

## کارگاه آموزشی جستجو و شمارش کلی فرم ها

"کار در آزمایشگاه"

عباسی

کارشناس بخش میکروبیولوژی

## کلی فرم ها

- کلی فرم ها عبارتند از باکتریهای میله ای شکل، گرم منفی، بدون هاگ (اسپور)، اکسیداز منفی، هوازی و بیهوازی اختیاری که قادرند لاکتوز را در ۲۴-۴۸ ساعت در دمای ۳۲-۳۷ درجه سلسیوس تخمیر و تولید گاز نمایند.
- کلی فرم ها در حضور نمکهای صفراوی، کریستال ویوله و بریلیانت گرین رشد می کنند.
- محیط مورد استفاده می تواند هر محیطی (مایع یا جامد) که حاوی لاکتوز است باشد.
- این گروه ممکن است شامل هر میکروارگانیسمی که با تعریف فوق تطابق داشته و حتی در گروه انتروباکتریاسه نباشد نیز گردد. بنابراین برای تشخیص باکتریهای کلی فرم به انجام آزمایش IMVIC ضروری است.
- از باکتریهای کلی فرم بعنوان شاخص بهداشتی (indicator) در بررسی کیفیت مواد غذایی استفاده می شود.

# کلی فرمهای مدفوعی

- استفاده از درجه حرارت بالا برای جدا کردن کلی فرم هایی که منشأ مدفوعی دارند از گونه هایی که منشأ مدفوعی ندارند کاربرد دارد.

- از جمله کلی فرمهای مهم

- E.coli

- Klebsiella

- Entero bacter

- Citro bacter

کلی فرم های مدفوعی قادرند در دمای ۴۵-۴۴ درجه سلسیوس قند لاکتوز را تخمیر کرده و تولید گاز نمایند در صورتی که کلی فرم های محیطی این توانایی را ندارند.





# روش های جستجو و شمارش کلی فرم ها

۱. شمارش استاندارد صفحه ای (Standard plate count) استاندارد ۹۲۶۳

که به دو شکل زیر انجام می شود:

✓ شمارش صفحه ای سطحی (Surface plate count)

✓ روش مخلوط کردن نمونه با محیط کشت (pour plate)

❖ باید به این نکته توجه داشت که زمان بین تهیه اولین رقت و آخرین پلیتی که کشت داده می

شود نباید از ۲۰ دقیقه (ترجیحا ۱۰ دقیقه) بیشتر باشد.



# روش های جستجو و شمارش کلی فرم ها

۲. شمارش بیشترین تعداد احتمالی MPN استاندارد ۱۱۱۶۶

- اصول روش مبتنی بر احتمالات است
- این روش مخصوصا در مواد غذایی بکار می رود که احتمال وجود تعداد کمی میکروارگانیسم (کمتر از ۱۰ عدد در هر گرم) در آن تخمین زده می شود.
- این روش به دو صورت ۳ سری ۳ لوله ای یا ۳ سری ۵ لوله ای انجام می شود.
- تفسیر نتایج این روش با استفاده از جداول MPN صورت میگیرد.

جدول الف - ۱. MPN برای ۳×۱ گرم (میلی لیتر)، ۳×۰/۱ گرم (میلی لیتر) و ۳×۰/۰۱ گرم (میلی لیتر)

