۱۸-۲۲ درجه سلسیوس به مدت حداکثر سه ماه نگه داری نمود. محیط هایی که تحت شرایط سترونی تقسیم و توزیع می شوند را می توان در دمای ۴-۱۰ درجه سلسیوس حداکثر به مدت یک ماه نگه داری نمود. کلیه محیط های کشت باید قبل از مصرف از نظر آلودگی، تبخیر زیاد و یا سایر نشانه های فساد کنترل شوند.

روش کار: با رعایت شرایط سترونی حجم معین نمونه آب را به لوله های حاوی محیط مایع تلقیح کنید. روش های متداول MPN ۳ یا ۵ لوله ای است. برای مثال اگر ۳ سری ۳ تایی لوله در نظر گرفته شود. به سری مضاعف محیط کشت ۱۰ میلی لیتر نمونه، به سری اول محیط کشت معمولی ۱ میلی لیتر و به سری دوم محیط کشت معمولی ۰/۱ میلی لیتر نمونه اضافه می شود.

برای سنجش کلیه کلیفرم از یک محیط کشت عمومی مانند لاکتوز براث در دمای محیط ۳۵-۳۷ درجه استفاده می گردد. جهت تایید این مرحله به تعداد لوله های آزمایش مثبت می توان از لوله های حاوی محیط کشت بریلینت گرین استفاده نمود.

برای سنجش فکال کلیفرم از یک محیط کشت اختصاصی مانند محیط کشت آماده EC-مدیوم در دمای محیط ۴۴-۴۵ درجه استفاده می گردد. مواد موجود در محیط کشت اختصاصی و دمای مذکور مشابه مواد و دمای موجود در روده بزرگ است باکتریهای کلیفرمهای گوارشی خود را با آن سازگار نموده و توان رشد در این شرایط را دارند. (شرایطی که باکتریهای غیر روده ای اکثراً قادر به رشد نیستند).

برای تایید وجود کلیفرمها توسط حلقه کشت (قطر حلقه ۳ میلی متر) یک حلقه کامل یا با پیت سترون یک قطره از هر از لوله های حاوی لاکتوز براث واکنش مثبت برداشت نموده و به لوله های حاوی محیط آبگوشت بریلینت گرین brilliant green broth تلقیح گردد. لوله ها در دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری نموده و پس از ۴۸ ساعت از نظر تولید گاز بررسی شود.

برای تایید اشریشیاکلی، توسط حلقه کشت از لوله های حاوی EC براث واکنش مثبت برداشت نموده و به لوله حاوی محیط آب تریپتونه Tryptone water تلقیح گردد. سپس لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۴ درجه سلسیوس قرار گیرد. پس از پایان این مدت مقدار ۰/۵ سی سی از معرف کواکس به لوله ها اضافه شود. پس از یک دقیقه تکان دادن لوله ها، ایجاد رنگ قرمز دلیل بر حضور اندول است و واکنش از نظر وجود اشریشیاکلی مثبت می باشد.

محاسبه

شمارش کلی فرم ها بر اساس تولید گاز و جمع شدن آن در لوله های درهام می باشد روش های MPN ۳ یا ۵ لوله ای را در صورت مثبت بودن می توان با جدول نتایج مقایسه نموده و در ۱۰۰ میلی لیتر نتیجه را گزارش نمایید. در صورتی که نمونه مورد آزمون رقیق می شود تنها از سه حجم متوالی برای محاسبه

محتمل ترین تعداد استفاده می گردد به منظور تخمین تعداد میکروارگانیزم ها در حجم مرجع (برای مثال ۱۰۰ میلی لیتر) تعداد بدست آمده از جدول را در ضریب رقت مورد استفاده ضرب کنید.

محیط کشتهای آلوده پس از بررسی توسط اتو کلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار یک اتمسفر استریل و سپس دور ریخته می شود.

