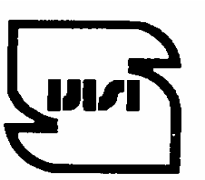
ISIRI
4207
1st.Revision

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
Institute of Standards and Industrial Research of Iran



استاندارد ملی ایران
۴۲۰۷
تجدیدنظر اول

کیفیت آب- شمارش میکروارگانیسم ها در آب با استفاده از روش کشت- راهنما

Water quality - Enumeration of microorganisms in water by culture - Guideline

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
تهران - خیابان ولیعصر، ضلع جنوبی میدان ونک، پلاک ۱۲۹۴، صندوق پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵
تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱
دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و۸۸۸۸۷۱۰۳
کرج - شهر صنعتی، صندوق پستی ۱۶۳-۳۱۵۸۵
تلفن: ۸- ۲۸۰۶۰۳۱(۰۲۶۱)
دورنگار: ۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶۱)
پیام نگار: standard@isiri.org.ir
وب‌گاه : www.isiri.org
بخش فروش، تلفن: ۲۸۱۸۹۸۹ (۰۲۶۱) ، دورنگار: ۲۸۱۸۷۸۷ (۰۲۶۱)
بها: ۵۷۵۰ ریال

Institute of Standards and Industrial Research of IRAN
Central Office: No.1294 Valiaser Ave. Vanak corner, Tehran, Iran
P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran
Tel: +98 (21) 88879461-5
Fax: +98 (21) 88887080, 88887103
Headquarters: Standard Square, Karaj, Iran
P.O. Box: 31585-163
Tel: +98 (261) 2806031-8
Fax: +98 (261) 2808114
Email: standard @ isiri.org.ir
Website: www.isiri.org
Sales Dep.: Tel: +98(261) 2818989, Fax.: +98(261) 2818787
Price: 5750 Rls.

به‌نام خدا

آشنایی با مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک مادهٔ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه* صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود وکوششی 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 وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود .پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی 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 می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذیصلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند درکمیتهٔ ملی طرح و بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود .بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که مؤسسه استاندارد تشکیل می‌دهد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)[1] کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بینالمللی بهره‌گیری می‌شود.

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشو ر و / یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. مؤسسه می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سا زمانها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش ، مؤسسهٔ استاندارد این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آنها نظارت می کند .ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این مؤسسه است.

---

* موسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

1- International organization for Standardization
2 - International Electro technical Commission
3- International Organization for Legal Metrology (Organization International de Metrology Legal)
4 - Contact point
5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین

« استاندارد کیفیت آب- شمارش میکروارگانیسم ها در آب با استفاده از روش کشت-راهنما »

(تجدید نظر اول)

رئیس :	**نمایندگی**
اصلانی ، محمد مهدی (دکترای میکروب شناسی)	انستیتو پاستور ایران
دبیر:	
زندوکیلی ، فاطمه (فوق لیسانس علوم بهداشتی در تغذیه)	موسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
اعضاء : (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
بینای مطلق ، پروین (فوق لیسانس مهندسی بهسازی)	وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی- ادارهٔ سلامت محیط و کار
رحیمی فرد ، ناهید (دکترای میکروب شناسی)	وزارت بهداشت ،درمان و آموزش پزشکی- ادارهٔ کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو
زمانی ، مینا (لیسانس شیمی)	وزارت نیرو – شرکت مدیریت منابع آب ایران
سرگزی ، مریم (لیسانس میکروبیولوژی)	شرکت آبفای شهر ها و شهرک های غرب تهران
شاکری فرد ، پروین (دکترای میکروبشناسی)	دانشگاه صنعت آب و برق شهید عباسپور- گروه آب و فاضلاب

شقاقی ، غلامرضا (فوق لیسانس محیط زیست)	وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی- ادارۀ سلامت محیط و کار
ضرغامپور ، زهره (فوق لیسانس میکروبشناسی)	شرکت آب و فاضلاب تهران
فیضی ، علی (فوق لیسانس بهداشت محیط)	وزارت نیرو- مرکز تحقیقات نیرو
کوهی کمالی ، پالیز (فوق لیسانس میکروب شناسی)	انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذائی کشور
نیک بین ، حمیده (فوق لیسانس تغذیه)	ادارۀ کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان تهران

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
آشنائی با موسسهٔ استاندارد	ج
کمیسیون فنی تدوین استاندارد	د
پیش گفتار	ح
۱ هدف	۱
۲ دامنهٔ کاربرد	۱
۳ مراجع الزامی	۱
۴ اصول آزمون	۲
۵ کلیات	۲
۶ محلول های رقیق کننده و محیط های کشت	۳
۷ سترون سازی وسایل	۷
۸ نمونه برداری و آماده سازی نمونه ها	۷
۹ شمارش پس از تلقیح آزمونه در محیط کشت جامد	۸
۹-۱ اصول آزمون	۸
۹-۲ روش آزمون	۸

ادامهٔ فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
۹-۳ روش شمارش	۱۴
۹-۴ محاسبهٔ نتایج	۱۴
۱۰ شمارش پس از تلقیح آزمونه در محیط کشت مایع	۲۱
۱۰-۱ اصول آزمون	۲۱
۱۰-۲ کاربرد روش	۲۱
۱۰-۳ روش آزمون	۲۲
۱۰-۴ تفسیر نتایج	۲۴
۱۰-۵ تعیین مقادیر MPN	۲۵
۱۰-۶ تخمین دقت	۲۸
پیوست الف (اطلاعاتی) معیارهای انتخاب روش شمارش	۳۰
پیوست ب (اطلاعاتی) جدول های MPN	۳۷

پیش گفتار

استاندارد «کیفیت آب ـ شمارش میکروارگانیسم ها در آب با استفاده از روش کشت -راهنما » نخستین بار در سال ۱۳۷۶ تدوین شد.این استاندارد بر اساس پیشنهاد های رسیده و بررسی توسط موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران و تأیید کمیسیون های مربوط برای اولین بار مورد تجدید نظر قرار گرفت ودر یکصد و بیست و نهمین اجلاس کمیتهٔ ملی میکروبیولوژی و بیولوژی مورخ ۸۶/۸/۸ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات موسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ ، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت های ملی و جهانی در زمینهٔ علوم و خدمات ، استاندارد های ملی ایران در صورت لزوم تجدید نظر خواهد شد و هرگونه پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استاندارد ها ارائه شود، تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین باید همواره از آخرین تجدید نظر استاندارد های ملی ایران استفاده کرد.

این استاندارد جایگزین استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴۲۰۷: سال ۱۳۷۶ می شود.

منابع و مآخذی که برای تدوین این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است :

۱-استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴۲۰۷ : سال ۱۳۷۶ آیین کار آزمون های میکروبیولوژی آب

2- ISO 8199 : 2005 , Water quality – General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture

کیفیت آب- شمارش میکروارگانیسم ها در آب با استفاده از روش کشت- راهنما

هشدار- کاربران این استاندارد باید با روش های معمول آزمایشگاهی آشنا بوده و آموزش های لازم را دیده باشند .این استاندارد تمام مخاطرات ایمنی را که ممکن است با کاربرد آن همراه باشد ، نشان نمی دهد. بنابراین مسئولیت کاربر است تا ضمن تعیین راهکارهای ایمنی و بهداشتی، از تطابق آن با مقررات و شرایط ملی نیز اطمینان حاصل کند.

۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد تعیین راهنما برای انجام روش های معمول آزمون میکروبیولوژی آب ،به ویژه آماده سازی نمونه ها و محیط های کشت است. این استاندارد علاوه بر شرح روش های مختلف شمارش ، معیار هائی را نیز برای انتخاب یک روش خاص ارائه می دهد.

۲ دامنهٔ کاربرد

این استاندارد برای آزمون باکتری ها ، مخمر ها و کپک ها کاربرد دارد . همچنین برخی ازقسمت های آن برای آزمون ویروس ها و انگل ها[1] کاربرد دارد.

۳ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد ملی به آن ها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد ملی ایران محسوب می شود.

در صورتی که به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد ، اصلاحیه ها و تجدید نظر های بعدی آن مورد نظر این استاندارد ملی ایران نیست. در مورد مدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن ها ارجاع داده شده است ، همواره آخرین تجدید نظر و اصلاحیه های بعدی آن ها مورد نظر است.

استفاده از مراجع زیر برای این استاندارد الزامی است :

۳-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۳۲۵ ، آیین کاربرد روش های عمومی در آزمایش های میکروبیولوژی

۳-۲ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۷۴۷ ، آیین کار در آزمایشگاه های میکروبیولوژی

---

[1] -Parasites

۳-۳ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۴۲۰۸ ، کیفیت آب - نمونه برداری از آب برای آزمون های میکروبیولوژی- آیین کار

۳-۴ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۷۴۴۲ ، درستی (صحت و دقت) روش ها و نتایج اندازه گیری -قسمت اول: تعاریف و اصول کلی

۳-۵ استاندارد ملی ایران شمارهٔ۲-۷۴۴۲ ، درستی (صحت و دقت) روش ها و نتایج اندازه گیری- قسمت دوم : روش پایه برای تعیین تکرارپذیری و تجدیدپذیری روش اندازه گیری استاندارد

3-6 ISO/TR 13843:2000 Water quality-General guidance on validation of microbiological methods

۴ اصول آزمون

اصول کلی این روش ها شامل تلقیح حجم معینی از نمونهٔ آب به محیط های کشت جامد یا مایع است. فرض بر این است که پس از گرمخانه گذاری ، هر میکروارگانیسم تکثیر می یابد و ایجاد کلنی قابل مشاهده روی محیط کشت جامد و یا تغییرات ظاهری در محیط کشت مایع می کند. انتخاب یک روش خاص بستگی به ماهیت آب، میکروارگانیسم مورد جستجو ، و دلیل آزمون دارد.

۵ کلیات

یکنواختی دما و زمان گرمخانه گذاری :

به طور کلی برای میکروارگانیسم های مورد آزمون، از محدودهٔ درجهٔ حرارت و زمان به شرح زیر استفاده کنید :

درجهٔ حرارت نگهداری نمونه : °C(۱۰±۷۰-) ، °C (۵±۲۰-) و °C (۳±۵)

دمای گرمخانه گذاری : °C (۲±۲۲) و °C (۲±۳۶)

دمای سترون سازی : °C (۳±۱۲۱) و °C (۱۰±۱۷۰)

زمان گرمخانه گذاری : h(۴±۴۴) ، h(۳±۲۱) و h (۴±۶۸)

درجهٔ حرارت و زمان ها ی فوق بسیار دقیق است و می تواند اثر زیادی روی رشد میکروارگانیسم ها داشته باشد. حدود پائینی آن ممکن است برای مدت کوتاهی بیشتر شود (برای مثال به دلیل باز بودن در گرمخانه) ولی برگشت دما به حالت اولیه باید سریع صورت گیرد.

محدودهٔ مجاز حجم و وزن : محدودهٔ قابل قبول به جز در مواردی که تعیین شده باشد ٪۵± است.

یادآوری – با توجه به استانداردهای خاص هر میکروارگانیسم می توان از محدودهٔ دما و زمان های تعیین شده در آن استانداردها ،استفاده کرد. .

۶ محلول های رقیق کننده و محیط های کشت

۶-۱ کلیات

۶-۱-۱ الزامات کیفی

از ترکیبات دارای کیفیت و درجهٔ خلوص آزمایشگاهی همسان[1] استفاده کنید. از محیط های کشت و محلول های رقیق کننده را که به صورت آماده در دسترس هستند نیز می توانید استفاده کنید. در این صورت آماده سازی آن ها را مطابق با دستورالعمل سازنده انجام دهید.

برای پیشگیری از تاثیر مواد روی رشد میکروارگانیسم ها در شرایط آزمون ، از آب تقطیر شده بوسیلهٔ دستگاه های شیشه ای استفاده کنید . ویژگی های آب مقطر مورد استفاده باید با استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۷۴۷ مطابقت داشته باشد.

برای آماده سازی محیط های کشت، به جز در مواردی که در استاندارد خاص هر میکروارگانیسم مشخص شده است ، تمام ترکیبات به جای اینکه به حجم معینی رسانده شود باید به حجم معین آب اضافه شود. پیش از استفاده از محیط های کشت ، کیفیت محیط های کشت ، محلول های رقیق کننده و صافی ها را کنترل کنید.

۶-۱-۲ سترون سازی

محیط های کشت و محلول های رقیق کننده را در ظروف مناسب برای سترون سازی تقسیم و در اتوکلاو سترون کنید. در بیشتر موارد درجهٔ حرارت $121\pm3^{\circ}C$ به مدت ۱۵ دقیقه برای سترون سازی کافی است. اگرچه در برخی از موارد ممکن است استفاده از دما و زمان خاص لازم باشد. برای سترون سازی مواد حساس به حرارت ، در صورت توصیه سازنده می توانید از صافی غشائی با اندازهٔ روزنهٔ ۰/۲ µm استفاده کنید.

۶-۲ محلول های رقیق کننده

از یکی از محلول های رقیق کنندهٔ بندهای ۶-۲-۱ تا ۶-۲-۵ برای آزمون آب استفاده کنید . پس از آماده سازی و توزیع محلول های رقیق کننده در ظروف مناسب ،آن را در اتوکلاو با دمای $121\pm3^{\circ}C$ برای مدت ۱۵ دقیقه سترون کنید. همچنین می توانید محلول های رقیق کننده را پس از سترون سازی ، با رعایت شرایط اسپتیک در ظروف پخش کنید.

محلول های رقیق کننده را در دمای $5\pm3^{\circ}C$ به مدت حداکثر شش ماه می توانید نگهداری کنید.

در صورت ایجاد هرگونه تغییر ظاهری در محلول های رقیق کننده ، از مصرف آن خودداری کنید.

---

[1] -Uniform

۶-۲-۱ محلول نمکی[1]

مواد تشکیل دهنده	مقدار
سدیم کلراید (NaCl)	۸/۵ g
آب مقطر	۱۰۰۰ml

آماده سازی:

ترکیبات فوق را در آب حل کنید و در صورت لزوم از حرارت استفاده کنید. pH را با محلول سدیم هیدروکساید یک مول بر لیتر و یا اسید هیدروکلریک یک مول بر لیتر به گونه ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی برابر ۷±۰/۵ در دمای $^{\circ}C$ ۲۵ باشد.

۶-۲-۲ محلول پپتون

مواد تشکیل دهنده	مقدار
کازئین هضم شدهٔ آنزیمی (پپتون)[2]	۱g
آب مقطر	۱۰۰۰ml

آماده سازی:

مواد فوق را در آب حل کنید و در صورت لزوم از حرارت استفاده کنید. pH را با محلول سدیم هیدروکساید یک مول بر لیتر و یا اسید هیدروکلریک یک مول بر لیتر به گونه ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی برابر ۷±۰/۵ در دمای $^{\circ}C$ ۲۵ باشد.

۶-۲-۳ محلول پپتون نمکی

مواد تشکیل دهنده	مقدار
کازئین هضم شدهٔ آنزیمی (پپتون)	۱g
سدیم کلراید ((NaCl))	۸/۵ g
آب مقطر	۱۰۰۰ ml

آماده سازی:

مواد فوق را در آب حل کنید و در صورت لزوم از حرارت استفاده کنید. pH را با محلول سدیم هیدروکساید یک مول بر لیتر و یا اسید هیدروکلریک یک مول بر لیتر به گونه ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی برابر ۷±۰/۵ در دمای $^{\circ}C$ ۲۵ باشد.