تعداد نتایج مثبت			MPN	رده مورد قبول هنگامی که تعداد آزمون برابر باشد با					حدود اطمینان			
				۱	۲	۳	۵	۱۰	۹۵٪		۹۹٪	
									حد پایین	حد بالا	حد پایین	حد بالا
۰	۰	۰	<۰/۳۰						۰/۰۰	۰/۹۴	۰/۰۰	۱/۴۰
۰	۰	۰	۰/۳۰	۳	۲	۲	۲	۱	۰/۰۱	۰/۹۵	۰/۰۰	۱/۴۰
۰	۱	۰	۰/۳۰	۲	۱	۱	۱	۱	۰/۰۱	۱/۰۰	۰/۰۰	۱/۶۰
۰	۱	۱	۰/۶۱	۰	۳	۳	۳	۳	۰/۱۲	۱/۷۰	۰/۰۵	۲/۵۰
۰	۲	۰	۰/۶۲	۳	۲	۲	۲	۱	۰/۱۲	۱/۷۰	۰/۰۵	۲/۵۰
۰	۳	۰	۰/۹۴	۰	۰	۰	۰	۳	۰/۳۵	۳/۵۰	۰/۱۸	۴/۶۰
۱	۰	۰	۰/۳۶	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۰۲	۱/۷۰	۰/۰۱	۲/۵۰
۱	۰	۱	۰/۷۲	۲	۲	۱	۱	۱	۰/۱۲	۱/۷۰	۰/۵۰	۲/۵۰
۱	۰	۲	۱/۱	۰	۰	۰	۳	۳	۰/۰۴	۳/۵۰	۰/۰۲	۴/۶۰
۱	۱	۰	۰/۷۴	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۱۳	۲/۰۰	۰/۰۶	۲/۷۰
۱	۱	۱	۱/۱	۳	۳	۲	۲	۲	۰/۰۴	۳/۵۰	۰/۰۲	۴/۶۰
۱	۲	۰	۱/۱	۲	۲	۱	۱	۱	۰/۰۴	۳/۵۰	۰/۰۲	۴/۶۰
۱	۲	۱	۱/۵	۳	۳	۳	۳	۲	۰/۰۵	۳/۸	۰/۰۲	۵/۲
۱	۳	۰	۱/۶	۳	۳	۳	۳	۲	۰/۰۵	۳/۸	۰/۰۲	۵/۲
۲	۰	۰	۰/۹۲	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۱۵	۳/۵۰	۰/۰۷	۴/۶۰
۲	۰	۱	۱/۴	۲	۱	۱	۱	۱	۰/۰۴	۳/۵۰	۰/۰۲	۴/۶۰
۲	۰	۲	۲/۰	۰	۳	۳	۳	۳	۰/۰۵	۳/۸	۰/۰۲	۵/۲
۲	۱	۰	۱/۵	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۰۴	۳/۸	۰/۰۲	۵/۲
۲	۱	۱	۲/۰	۲	۲	۱	۱	۱	۰/۰۵	۳/۸	۰/۰۲	۵/۲
۲	۱	۱	۲/۰	۲	۲	۱	۱	۱	۰/۰۵	۳/۸	۰/۰۲	۵/۲



**MPN calculation program, version 5**, dated 2017-01-09, for calculating most probable numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values.

[Calculate Results](#)

More information can be found in the following sheets 'Equations & Info' and 'Examples'. For details see: B. Jarvis, C. Wilrich and P.-T. Wilrich, Journal of Applied Microbiology **109**, 2010, 1660-1667.

[Print Tables color](#)

This Excel program is distributed in the hope that it will be useful, but without any warranty. It can be downloaded at: [www.wiwiss.fu-berlin.de/fachbereich/wvl/iso/ehemalige/wilrich/index.html](http://www.wiwiss.fu-berlin.de/fachbereich/wvl/iso/ehemalige/wilrich/index.html).

[Print Tables b/w](#)

### General data and data for generating the input tables

Name of experiment	Date of experiment	No. of test series	Max. no. of dilutions
pak	2021-03-14	1	3

### How to use this program (Macros have to be enabled):

- Enter the no. of test series (up to 30) and the max. no. of dilutions (up to 30) per test series into the yellow table.
  - The tables for your input data will be generated automatically below.
- Enter your data into the yellow cells of the input tables generated according to step 1.
- Press 'Ctrl+m' to start the calculation or use the button 'Calculate Results'.
  - The results will be shown below in a green table (with two significant decimals in columns 8 to 12).
- You can change the no. of test series or dilutions in row 7 at any time (and preserve data you entered before).
- You can also change the data in the input tables at any time.
  - Changes of the input data cause the results table to be deleted but you can re-calculate as per step 3 at any time.
- You can print the tables (with a dynamically adjusted print area) using the buttons 'Print Tables'.

**Note:** A test series / matrix consists of the different dilutions for one target organism / test medium.

**Note:** The dilution factor  $d$  is the dilution ratio used for inoculating the tubes of that row, i.e. 1.0 (undiluted), 0.1 (diluted 1 in 10), etc. The volume  $w$  is the volume of the dilution added to each tube in that row.

