سازمان حفاظت محیط زیست ایران

دفترپایش فراگیر آلودگی محیط زیست

دستورالعمل آزمون های باکتریولوژیکی

تدوین :

شبنم ملاکرمی

گروه پایش پارامترهای بیولوژی

۱۳۹۵

سازمان حفاظت محیط زیست

آزمون های باکتریولوژیکی:

پس از تلقیح نمونه بر روی سطح و یا درون محیط کشت وگرمخانه‌گذاری، هر میکروارگانیسم تکثیر یافته و ایجاد پرگنه قابل مشاهده در محیط کشت می‌کند.

روش پورپلیت pour plate :

این روش براساس مخلوط کردن حجم معینی از نمونه و یا رقتی از آن با محیط ذوب شده تا دمای نزدیک به انجماد می‌باشد . پس از گرمخانه‌گذاری پرگنه‌های روی سطح محیط و یا درون آن شمارش می‌شود . حجم برداشت شده می تواند بین ۰/۱ میلی لیتر تا ۲ میلی لیتر بسته به اندازه پلیت و حجم محیط کشت مورد استفاده متفاوت باشد. محیط کشت مورد نظر باید درون حمام بخار آب ذوب شود و سپس در دمای ۱±۴۵ درجه سلسیوس قرار داده شود، افزودن هر گونه ترکیب اضافی به محیط کشت در همین مرحله با رعایت شرایط سترونی انجام می گیرد. پس از ریختن حجم مورد نظر نمونه درون پلیت، ظرف حاوی محیط را از حمام بخار بیرون آورده و پس از خشک کردن قسمت خارجی آن سر ارلن را شعله داده و بدون تاخیر به پلیت افزوده شود. پس از چندبار حرکت دورانی، نمونه را با محیط کشت مخلوط نمائید، پلیت را در یک سطح افقی و صاف قرار دهید تا سرد شود و سپس در دمای مناسب گرمخانه گذاری نمائید.

روش کشت سطحی Spread plate:

در این روش حجم معینی از نمونه یا رقتی از آن روی سطح محیط کشت حاوی آگار گسترده می‌شود و پس از گرمخانه‌گذاری کلیه پرگنه‌های روی سطح محیط شمارش می‌شود. حجم نمونه برداشت شده برای پلیت هائی با قطر ۱۰۰-۹۰ میلی لیتر باید بین ۰/۱ تا ۰/۵ میلی لیتر باشد.

روش کار به این ترتیب است که ابتدا پلیت حاوی محیط کشت را مدت نیم ساعت در گرمخانه ۵۵-۵۰ درجه سلسیوس قرار می دهند تا سطح آن خشک شود. سپس حجم مناسب نمونه را با استفاده از یک پی پت سترون به سطح محیط ریخته و با یک میله شیشه ای (به شکل L) سترون نمونه را در سطح محیط بگسترانید و آنگاه گرمخانه گذاری کنید.

روش صافی غشائی:

روش براساس عبور دادن حجم معین نمونه از صافی است میکروارگانیسم‌ها روی صافی باقی می‌ماند سپس صافی روی محیط آگاردار و یا بالشتک جاذب ۶ آغشته به محیط مایع قرار می‌گیرد . پس از گرمخانه‌گذاری، پرگنه‌های روی سطح صافی‌ها شمارش می‌شود. در مواردی که جستجوی میکروارگانیسم‌های بی هوازی موردنظر است , ابتدا صافی درون پلیت قرار می‌گیرد (به گونه‌ای که سطح چهارخانه آن به طرف پائین باشد). و سپس با محیط حاوی آگار ذوب شده پوشانیده می‌شود .

حداکثر حجم نمونه آزمایشی بستگی به قابلیت صاف شدن نمونه و صافی مورد استفاده دارد. صافی‌هائی با اندازه ۰/۴۵ میکرون امکان صاف کردن چند لیتر آب وجود دارد که در این صورت روش آزمایش از حساسیت بالائی برخوردار است .