---

[1] -Saline solution

[2] -Enzymatic digest of casein (peptone)

۶-۲-۴ محلول رینگر یک چهارم

مواد تشکیل دهنده	مقدار
سدیم کلراید ((NaCl)	۲/۲۵ g
پتاسیم کلراید ((KCl)	۰/۱۰۵ g
کلسیم کلراید بدون آب ($CaCl_2$)	۰/۱۲ g
سدیم هیدروژن کربنات($NaHCO_3$)	۰/۰۵ g
آب مقطر	۱۰۰۰ ml

آماده سازی:

مواد فوق را در آب حل کنید و در صورت لزوم از حرارت استفاده کنید.pH را با محلول سدیم هیدروکساید یک مول بر لیتر و یا اسید هیدروکلریک یک مول بر لیتر به گونه ای تنظیم کنید که پس از سترون سازی برابر ۷±۰/۲ در دمای $^{\circ}C$ ۲۵ باشد.

۶-۲-۵ محلول فسفات بافری

الف- محلول فسفات

مواد تشکیل دهنده	مقدار
پتاسیم دی هیدروژن ارتوفسفات(KH_2PO_4)	۳۴ g
آب مقطر	۱۰۰۰ ml

آماده سازی:

پتاسیم دی هیدروژن ارتوفسفات را در ۵۰۰ml آب مقطر حل کنید. pH را با محلول سدیم هیدروکساید یک مول بر لیتر و یا اسید هیدروکلریک یک مول بر لیتر برابر ۷/۲±۰/۲ در دمای $^{\circ}C$ ۲۵ تنظیم کنید. سپس مقدار ۵۰۰ml دیگر به آن آب مقطر اضافه کنید.

در صورتی که محلول فوق نگهداری می شود، آن را پیش از نگهداری سترون کنید.

ب -محلول منیزیم کلراید

مواد تشکیل دهنده	مقدار
منیزیم کلراید ($MgCl_2$)	۳۸g
آب مقطر	۱۰۰۰ml

به جای منیزیم کلراید می توانید از ۹۹g منیزیم سولفات ($MgSO_4.7H_2O$) نیز استفاده کنید.

آماده سازی:
منیزیم کلراید را در آب حل کنید. در صورتی که محلول فوق نگهداری می شود آن را پیش از نگهـداری سترون کنید.

پ- محلول نهائی

مواد تشکیل دهنده	مقدار
محلول فسفات (طبق بند الف)	۱٫۲۵ ml
محلول منیزیم کلراید (طبق بند ب)	۵ ml
آب مقطر	۱۰۰۰ml

آماده سازی:
محلول فسفات (طبق بند الف) و محلول منیزیم کلراید (طبق بند ب) را به آب مقطر بیافزائید و آن را کاملاً مخلوط کنید . پس از توزیع محلول فوق در حجم های مناسب آن را سترون کنید. pH نهائی باید برابر ۰٫۲±۷ در دمای $^{\circ}C$ ۲۵ باشد.

۶-۳ محیط های کشت

هنگامی که بستهٔ محیط کشت باز می شود ، تاریخ را روی برچسب ظرف یادداشت و بـرای آن حـداکثر زمان نگهداری را تعیین کنید.
به طور کلی بیشتر محیط های کشت چنانچه پس از سـترون سـازی در تـاریکی و در ظـروف در بـسته[1] نگهداری شود ، ممکن است تا چندین ماه در درجهٔ حرارت آزمایشگاه به طور رضایت بخشی حفظ شوند.
محیط های کشت که تحت شرایط اسپتیک توزیع می شـوند ممکـن اسـت در دمـای$^{\circ}C$ (۳±۵) بـرای مدت حداکثر تا دو هفته یا در صورت تائید برای مدت زمان بیـشتر نگهـداری شـود. پـیش از اسـتفاده ، محیط های کشت را به دقت از نظر آلودگی ، تبخیر بیش از حد یـا سـایر شـواهد فـساد بررسـی کنیـد. محیط های کشت پیش ریخته[2] را مطابق با دستورالعمل سازنده استفاده کنید. درصورتی که مکمل های حساس به حرارت پس از سترون سازی به محیط های کشت اضافه می شود ، پـیش از افـزودن مکمـل، محیط کشت را تا دمای $^{\circ}C$۴۵ تا $^{\circ}C$ ۵۰ سرد کنید.

۷-سترون سازی وسایل

وسایل را به یکی از روش های زیر سترون کنید:
الف- در آون با دمای $^{\circ}C$ (۱۰±۱۷۰) برای مدت حداقل یک ساعت (از زمان رسیدن به دمای $^{\circ}C$۱۷۰)
ب- در اتوکلاو با دمای$^{\circ}C$ (۳±۱۲۱) برای مدت حداقل ۱۵ دقیقه

---
[1] -Sealed containers
[2] -Pre-poured

یآداوری -در صورت سترون نبودن صافی غشائی ، آن را پیش از استفاده مطابق با دستورالعمل سازنده سترون کنید.

۸-نمونه برداری و آماده سازی نمونه

۸-۱ روش نمونه برداری

نمونه برداری از نمونه های آب را مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۴۲۰۸ انجام دهید.

۸-۲ آماده سازی نمونه

برای دستیابی به توزیع یکنواخت میکروارگانیسم ها ، پیش از انجام آزمون ، نمونه ها را با تکان دادن شدید[1] کاملاً مخلوط کنید . بسته به ماهیت نمونهٔ آب و میزان آلودگی مورد انتظار ، رقت های لازم را تهیه کنید.

برای آزمون شمارش در پلیت ، رقت های دهدهی[2] را با رعایت شرایط اسپتیک تهیه کنید (به استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۳۲۵ مراجعه شود). برای روش صافی غشائی (با سطح کمتر) استفاده از رقت های پائین تر توصیه می شود.

برای رقت های ۱۰ برابر ، ۹۰ml یا 9ml از محلول های رقیق کننده را به ارلن یا لوله های سترون اضافه کنید. .همچنین می توانید حجم های مختلف محلول های رقیق کننده را از پیش در ظروف در پیچ دار، سترون کنید. با انتقال یک حجم نمونهٔ آب به ۹ حجم محلول رقیق کننده ، رقت های ۱۰ برابر را تهیه کنید. با استفاده از پیپت جدید و یا روش های مکانیکی ، محلول را کاملاً مخلوط کنید. یک حجم از رقت فوق را به ۹ حجم محلول رقیق کننده اضافه کنید. مراحل فوق راچندین بار تا بدست آوردن رقت لازم تکرار کنید. برای تمام آزمون هائی که باید روی نمونه انجام شود، حجم های کافی از هر رقت را تهیه کنید.

برای رقت هائی به غیر از ۱۰ برابر ، نسبت حجم محلول رقیق کننده به حجم نمونه را تنظیم کنید. روش های متفاوتی را می توانید انتخاب کنید. برای مثال سری رقت های ۳ یا ۴ برابر یا سری رقت های دهدهی از نمونه های ۱۰ یا ۳۰ میلی لیتری که صاف شده اند . برای تهیهٔ رقت های ۴ برابر مانند تهیه رقت های ۱۰ برابر و بیشتر عمل کنید به جز اینکه یک حجم نمونهٔ آب را با ۳ حجم محلول رقیق کننده مخلوط کنید.

در صورتی که انتظار می رود غلظت میکروارگانیسم های مورد آزمون بالا باشد، رقت های ۱۰۰ برابر را نیز می توانید تهیه کنید.

۹-شمارش پس از تلقیح آزمونه به محیط کشت جامد

---

[1] -Vigorous
[2] -Decimal

۹-۱ اصول آزمون

آزمونه و یا رقتی از آن به طور مستقیم یا تغلیظ شده روی صافی غشائی به سطح محیط کشت جامد یا محیط ذوب شده اضافه می شود تا پس از گرمخانه گذاری روی سطح محیط یا درون آن کلنی تشکیل شود. فرض براین است که هر کلنی منشاء یک میکروارگانیسم منفرد و یا دستهٔ میکروارگانیسم های موجود در آزمونه هنگام تلقیح است. با در نظر گرفتن حجم آزمونه و تعداد کلنی های تشکیل شده ، نتیجه به صورت « تعداد واحد های تشکیل دهندهٔ کلنی(cfu) [۱] یا ذرات تشکیل دهندهٔ کلنی(cfp)[۲]» در حجم معینی از نمونه (برای مثال ۱ml یا ۱۰۰ml) بیان می شود.

۹-۲ روش آزمون

۹-۲-۱ کلیات

برای تلقیح به محیط کشت جامد ، یکی از روش های زیر را به کار برید:

الف- روش کشت آمیخته[۳]

در این روش آزمونه با محیط کشت ذوب شده که تا درجهٔ حرارت نزدیک به نقطهٔ انجماد سرد شده است ،مخلوط می شود .پس از گرمخانه گذاری کلنی های تشکیل شده روی سطح و درون محیط کشت شمارش می شوند.

ب- روش کشت سطحی[۴]

در این روش،آزمونه روی سطح محیط کشت آگاردارگسترده می شود و پس از گرمخانه گذاری ،کلنی های تشکیل شده روی سطح شمارش می شود.

پ- روش صافی غشائی

در این روش آزمونه از صافی غشائی عبور داده می شود و میکروارگانیسم های مورد جستجو روی صافی باقی می مانند. سپس صافی روی محیط کشت آگاردار یا پد جاذب[۵] اشباع شده از محیط کشت قرار داده می شود. پس از گرمخانه گذاری ،کلنی ها روی سطح صافی تشکیل می شوند. همچنین برای میکروارگانیسم های خاص مانند باکتری های بی هوازی ، صافی را می توان به گونه ای در پلیت قرار داد که سطح آن به طرف پائین باشد و با لایهٔ دیگری از محیط کشت آگار دار پوشانده شود.

۹-۲-۲ انتخاب روش

---

[1] -Colony- forming units
[2] -Colony-forming particles
[3] -Pour plate technique
[4] -Spread plate technique
[5] -Absorbent pad

انتخاب روش به عوامل مختلفی بستگی دارد. این عوامل شامل ویژگی های فیزیکی و شیمیائی آب ، ماهیت میکروارگانیسم های مورد جستجو ، غلظت احتمالی آنها ، بازیافت موثر میکروارگانیسم های آسیب دیده[1] و تحت تنش[2]، دقت[3] آزمون و حساسیت لازم می باشد.الزامات هر روش در بند های ۹-۲-۳ ،۹-۲-۴و ۹-۲-۵ ارائه شده است (به پیوست اطلاعاتی **الف** مراجعه شود).

حجم نمونهٔ آب مورد استفاده در هر روش ، محدودیت و درستی[4] روش دربند الف-۲ پیوست **الف** شرح داده شده است. همچنین الزامات هر روش ممکن است انتخاب روش را تحت تاثیر قرار دهد برای مثال دقت مطلوب و اهمیت وجود یا عدم وجود یک میکروارگانیسم در حجم معین نمونهٔ آب.

۹-۲-۳ روش کشت آمیخته

۹-۲-۳-۱ آزمونه

حجم آزمونه و یا رقتی از نمونه بسته به اندازهٔ پلیت و حجم محیط کشت مورد استفاده بین ۰/۱ ml تا ۵ ml است . رقت باید به گونه ای انتخاب شود که تعداد مورد انتظار کلنی های تیپیک[5] تشکیل شده روی پلیت هائی با قطر ۹۰ mm تا ۱۰۰mm بین ۱۰ تا ۱۵۰ کلنی باشد. تعداد کل کلنی ها ی تیپیک و غیر تیپیک[6] روی پلیت باید کمتر از ۳۰۰ کلنی باشد (به استاندارد ملی ایران شمارهٔ۲۳۲۵ مراجعه شود).

یادآوری- تعداد کل کلنی های قابل شمارش به اندازهٔ کلنی بستگی دارد و برای کلنی های بزرگتر تعداد ممکن است کاهش یابد.

۹-۲-۳-۲ تلقیح

محیط کشت مورد استفاده را در حمام آب جوش ذوب کنید. از سایر فرایند های مناسب مانند قرار دادن در جریان بخار آزاد اتوکلاو یا ماکروویو و سایر فرایند های مناسب که ترکیب دما و زمان آن برای آماده سازی محیط کشت، صحه گذاری شده است نیز می توانید استفاده کنید. از حرارت دادن زیاد محیط کشت خودداری کنید و آن را به محض ذوب شدن از حمام آب خارج کنید. محیط کشت ذوب شده را در حمام آب با دمای$^{\circ}C$ (۱±۴۵) قرار دهید تا دمای آن به $۴۵^{\circ}C$ برسد. پس از تهیه و آماده سازی پلیت ها و رقت های لازم ، .مطابق با بند ۸-۲ این استاندارد ، آزمونه را کاملاً مخلوط و در پلیت ها تقسیم کنید.

---

[1] -Injured
[2] -Stressed
[3] -Precision
[4] -Accuracy
[5] -Typical
[6] -Non-typical

یادآوری۱- محیط های کشت را برای مدت بیشتر از h ۴ به صورت ذوب شده نگهداری نکنید.
یادآوری۲- محیط های کشت آگاردار را بیشتر از یکبار ذوب نکنید.

هر یک از لوله ها و ارلن ها را به نوبت از حمام آب خارج کنید و پس از خشک کردن قسمت بیرونی آن ، گردن ظرف را از روی شعله عبور دهید. محیط کشت را بدون تأخیر به پلیت ها به گونه ای بیافزائید که ایجاد شوک حرارتی برای آزمونه به حداقل برسد. سپس به منظور توزیع یکنواخت میکروارگانیسم ها، آزمونه و محیط کشت را کاملاً مخلوط کنید. به طور کلی برای یک میلی لیتر تا دو میلی لیتر آزمونه،مقدار ml ۱۵ محیط کشت استفاده می شود. برای حجم های بیشتر آزمونه ،مقدار محیط کشت را بر همین اساس تنظیم کنید.
پلیت ها را روی سطح افقی قرار دهید تا سرد شود و محیط آگاردار جامد شود. پس از جامد شدن آگار ، پلیت ها را بدون تأخیر طبق بند ۹-۲-۶ گرمخانه گذاری کنید.

یادآوری - کاربرد سیستم های آماده کننده آگار[1] برای آزمایشگاه هائی که دارای تعداد زیاد نمونه هستند ، مفید می باشد.

۹-۲-۴ روش کشت سطحی

۹-۲-۴-۱ آزمونه

برای پلیت هائی با قطر mm ۹۰ تا mm ۱۰۰ ، حجم آزمونه و یا رقتی از آن باید بین ml ۰/۱ تا ml ۰/۵ باشد. رقت را به گونه ای انتخاب کنید که در آن تعداد مورد انتظار کلنی های تشکیل شده بین ۱۰ تا ۱۵۰ کلنی تیپیک باشد. تعداد کل کلنی های تیپیک و غیرتیپیک روی پلیت باید کمتر از ۲۰۰ کلنی باشد.

یادآوری- تعداد کل کلنی های قابل شمارش ، به اندازهٔ کلنی ها بستگی دارد و برای کلنی های بزرگتر تعداد کلنی ها ممکن است کاهش یابد.