کالیبراسیون:

با توجه به این مهم که یکی از اساسی ترین پارامترهای موثر در دستیابی به پاسخ صحیح در آزمایشات صحت، دقت و عملکرد صحیح دستگاهها می باشد بررسی این موارد یکی از وظایف اصلی شخص آزمایشگر را تشکیل می دهد. در آزمایشگاه بیولوژی دستگاهها مورد استفاده در سیکل آنالیز از مرحله تهیه محیط کشت، گرمخانه گذاری و استریل همگی نیازمند کالیبراسیون دمایی (بن ماری، انکوباتور و ...)، دما و فشار (اتو کلاو) و جرمی (ترازو) می باشند که برای انجام آن پس از تعیین دما و بازه زمانی مورد نظر که کاملاً بسته به حجم کاری و نظر کارشناس متغیر است، می توان از مراکز و مراجع ذی صلاح جهت کالیبراسیون دعوت به همکاری نمود.

در خصوص دستگاه اتو کلاو بغیر از بررسی دما و گیج فشار یکی از روشهای دیگر بررسی صحت عملکرد استفاده از Sterikon plus Bioindicator است. این محصول آمپولی است که مشکل از آبگوشت مغذی، شکر، نشانگر pH، میکروب های غیر بیماری زا و *Geobacillus Stearothermophilus* می باشد. مقاومت گرمایی این گونه به نوعی است که پس از ۱۵ دقیقه دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد بطور کامل کشته می شود. در صورت انجام کامل سیکل استریل میکروب ها بطور کامل کشته شده و محتویات آمپول به رنگ ارغوانی شفاف (بنفش) در می آید در غیر اینصورت رنگ آمپول به رنگ زرد- نارنجی می باشد که علت آن تخمیر و جوشش شکر است که بر اثر رشد میکروبی غلیظ شده است.

منابع

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران بشماره استاندارد ۲۹۴۶، ۴۲۰۷

جدول تخمین محتمل ترین تعداد باکتری در ۱۰۰ میلی لیتر نمونه
به روش ۳ لوله ای (MPN)

تعداد لوله های واکنش مثبت				تعداد لوله های واکنش مثبت			
در ۱۰۰ میلی لیتر نمونه	۳ ۰/۱ میلی لیتر	۳ ۱ میلی لیتر	۳ ۱۰ میلی لیتر	در ۱۰۰ میلی لیتر نمونه	۳ ۰/۱ میلی لیتر	۳ ۱ میلی لیتر	۳ ۱۰ میلی لیتر
۹	۰	۰	۲	<۳	۰	۰	۰
۱۴	۱	۰	۲	۳	۱	۰	۰
۲۰	۲	۰	۲	۶	۲	۰	۰
۲۶	۳	۰	۲	۹	۳	۰	۰
۱۵	۰	۱	۲	۳	۰	۱	۰
۲۰	۱	۱	۲	۶	۱	۱	۰
۲۷	۲	۱	۲	۹	۲	۱	۰
۳۴	۳	۱	۲	۱۲	۳	۱	۰
۲۱	۰	۲	۲	۶	۰	۲	۰
۲۸	۱	۲	۲	۹	۱	۲	۰
۳۵	۲	۲	۲	۱۲	۲	۲	۰
۴۶	۳	۲	۲	۱۶	۳	۲	۰
۲۹	۰	۳	۲	۹	۰	۳	۰
۳۶	۱	۳	۲	۱۳	۱	۳	۰
۴۴	۲	۳	۲	۱۶	۲	۳	۰
۵۳	۳	۳	۲	۱۹	۳	۳	۰
۲۳	۰	۰	۳	۴	۰	۰	۱
۳۹	۱	۰	۳	۷	۱	۰	۱
۶۴	۲	۰	۳	۱۱	۲	۰	۱
۹۵	۳	۰	۳	۱۰	۳	۰	۱
۴۳	۰	۱	۳	۷	۰	۱	۱
۷۵	۱	۱	۳	۱۱	۱	۱	۱
۱۲۰	۲	۱	۳	۱۰	۲	۱	۱
۱۶۰	۳	۱	۳	۱۹	۳	۱	۱
۹۳	۰	۲	۳	۱۱	۰	۲	۱
۱۵۰	۱	۲	۳	۱۰	۱	۲	۱
۲۱۰	۲	۲	۳	۲۰	۲	۲	۱
۲۹۰	۳	۲	۳	۲۴	۳	۲	۱
۲۴۰	۰	۳	۳	۱۶	۰	۳	۱
۴۶۰	۱	۳	۳	۲۶	۱	۳	۱
۱۱۰۰	۲	۳	۳	۲۴	۲	۳	۱
>۱۱۰۰	۳	۳	۳	۲۹	۳	۳	۱