### Input data

Test series 1 / Matrix 1 - Designation:			
Target organism / Test medium:			
Dilution factor $d$	Volume in ml or g $w$	No. of tubes $n$	No. of positive tubes $x$
1.0	1.0	3	2
0.1	1.0	3	1
0.01	1.0	3	1

### Results of the MPN calculations

No.	Test series / Matrix Designation	MPN	$\log_{10}$ MPN	SD		95% confidence limits		Rarity Index	Category
				$\log_{10}$ MPN	Lower	Upper			
1		2.0	0.31	0.23	0.69	6.0	0.019	2	

<https://standards.iso.org/iso/7218/>



# روش های جستجو و شمارش کلی فرم ها

## ۳. جستجوی کلی فرم ها در مواد غذایی استاندارد ۱۱۶۶

- این روش با استفاده از محیط کشت مایع و در لوله انجام می شود.
- در مواد غذایی مایع هم نمونه مستقیم و هم اولین رقت را می توان مورد آزمون قرار داد.
- در مواد غذایی جامد اولین رقت مورد آزمون قرار می گیرد.
- از محیط کشت دو بل و ساده در این روش می توان استفاده کرد.
- این روش شامل دو مرحله تلقیح در محیط کشت غنی کننده انتخابی و کشت تاییدی می باشد.





# روش های جستجو و شمارش کلی فرم ها

۴. جستجو با استفاده از فیلتر غشایی استاندارد ۱-۳۷۶۰

- در این روش از فیلتر غشایی ۰.۴۵ میکرون استفاده می شود.
- این روش برای جستجوی کلی فرم ها در آب آشامیدنی یا عرقیات گیاهی مورد استفاده قرار می گیرد.
- این روش نیاز به تجهیزاتی نظیر ست فیلتراسیون مایعات، پمپ خلاء، فیلتر میکروبی ۰.۴۵ میکرون دارد.













# نکات مهم قبل از شروع آزمون

- ضابطه کشوری ویژگی های میکروبیولوژی M5
- کنترل محیط PH محیط کشت ها و تهیه آنها طبق دستور شرکت سازنده
- استفاده از محیط کشت معتبر و دارای گواهی تایید و تضمین کیفیت
- استفاده از محیط کشت با تاریخ انقضاء معتبر
- در صورت نیاز به ساپلمنت در دستور تهیه محیط کشت از ساپلمنت مربوطه تهیه و به محیط افزوده شود.
- استفاده مستمر از اندیکاتورهای بیوشیمیایی و بیولوژیک بخار و خشک



# نکات مهم قبل از شروع آزمون

- انجام کالیبراسیون میانی مستمر انکوباتورها
- نظافت مستمر فضای داخلی انکوباتورها
- پایش مستمر سطوح و هوای اتاق کشت بخش میکروبیولوژی و ضد عفونی با مواد گند زدای مثر ثمر
- انجام آزمونها طبق آخرین ویرایش استاندارد ملی ایران



پیوست الف

(اطلاعاتی)

خصوصیات برخی از ضدعفونی کننده‌ها

جدول الف ۱ - خصوصیات برخی از ضدعفونی کننده‌ها

سمیت			غیر فعال شده با استفاده از					موثر در برابر					ضد عفونی کننده‌ها		
ریه	چشم	پوست	پاک کننده	آب سخت	مواد مصنوعی	مواد طبیعی	پروتئین	ویروس‌های غیر لیپیدی	ویروس‌های لیپیدی	اسپورها	مایکوباکتری‌ها	باکتری‌ها		قارچ‌ها	
												گرم مثبت			گرم منفی
+	+	+	C	+	+	+	+++	+	+	++	++	+++	+++	+	هیپو کلریت
	+		-	+	+	+	+	V	+	-	+++	+++	+++	-	الکل‌ها
+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+++ <sup>a</sup>	+++	+++	+++	+++	فرمالدئید
++	++	++	NA	+	+	+	NA	+	+	+++ <sup>b</sup>	+++	+++	+++	+++	گلو تار آل‌دئید
-	+	+	A	+	+	+	+++	+	+	+	+++	+++	+++	+++	یدوفورها

+++ خوب  
 ++ نسبتاً خوب  
 + ضعیف  
 - منفی  
 V به نوع ویروس بستگی دارد  
 C کاتیونی  
 A آنیونی  
 NA کاربرد ندارد  
 a بیش از ۴۰°C  
 b بیش از ۲۰°C  
 پیوست ث - کتابنامه