۹-۲-۴-۲ تلقیح

پلیت های دارای حدودml ۱۵ محیط کشت را آماده و نشانه گذاری کنید. در صورت لزوم سطح محیط های کشت را پیش از استفاده خشک کنید. آزمونه را بوسیلهٔ پیپت روی سطح پلیت بریزید و سپس با استفاده از میلهٔ شیشه ای سترون و یا وسایل مکانیکی آن را روی سطح پخش کنید. پس از جذب مادهٔ تلقیحی ،پلیت ها را مطابق با بند۹-۲-۶ گرمخانه گذاری کنید.
برای خشک کردن پلیت ها ، توجه به نکات زیر مهم است :

[1] -Agar preparator pourer-stacker systems

الف- میزان رطوبت در محیط کشت مهم است زیرا رشد بهینهٔ باکتری ها بـه شـرایط رطوبـت درون و سطح محیط کشت بستگی دارد.از دست دادن رطوبت زیاد ممکن است منجر به افـزایش غلظـت مـواد بازدارندهٔ در محیط های کشت انتخابی و کاهش فعالیت آب[1] در سطح محیط کشت شود.

ب- در مورد باکتری هائی که کلنی آن ها به سرعت روی محیط کـشت پخـش نمـی شـوند و سـطح محیط کشت در پلیت ها خشک به نظر می رسد، ، خشک کردن سطح پلیت ها ضرورت ندارد. در این موارد ، می توانید خشک کردن سطح پلیت ها را حذف کنید ، زیرا باعث افزایش احتمـال آلـودگی و از دست دادن بی مورد رطوبت می شود.

پ- درجهٔ حرارت و زمان خشک شدن را به گونه ای انتخاب کنید که احتمـال آلـودگی تـا حـد ممکـن پائین نگه داشته شود و درجهٔ حرارت اثر سوئی روی کیفیت محیط کـشت نداشـته باشـد.زمـان خـشک شدن به میزان بخار آبی که در سطح محیط کشت در پلیت ها قرار گرفته است بستگی دارد ولی باید تـا حد امکان کوتاه نگه داشته شود.

ت- چنانچه برای خشک کردن پلیت ها از اتاقک با جریان هوای لایـه ای[2] اسـتفاده نمـی کنیـد ، بـرای پیشگیری از آلودگی پلیت ها ، سطح محیط کشت را به طرف پائین قرار دهید.

در عمل پلیت ها با قرار دادن در گرمخانهٔ $25\ ^{\circ}C$ تا $50\ ^{\circ}C$ به گونه ای که سطح آگار پلیت ها بـه طـرف پائین باشد و در پلیت نیمه باز باشد ، خشک می شوند.

خشک کردن پلیت ها را تا زمان ناپدید شدن قطرات در سطح آگار یا روی در پلیت ادامه دهید. بـیش از آن، خشک کردن را ادامه ندهید. همچنین می توانید پلیت ها را در اتاقک ایمنی با جریان هوای لایـه ای در دمای محیط برای مدت ۳۰ دقیقه تا ۶۰ دقیقه یا به مدت یک شـب[3] بـه صـورت دربـسته در درجـهٔ حرارت محیط خشک کنید.

۹-۲-۵ روش صافی غشائی

۹-۲-۵-۱ آزمونه

حداکثر حجم آزمونه به قابلیت صاف شدن نمونهٔ آب و صافی غـشائی مـورد اسـتفاده بـستگی دارد. ایـن روش برای آب هائی مانند آب آشامیدنی که دارای مقادیر کمی از ذرات یا مواد کلوئیدی (ماننـد آهـن) به صورت معلق هستند ، کاربرد دارد. با صافی هائی با اندازهٔ روزنهٔ $0/45\ \mu m$ امکان صاف کردن چندین لیتر از چنین آب هائی با استفاده از یک صافی و در نتیجه دستیابی بـه حـساسیت بـالای آزمـون وجـود

---

[1] Water activity (a_W)
[2] -Laminar -flow safety cabinet
[3] -Over night

دارد. اگرچه برای برخی از میکروارگانیسم ها (مانند لژیونلا) استفاده از صافی هائی با اندازهٔ روزنهٔ ۰/۲ µm لازم است.
حجم نمونهٔ مورد آزمون و یا رقتی از آن باید به گونه ای انتخاب شود که تعداد مورد انتظار کلنی های تیپیک تشکیل شده روی صافی با قطر ۴۷ ml تا ۵۰ml حدود ۱۰ تا ۱۰۰ کلنی باشد. تعداد کل کلنی های تیپیک و غیر تیپیک روی صافی باید کمتر از ۲۰۰ کلنی باشد.

یادآوری - توجه داشته باشید که تعداد کل کلنی های قابل شمارش به اندازهٔ کلنی بستگی دارد و تعداد با بزرگ شدن کلنی کاهش می یابد.

۹-۲-۵-۲ صاف کردن

دستگاه های صافی سترون را به منبع خلاء وصل کنید. روی صفحهٔ متخلخل[1] پایهٔ صافی یک صافی غشائی سترون را که سطح چهارخانهٔ آن به طرف بالا باشد قرار دهید.قسمت بیرونی صافی غشائی را با استفاده از گیرهٔ سر پهن محکم کنید. قیف سترون را به گونه ای مطمئن روی پایهٔ صافی قرار دهید.در حالیکه پمپ خلاء خاموش است یکی از آزمونه های زیر را درون قیف بریزید:

الف- حجم مشخصی از نمونه و یا رقتی از آن که کاملاً مخلوط شده باشد(حداقل ۱۰ ml)
ب- محتوای ظرف حاوی آزمونه و مقدار کافی محلول رقیق کننده برای رساندن حجم کل به حداقل ۱۰ ml
پ- چنانچه آزمونه با پیپت اندازه گرفته می شود، حداقل ۱۰ ml محلول رقیق کننده را مستقیماً به آن بیافزایید و با پیپت مخلوط کنید.
پمپ خلاء را با میزان خلاء کافی (حدود ۷۰kPa) روشن کنید تا نمونهٔ آب از صافی عبور کند. به محض صاف شدن نمونه، پمپ خلاء را خاموش کنید. بهتر است دیواره های قیف را در حالیکه صافی هنوز در جای خود قرار دارد، با استفاده از ۱ تا ۳ قسمت ۱۰ml تا ۳۰ ml محلول رقیق کنندهٔ سترون، شستشو دهید.

۹-۲-۵-۳ انتقال صافی ها

پس از اطمینان از خاموش بودن پمپ خلاء ،قیف را بردارید و صافی ها را با گیرهٔ سترون به یکی از موارد زیر انتقال دهید:

الف- به پلیت حاوی محیط کشت آگاردار

[1] -Porous

ب- به پد جاذب سترون که از پیش با محیط کشت مایع اشباع شده است و یا پد جاذب حاوی محیط کشت بدون آب[1] که آب مقطر به آن اضافه می شود ، برای پیشگیری از از تداخل کلنی[2] ، پیش از قرار دادن صافی روی پد جاذب، محیط کشت اضافی آن بیرون ریخته شده است.

پ- به پلیت حاوی مقدار کمی محیط آگاردار و سپس افزودن لایهٔ دیگر از محیط کشت با دمای $^{\circ}C$ (۱±۴۵) درجهٔ سلسیوس روی صافی غشائی.

هنگام انتقال صافی ها، از عدم وجود حباب هوا بین صافی و محیط کشت اطمینان یابید.

برای حجم های مختلف یک نمونه ،در صورتی که کمترین حجم و یا رقیق ترین نمونه را ابتدا صاف کنید، می توانید قیف را بدون گندزدائی، برای رقت های پایین تر همان نمونه استفاده کنید. برای صاف کردن نمونهٔ دیگر می توانید از وسایل سترون جدید استفاده کنید برای مثال بوسیلهٔ شعله ، قیف را گندزدائی کنید. برای گندزدائی قیف ، مطابق با دستورالعمل سازنده عمل کنید.

۹-۲-۶ گرمخانه گذاری

پلیت های تلقیح شده را وارونه کنید و آن را در گرمخانه و یا حمام آب (پس از قرار دادن در ظروف مقاوم به نفوذ آب) قرار دهید.در صورت لزوم پلیت ها را برای پیشگیری از خشک شدن در یک کیسهٔ پلاستیکی قرار دهید مانند مواردی که از گرمخانهٔ دارای تهویه[3] استفاده می کنید. پلیت هائی که حاوی صافی روی پد جاذب هستند را برای پیشگیری از خشک شدن در ظروف مقاوم به نفوذ هوا و آب درگرمخانه یا حمام آب (نه به صورت وارونه) قرار دهید.

برای اطمینان از اینکه دمای پلیت ها سریعاً به دمای گرمخانه می رسد ، نباید بیشتر از ۶ پلیت را در گرمخانه روی هم قرار دهید.

زمان و درجهٔ حرارت گرمخانه گذاری را با استفاده از استاندارد های خاص مربوط به میکروارگانیسمهای مورد جستجو انتخاب کنید.

گرمخانه گذاری می تواند در دو مرحله به شرح زیر انجام شود:

برای احیاء[4]میکروارگانیسم های تحت تنش می توانید پلیت ها را در زمان های متفاوت برای مثال دوساعت تا چهار ساعت در درجهٔ حرارت کمتر (مانند $25^{o}C$ تا $30^{o}C$) و متعاقب آن برای مدت زمان بیشتر در درجهٔ حرارت معمول برای میکروارگانیسم مورد جستجو ،. پیش گرمخانه گذاری کنید.

تغییرات دما ممکن است با انتقال به گرمخانه و یا حمام آب دیگر و یا با استفاده از دستگاه هایی که درجهٔ حرارت آن ها به طور خودکار پس از زمان معین تغییر می یابد ، تحت تاثیر قرار گیرد. بهتر است تمام پلیت ها را به طور هم زمان در گرمخانه یا حمام آب قرار دهید.

---

[1] -Dehydrated medium
[2] -Confluent growth
[3] -Fan-assisted incubator
[4] -Resuscitation

همچنین می توانید صافی ها را برای مدت کوتاهی (مانند ۲ h تا ۴ h) در محیط کشتی که سبب احیاء میکروارگانیسم می شود قرار دهید و سپس برای گرمخانه گذاری بیشتر به محیط دیگر (معمولاً محیط انتخابی[1]) منتقل کنید.

۹-۳ روش شمارش

۹-۳-۱ کلیات

پلیت ها و صافی ها را بلافاصله پس از پایان گرمخانه گذاری بررسی کنید.در مواردی که این کار امکان پذیر نباشد می توانید آن را برای مدت کوتاهی (برای مثال چند روز) در دمای $^{\circ}C$ (۵±۳)در صورت نداشتن اثرات سوء بر تعداد و ظاهر میکروارگانیسم ها و همچنین آزمون های تاییدی ، قرار دهید. در صورتی که پلیت ها یا صافی ها را نگهداری می کنید، مدت زمان نگهداری قابل قبول را با توجه به نوع نمونه و روش آزمون، صحه گذاری کنید.

۹-۳-۲ شمارش و تائید کلنی ها

برای شمارش کلی روی محیط غیر انتخابی، تمام کلنی ها را شمارش کنید.در محیط های انتخابی و افتراقی[2] ، فقط کلنی هائی را که ظاهر مختص میکروارگانیسم مورد جستجو را نشان می دهد شمارش کنید. در صورتی که اندازهٔ کلنی کوچک است ویا تشخیص کلنی ها از سایر ذرات مشکل است ، می توانید از ذره بین استفاده کنید. به طور کلی برای چنین شمارش هائی ، مشخص کردن میکروارگانیسم ها ئی که فقط تعلق به یک گروه رده بندی[3]دارند معمول نیست ، ولی در عمل،این تفاوت ممکن است مورد قبول باشد و نتایج به صورت فرضی[4] بیان شود. برای تعیین ویژگی های دقیق تر ، آزمون های تائیدی باید انجام شود.

اگرچه هنگامی که تعداد کلنی ها زیاد است ، تائید مشخصات همهٔ آن ها عملی نیست.در چنین مواردی تمام کلنی های تیپیک از قسمت های حاشیه پلیت یا صافی را مورد بررسی قرار دهید.

۹-۴ محاسبهٔ نتایج

۹-۴-۱ اصول روش

در روش های محاسبهٔ زیر ، تمام مواردی که احتمال دارد هنگام آزمون بر طبق عملیات (روش های) خوب آزمایشگاهی[5] پیش آید ، در نظر گرفته شده است. در موارد نادر و خاص نیز مانند وجود اختلاف معنی دار بین شمارش کلنی ها در دو پلیت با رقت یکسان و یا نسبت بسیار متفاوت با ضریب رقت بین پلیت های دو رقت متوالی ، تفسیر و بررسی نتایج بدست آمده از شمارش لازم است.

---

[1] -Selective
[2] -Differential
[3] -Taxonomic group
[4] -Presumptive
[5] -Good laboratory practices

۹-۴-۲ کلیات

روش محاسبهٔ نتایج در این بند هنگامی که تعداد کل کلنی های روی پلیت بین ۱۰ تـا ۲۰۰ کلنـی (در روش کشت سطحی و صافی غشائی) یا بین ۱۰ تا ۳۰۰ کلنی (در روش کشت آمیخته) و یـا هنگـامی که تعداد کلنی های تیپیک بین ۱۰ تا ۱۵۰ کلنی (در روش کشت سطحی و آمیخته) و یا بـین ۱۰ تـا ۱۰۰ کلنی است (در روش کشت آمیخته) به کار برده می شود.

به دلیـل اینکـه فـرض بـر ایـن اسـت کـه هـر کلنـی از یـک میکروارگانیـسم یـا از یـک تجمـع منفـرد میکروارگانیسم ها منشاء گرفته است، نتایج به صورت تعداد واحد هـای تـشکیل دهنـدهٔ کلنـی(cfu) یـا ذرات تشکیل دهندهٔ کلنی(cfp) در حجم معینی از نمونه (معمولاً ۱۰۰ml یا ۱ ml) با استفاده از فرمول ۱ بدست می آید.

$$C_s = \frac{Z}{V_{tot}} \times V_s \qquad (۱)$$

که در آن :

C_s تخمین تعداد cfu در حجم مرجع V_s است ؛

Z جمع کلنی های شمارش شده روی پلیت ها یا صافی ها بدست آمده از رقت های d_n یا حاصـل از حجم های جداگانهٔ آزمونه (نمونه یا رقت)؛

V_s حجم مرجع انتخاب شده برای بیان غلظت میکروارگانیسم ها در نمونه ؛

V_{tot} کل حجم مرجع محاسبه شده نمونه اصلی شامل پلیت های شمارش شـده اسـت. همچنـین جمـع حجم های جداگانه از آزمونه (نمونه یا رقت) یا محاسبه شده بوسیلهٔ فرمول۲ است.

$$V_{tot} = (n_۱V_۱d_۱) + (n_۲V_۲d_۲) \ + ... + (n_iV_id_i) \qquad (۲)$$

که در آن :

V_{tot}حجم کل محاسبه شدهٔ نمونهٔ اصلی شامل پلیت های شمارش شده؛

$n_۱, n_۲, ..., n_i$ تعداد پلیت های شمارش شده برای رقت های $d_۱, d_۲, ..., d_i$

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

$d_۱, d_۲, ..., d_i$ رقت مورد استفاده برای حجم آز مونهٔ $V_1, V_2, ..., V_i$

برای نمونهٔ رقیق نشده $d = ۱$ و برای رقت ۱۰ برابر $d = ۰/۱$ است.