جدول تخمین محتمل ترین تعداد باکتری در ۱۰۰ میلی لیتر نمونه به روش ۵ لوله ای (MPN)

تعداد لوله های واکنش مثبت				تعداد لوله های واکنش مثبت				تعداد لوله های واکنش مثبت				تعداد لوله های واکنش مثبت			
۱۰۰ در ۱۰۰ میلی لیتر	۵۵ میلی لیتر	۱۰ میلی لیتر	۵ میلی لیتر	۱۰۰ در ۱۰۰ میلی لیتر	۵۵ میلی لیتر	۱۰ میلی لیتر	۵ میلی لیتر	۱۰۰ در ۱۰۰ میلی لیتر	۵۵ میلی لیتر	۱۰ میلی لیتر	۵ میلی لیتر	۱۰۰ در ۱۰۰ میلی لیتر	۵۵ میلی لیتر	۱۰ میلی لیتر	۵ میلی لیتر
۲۵	۰	۳	۴	۸	۰	۰	۳	۸	۰	۳	۱	<۲	۰	۰	۰
۳۵	۱	۳	۴	۱۱	۱	۰	۳	۱۰	۱	۳	۱	۲	۱	۰	۰
۴۰	۲	۳	۴	۱۳	۲	۰	۳	۱۳	۲	۳	۱	۴	۲	۰	۰
۴۵	۳	۳	۴	۱۶	۳	۰	۳	۱۵	۳	۳	۱	۵	۳	۰	۰
۵۰	۴	۳	۴	۲۰	۴	۰	۳	۱۷	۴	۳	۱	۷	۴	۰	۰
۶۰	۵	۳	۴	۲۵	۵	۰	۳	۱۹	۵	۳	۱	۱	۵	۰	۰
۳۵	۰	۴	۴	۱۱	۰	۱	۳	۱۱	۰	۴	۱	۲	۰	۱	۰
۴۰	۱	۴	۴	۱۴	۱	۱	۳	۱۲	۱	۴	۱	۴	۱	۱	۰
۴۵	۲	۴	۴	۱۷	۲	۱	۳	۱۵	۲	۴	۱	۶	۲	۱	۰
۵۵	۳	۴	۴	۲۰	۳	۱	۳	۱۷	۳	۴	۱	۷	۳	۱	۰
۶۶	۴	۴	۴	۲۵	۴	۱	۳	۱۹	۴	۴	۱	۹	۴	۱	۰
۷۰	۵	۴	۴	۲۵	۵	۱	۳	۲۲	۵	۴	۱	۱۱	۵	۱	۰
۴۰	۰	۵	۴	۱۴	۰	۲	۳	۱۳	۰	۵	۱	۴	۰	۲	۰
۵۰	۱	۵	۴	۱۷	۱	۲	۳	۱۵	۱	۵	۱	۶	۱	۲	۰
۵۱	۲	۵	۴	۲۰	۲	۲	۳	۱۲	۲	۵	۱	۷	۲	۲	۰
۶۵	۳	۵	۴	۲۵	۳	۲	۳	۱۱	۳	۵	۱	۹	۳	۲	۰
۷۰	۴	۵	۴	۲۵	۴	۲	۳	۱۲	۴	۵	۱	۱۱	۴	۲	۰
۸۰	۵	۵	۵	۳۰	۵	۲	۳	۲۴	۵	۵	۱	۱۲	۵	۲	۰
۲۵	۰	۰	۵	۱۷	۰	۳	۳	۴	۰	۰	۲	۶	۰	۳	۰
۳۰	۱	۰	۵	۲۱	۱	۳	۳	۶	۱	۰	۲	۸	۱	۳	۰
۴۵	۲	۰	۵	۲۵	۲	۳	۳	۹	۲	۰	۲	۹	۲	۳	۰
۶۰	۳	۰	۵	۳۰	۳	۳	۳	۱۲	۳	۰	۲	۱۱	۳	۳	۰