صاف کردن : پایه نگاه دارنده صافی را به ارلن تخلیه که به خلاء وصل شده است، متصل کرده و توسط پنس سترون، صافی را روی آن قرار دهید(به طوریکه سطح چهار خانه صافی به طرف بالا باشد). سپس با رعایت شرایط سترونی قیف را روی پایه قرار داده و قسمت بیرونی آن را با گرمای محکم کنید و در حالیکه دگمه پمپ خلاء خاموش است. حجم معین نمونه به درون قیف ریخته شود. در مورد آب تصفیه شده که در آن تعداد میکروارگانسیم ها کم است(به حدی که در ۱۰۰ میلی لیتر نمونه غیر قابل جدا کردن است) می توان مقدار یک لیتر آب صاف نمود که در این صورت آن را به چهار حجم ۲۵۰ میلی لیتر تقسیم کنید(برای هر صافی ۲۵۰ میلی لیتر) زمانی که حجم نمونه مورد نظر کمتر از ۲۰ میلی لیتر است حداقل ۲۰ میلی لیتر از محلول رقیق کننده را قبل از ریختن نمونه، به درون قیف بریزید.(این عمل به منظور توزیع یکسان میکروارگانیسم ها در سطح صافی است). سپس دگمه پمپ خلاء را روشن نموده و خلاء حدود ۷۰ کیلو پاسکال بر قرار شود تا آب به آهستگی از میان صافی عبور کند. زمانی که حجم نمونه بالای صافی صافی به حدود ۶ میلی لیتر رسید دیواره های داخلی قیف را با ۳۰-۲۰ میلی لیتر محلول رقیق کننده شستشو دهید. به محض تمام شدن نونمه درون قیف، خلاء باید قطع شود.

انتقال صافی – پس از برداشتن صافی باکمک پنس سترون آن را به یکی از موارد زیر به طوری که سطح چهار خانه آن به طرف بالا باشد انتقال دهید:

الف) به یک پلیت حاوی محیط آگار دار انتقال دهید باید توجه داشت که بین صافی و محیط کشت حباب هوا وجود نداشته باشد.

ب) صافی را به یک بالشتک جاذب سترون که قبلاً با محیط کشت مورد نظر اشباع شده است منتقل نمود. باید توجه داشتکه قبل از قرار دادن صافی روی بالشتک، محیط مایع اضافی را دور بریزید تا از تداخل رشد میکروارگانسیم ها جلوگیری شود. بالشتک مورد استفاده باید دارای قطری حدود ۴۸ میلی متر و دارای ضخامت کافی باشد تا بتواند حجم ۲/۲ –۱/۸ میلی لیتر محیط را جذب کند.

ج) صافی را درون یک پلیت خالی یا پلیتی که حاوی مقدار کمی محیط آگار دار است(حدود ۲ میلی لیتر) گذاشته سپس با محیط آگار ذوب شده پوشانیده می شود.برای صاف کردن حجم های مختلف یک نمونه می توان قیف را بدون سترونی مجدد مورد استفاده قرار داد. در چنین مواردی ابتدا کمترین حجم مورد آزمون صاف می شود. برای صاف کردن نمونه دیگر باید از دستگاه سترون دیگری استفاده و یا قیف را درون آب در حال جوش به مدت یک دقیقه غوطه ور و گندزدائی نمود در طی صاف کردن نمونه های مختلف پایه دستگاه صافی احتیاج به گندزدائی ندارد مگر آنکه صافی آسیب دیده و یا آلوده شده باشد.

- گرمخانه گذاری

کلیه پلیت‌ها را به صورت وارونه درون گرمخانه قرار داد. زمان و دمای گرمخانه گذاری بسته به نوع میکروارگانیسم مورد جستجو متفاوت می باشد در شمارش اگر بیش از ۵۰ پرگنه هر صافی داشته باشد بدین طریق عمل کنید که تعداد ۱۰ مربع را بطور اختیاری انتخاب کرده و پرگنه های آن را شمارش کنید. در صورتی که صافی غشایی دارای ۱۰۰ مربع و یا ۱۴۰ مربع باشد. تعداد شمارش شده را در عدد ۱۰ یا ۱۴ ضرب نمائید.