یادآوری۱- بنابراین نتایج نهایی به صورت تابعی از میانگین ارزیابی شدهٔ[1] شمارش هر پلیت می باشد.

[1] -Weighted average

نتایج محاسبه شده را تا دو رقم معنی دار گرد کنید ، اگر رقم سوم بزرگتر یا برابر ۵ است عـدد پـیش از آن را به اندازهٔ یک واحد افزایش دهید.
بهتر است نتایج را به صورت عددی بین ۱ و ۹/۹ ضرب در توان مناسبی از ۱۰ ، یا تعداد کل بـا دو رقـم معنی دار بیان کنید.

مثال ۱ : محاسبه برای روش های کشت آمیخته و سطحی (شمارش دوتائی[1])

در صورتی که حجم محلول مورد آزمون (V_i یک میلی لیتر باشد، و شمارش رقت های متـوالی در رقـت یکـصدم ۸۱ و ۹۷ کلنی و در رقت یک هزارم ۹ و ۱۵ کلنی باشد،در نتیجه :

$Z = ۸۱+۹۷+۹+۱۵ = ۲۰۲$

$V_{tot} = (۲\times۱\times۰/۰۱)+(۲\times۱\times۰/۰۰۱) = ۰/۰۲۲$

اگر V_s در میلی لیتر باشد، تعداد کلنی ها برابر است با :

$$C_s = \frac{۲۰۲}{۰/۰۲۲}\times۱ = ۹۱۸۲$$

پس از گرد کردن تعداد کلنی ها برابر است با:

$$C_s = ۹/۲\times۱۰^{۳}\, cfu/ml(cfp/ml)$$

مثال ۲ : محاسبه برای روش صافی غشائی (شمارش شده به صورت منفرد)

در صورتی که در حجم نمونه مورد آزمون (V_i) ۱۰۰ ml و ۱۰ ml شمارش به ترتیب ۸۲ و ۱۱ کلنی باشد،در نتیجه:

$Z = ۱۱+۸۲ = ۹۳$

$V_{tot} = (۱\times ۱۰۰\times۱) +(۱\times ۱۰\times۱) = ۱۱۰$

و اگر V_s در ۱۰۰ml باشد :

$$C_s = \frac{۹۳}{۱۱۰}\times۱۰۰ = ۸۴ cfu/۱۰۰ml(cfp/۱۰۰ml)$$

در چنین مواردی بهتر است نتایج شمارش بـا سـطح اطمینـان٪ ۹۵کـه بـا اسـتفاده از فرمـول هـای زیـر بدسـت مـی آید،گزارش شود :

۱-هنگامی که $Z \geq ۲۰$ باشد، نتیجهٔ نهائی با اطمینان٪ ۹۵ برابر است با :

$$C_s \pm ۹۵\%CI = \left[Z \pm ۲\sqrt{Z}\Big/V_{tot}\right]\times V_s = \left[\frac{Z}{V_{tot}} \pm \frac{۲\sqrt{Z}}{V_{tot}}\right]\times V_s$$

۲-هنگامی که $Z < ۲۰$ است، اثر افزایش انحراف (عدم تقارن)توزیع پواسون روی سطح اطمینـان بـا انجـام تغییـرات کمی در فرمول بالا در نظر گرفته می شود :

---

[1] -Duplicate

$$\text{سطح پائینی و بالائی اطمینان ٪ ۹۵} = \left[\frac{Z + ۲ \pm ۲\sqrt{Z+۱}}{V_{tot}}\right] \times V_s$$

یادآوری۲–معادلهٔ فوق حتی در موارد $Z = ۰$ که ممکن است گمراه کننده باشد ،میانگین و سطح اطمینان ٪ ۹۵ را می دهد.

یادآوری۳–در فرمول فوق عدد ۲ (پیش از رادیکال) گرد شدهٔ عدد ۱٫۹۶ است (۲ ≅)

یادآوری ۴– در تمام موارد توزیع پواسون سطح اطمینان ۹۵٪ فرض می شود.

۹-۴-۳ موارد پس از شناسائی یا تائید

در مواردی که روش استفاده شده نیاز به شناسائی و تائید دارد، تمام کلنی های مشکوک فرضی را باید از هر پلیتی که برای شمارش نگهداری شده است ،تلقیح کنید. در مواردی که این کار عملی نیست، تمام کلنی های تیپیک (n) باید ازحاشیه پلیت یا صافی غشائی مورد آزمون قرار گیرد (n ممکن است از یک پلیت به پلیت دیگر متفاوت باشد).

دلیل اصلی برای توصیه به تائید تمام کلنی های فرضی از یک منطقهٔ معین به جای انتخاب تصادفی کلنی ها ، این است که آزمایشگاه ها (آزمایش کننده ها) نمی توانند انتخاب تصادفی واقعی از تمام کلنی های مشکوک را داشته باشند.در موارد پایش روتین برای انجام آزمون های تاییدی،در صورتی که یک نمونهٔ تصادفی موثق[1] قابل دستیابی باشد، میانگین تعداد حداقل و کافی کلنی ها، حدود ۵ کلنی در هر پلیت است.

توصیه می شود هنگامی که تعداد کلنی ها کمتر از ۵ و یا نزدیک به ۵ باشد (مانند ۶ یا ۷ کلنی های فرضی) باشد ، تمام کلنی ها را انتخاب کنید. پس از شناسائی و تائید برای هر پلیت ، نتایج تائید شده را به صورت نسبت کلنی های فرضی که با معیار های تائید و شناسائی مطابقت دارند با استفاده از فرمول ۳ محاسبه کنید:

$$x = \frac{k}{n} \times z \qquad (۳)$$

که در آن :

x تعداد تخمینی کلنی های تائید شده در هر پلیت است؛

k تعداد کلنی ها در میان کلنی های تلقیح شده است که با معیار های شناسائی مطابقت دارد؛

n تعداد کلنی های مثبت فرضی است که از یک پلیت برای تائید ،تلقیح می شود؛

z تعداد کل کلنی های مثبت فرضی است که روی پلیت شمارش می شود.

از گرد کردن نتایج آزمون x که تائید کامل نشده اند خودداری کنید.

---

[1]– Reliable

تعداد C_s میکروارگانیسم های تائید شده یا شناسائی شده موجود در آزمایه را با جایگزینی z با x (جمع x)با استفاده از فرمول بند ۹-۴-۲ محاسبه کنید. نتایج را گرد کنید و به صورتی که در بند ۹-۴-۲ توصیه شده است بیان کنید.

مثال:

در رقت ۰/۰۰۱ تعداد ۶۶ و ۸۰ کلنی و در رقت ۰/۰۰۰۱ تعداد ۴ و ۷ کلنی شمارش شده است.

کلنی های انتخاب شده به صورت زیرتایید شده است:

از ۶۶ کلنی ، ۸ کلنی آزمون شد که از این تعداد ۶ کلنی با معیارها مطابقت داشته است در نتیجه :

$$x = \frac{۶}{۸} \times ۶۶ = ۴۹/۵$$

از ۸۰ کلنی ،۹ کلنی آزمون شد که از این تعداد ۶ کلنی با معیار ها مطابقت داشته است؛ در نتیجه $x_2 =$ ۵۳/۳

از ۷ کلنی، ۵ کلنی آزمون شد که از این تعداد ۴ کلنی با معیار ها مطابقت داشته است ؛در نتیجه $x_3 =$ ۵/۶

از۴کلنی، ۴ کلنی آزمون شد که تمام ۴ کلنی با معیار ها مطابقت داشته است ؛ در نتیجه $x_4 = z_4 =$ ۴

$$X = ۴۹/۵+۵۳/۳ +۵/۶ +۴ = ۱۱۲/۴$$

و اگر V_s دریک میلی لیتر باشد :

$$C_s = \frac{X}{V_{tot}} \times V_s = \frac{۱۱۲/۴}{(۲ \times ۱ \times ۰/۰۰۰۱)} \times V_s = \frac{۱۱۲/۴}{۰/۰۰۲۲} \times ۱ = ۵۱/۹۱$$

پس از گرد کردن عدد بدست آمده ، تعداد میکروارگانیسمهای تائید شده برابر است با :

$$C_s = ۵/۱ \times ۱۰^{۴}\, cfu/ml (cfp/ml)$$

در مواردی که تائید به طور کامل انجام نمی شود، مانند مثال بالا ،نتایج پس از تائید از توزیع پواسون پیروی نمی کند. برای سطح اطمینان ٪ ۹۵ فرمول ۲ که در بند ۹-۴-۲ آورده شده است معتبر نیست.

۹-۴-۴ موارد خاص

۹-۴-۴-۱ تمام پلیت های کمتر از ۱۰ کلنی

شمارش های از ۲۰ تا حد بالائی هر روش ،در محدودهٔ دقت بهینه است. برای شمارش های بین ۱۰ تا ۲۰ ، دقت همچنان قابل قبول است. با کاهش تعداد کلنی ها به کمتر از ۱۰، دقت به سرعت کاهش می یابد. بسته به هدف آزمون ،حد پائین تر تعیین ، در شمارش های کمتر از ۱۰ تعریف می شود.

مطابق با استاندارد ISO/TR 13843 حد تعیین ،کمترین میانگین غلظت ذره x در آزمونه تعریف شده است ،چنانچه عدم قطعیت استاندارد نسبی برابر با مقدار تعیین شده $(RSD)^n$ [1] باشد.

---

[1] - 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 می آید .برای محاسبه انحراف معیار نسبی از w استفاده می شود. بنابراین $w = \frac{s}{\bar{x}}$

در موارد توزیع پواسون ، x از فرمول ۴ محاسبه می شود.

$$x = \frac{۱}{w^۲} \qquad \textbf{(۴)}$$

اگر w برابر ۰٫۵۰ (۵۰٪) باشد به دلیل حد دقت نسبی قابل قبول (که در میکروبیولوژی منطقی به نظر می رسد) ، حد پائینی تعیین به صورت زیر بدست می آید:

$$x = \frac{۱}{۰٫۵۰^۲} = ۴$$

بنابراین نتایجی که براساس شمارش کمتر از ۴ می باشد باید فقط به صورت تشخیص وجود میکروارگانیسم بیان شود.

اگر تمام پلیت ها دارای کمتر از ۱۰ کلنی باشد، ولی تعداد کل کلنی ها در تمام پلیت های در دسترس با هم ۴ یا بیشتر باشد، نتایج مانند موارد کلی طبق بند ۹-۴-۲ محاسبه می شود، ولی عدد نهائی به صورت تخمینی می باشد. اگر تعداد کل از ۳ تا ۱ باشد، دقت به حدی کم است که نتایج به صورت « میکروارگانیسم در حجم آزمون شده وجود دارد »گزارش شود.

۹-۴-۴-۲ پلیت ها ی بدون کلنی

در صورتی که پلیت ها هیچ کلنی نداشته باشد ،نتایج را به صورت زیر بیان کنید:

تعداد میکروارگانیسم ها کمتر از $\frac{1}{V_{tot}}$ cfu یا cfp در حجم مورد آزمون است.

در مواردی که V_{tot} حجم کل محاسبه شدهٔ نمونه اصلی در پلیت های شمارش شده است ، به بند ۹-۴-۲ مراجعه کنید.

همچنین می توانید نتایج را به صورت « میکروارگانیسم در حجم مورد آزمون قابل شناسائی نیست» گزارش کنید.

۹-۴-۴-۳ بیش از ۲۰۰ یا ۳۰۰ کلنی با کلنی های تیپیک یا تأیید شده قابل مشاهده

در صورتی که تعداد تمام کلنی های تیپیک و غیر تیپیک برای تمام پلیت ها در رقت اول $d_۱$ بیش از ۲۰۰ کلنی (در مورد کشت سطحی و صافی غشائی) یا بیشتر از ۳۰۰ کلنی (برای روش کشت آمیخته) با کلنی های تیپیک قابل مشاهده یا تأیید شده باشد و اگر برای تمام پلیت ها در رقت بعدی $d_۲$ که کمتر از ۲۰۰ کلنی (برای روش های کشت سطحی و صافی غشائی) یا کمتر از ۳۰۰ کلنی (برای روش کشت آمیخته) داشته باشد ،هیچ کلنی تأیید شده یا تیپیک شمارش نشد ، نتایج را به صورت زیر بیان کنید :

کمتر از $1/d_2$ واحد یا ذرهٔ تشکیل دهندهٔ کلنی در حجم نمونه و بیش از $1/d_1$ واحد یا ذرهٔ تشکیل دهندهٔ کلنی در حجم نمونه که $1/d_1$ و $1/d_2$ ضریب رقت مربوط به رقت های d_1 و d_2 است.

مثال :

در رقت اول (10^{-2}): بیش از ۳۰۰ کلنی روی هر پلیت، با کلنی های تیپیک یا تأیید شده وجود دارد.

در رقت دوم (10^{-3}) : ۳۳ کلنی و ۳۵ کلنی ، بدون کلنی تأیید شده یا تیپیک وجود دارد.

نتیجه : کمتر از ۱۰۰۰ واحد تشکیل دهندهٔ کلنی (یا cfp) در حجم نمونه و بیش از ۱۰۰ واحد تشکیل دهندهٔ کلنی (یا cfp) در حجم نمونه وجود دارد.

۹-۴-۴-۴ بیش از ۲۰۰ یا ۳۰۰ کلنی بدون کلنی های تأیید شده یا تیپیک قابل مشاهده.

اگر تعداد تمام کلنی های تیپیک و غیر تیپیک برای تمام پلیت ها در رقت اول d_1 ، بیش از ۲۰۰ کلنی (برای روش های کشت سطحی و صافی غشائی) یا بیش از ۳۰۰ کلنی (برای روش کشت آمیخته) بدون کلنی تیپیک قابل مشاهده یا تأیید شده باشد و اگر برای تمام پلیت ها در رقت های متوالی d_2 کمتر از ۲۰۰ کلنی (برای روش های کشت سطحی و صافی غشائی) یا کمتر از ۳۰۰ کلنی (برای روش کشت آمیخته) ، هیچ کلنی تأیید شده ای شمارش نشد ، نتیجه را به صورت زیر بیان کنید :

کمتر از $1/d_2$ واحد تشکیل دهندهٔ کلنی (یا cfp) در حجم نمونه

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

مثال :

در رقت اول (10^{-2}): بیش از ۳۰۰ کلنی روی هر پلیت ، بدون کلنی تیپیک یا تأیید شده وجود دارد.

در رقت دوم (10^{-3}) : ۳۳ کلنی یا ۳۵ کلنی ، بدون کلنی های تیپیک یا تأیید شده وجود دارد.

نتیجه : کمتر از ۱۰۰۰ واحد تشکیل دهندهٔ کلنی در حجم نمونه وجود دارد.

یادآوری هنگامی که تعداد کلنی های غیر تیپیک زیاد است ، به دلیل رشد بیش از حد آن ها ، کلنی های تیپیک پنهان می ماند. لازم است این مسئله برای اطلاع ، گزارش شود.