شرح عملی انجام آزمون جستجو و شمارش کلی فرم ها



**شمارش استاندارد صفحه ای (Standard plate count)**  
**۱. شمارش صفحه ای سطحی (Surface plate count)**

**محیط کشت های مورد نیاز**

- ✓ رقیق کننده: رینگر یا پتون نمکی (MRD) یا پتون واتر بافری
- ✓ محیط کشت انتخابی: محیط کشت ویولت رد بایل آگار (VRBA) یا مکانکی آگار (MC/A)

**طرز تهیه محیط کشت ها**

رینگر

- ✓ که بصورت قرص های برای حجم ۵۰۰ سی سی موجود است.
- ✓ استریلیزاسیون



## ۱. شمارش صفحه ای سطحی (Surface plate count)

### پپتون نمکی (MRD)

✓ تهیه طبق دستورالعمل روی بطری شرکت سازنده محیط کشت

✓ استریلیزاسیون

### پپتون واتر بافری

✓ تهیه طبق دستورالعمل روی بطری شرکت سازنده محیط کشت

✓ استریلیزاسیون

### محیط کشت ویولت رد بایل آگار (VRBA)

✓ تهیه با تجهیزات و مواد استریل

✓ عدم نیاز به استریلیزاسیون



## ۱. شمارش صفحه ای سطحی (Surface plate count)

### محیط کشت مکانکی آگار (MC/A)

- ✓ تهیه طبق دستورالعمل روی بطری شرکت سازنده محیط کشت
- ✓ استریلیزاسیون

### روش کار

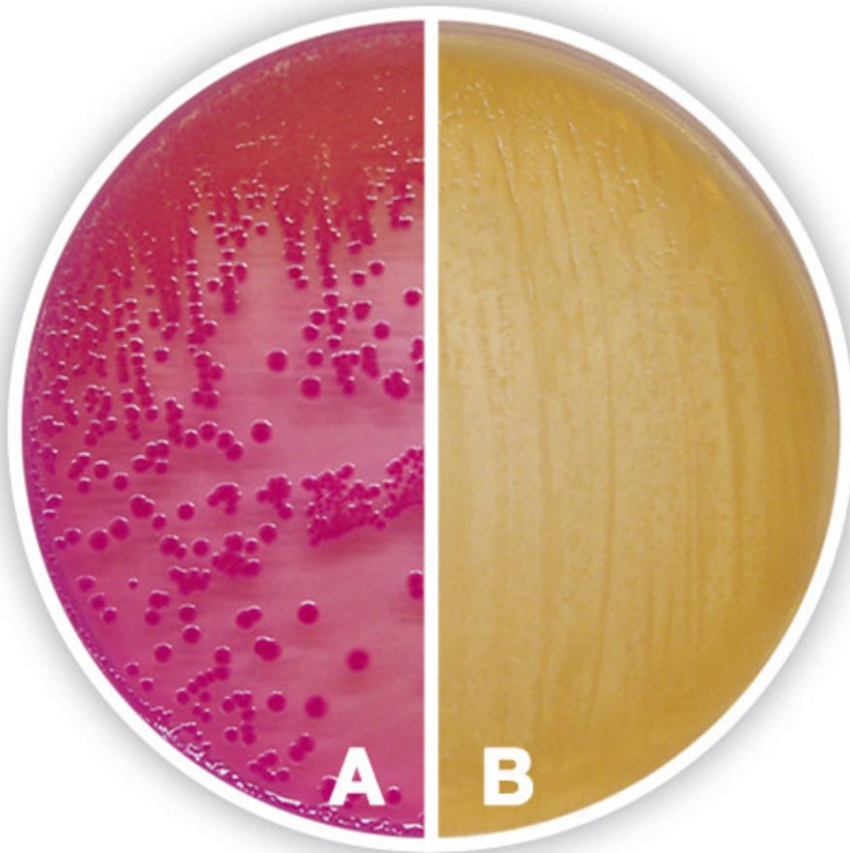
- یکنواخت کردن نمونه
- رقت سازی
- کشت بر روی محیط کشت انتخابی مورد نظر
- انکوباسیون
- تفسیر نتایج

# تفسیر نتایج

## مکانکی آگار (MC/A)

کلنی های لاکتوز منفی: بیرنگ

کلنی های لاکتوز مثبت: قرمز تیره تا ارغوانی  
و توسط هاله کدری ناشی از رسوب اسید  
های صفراوی که باعث پایین آمدن  
PH اتفاق می افتد احاطه شده اند.