- شمارش

پس از پایان زمان گرمخانه گذاری پلیت‌ها و صافی‌ها را سریعاً مورد بررسی قرار دهید و در صورتی که امکان بررسی سریع آن نیست . می‌توان پلیت‌ها را در دمای ۴ تا ۵ درجه سلسیوس حداکثر به مدت ۲۴

ساعت نگه داری نمود . در مورد یک سری رقت متوالی پلیتی را شمارش کنید که بین ۲۵ تا ۳۰۰ پرگنه دارد .

آزمون برای وجود یا عدم وجود میکروارگانیسم‌ها: پس از تلقیح حجم معین در محیط کشت مایع و گرمخانه گذاری، با پیدایش تظاهرات ناشی از رشد میکروارگانیسم می‌توان به وجود یا عدم وجود آن در حجم معین نمونه پی برد .

آزمون برای غنی سازی: در مواردی که تعداد احتمالی باکتری در نمونه کم است و شمارش نیز مطرح نیست می‌توان حجم معینی از نمونه را در محیط کشت مایع فاقد عوامل بازدارنده از رشد تلقیح نمائید. پس از گرمخانه گذاری آن را به محیط کشت انتخابی جامد منتقل کنید .

آزمون برای شمارش - روش تخمین محتمل‌ترین تعداد (M.P.N)

روش براساس نظریه احتمالات بوده و فرض براین است که میکروارگانیسم‌ها با یک توزیع یکنواخت و به صورت انتخابی در نمونه پخش شده‌اند. پس از تلقیح حجم‌های مختلف نمونه به لوله‌های حاوی محیط مایع و گرمخانه گذری، تغییرات ویژه ای ناشی از رشد باکتری‌ها مانند کدورت، تولید گاز، تغییر PH ظاهر خواهد شد. با در نظر گرفتن تعداد لوله‌های مثبت و با استفاده از جداول آماری می‌توان بیشترین تعداد احتمالی باکتری‌ها را تخمین زد .

انتخاب روش :

انتخاب روش آزمون آب به عوامل متعددی از جمله ویژگی‌های فیزیکی - شیمیائی نمونه و نوع میکروارگانیسم مورد جستجو دارد. انتخاب روش در موارد مختلف به شرح زیر است .

در مواردی که آب حاوی ذرات معلق است، استفاده از روش صافی غشائی مناسب نمی‌باشد . (به علت مسدود شدن صافی‌ها توسط ذرات معلق و حتی موجودات زنده مانند میکروپلانکتون‌ها) مسدود شدن روزنه صافی‌ها باعث کاهش عبور مواد غذائی از صافی شده و در نتیجه عدم تشکیل پرگنه می‌شود).

در مورد آبهای خیلی کدر روش M.P.N تنها روشی است که می‌توان استفاده نمود. در مواردی که مواد محلول در آب زیاد است استفاده از روش صافی غشائی توصیه می‌شود.

سازمان حفاظت محیط زیست

در مواردی که احتمال وجود بیش از ۱۰۰ پرگنه روی هر صافی وجود دارد استفاده از روش صافی غشائی از حساسیت لازم برخوردار نمی‌باشد .

در مواردی که تعداد میکروارگانیسم‌ها در نمونه کم است (کمتر از ۱۰۰ عدد در هر میلی لیتر) استفاده از روش کشت سطحی مناسب نمی‌باشد .

در مورد آب‌های حاوی ذرات معلق استفاده از روش کشت ((مخلوط کردن نمونه با محیط کشت)) (پورپلیت) به دلیل شمارش ذرات به جای پرگنه و ((روش کشت سطحی)) به دلیل نداشتن حساسیت لازم مناسب نمی‌باشد .

به طور کلی روش .N.P.M به دلیل تخمینی بودن نسبت به روش شمارش در محیط جامد دارای دقت کمتری می‌باشد . توصیه می‌شود در صورت امکان به طور هم زمان از هر دو روش استفاده نمود .

منابع:

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران – شماره استاندارد ۴۲۰۷

سازمان حفاظت محیط زیست