۹-۴-۴-۵ بیش از ۲۰۰ یا ۳۰۰ کلنی با کلنی های تیپیک یا مشکوک در تمام رقت ها

در صورتی که تعداد کل کلنی های شمارش شده در هر یک از پلیت ها برای تمام رقت های تلقیح شده بیش از ۲۰۰ کلنی(برای روش کشت سطحی و صافی غشائی) یا بیش از ۳۰۰ کلنی(برای روش کشت آمیخته) و اگر تعداد کلنی های تیپیک یا مشکوک بیش از ۱۵۰ کلنی (برای روش کشت سطحی و آمیخته) یا بیش از ۱۰۰کلنی (برای روش صافی غشائی) باشد ، نتایج را به صورت زیر بیان کنید:

صافی غشائی : تعداد کل کلنی ها بیش از $۲۰۰/d$ واحد تشکیل دهندهٔ کلنی (یا cfp) در حجم نمونه و تعداد کلنی های تیپیک بیش از $۱۰۰\times k/n\times ۱/d$ واحد تشکیل دهندهٔ کلنی (یا cfp) در حجم نمونه.

کشت آمیخته : تعداد کل کلنی ها بیش از $۳۰۰/d$ واحد تشکیل دهندهٔ کلنی (یا cfp) در حجم نمونه و تعداد کلنی های تیپیک بیش از $۱۵۰\times k/n\times ۱/d$ واحد تشکیل دهندهٔ کلنی (یا cfp) در حجم نمونه.

کشت سطحی : تعداد کل کلنی ها بیش از $۲۰۰/d$ واحد تشکیل دهندهٔ کلنی (یا cfp) در حجم نمونه و تعداد کلنی های تیپیک بیش از $۱۵۰\times k/n\times ۱/d$ واحد تشکیل دهندهٔ کلنی (یا cfp) در حجم نمونه.

که در آن :

$۱/d$ ضریب رقت برای آخرین رقت تلقیح شده ؛

k تعداد کلنی هائی است که در میان کلنی هائی مشکوک فرضی تلقیح شده (n)با معیار های شناسائی و تأیید مطابقت دارد.

۱۰ شمارش پس ازتلقیح آزمونه در محیط کشت مایع

۱۰-۱ اصول آزمون

آزمونهٔ نمونهٔ آب به محیط کشت مایع تلقیح می شود تا از رشد میکروارگانیسم های خاص یا گروهی از میکروارگانیسم ها اطمینان حاصل شود.بیشترین تعداد احتمالی (MPN) میکروارگانیسم های موجود در نمونهٔ اصلی و دقت تخمین ، را می توان بر اساس تعداد آزمونه های مثبت و منفی مشاهده شده پس از گرمخانه گذاری ، با استفاده از روش های آماری تخمین زد.

۱۰-۲ کاربرد روش

۱۰-۲-۱ آزمون وجود یا عدم وجود میکروارگانیسم ها

پس از تلقیح و گرمخانه گذاری یک آزمونهٔ منفرد از نمونه در یک لولهٔ حاوی محیط کشت مایع و ایجاد علائم ظاهری رشد یک میکروارگانیسم مورد نظر در آن ،تنها می توان به وجود و یا عدم وجود میکروارگانیسم مورد نظر در حجم نمونهٔ آزمون ، پی برد.

در صورت نمونه برداری لحظه ای، نتیجه را به صورت « وجود یا عدم وجود میکروارگانیسم مورد نظر در میلی لیتر » بیان کنید .با این روش هم نمی توان « وجود» و یا «عدم وجود» میکروارگانیسم در آزمونهٔ دیگر و غلظت میکروارگانیسم مورد نظر را تخمین زد و هم امکان شمارش و تعیین غلظت میکروارگانیسم ها وجود ندارد.

۱۰-۲-۲ تخمین بیشترین تعداد احتمالی (MPN)

اساس روش MPN ، ،در بیشتر موارد، تلقیح آزمونه های متعدد از یک نمونه و یا رقت های آن به لوله های حاوی محیط کشت مایع است.

پس از گرمخانه گذاری لوله های تلقیح شده که دارای یک میکروارگانیسم یـا بیـشتر باشـد ، علائـم رشـد را نشان خواهد داد که با یا بدون تغییرات مشخص در محیط کشت مشاهده می شود. بر اساس نتایج مثبـت یـا منفی در برخی از لوله ها ، بیشترین تعداد احتمالی میکروارگانیسم ها در حجم معین از نمونه را می تـوان از تعداد و توزیع لوله هائی که واکنش مثبت داشته اند تخمین زد.

در میان ترکیب های مختلف MPN با توجه به تعداد مورد انتظار میکروارگانیسم ها در نمونهٔ مـورد آزمـون ، الزامات قانونی و دقت لازم است. دقت به تعداد آزمونه مثبت مـشاهده شـده در روش تقریبـاً مـشابه بـستگی دارد. همان طور که دقت شمارش کلنی ها به تعداد کلنی ها بـستگی دارد. دقـت بـه صـورت تـابعی از جـذر تعداد لوله های استفاده شده افزایش می یابد. برای دوبرابر شدن دقت ، تعداد لوله ها باید چهـار برابـر شـود. درروش هائی که فقط از تعداد کمی لوله های چندتائی استفاده می کنند ، دقت کم اسـت . از طـرف دیگـر ، این روش ها در عمل ، از حساسیت کافی (که به حجـم کـل نمونـهٔ آزمـون شـده بـستگی دارد) برخـوردار هستند. تفسیر سادهٔ نتایج مثبت ، مزیت مشخص و متمایز بیشتر روش های MPN است.

۱۰-۳ روش آزمون

۱۰-۳-۱ کلیات

انتخاب روش شمارش MPN به عواملی مشابه آنچه در بند ۹-۲-۲ گفته شـد بـستگی دارد. مـوارد زیـر بـه عنوان راهنما برای انجام آزمون ، بیشترین کاربرد را دارد.

۱۰-۳-۲ آزمونه

افزودن آزمونه نباید سبب تغیر ترکیبات محیط کشت شـود و بـرای رشـد میکروارگانیـسم هـای مـورد نظـر مزاحمت ایجاد کند. به طور معمول ،آزمایه های کمتر یا برابر ml ۱ بـه مقـدار ۵ برابـر یـا بیـشتر از محـیط کشت با غلظت معمولی اضافه می شود. به طور معمول آزمایه های بین ۱ml تا ml ۱۰۰ به حجم مـساوی از محیط کشت با غلظت دو برابر اضافه می شود، اگر نمونه حاوی مقادیر زیاد نمک های معدنی ،مواد سـمی یـا مغذی که روی رشد باکتری ها اثر می گذارد نباشد.روش های کشت مایع معمـولاً مقـادیر زیـاد مـواد جامـد معلق را تحمل می کنند.

برای حجم های بیشتر از ml ۱۰۰ ، می توانید از محیط های کشت بـا غلظـت بـالاتر اسـتفاده کنیـد. بـرای اهداف خاص محیط های کشت بدون آب سترون را می توانید در نمونهٔ سرد یا از پیش گـرم شـده در دمـای C° ۳۰ حل و آزمون کنید.

برای از بین بردن زیان های ناشی از وجود مقادیر زیاد مواد معدنی یا سمی بر جداسازی میکروارگانیسم ها از نمونهٔ آب ، می توانید از روش صافی غشائی مطابق با بند ۹-۲-۵ ، و در صورت کدر بودن نمونه از مواد کمک صافی سترون[1] مانند خاک دیاتومه[2] یا سوسپانسیون آلومینیوم اکساید[3] استفاده کنید . همراه با رسـوب مـواد

[1] -Filter-aid
[2] -Diatomaceous earth
[3] -Aluminum oxide

کمک صافی، میکروارگانیسم ها نیز با آن رسوب می کنند. پس از تکمیل فرایند جداسازی با استفاده از سانتریفوژ یا صافی ، خاک دیاتومه، اکسید آلومینیوم یا صافی غشائی در محیط کشت مایع قرار داده می شود.

۱۰-۳-۳ انتخاب روش تلقیح

اگر غلظت مورد انتظار میکروارگانیسم ها کم است و یا انتظار می رود که مقدار متوسطی متفاوت باشد، مناسب ترین روش ، تلقیح سری منفرد[1] آزمونه های یکسان است. در صورتی که نسبت مورد انتظار بین حداقل و حداکثر تعداد میکروارگانیسم ها کمتر از حدود ۲۵ باشد، ۱۰ آزمونهٔ سری یا موازی[2] ، کمترین تعداد ی است که باید آزمون شود . با افزایش نسبت فوق تعداد لوله های سری که باید آزمون شود افزایش می یابد(برای مثال برای نسبت مورد انتظار حدود ۲۰۰ تعداد ۵۰ آزمونهٔ سری لازم است) . به پیوست اطلاعاتی **ب** ، جدول ب-۱ تا ب-۴ مراجعه شود.

در صورتی که نمونه ناشناخته است و یا تفاوت زیادی مورد انتظار است، لازم است از چندین رقت تلقیح انجام شود. برای اطمینان از روشی با نتایج مثبت و منفی ،تعداد کافی از رقت ها را تلقیح کنید.تعداد رقت ها به روش قابل دسترس برای تخمین مقادیر MPN بستگی دارد. در صورت استفاده از جدول، نتایج ۳ رقت باید قابل دسترس باشد و ترکیب روش به آن هائی که در جدول قابل دسترس است، محدود شود.

در صورت کاربرد برنامه های رایانه ای ، تعداد رقت ها و لوله های سری یا موازی نامحدود است.

معمول ترین روش MPN که مورد استفاده قرار می گیرد، استفاده از روش ۳ لوله ای یا ۵ لوله ای برای هر رقت است.این روش (به ویژه روش ۳ لوله ای) دقت کمی دارد . از کاربرد روش سه لوله ای (به دلیل کم بودن دقت آن) برای غلظت های بالای میکروارگانیسم خودداری کنید.برای افزایش دقت روش توصیه می شود از روش ۵ لوله ای یا بیشتر استفاده کنید.

مثال هائی از روش ۳ لوله ای و ۵ لوله ای در پیوست اطلاعاتی **ب** جدول های ب-۵ و ب-۶ آورده شده است.

در سیستم های نامنظم[3]، رقت های مختلف دارای تعداد لوله های یکسان نیستند.این سیستم ها فقط برای تخمین تعداد میکروارگانیسم ها در محدوده های معین استفاده می شود.

مثال هائی از این سیستم در پیوست اطلاعاتی **ب** جدول های ب-۷، ب-۸ و ب-۹ ارائه شده است.

به عنوان یک روش جایگزین برای تلقیح لوله ها ، می توان از پلیت های دارای چاهک های متعدد[4] استفاده کرد که در آن چاهک ها نشانگر لوله ها هستند. مزیت این پلیت ها این است که امکان تلقیح تعداد زیادی از آن ها به راحتی وجود دارد .برای مثال سه رقت متوالی ، هر کدام به ۳۲ چاهک تلقیح می شود.

دقت نتیجهٔ این روش در حدود دقت روش شمارش در پلیت یا روی صافی غشائی است.

---

[1] -Single
[2] -Parallel
[3] -Non-symmetrical
[4] -Multiwell

تنها اشکال این روش ، تلقیح مقادیر کم نمونه (معمولاً ۰٫۲ml برای هرچاهک) است. اگرچه مقدار تلقیحی به اندازهٔ پلیت و چاهک ها بستگی دارد.این پلیت ها به صورت ۱۲ چاهک ۵ ml ، ۲۴ چاهک ۳ ml و ۴۸ چاهک ۱ ml در دسترس می باشند. افزایش اندازهٔ چاهک ها باعث کاهش تعداد آن ها و در نتیجه کاهش دقت نتایج نهائی می شود. برای محاسبهٔ MPN از پلیت های دارای چاهک های متعدد ، جدول های MPN مخصوص و /یا برنامه های رایانه ای در دسترس می باشند.

۱۰-۳-۴ تلقیح در محیط کشت مایع

با رعایت شرایط اسپتیک ، حجم معینی از نمونهٔ آب یا رقتی از آن را با توجه روش انتخاب شده به لوله یا ارلن تلقیح کنید.(به بند ۱۰-۳-۳ مراجعه کنید) به طور جایگزین اگر صاف کردن و یا رسوب دادن اولیه لازم است ، صافی ، خاک دیاتومه و رسوبات را به لوله های حاوی محیط کشت منتقل کنید.

۱۰-۳-۵ گرمخانه گذاری

لوله های تلقیح شده را در گرمخانه و یا حمام آب قرار دهید. با توجه به استاندارد خاص هر میکروارگانیسم از درجهٔ حرارت و زمان خاص استفاده کنید. برای برخی از میکروارگانیسم ها روش گرمخانه گذاری دو مرحله ای مطابق با بند ۹-۲-۶ لازم است.

۱۰-۴ 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 میکروارگانیسم ها و همچنین محیط کشت مورد استفاده متفاوت است.

مثبت شدن نتایج آزمون همیشه دلیل بر وجود میکروارگانیسم مورد جستجو نیست و ممکن است انجام آزمون های تأییدی با استفاده از یکی از روش های زیر لازم باشد:

الف- کشت مجدد روی محیط جدا کنندهٔ انتخابی و متعاقب آن انجام آزمون های بیوشیمیائی و سرولوژیکی برای تعیین کلنی های مشکوک

ب- کشت مجدد روی محیط مایع دیگر و متعاقب آن آزمون مستقیم که گاهی باعث تأیید با درجهٔ قابل قبول احتمال می شود و یا باعث جداسازی میکروارگانیسم و متعاقب آن انجام آزمون برای شناسائی می شود.

پ- کشت مجدد روی محیط جامد غیر انتخابی برای بدست آوردن کلنی های خالص و منفرد ، که در مراحل بعدی شناسائی می شود.

آزمون های تأییدی فوق باعث تعیین نتایج مثبت واقعی می شود و برای تعیین مقادیر MPN استفاده می شود. ردیابی نتایج آزمون های تأییدی تا لوله های مثبت فرضی (حداقل تا سطح رقت) باید انجام شود.

۱۰-۵ تعیین مقادیر MPN

۱۰-۵-۱ اساس روش

سه روش اصلی برای تعیین مقادیر MPN وجود دارد:

الف- فرمول های ریاضی

ب- جدول های MPN

پ- برنامه های رایانه ای

۱۰-۵-۲ فرمول های ریاضی

۱۰-۵-۲-۱ فرمول های تقریبی برای تمام موارد

مقادیر تقریبی MPN برای هر تعداد رقت و لوله های سری با کاربرد فرمول ۵ بدست می آید :

$$MPN = \frac{n_{pos} \times V_s}{\sqrt{V_{neg} \times V_{tot}}} \qquad (۵)$$

که در آن :

n_{pos} تعداد لوله های دارای واکنش مثبت ؛

V_s حجم نمونهٔ مرجع در نمونهٔ اصلی به میلی لیتر؛

V_{neg} حجم کل در تمام لوله های دارای واکنش منفی به میلی لیتر ؛

V_{tot} حجم کل نمونه در تمام لوله ها به میلی لیتراست.

۱۰-۵-۲-۲ روش « دقیق » برای یک سری از لوله ها

مقدار MPN برای سری منفرد از لوله ها ممکن است از فرمول۶ بدست آید.

$$MPN = \frac{V_s}{V_{tube}} \ln\left(\frac{n}{n - n_{pos}}\right) \qquad (۶)$$

که در آن :

V_s حجم نمونهٔ مرجع در نمونهٔ اصلی به میلی لیتر ؛

V_{tube} حجم نمونه در هر لوله از سری به میلی لیتر ؛

ln لگاریتم طبیعی ؛

n تعداد لوله ها در هر سری ؛

n_{pos} تعداد لوله های دارای واکنش مثبت است.