## تفسیر نتایج

### ویولت رد بایل آگار (VRBA)

کلنی هایی با اندازه بیشتر از

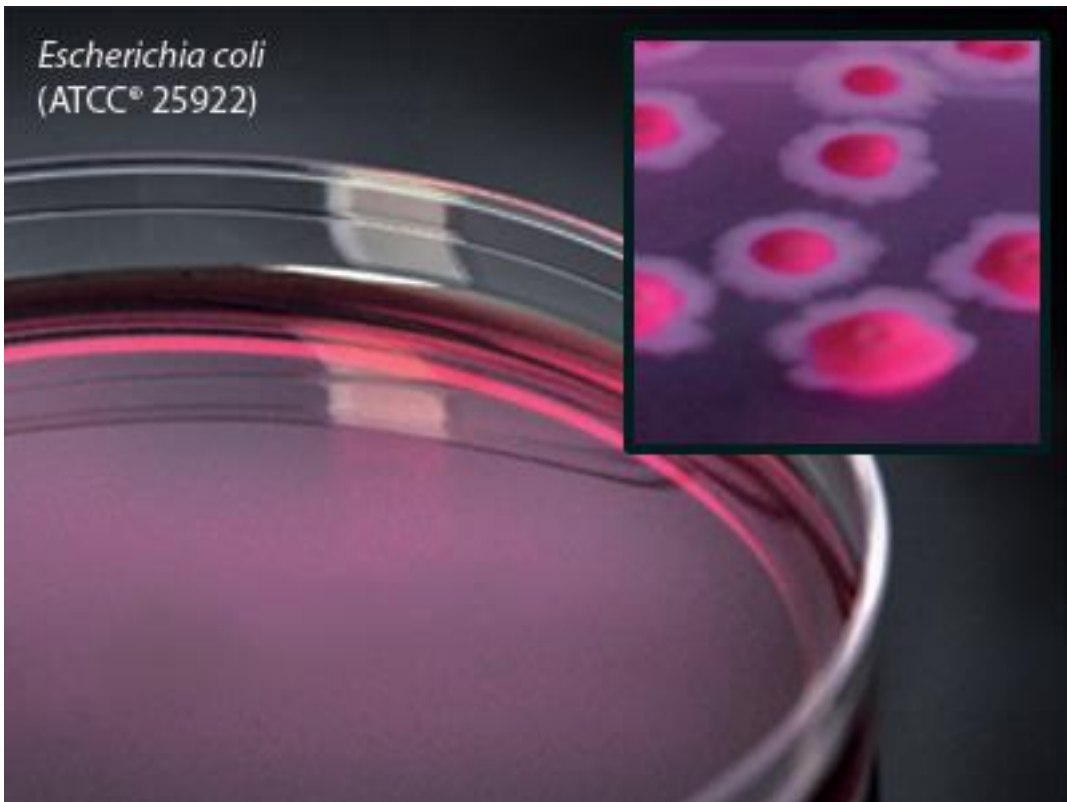
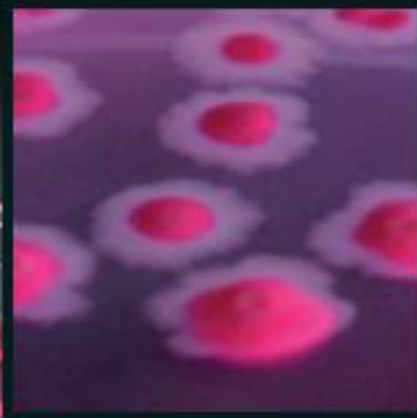
۰.۵ میکرون با رنگ قرمز

تیره تا ارغوانی که با املاح

صفراوی احاطه شدند کلنی های

کلی فرم هستند.

*Escherichia coli*  
(ATCC® 25922)





**شمارش استاندارد صفحه ای (Standard plate count)**

## ۲. روش مخلوط کردن نمونه با محیط کشت (pour plate)

محیط کشت ها و طرز تهیه آنها مطابق روش شمارش صفحه ای سطحی می باشد.

### روش کار

- یکنواخت کردن نمونه
- رقت سازی
- کشت بر روی محیط کشت انتخابی مورد نظر
- انکوباسیون
- تفسیر نتایج. (تفسیر نتایج مشابه روش شمارش صفحه ای سطحی می باشد.)