۷۵	۴	۰	۵	۳۰	۴	۳	۳	۱۴	۴	۰	۲	۱۳	۴	۳	۰
۶۵	۵	۰	۵	۳۵	۵	۳	۳	۱۶	۵	۰	۲	۱۰	۵	۳	۰
۳۵	۰	۱	۵	۲۰	۰	۴	۳	۷	۰	۱	۲	۸	۰	۴	۰
۴۵	۱	۱	۵	۲۵	۱	۴	۳	۹	۱	۱	۲	۹	۱	۴	۰
۶۵	۲	۱	۵	۳۰	۲	۴	۳	۱۲	۲	۱	۲	۱۱	۲	۴	۰
۸۵	۳	۱	۵	۳۰	۳	۴	۳	۱۴	۳	۱	۲	۱۲	۳	۴	۰
۱۱۰	۴	۱	۵	۳۵	۴	۴	۳	۱۷	۴	۱	۲	۱۵	۴	۴	۰
۱۳۰	۵	۱	۵	۴۰	۵	۴	۳	۱۹	۵	۱	۲	۱۷	۵	۴	۰
۵۰۰	۰	۲	۵	۲۵	۰	۵	۳	۹	۰	۲	۲	۹	۰	۵	۰
۷۰	۱	۲	۵	۳۰	۱	۵	۳	۱۲	۱	۲	۲	۱۱	۱	۵	۰
۶۵	۲	۲	۵	۳۰	۲	۵	۳	۱۴	۲	۲	۲	۱۲	۲	۵	۰
۱۲۰	۳	۲	۵	۴۰	۳	۵	۳	۱۷	۳	۲	۲	۱۵	۳	۵	۰
۱۵۰	۴	۲	۵	۴۰	۴	۵	۳	۱۹	۴	۲	۲	۱۷	۴	۵	۰
۱۸۰	۵	۲	۵	۴۵	۵	۵	۳	۲۰	۵	۲	۲	۱۹	۵	۵	۰
۸۰	۰	۳	۵	۱۳	۰	۰	۴	۱۲	۰	۳	۲	۲	۰	۰	۱
۱۱۰	۱	۳	۵	۱۷	۱	۰	۴	۱۴	۱	۳	۲	۴	۱	۰	۱
۱۴۰	۲	۳	۵	۲۰	۲	۰	۴	۱۷	۲	۳	۲	۶	۲	۰	۱
	۳	۳	۵	۲۵	۳	۰	۴	۲۰	۳	۳	۲	۸	۳	۰	۱
۲۱۰	۴	۳	۵	۳۰	۴	۰	۴	۲۰	۴	۳	۲	۱۰	۴	۰	۱
۲۵۰	۵	۳	۵	۳۵	۵	۰	۴	۲۵	۵	۳	۲	۱۲	۵	۰	۱
۱۳۰	۰	۴	۵	۱۷	۰	۱	۴	۱۵	۰	۴	۲	۴	۰	۱	۱
۱۷۰	۱	۴	۵	۲۰	۱	۱	۴	۱۷	۱	۴	۲	۶	۱	۱	۱
۲۲۰	۲	۴	۵	۲۵	۲	۱	۴	۲۰	۲	۴	۲	۸	۲	۱	۱
۲۷۵	۳	۴	۵	۳۰	۳	۱	۴	۲۵	۳	۴	۲	۱۰	۳	۱	۱
۳۵۰	۴	۴	۵	۳۵	۴	۱	۴	۲۵	۴	۴	۲	۱۱	۴	۱	۱
۴۲۵	۵	۴	۵	۴۰	۵	۱	۴	۳۰	۵	۴	۲	۱۴	۵	۱	۱
۲۵۰	۰	۵	۵	۲۰	۰	۲	۴	۱۷	۰	۵	۲	۶	۰	۲	۱
۲۵۰	۱	۵	۵	۲۵	۱	۲	۴	۲۰	۱	۵	۲	۸	۱	۲	۱
۵۴۰	۲	۵	۵	۳۰	۲	۲	۴	۲۵	۲	۵	۲	۱۰	۲	۲	۱
۲۰۰	۳	۵	۵	۴۰	۳	۲	۴	۲۵	۳	۵	۲	۱۲	۳	۲	۱
۱۶۰۰	۴	۵	۵	۴۵	۴	۲	۴	۳۰	۴	۵	۲	۱۵	۴	۲	۱
>۱۶۰۰	۵	۵	۵	۵۰	۵	۲	۴	۳۰	۵	۵	۲	۱۷	۵	۲	۱

سازمان حفاظت محیط زیست