۱۰-۵-۳ جدول های MPN

۱۰-۵-۳-۱ کلیات

در پیوست اطلاعاتی **ب** ، مثال هائی از جدول MPN برای رقت منفرد MPN ،سری های منظم[1] چند لوله ای و سری های نامنظم چند لوله ای ارائه شده است.

۱۰-۵-۳-۲ جدول برای آزمونه های سری با رقت منفرد

جدول ب-۱ تا ب-۴ در پیوست اطلاعاتی **ب** مقادیر MPN را با سطح اطمینان ٪۹۵ برای آزمایه های ۱۰ ، ۱۵ ، ۲۰ و ۲۵ لولهٔ سری یا موازی نشان می دهد (هر لوله با رقت یکسان و منفرد تلقیح شده است). برای بیان نتیجه در حجم مرجع نمونه ، مقادیر MPN با حد اطمینان٪۹۵ در نسبت «حجم مرجع» به «حجم آزمایه » ضرب می شود. عدم قطعیت استاندارد لگاریتمی نباید ضرب شود. در میکروبیولوژی آب حجم مرجع معمولاً ۱۰۰ ml است. حجم آزمایه ممکن است ۱ ml و یا هر حجم تلقیح شده به لوله ها باشد.

مثال:

مقدار۵ ml از نمونهٔ مایع به بیست لولهٔ حاوی محیط کشت مایع با غلظت مضاعف تلقیح شده است(به هر لوله۵ ml). پس از گرمخانه گذاری لوله ها ، در ۱۶ لوله آثار رشد مشاهده شد. بیشترین تعداد احتمالی باکتری ها (میکروارگانیسم در ۱۰۰ ml نمونه) مطابق با جدول ب-۳ پیوست **ب** ، در هر لوله برابر ۱٫۶۱ است. چون هر لوله حاوی۵ml از نمونه است ، بیشترین تعداد احتمالی میکروارگانیسم در ۱۰۰ ml از نمونه برابر است با:

$$۱٫۶۱ / ۵\ ml \times ۱۰۰ml = ۳۲٫۱۰۰\ ml$$

۱۰-۵-۳-۳ جدول برای چندین رقت

با سیستم منظم . معمول ترین روش . انتخاب سه رقت متوالی لوله ها ی دارای نتایج مثبت و منفی است.تعداد نتایج مثبت برای هر سری لوله را گزارش کنید.با استفاده از جدول MPN و با در نظر گرفتن روش تلقیح مورد استفاده ، بیشترین تعداد احتمالی موجود در حجم مرجع نمونه را تعیین کنید. جدول های ب-۵ و ب-۶ پیوست اطلاعاتی **ب** ، بیشترین تعداد احتمالی برای روش های منظم (سه لوله ای یا ۵ لوله ای)را با فرض حجم مرجع ۱۰۰ ml ارائه می دهد . روش فوق ، روش قدیمی MPN برای آزمون آب است.
با سیستم های غیر منظم ، تمام لوله ها در نظر گرفته می شود.جدول های ب-۷ ،ب-۸ و ب-۹ در پیوست اطلاعاتی **ب** بیشترین تعداد احتمالی برای سیستم غیر منظم را ارائه می دهد:

$$۱\times۵۰\ ml + ۵\times۱۰ml\ ,\ ۵\times۱۰۰\ ml + ۱\times۱۰ml + ۱\times۱ml\ ,\ ۱\times۵۰\ ml + ۵\times۱۰ml + ۵\times۱ml$$

---

[1] -Symmetrical

با حجم ها یا رقت های مختلف نمونه ، هنگام استفاده از جدول ب-۶ و سایر جدول ها در سیستم MPN منظم ، مقررات زیر را به کار برید :

الف- اگر در یک سری بیشتر از ۳ رقت استفاده شده باشد ، بیشترین حجم نمونه را که نتایج آن منفی است و کمترین حجم نمونه را که نتایج آن مثبت است و تمام رقت های بین آن را انتخاب کنید.

ب- اگر با کاربرد مقررات الف ، فقط سه رقت باقی بماند ، مقدار MPN مربوطه را از جدول ب-۶ بدست آورید. به مثال ب جدول ۱ مراجعه کنید.

پ- اگر با کاربرد مقررات الف ، فقط ۴ رقت باقی بماند ، مقدار MPN را برای هر دو سری از سه رقت ،با در نظر گرفتن تفاوت سطح رقت ها تخمین بزنید. میانگین حسابی دو تخمین به صورت مقدار MPN در مثال پ جدول ۱ ارائه شده است.

ت- اگر با کاربرد مقررات الف ، فقط دو رقت باقی بماند ، سری سه رقت دارای سری کامل اضافی نتایج مثبت را مطابق با مثال ت جدول ۱انتخاب کنید.

ث- اگر با کاربرد مقررات الف بیشتر از چهار رقت باقی بماند ، فرض آماری تخمین MPN انجام نمی شود و نباید نتیجه ای تعیین شود (این مقررات برای رقت هائی با ضریب رقت کمتر از ۱۰ به کار نمی رود).

ج- اگر فقط در یک سری از لوله ها یک یا دو نتیجهٔ مثبت وجود داشته باشد ، از این رقت همراه با رقت بالاتر و بائین تر استفاده کنید (به مثال ث در جدول ۱ مراجعه شود).

جدول ۱ - مثالی از MPN بدست آمده از تعداد نتایج مثبت در سری لوله های ۵ تائی با استفاده از جدول ب-۶

مثال در متن	حجم آزمونه ml					MPN در ۱۰۰ml
	۱۰	۱	۰/۱	۰/۰۱	۰/۰۰۱	
ب	۵	۵ [a]	۲ [a]	. [a]	۰	۴۹۰
ب	۳ [a]	۱ [a]	. [a]	۰		۱۱
پ	۵	۵ [a]	۳ [a]	۲ [a]	. [a]	
پ-۱	۵	۳	۳			۱۸۰
پ-۲		۳	۳	۰		۱۷۰
میانگین هندسی پ-۱ و پ-۲						۱۷۵
ت	۵ [a]	۵ [a]	. [a]	۰	۰	۲۴۰
ث	. [a]	۱ [a]	. [a]	۰		۲

a - نتایجی که باید برای تعیین مقدار MPN استفاده شود.

جدول ب-۶ پیوست اطلاعاتی **ب** ، نتایج برای ترکیب لوله های مثبت و منفی که بیشترین احتمال را دارد، نشان می دهد. اگر ترکیب مشاهده شدهٔ لوله های مثبت و منفی در جدول ب-۶ وجود نداشته باشد، نتایج را رد کنید. حتی اگر فرمول های تقریبی در بند ۱۰-۵-۲-۱ یا برنامه های رایانه ای به منظور تعیین مقدار MPN ، برای سری هایی که در جدول ب-۶ ارائه نشده است ، وجود داشته باشد، نتایج بسیار نامحتمل است و نباید گزارش شود.

۱۰-۵-۴ برنامه های رایانه ای

ساده ترین برنامه های رایانه ای محدودیتی برای تعداد رقت ها و لوله های سری در روش MPN منظم را ندارد.

۱۰-۶ تخمین دقت

۱۰-۶-۱ کلیات

جدول های چاپ شده با اطمینان ٪ ۹۵ . دقت را تعیین می کند. برنامه های رایانه ای ممکن است عدم قطعیت لگاریتم MPN را نیز تعیین کند.

۱۰-۶-۲ ارزیابی رقت منفرد[1]

چنانچه جدول یا برنامهٔ کامپیوتری در دسترس نمی باشد، با استفاده از فرمول ۷ و سطح اطمینان ٪ ۹۵ حدود بالائی و پائینی MPN را می توان تخمین زد.

$$x = \frac{V_s}{V_{tube}} \ln\left(\frac{n}{n_{neg} \pm ۲\sqrt{\frac{n_{neg(n-n_{neg})}}{n}}} \right) \qquad (۷)$$

که در آن :

x بالاترین و کمترین حد اطمینان ؛

V_s حجم نمونه مرجع در نمونه اصلی به میلی لیتر؛

V_{tube} حجم نمونه در هر لوله از سری ها به میلی لیتر ؛

ln لگاریتم طبیعی؛

---

[1] -Single-dilution assay

n تعداد لوله ها در سری ها؛

n_{neg} تعداد لوله ها با واکنش منفی است.

علامت مثبت (+) برای حد بایینی و علامت منفی (-) برای حد بالائی به کار برده مـی شـود. هنگـامی کـه بیشتر لوله ها منفی هستند ، تخمین خوبی بدست نمی آید ولی با افزایش نسبت لوله های مثبـت ، تخمـین بهتری بدست می آید.

۱۰-۶-۳ ارزیابی چند رقتی[1] منظم

در مواردی که جدول های MPN ویا رایانه در دسترس نمی باشد ، عدم قطعیت اسـتاندارد لگـاریتمی یـک روش MPN چند رقتی منظم را با استفاده از فرمول ۸ بدست آورید.

$$s_{\bar{x}}(\lg MPN) = ۰/۵۸\sqrt{\frac{\lg f}{n}} \qquad (۸)$$

که در آن :

$s_{\bar{x}}$ خطای استاندارد؛

lg لگاریتم دهدهی معمول ($\log_{10}$) ؛

f ضریب رقت بین رقت های متوالی ؛

n تعداد لوله ها در رقت است.

حدود اطمینان ٪۹۵ را می توانید با ضرب و تقسیم MPN در آنتـی لگـاریتم $۲\times s\bar{x}(\lg MPN)$ تخمـین بزنید.این روش باعث بیشتر شدن حد بالائی اطمینان می شود.

---

[1] -Multiple-dilution assay

پیوست الف

(اطلاعاتی)

معیار های انتخاب روش شمارش

الف-۱ مقدمه

بیشتر میکروارگانیسم های قابل کشت در آب را می توانید بوسیله هر یک از چهار روش اصلی شرح داده شده در بند های ۹ و ۱۰این استاندارد شمارش کنید.

عوامل موثر در انتخاب روش به شرح زیر طبقه بندی می شود:

الف- عوامل مربوط به کیفیت نتایج

ب- عوامل مربوط به ماهیت نمونه

پ- عوامل مربوط به هزینه آزمون

در این پیوست عوامل فوق از نظر کلی مورد بررسی قرار می گیرد.

برای کسب آگاهی از جزئیات بیشتر مربوط به عوامل موثر در انتخاب روش به استاندارد ISO TR 13843 مراجعه شود.

الف-۲ عوامل مربوط به کیفیت نتایج

الف-۲-۱ کلیات

کیفیت نتایج بدست آمده از هر آزمون به صورت عدم قطعیت اندازه گیری[1] . درستی (شامل صحت[2] و دقت) و حد تشخیص تعیین می شود.

برای کسب آگاهی بیشتراز عوامل مربوط به کیفیت نتایج به استاندارد های ملی ایران شمارهٔ ۱-۷۴۴۲ و ۲-۷۴۴۲ مراجعه شود.

الف-۲-۲ عدم قطعیت اندازه گیری

---

[1] -Uncertainty in measurement

[2] -Trueness

هیچ اندازه گیری کامل نیست. عدم قطعیت های ناشی از عوامل بسیاری شامل خطاها[1] و تجدید پذیری[2] ناقص وجود دارد. به طور ایده آلی گزارش هر اندازه گیری باید همراه با تعیین عدم قطعیت به صورت $\pm x$ نیز باشد تا بر اساس اندازه گیری ، تصمیم گیری به طور دقیق انجام شود.

عدم قطعیت شمارش ، انحراف معیار نسبی نتایج حاصل از تکرار شمارش کلنی ها یا ذرات در یک پلیت یا صافی تحت شرایط همانند سازی[3] است.

مثال :

شرایط همانند سازی ممکن است شامل همان فرد یا فردی دیگر در یک آزمایشگاه یا آزمایشگاه های مختلف باشد.

الف-۲-۳ درستی

الف-۲-۳-۱ اصول کار

درستی اندازه گیری نزدیکی توافق بین نتایج آزمون و مقدار مرجع پذیرفته شده است. درستی ارتباط معکوسی با عدم قطعیت اندازه گیری دارد. برای مثال تفاوت بین مقدار اندازه گیری شده و مقدار واقعی. عدم قطعیت همه جانبه یک اندازه گیری منفرد از طریق دو جزء سیستماتیک (مانند اریبی یا تورش[4]) و تصادفی (مانند بی دقتی) به صورت زیر بیان می شود:

عدم قطعیت = اریبی + بی دقتی

این ساده سازی شرایط است.در میکروبیولوژی معمولاً مواردی برای عدم قطعیت وجود دارد که دراین طبقه بندی قرار نمی گیرد مانند نوسان غیر قابل انتظار که از نظر ریاضی قابل الگوبرداری نیست. در مقابل صحت ، اریبی قرار دارد. این ویژگی روش استفاده شده برای آزمون است و به ماهیت نمونه نیز بستگی دارد. صحت به خطا در کاربرد روش در هر آزمایشگاه مربوط نیست. اینها در خطای تصادفی اندازه گیری قرار می گیرد و بوسیله تفاوت های بین آزمایشگاه ها یا یک آزمایشگاه ایجاد می شود.در مقابل خطای تصادفی ، دقت قرار می گیرد ارتباط بین درستی و دقت به صورت زیر بیان می شود :

درستی = صحت + دقت

---

[1] -Errors
[2] -Reproducibility
[3] -Stipulated
[4] -Bias

الف-۲-۳-۲ صحت

الف-۲-۳-۲-۱ کلیات

صحت عبارت است از نزدیکی توافق بین میانگین مقدار بدست آمده از سری بزرگ نتایج آزمون و مقدار پذیرفته شده است. مقدار صحت معمولاً از نظر اریبی بیان می شود.اریبی ،تفاوت بین نتایج آزمون قابل انتظار و مقدار مرجع پذیرفته شده است.

به طور کلی در آزمون های میکروبیولوژی مقدار واقعی یک مشخصه شناخته شده نیست و فقط به عنوان هدف فرضی به کار برده می شود. بنابراین خطای سیستماتیک با استفاده از یک روش مطلق تعیین نمی شود. از نظر تئوری ،خطای سیستماتیک با بررسی همان نمونه به صورت مکرر و با استفاده از روش های مختلف قابل دستیابی است.به دلیل اینکه روش های میکروبیولوژی دارای ماهیت مخرب هستند یعنی نمونه در طی آزمون از بین می رود، بنابراین باید از نمونهٔ کاملاً مخلوط شده که در آن باکتری ها به طور تصادفی توزیع شده است و یا از چندین آزمایشگاه استفاده شود.

خطاها ممکن است کمی یا کیفی باشد و به طور همزمان اتفاق بیافتد.

مثال۱:

خطاهای کمی هنگامی اتفاق می افتد که میکروارگانیسم های شمارش شده متعلق به گروه مورد جستجو باشند ولی نتایج شمارش نهائی کمتر از مقدار واقعی تخمین زده شود.

مثال۲ :

خطاهای کیفی هنگامی اتفاق می افتد که میکروارگانیسم هایی که متعلق به گروه مورد جستجو نیستند شمارش شوند به گونه ای که نتیجه نهائی شمارش بزرگ تر از مقدار واقعی باشد.