## شمارش بیشترین تعداد احتمالی MPN

### محیط کشت های مورد نیاز

- ✓ رقیق کننده: رینگر یا پپتون نمکی (MRD) یا پپتون واتر بافری
- ✓ محیط کشت انتخابی: محیط لوریل سولفات براث
- ✓ محیط کشت تاییدی: بریلیانت گرین (BGBL)

### طرز تهیه محیط کشت ها

- محیط کشت لوریل سولفات براث ساده
- ✓ تهیه طبق دستورالعمل روی بطری شرکت سازنده محیط کشت
- ✓ توزیع در لوله های آزمایش در حجم ۱۰ سی سی
- ✓ افزودن لوله درهام
- ✓ استریلیزاسیون



## شمارش بیشترین تعداد احتمالی MPN

### محیط کشت لوریل سولفات برات با غلظت مضاعف

- ✓ تهیه بصورت دو برابر وزن توصیه شده بر روی بطری محیط کشت
- ✓ توزیع در لوله های آزمایش در حجم ۱۰ سی سی
- ✓ افزودن لوله درهام
- ✓ استریلیزاسیون



## شمارش بیشترین تعداد احتمالی MPN

### روش کار

- یکنواخت کردن نمونه
- تلقیح بر روی محیط کشت غنی کننده انتخابی
- انکوباسیون
- تست تاییدی
- انکوباسیون
- تفسیر نتایج با جدول MPN

## تفسیر نتایج



لوریل سولفات برات



بریلیانت گرین

جدول الف - ۱. MPN برای ۳×۱ گرم (میلی لیتر) ۳۰×۱/۱ گرم (میلی لیتر) و ۳۰×۱/۰۱ گرم (میلی لیتر)

تعداد نتایج مثبت			MPN	رده مورد قبول هنگامی که تعداد آزمون برابر باشد با <sup>۱</sup>					حدود اطمینان			
									۹۵٪		۹۹٪	
				۱	۲	۳	۵	۱۰	حد پایین	حد بالا	حد پایین	حد بالا
۰	۰	۰	<۰/۳۰						۰/۱۰۰	۰/۹۴	۰/۱۰۰	۱/۴۰
۰	۰	۰	۰/۳۰	۳	۲	۲	۲	۱	۰/۱۰۱	۰/۹۵	۰/۱۰۰	۱/۴۰
۰	۱	۰	۰/۳۰	۲	۱	۱	۱	۱	۰/۱۰۱	۱/۰۰	۰/۱۰۰	۱/۶۰
۰	۱	۱	۰/۶۱	۰	۳	۳	۳	۳	۰/۱۲	۱/۷۰	۰/۱۰۵	۲/۵۰
۰	۲	۰	۰/۶۲	۳	۲	۲	۲	۱	۰/۱۲	۱/۷۰	۰/۱۰۵	۲/۵۰
۰	۳	۰	۰/۹۴	۰	۰	۰	۰	۳	۰/۳۵	۳/۵۰	۰/۱۸	۴/۶۰
۱	۰	۰	۰/۳۶	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۱۰۲	۱/۷۰	۰/۱۰۱	۲/۵۰
۱	۰	۱	۰/۷۲	۲	۲	۱	۱	۱	۰/۱۲	۱/۷۰	۰/۵۰	۲/۵۰
۱	۰	۲	۱/۱	۰	۰	۰	۳	۳	۰/۴	۳/۵	۰/۲	۴/۶
۱	۱	۰	۰/۷۴	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۱۳	۲/۰۰	۰/۱۰۶	۲/۷۰
۱	۱	۱	۱/۱	۳	۳	۲	۲	۲	۰/۴	۳/۵	۰/۲	۴/۶
۱	۲	۰	۱/۱	۲	۲	۱	۱	۱	۰/۴	۳/۵	۰/۲	۴/۶
۱	۲	۱	۱/۵	۳	۳	۳	۳	۲	۰/۵	۳/۸	۰/۲	۵/۲
۱	۳	۰	۱/۶	۳	۳	۳	۳	۲	۰/۵	۳/۸	۰/۲	۵/۲
۲	۰	۰	۰/۹۲	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۱۵	۳/۵۰	۰/۱۰۷	۴/۶۰
۲	۰	۱	۱/۴	۲	۱	۱	۱	۱	۰/۴	۳/۵	۰/۲	۴/۶
۲	۰	۲	۲/۰	۰	۳	۳	۳	۳	۰/۵	۳/۸	۰/۲	۵/۲
۲	۱	۰	۱/۵	۱	۱	۱	۱	۱	۰/۴	۳/۸	۰/۲	۵/۲
۲	۱	۱	۲/۰	۲	۲	۱	۱	۱	۰/۵	۳/۸	۰/۲	۵/۲
۲	۱	۱	۲/۰	۲	۲	۱	۱	۱	۰/۵	۳/۸	۰/۲	۵/۲