الف-۲-۳-۲-۲ خطا های کمی

برخی از خطا ها مستقل از روش شمارش هستند. در حضور ذرات معلق، میکروارگانیسم ها ممکن است جذب شوند و با وجود مخلوط کردن کامل نمونه قابل جداسازی نباشند. این باعث می شود که فرض تشکیل یک کلنی یا کدورت در محیط کشت مایع تلقیح شده با حجم کمی از نمونهٔ بدست آمده از یک میکروارگانیسم منفرد ، معتبر نباشد.

عملکرد یک محیط انتخابی ممکن است اثر ممانعت کنندگی زیادی داشته باشد و در نتیجه با رشد میکروارگانیسم های همراه و میکروارگانیسم هائی که باید شمارش شوند تداخل ایجاد کند.

سایر خطاها مربوط به ماهیت نمونهٔ آب است. اجزای فیزیکی - شیمیائی مانند مواد سمی یا غلظت های زیاد نمک با تاثیر بر محیط های کشت ،از رشد میکروارگانیسم ها ممانعت می کند.این اثر به ویژه در صورت زیاد بودن حجم آزمونهٔ استفاده شده در مقایسه با حجم محیط کشت استفاده شده ، دارای اهمیت است.

مثال :

در روش MPN که در آن محیط کشت با غلظت مضاعف یا چند برابر یا محیط کشت حل شده در نمونه استفاده می شود، ممکن است مقدار مواد ممانعت کننده بیشترباشد. صافی غشائی که میکروارگانیسم ها را از نمونه جدا می کند ممکن است به دلیل این که مواد ممانعت کننده روی صافی باقی نمی ماند این مشکل را نداشته باشد.

اجزای بیولوژیکی مانند فلور میکروبی همراه ممکن است از طریق رقابت بیولوژیکی با رشد میکروارگانیسم های مورد جستجو تداخل داشته باشد.این اثر به ویژه در محیط های کشت مایع اتفاق می افتد. در سایر روش های آزمون که میکروارگانیسم ها کلنی های جداگانه ایجاد می کنند، این رقابت بیولوژیکی به علت عدم گسترش و یا رشد زیاد کلنی ها روی پلیت، محدود می شود.

الف-۲-۳-۲-۳ خطاهای کیفی

خطا های کیفی هنگامی اتفاق می افتد که بین تعریف میکروارگانیسم مورد جستجو و مشخصات میکروارگانیسم های جداشده تفاوت وجود داشته باشد. وقتی که تعریف دقیق است مانند هر یک از اعضای یک جنس یا گونه ، داشتن نتایج نهائی درست برای یک مشاهدهٔ منفرد استثناست و غالباً انجام تمام آزمون های بعدی برای شناسائی عملی نیست.

بنابراین روش تلقیح و محیط کشت استفاده شده دارای اهمیت است و باید تا حد امکان اطلاعات تشخیصی زیادی را داشته باشد.

الف-۲-۳-۳ دقت

دقت ، نزدیکی توافق بین نتایج آزمون مستقل بدست آمده تحت شرایط همانندسازی شده است. دقت ، معمولاً به صورت عدم دقت بیان می شود و به صورت انحراف معیار از نتایج آزمون محاسبه می شود. دقت کمتر ، با انحراف معیار بزرگتر نشان داده می شود.

دو معیار دقت ، تکرار پذیری[1] و تجدید پذیری است.

تکرارپذیری (r): نزدیکی توافق بین نتایج آزمون مستقل با همان روش ، روی یک نمونه در همان آزمایشگاه بوسیلهٔ افراد و تجهیزات یکسان ، در فاصلهٔ زمانی کوتاه است.

تجدید پذیری (R) : نزدیکی توافق بین نتایج آزمون بدست آمده از یک نمونه با یک روش در آزمایشگاه های مختلف بوسیلهٔ افراد و تجهیزات مختلف است.

در میکروبیولوژی ، امکان تهیهٔ مواد آزمون واقعاً یکسان وجود ندارد. توزیع تصادفی میکروارگانیسم ها و دستیابی به حد مورد نظر برای تعیین تکرار پذیری و تجدید پذیری بحرانی است. پراکندگی زیاد در مواد آزمون، متغیر بودن نتایج آزمون را بیشتر می کند.

---

[1] -Repeatability

عوامل متعدد روی دقت اثر می گذارد ولی در این استاندارد فقط عواملی که به توزیع تصادفی میکروارگانیسم ها در نمونه مربوط می شود، بررسی می شود.
توزیع تصادفی میکروارگانیسم ها در نمونه باعث عدم دقت در نتایج می شود.این مشکل را می توان با کـاربرد روش تلقیح مناسب کاهش داد.
در روش MPN دقت ، با افزایش تعداد لوله های تلقیح شدهٔ چندتائی در هر سری حجم آزمایه افـزایش مـی یابد.
دقت نسبی به الگوی نتایج مثبت بدست آمده بستگی دارد.
در روش شمارش کلنی ، دقت به تعداد کل کلنی ها بستگی دارد و درنتیجه با افزایش تعداد پلیت ها و صافی های کشت داده شده ، افزایش می یابد. دقت همچنین با افزایش تعداد کلنی ها تا حداکثر حدود ۱۵۰ کلنـی (تیپیک) در هر پلیت برای روش شمارش و حدود ۱۰۰ کلنی (تیپیـک) در هـر پلیـت بـرای روش صـافی غشائی افزایش می یابد.

الف-۲-۴حد تشخیص

الف-۲-۴-۱ اصول

بر خلاف آزمون های شیمیائی که حد تشخیص به مقدار واقعی بستگی دارد، در میکروبیولوژی حد تشخیص، به روش آزمون بستگی دارد.
حد تشخیص در یک روش هم به صورت حجمی که در آن یک میکروارگانیسم می تواند شناسائی شود، و هم به صورت کمترین تعداد قابل تشخیص میکروارگانیسم ها درحجم معـین نمونـه (معمـولاً۱ml یـا۱۰۰ ml) در نظر گرفته می شود.
حد تشخیص به صورت تعداد ذرات x (در حجم مورد آزمون) که در آن احتمال p_0 نتـایج منفـی برابـر ۵٪ است تعیین می شود.

الف-۲-۴-۲ حد تشخیص در روش شمارش کلنی

حد تشخیص به رشد یک کلنی در آزمونه و درنتیجه به حجم نمونهٔ تلقیح شده بستگی دارد.
اگرچه محدودیت ایجاد شده بوسیلهٔ میکروارگانیسم های همراه در نمونـه کـه در همـان شـرایط آزمـون کـه میکروارگانیسم ها شمارش می شوند، قادر به رشد هستند نیز وجود دارد. برای مثال تشکیل حـداکثر حـدود ۱۰۰ کلنی روی صافی می تواند پذیرفته شود. در صورتی که تعداد میکروارگانیسم های همـراه بـیش از ۱۰۰ برابر بیشتر از تعداد کلنی های قابل جستجو باشد، حد تشخیص کـاهش مـی یابـد. در چنـین مـواردی و در موارد عدم وجود محیط کشت انتخابی مناسب ، کاربرد روش MPN ارجحیت دارد.
در عمل، حد تشخیص به صورت زیر می باشد :

الف- در روش صافی غشائی ، امکان صاف کردن حجم های زیاد نمونهٔ آب تمیز ، بدون مشکل وجود دارد بنابراین حد تشخیص ، یک میکروارگانیسم در حجم صاف شده تعیین می شود.

ب- در روش کشت آمیخته ، امکان تلقیح حداکثر ml ۵ نمونه وجود دارد.بنابراین حد تشخیص یک میکروارگانیسم در ml ۵ تعیین می شود. حد تشخیص با افزایش تعداد آزمونه مورد استفاده بیشتر می شود، ولی در عمل تلقیح بیش از ۵ پلیت عملی نیست و حد تشخیص یک میکروارگانیسم در ml ۲۵ تعیین می شود.

پ- در روش کشت سطحی ، حداکثر حجم نمونه که معمولاً استفاده می شود ml۲/. برای هر پلیت است و چون حداکثر ۵ پلیت تلقیح می شود ، بنابراین حد تشخیص ، یک میکروارگانیسم در هر میلی لیتر است. در مورد محیط های کشت دارای سطح خشک ، می توان از حجم های آزمونه ml ۰/۵ میلی لیتر برای هر پلیت استفاده کرد. بنابراین در صورت تلقیح به ۵ پلیت ، حد تشخیص برای یک میکروارگانیسم در ml ۲/۵ تعیین می شود.

الف-۲-۴-۳حد تشخیص در روش MPN

حد تشخیص در واقع به حجم نمونهٔ آزمون شده بستگی دارد.افزایش حجم کل آزمون شده باعث افزایش حد تشخیص می شود. در روش MPN با افزایش تعداد لوله ها در هر رقت یا افزایش حجم آزمایه برای هر لوله یا با تغلیظ نمونه بوسیلهٔ صافی غشائی ، می توان حد تشخیص را افزایش داد.

الف-۳ الزامات مربوط به ماهیت نمونه

الف-۳-۱ ماهیت میکروارگانیسم ها

علاوه بر ماهیت میکروارگانیسم های مورد جستجو ، رشد میکروارگانیسم های دیگر در همان محیط کشت نیز انتخاب روش را تحت تاثیر قرار می دهد.

برای مثال میکروارگانیسم های هوازی مطلق با استفاده از روش کشت سطحی یا صافی غشائی آزمون می شوند. برای میکروارگانیسم هایی که شرایط بی هوازی را ترجیح دهند و یا تحمل کنند ، استفاده از روش کشت آمیخته ارجحیت دارد. اگر شرایط بی هوازی بیشتری مورد نیاز باشد، ممکن است برای حذف اکسیژن و در نتیجه حذف میکروارگانیسم های هوازی مطلق ،از روش کشت عمقی در لوله استفاده شود.

برخی از میکروارگانیسم ها (مانند بسیاری از میکروارگانیسم های موجود در دریاچه ها و سایر آب های سطحی) قادر به تحمل شوک حرارتی ایجاد شده بوسیلهٔ محیط کشت ذوب شده در دمای ^{o}C (۱ ±۴۵) نیستند و نباید برای شمارش آن ها از روش کشت آمیخته استفاده کرد. اگرچه ، برای جداسازی میکروارگانیسم هائی که در درجهٔ حرارت بالاتر در چنین آب هائی زندگی می کنند و مقاومت حرارتی بیشتری دارند ،استفاده از روش کشت آمیخته دارای مزایای بیشتری است.

الف-۳-۲ ترکیبات آب

مواد معلق به ویژه در روش صافی غشائی، با مسدود کردن صافی ها و اختلال در عمل صاف کردن باعث محدود کردن حساسیت روش می شود. گاهی انسداد نسبی صافی ها مورد شک قرار نمی گیرد و می تواند با کاهش تبادل مواد مغذی، از تشکیل کلنی روی صافی پیشگیری کند. این انسداد ممکن است گاهی بوسیلهٔ موجودات زنده مانند میکروپلانکتون[1] یا حتی باکتری هائی که در روزنه های صافی تکثیر می یابند ، ایجاد شود.

گاهی در روش کشت آمیخته ، ذرات بزرگ ممکن است با کلنی اشتباه گرفته شوند.

برای آب های خیلی کدر ، کاربرد روش کشت سطحی حساسیت کافی را ندارد و ممکن است روش MPN تنها روش قابل استفاده باشد .

مواد محلول ممکن است با تغییر ترکیب محیط های کشت انتخابی یا به دلیل سمیت ، در رشد میکروارگانیسم ها اختلال ایجاد کند. این تداخل به ویژه در مواردی که حجم نمونه نسبت به حجم محیط کشت زیاد است ایجاد می شود (به بند ۱۰-۳-۲ مراجعه کنید).

گاهی برخی از مواد موجود در نمونه ،به دلیل واکنش با ترکیبات محیط کشت ،واکنش های خاص میکروارگانیسم مورد جستجو را بدون تداخل با رشد میکروارگانیسم ها از طریق تشکیل قند های قابل تخمیر که در محیط اصلی وجود ندارد و تغییر pH ناشی از تخمیر این قند ها ، تحت تاثیر قرارمی دهند. در این موارد کاربرد روش صافی غشائی به سایر روش ها ارجحیت دارد.

الف-۴ الزامات مالی

مقایسهٔ هزینهٔ روش های مختلف نسبتاً مشکل است و گاهی به شرایط منطقه ای بستگی دارد . اگرچه آگاهی از عوامل موثر بر هزینه ها ، انتخاب روش را تسهیل می کند.

[1] - Micro-plankton

پیوست ب

(اطلاعاتی)

جدول های MPN

جدول ب-۱ مقدار MPN در آزمونه با سطح اطمینان ٪ ۹۵ برای سری ۱۰ لوله ای

تعداد لوله های مثبت	سری ۱۰ لوله ای			
	MPN	عدم قطعیت استاندارد لگاریتم MPN	حدود ٪۹۵	
			حد پایینی	حد بالائی
۱	۰/۱۱	۰/۴۳۵	۰/۰۲	۰/۷۵
۲	۰/۲۲	۰/۳۰۸	۰/۰۶	۰/۸۹
۳	۰/۳۶	۰/۲۵۲	۰/۱۱	۱/۱۱
۴	۰/۵۱	۰/۲۲۰	۰/۱۹	۰/۳۸
۵	/۶۹	۰/۱۹۸	۰/۲۸	۱/۶۹
۶	۰/۹۲	۰/۱۸۴	۰/۴۰	۲/۱۰
۷	۱/۲۰	۰/۱۷۴	۰/۵۵	۲/۶۴
۸	۱/۶۱	۰/۱۷۱	۰/۷۵	۳/۴۸
۹	۲/۳۰	۰/۱۷۹	۱/۰۳	۵/۱۶

جدول ب-۲ مقدار MPN در آزمونه با سطح اطمینان ٪ ۹۵ برای سری ۱۵ لوله ای

تعداد لوله های مثبت	سری۱۵ لوله ای			
	MPN	عدم قطعیت استاندارد لگاریتم MPN	حدود ٪۹۵	
			حد پایینی	حد بالائی
۱	۰/۰۷	۰/۴۳۴	۰/۰۱	۰/۴۹
۲	۰/۱۴	۰/۳۰۷	۰/۰۴	۰/۵۷
۳	۰/۲۲	۰/۲۵۱	۰/۰۷	۰/۶۹
۴	۰/۳۱	۰/۲۱۸	۰/۱۲	۰/۸۳
۵	۰/۴۱	۰/۱۹۶	۰/۱۷	۰/۹۸
۶	۰/۵۱	۰/۱۷۹	۰/۲۳	۱/۱۵
۷	۰/۶۳	۰/۱۶۷	۰/۳۰	۱/۳۳
۸	۰/۷۶	۰/۱۵۷	۰/۳۷	۱/۵۵
۹	۰/۹۲	۰/۱۵۰	۰/۴۷	۱/۸۰
۱۰	۱/۱۰	۰/۱۴۴	۰/۵۷	۲/۱۱
۱۱	۱/۳۲	۰/۱۴۱	۰/۷۰	۲/۴۹
۱۲	۱/۶۱	۰/۱۳۹	۰/۸۶	۳/۰۲
۱۳	۲/۰۱	۰/۱۴۲	۱/۰۶	۳/۸۲
۱۴	۲/۷۱	۰/۱۵۵	۱/۳۵	۵/۴۵

جدول ب-۳ مقدار MPN در آزمونه با سطح اطمینان ٪ ۹۵ برای سری ۲۰ لوله ای

تعداد لوله های مثبت	سری ۲۰ لوله ای			
	MPN	عدم قطعیت استاندارد لگاریتم MPN	حدود ٪۹۵	
			حد پایینی	حد بالائی
۱	۰٫۰۵	۰٫۴۳۴	۰٫۰۱	۰٫۳۶
۲	۰٫۱۱	۰٫۳۰۷	۰٫۰۳	۰٫۴۲
۳	۰٫۱۶	۰٫۲۵۱	۰٫۰۵	۰٫۵۰
۴	۰٫۲۲	۰٫۲۱۸	۰٫۰۸	۰٫۶۰
۵	۰٫۲۹	۰٫۱۹۵	۰٫۱۲	۰٫۶۹
۶	۰٫۳۶	۰٫۱۷۸	۰٫۱۶	۰٫۸۰
۷	۰٫۴۳	۰٫۱۶۵	۰٫۲۰	۰٫۹۱
۸	۰٫۵۱	۰٫۱۵۵	۰٫۲۵	۱٫۰۳
۹	۰٫۵۹	۰٫۱۴۷	۰٫۳۱	۱٫۱۶
۱۰	۰٫۶۹	۰٫۱۴۰	.۳۷	۱٫۳۰
۱۱	۰٫۸۰	۰٫۱۳۴	۰٫۴۴	۱٫۴۶
۱۲	۰٫۹۲	۰٫۱۳۰	۰٫۵۱	۱٫۶۵
۱۳	۱٫۰۵	۰٫۱۲۶	۰٫۵۹	۱٫۸۵
۱۴	۱٫۲۰	۰٫۱۲۳	۰٫۶۹	۲٫۱۰
۱۵	۱٫۳۹	۰٫۱۲۱	۰٫۸۰	۲٫۴۰
۱۶	۱٫۶۱	۰٫۱۲۱	۰٫۹۳	۲٫۷۷
۱۷	۱٫۹۰	۰٫۱۲۲	۱٫۰۹	۳٫۲۹
۱۸	۲٫۳۰	۰٫۱۲۷	۱٫۳۰	۴٫۰۸
۱۹	۳٫۰۰	۰٫۱۴۱	۱٫۵۸	۵٫۶۷

جدول ب-۴ مقدار MPN در آزمونه با سطح اطمینان ٪ ۹۵ برای سری ۲۵ لوله ای

تعداد لوله های مثبت	سری۲۵ لوله ای			
	MPN	عدم قطعیت استاندارد لگاریتم MPN	حدود ٪۹۵	
			حد پایینی	حد بالائی
۱	۰٫۰۴	۰٫۴۳۴	۰٫۰۱	۰٫۲۹
۲	۰٫۰۸	۰٫۳۰۷	۰٫۰۲	۰٫۳۳
۳	۰٫۱۳	۰٫۲۵۱	۰٫۰۴	۰٫۴۰
۴	۰٫۱۷	۰٫۲۱۷	۰٫۰۷	۰٫۴۷
۵	۰٫۲۲	۰٫۱۹۵	۰٫۰۹	۰٫۵۴
۶	۰٫۲۷	۰٫۱۷۸	۰٫۱۲	۰٫۶۱
۷	۰٫۳۳	۰٫۱۶۵	۰٫۱۶	۰٫۶۹
۸	۰٫۳۹	۰٫۱۵۴	۰٫۱۹	۰٫۷۷
۹	۰٫۴۵	۰٫۱۴۶	۰٫۲۳	۰٫۸۶
۱۰	۰٫۵۱	۰٫۱۳۹	۰٫۲۷	۰٫۹۶
۱۱	۰٫۵۸	۰٫۱۳۳	۰٫۳۲	۱٫۰۶
۱۲	۰٫۶۵	۰٫۱۲۸	۰٫۳۷	۱٫۱۶
۱۳	۰٫۷۳	۰٫۱۲۳	۰٫۴۲	۱٫۲۸
۱۴	۰٫۸۲	۰٫۱۱۹	۰٫۴۸	۱٫۴۱
۱۵	۰٫۹۲	۰٫۱۱۶	۰٫۵۴	۱٫۵۵
۱۶	۱٫۰۲	۰٫۱۱۳	۰٫۶۱	۱٫۷۰
۱۷	۱٫۱۴	۰٫۱۱۱	۰٫۶۹	۱٫۸۸
۱۸	۱٫۲۷	۰٫۱۰۹	۰٫۷۸	۲٫۰۹
۱۹	۱٫۴۳	۰٫۱۰۸	۰٫۸۸	۲٫۳۳
۲۰	۱٫۶۱	۰٫۱۰۸	۰٫۹۹	۲٫۶۲
۲۱	۱٫۸۳	۰٫۱۰۹	۱٫۱۲	۲٫۹۹
۲۲	۲٫۱۲	۰٫۱۱۱	۱٫۲۹	۳٫۵۰
۲۳	۲٫۵۳	۰٫۱۱۷	۱٫۴۹	۴٫۲۸
۲۴	۳٫ ۲۲	۰٫۱۲۳	۰٫۷۷	۵٫۸۵

جدول ب-۵ مقدار MPN در ۱۰۰ml نمونه با سطح اطمینان ٪۹۵ برای سری ۹ لوله ای

(۳ لولهٔ ۱۰ ml، ۳ لولهٔ ۱ ml و ۳ لولهٔ ۰/۱ ml)

تعداد لوله های دارای واکنش مثبت			MPN (در ۱۰۰ ml)	حد اطمینان ٪۹۵	
۳لولهٔ ۱۰ ml	۳لولهٔ ۱ ml	۳لولهٔ ۰/۱ ml		حد پائینی	حد بالائی
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	۳۹	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

جدول ب-۶ مقدار MPN در ml ۱۰۰نمونه با سطح اطمینان ٪۹۵

(۵ لولهٔ ml ۱۰ ، ۵ لولهٔ ml ۱ و ۵ لولهٔ ml ۰/۱)

تعداد لوله های دارای واکنش مثبت			MPN (در ml ۱۰۰)	حد اطمینان ٪۹۵	
۵لولهٔ ml ۱۰	۵لولهٔ ml ۱	۵لولهٔ ml ۰/۱		حد پائینی	حد بالائی
۰	۰	۰	‹۲	‹۱	۷
۰	۱	۰	۲	‹۱	۷
۰	۲	۰	۴	‹۱	۱۱
۱	۰	۰	۲	‹۱	۷
۱	۰	۱	۴	‹۱	۱۱
۱	۱	۰	۴	‹۱	۱۱
۱	۱	۱	۶	‹۱	۱۵
۲	۰	۰	۵	‹۱	۱۳
۲	۰	۱	۷	۱	۱۷
۲	۱	۰	۷	۱	۱۷
۲	۱	۱	۹	۲	۲۱
۲	۲	۰	۹	۲	۲۱
۲	۳	۰	۱۲	۳	۲۸
۳	۰	۰	۸	۱	۱۹
۳	۰	۱	۱۱	۲	۲۵
۳	۱	۰	۱۱	۲	۲۵
۳	۱	۱	۱۴	۴	۳۴
۳	۲	۰	۱۴	۴	۳۴
۳	۲	۱	۱۷	۵	۴۶
۳	۳	۰	۱۷	۵	۴۶
۴	۰	۰	۱۳	۳	۳۱
۴	۰	۱	۱۷	۵	۴۶
۴	۱	۰	۱۷	۵	۴۶
۴	۱	۱	۲۱	۷	۶۳
۴	۱	۲	۲۶	۹	۷۸

ادامه جدول ب-۶

تعداد لوله های دارای واکنش مثبت			MPN (در ۱۰۰ ml)	حد اطمینان ٪۹۵	
۵لولهٔ ۱۰ ml	۵لولهٔ ۱ ml	۵لولهٔ ۰٫۱ ml		حد پائینی	حد بالائی
۴	۲	۰	۲۲	۷	۶۷
۴	۲	۱	۲۶	۹	۷۸
۴	۳	۰	۲۷	۹	۸۰
۴	۳	۱	۳۳	۱۱	۹۳
۴	۴	۰	۳۴	۱۲	۹۳
۵	۰	۰	۲۳	۷	۷۰
۵	۰	۱	۳۱	۱۱	۸۹
۵	۰	۲	۴۳	۱۵	۱۱۰
۵	۱	۰	۳۳	۱۱	۹۳
۵	۱	۱	۴۶	۱۶	۱۲۰
۵	۱	۲	۶۳	۲۱	۱۵۰
۵	۲	۰	۴۹	۱۷	۱۳۰
۵	۲	۱	۷۰	۲۳	۱۷۰
۵	۲	۲	۹۴	۲۸	۲۲۰
۵	۳	۰	۷۹	۲۵	۱۹۰
۵	۳	۱	۱۱۰	۳۱	۲۵۰
۵	۳	۲	۱۴۰	۳۷	۳۴۰
۵	۳	۳	۱۸۰	۴۴	۵۰۰
۵	۴	۰	۱۳۰	۳۵	۳۰۰
۵	۴	۱	۱۷۰	۴۳	۴۹۰

۵	۴	۲	۲۲۰	۵۷	۷۰۰
۵	۴	۳	۲۸۰	۹۰	۸۵۰
۵	۴	۴	۳۵۰	۱۲۰	۱۰۰۰
۵	۵	۰	۲۴۰	۶۸	۷۵۰
۵	۵	۱	۳۵۰	۱۲۰	۱۰۰۰
۵	۵	۲	۵۴۰	۱۸۰	۱۴۰۰
۵	۵	۳	۹۲۰	۳۰۰	۳۲۰۰
۵	۵	۴	۱۶۰۰	۶۴۰	۵۸۰۰
۵	۵	۵	>۱۸۰۰	—	—

جدول ب ـ۷ مقدار MPN در ۱۰۰ml نمونه با سطح اطمینان ٪۹۵

(۱ لولهٔ ۵۰ ml و ۵ لولهٔ ۱۰ ml)

تعداد لوله های دارای واکنش مثبت		MPN	حد اطمینان ٪۹۵	
۱ لولهٔ ۵۰ ml	۵ لولهٔ ۱۰ ml	(در ۱۰۰ ml)	حد پائینی	حد بالائی
۰	۰	‹۱		
۰	۱	۱	‹۱	۴
۰	۲	۲	‹۱	۶
۰	۳	۴	‹۱	۱۱
۰	۴	۵	۱	۱۳
۰	۵	۷	۲	۱۷
۱	۰	۲	‹۱	۶
۱	۱	۳	‹۱	۹
۱	۲	۶	۱	۱۵
۱	۳	۹	۲	۲۱
۱	۴	۱۶	۴	۴۰
۱	۵	›۱۸		

جدول ب-۸ مقدار MPN در ml ۱۰۰ نمونه با سطح اطمینان ٪۹۵
(۵ لولهٔ ml ۱۰۰ ، ۱ لولهٔ ml ۱۰ و ۱ لولهٔ ml ۱)

تعداد لوله های دارای واکنش مثبت			MPN (در ml ۱۰۰)	حد اطمینان ٪۹۵	
۵لولهٔ ml ۱۰۰	۱ لولهٔ ml۱۰	۱ لولهٔ ml ۱		حد پائینی	حد بالائی
۱ [a]			‹۱	‹۱	۱
۰	۱	۰	‹۱	‹۱	۱
۱	۰	۰	‹۱	‹۱	۱
۱	۱	۰	‹۱	‹۱	۲
۲ [a]			‹۱	‹۱	۲
۲	۰	۰	‹۱	‹۱	۲
۲	۱	۰	‹۱	‹۱	۲
۳[a]			‹۱	‹۱	۳
۳	۰	۰	‹۱	‹۱	۳
۳	۰	۱	۱	‹۱	۳
۳	۱	۰	۱	‹۱	۴
۴[a]			۲	‹۱	۵
۴	۰	۰	۲	‹۱	۵
۴	۰	۱	۲	‹۱	۶
۴	۱	۰	۲	‹۱	۶
۵	۰	۰	۴	۲	۳۶
۵	۰	۱	۱۰	۳	۵۴
۵	۱	۰	۲۰	۱۰	۳۸۰

a - این نتایج فقط در مواردی که یک سطح در ۵ لوله استفاده شود ، کاربرد دارد.

جدول ب-۹ مقدار MPN در ۱۰۰ ml نمونه با سطح اطمینان ٪۹۵

(۱ لولهٔ ۵۰ ml ، ۵ لولهٔ ۱۰ ml و ۵ لولهٔ ۱ ml)

تعداد لوله های دارای واکنش مثبت			MPN (در ۱۰۰ ml)	حد اطمینان ٪۹۵	
۱ لولهٔ ۵۰ ml	۵ لولهٔ ۱۰ ml	۵ لولهٔ ۱ ml		حد پائینی	حد بالائی
۰	۰	۰	<۱		
۰	۰	۱	۱	<۱	۴
۰	۰	۲	۲	<۱	۶
۰	۱	۰	۱	<۱	۴
۰	۱	۱	۲	<۱	۶
۰	۱	۲	۳	<۱	۸
۰	۲	۰	۲	<۱	۶
۰	۲	۱	۳	<۱	۸
۰	۲	۲	۴	<۱	۱۱
۰	۳	۰	۳	<۱	۸
۰	۳	۱	۵	<۱	۱۳
۰	۴	۰	۵	<۱	۱۳
۱	۰	۰	۱	<۱	۴
۱	۰	۱	۳	<۱	۸
۱	۰	۲	۴	<۱	۱۱
۱	۰	۳	۶	<۱	۱۵
۱	۱	۰	۳	<۱	۸
۱	۱	۱	۵	<۱	۱۳
۱	۱	۲	۷	۱	۱۷
۱	۱	۳	۹	۲	۲۱
۱	۲	۰	۵	<۱	۱۳
۱	۲	۱	۷	۱	۱۷
۱	۲	۲	۱۰	۳	۲۳
۱	۲	۳	۱۲	۳	۲۸
۱	۳	۰	۸	۲	۱۹

ادامه جدول ب ـ ۹

تعداد لوله های دارای واکنش مثبت			MPN (در ۱۰۰ ml)	حد اطمینان ٪۹۵	
۱لولهٔ ۵۰ ml	۵لولهٔ ۱۰ ml	۵لولهٔ ۱ ml		حد پائینی	حد بالائی
۱	۳	۱	۱۱	۳	۲۶
۱	۳	۲	۱۴	۴	۳۴
۱	۳	۳	۱۸	۵	۵۳
۱	۳	۴	۲۱	۶	۶۶
۱	۴	۰	۱۳	۴	۳۱
۱	۴	۱	۱۷	۵	۴۷
۱	۴	۲	۲۲	۷	۶۹
۱	۴	۳	۲۸	۹	۸۵
۱	۴	۴	۳۵	۱۲	۱۰۱
۱	۴	۵	۴۳	۱۵	۱۱۷
۱	۵	۰	۲۴	۸	۷۵
۱	۵	۱	۳۵	۱۲	۱۰۱
۱	۵	۲	۵۴	۱۸	۱۳۸
۱	۵	۳	۹۲	۲۷	۲۱۷
۱	۵	۴	۱۶۱	۳	۴۵۰
۱	۵	۵	›۱۸۰	—	—

ICS: 07.100.20

صفحه: ۴۶