جدول استاندارد: بیشترین تعداد احتمالی (MPN) در هر گرم از نمونه و با ۹۵ درصد حدود اطمینان

روش ۳ لوله ای با مقادیر ۰/۱ و ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ گرم نمونه

تعداد لوله های مثبت

MPN

حدود MPN

لوله های جای			در هر گرم	پایین ترین	بالا ترین
۰/۱	۰/۰۱	۰/۰۰۱			
۰	۰	۰	۳		۹
۰	۰	۱	۳	۰/۵	۱۳
۰	۱	۰	۳	۰/۵	۲۰
۱	۰	۰	۴	۰/۵	۲۱
۱	۰	۱	۷	۱	۲۲
۱	۱	۰	۷	۱	۲۶
۱	۱	۱	۱۱	۳	۲۶
۱	۲	۰	۱۱	۳	۳۶
۲	۰	۰	۹	۱	۳۷
۲	۰	۱	۱۴	۳	۴۴
۲	۱	۰	۱۵	۳	۸۹
۲	۱	۱	۲۰	۷	۴۷
۲	۲	۰	۲۱	۴	۱۵۰
۲	۲	۱	۲۸	۱۰	۱۲۰
۲	۰	۰	۲۳	۴	۱۳۰
۲	۰	۱	۳۹	۷	۳۸۰
۲	۰	۲	۶۴	۱۵	۲۱۰
۲	۱	۰	۴۳	۷	۲۳۰
۲	۱	۱	۷۵	۱۴	۳۸۰
۲	۲	۰	۱۲۰	۳۰	۳۸۰
۲	۲	۱	۹۳	۱۵	۴۴۰
۲	۲	۲	۱۵۰	۳۰	۴۷۰
۲	۳	۰	۲۱۰	۳۵	۱۳۰۰
۲	۳	۱	۲۴۰	۳۶	۲۴۰۰
۲	۳	۲	۴۶۰	۷۱	۴۸۰۰
۳	۳	۳	۱۱۰۰	۱۵۰	
			۲۴۰۰		



## جستجوی کلی فرم ها در مواد غذایی

❖ محیط کشت های مورد نیاز و طرز تهیه آنها مطابق روش شمارش کلی فرم ها به روش MPN می باشد.

### روش کار

- یکنواخت کردن نمونه
- تلقیح بر روی محیط کشت غنی کننده انتخابی
- انکوباسیون
- تست تاییدی
- انکوباسیون
- تفسیر نتایج با جدول MPN



## جستجو با استفاده از فیلتر غشایی

### محیط کشت های مورد نیاز

✓ محیط کشت انتخابی: محیط کشت ویولت رد بایل آگار (VRBA) یا مکانکی آگار (MC/A) یا کروموژنیک کلی فرم آگار (CCA)

### طرز تهیه محیط کشت ها

#### محیط کشت ویولت رد بایل آگار (VRBA)

✓ تهیه با تجهیزات و مواد استریل

✓ عدم نیاز به استریلیزاسیون

#### محیط کشت مکانکی آگار (MC/A)

✓ تهیه طبق دستورالعمل روی بطری شرکت سازنده محیط کشت

✓ استریلیزاسیون



## جستجو با استفاده از فیلتر غشایی

### محیط کشت کروموژنیک کلی فرم آگار (CCA)

- ✓ تهیه طبق دستورالعمل روی بطری شرکت سازنده محیط کشت
- ✓ عدم استریلیزاسیون

### روش کار

- یکنواخت کردن نمونه
- عبور از فیلتر میکروبی ۰.۴۵ میکرون
- گذاشتن فیلتر بر روی محیط کشت
- انکوباسیون
- تفسیر نتایج